

DANUTA SOLECKA 

e-mail: d.solecka@uw.edu.pl

Zakład Ekofizjologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin,
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, Polska

Department of Plant Molecular Ecophysiology, Institute of Plant Experimental Biology and Biotechnology,
Faculty of Biology, University of Warsaw, Miecznikowa 1, 02-096 Warsaw, Poland

Kultury roślinne *in vitro* – od produkcji leków do ochrony bioróżnorodności

Plant cultures *in vitro* – from medicine production to biodiversity conservation

DOI: <https://doi.org/10.12775/KOSMOS.2025.016>

Abstrakt

Roślinne kultury *in vitro* stają się coraz ważniejszym narzędziem w ochronie bioróżnorodności i w zrównoważonym rozwoju. Umożliwiają one nie tylko pozyskiwanie cennych substancji bez niszczenia roślin w ich środowisku naturalnym i niezależnie od warunków klimatycznych, ale także rozmnażanie zagrożonych gatunków i ich reintrodukcję. W artykule przedstawiono przegląd zastosowań różnych typów kultur *in vitro* w medycynie (produkcja leków, białek terapeutycznych), rolnictwie (biostymulanty, mikrorozmnażanie), przemyśle spożywczym (barwniki, enzymy) i nowoczesnych technologiach (nanomateriały). Szczególną uwagę poświęcono wykorzystaniu kultur *in vitro* w ochronie gatunków zagrożonych, dzikich i uprawnych. Artykuł podkreśla znaczenie zintegrowanego podejścia łączącego wiedzę z zakresu biotechnologii, chemii i ochrony środowiska. Mimo trudności w otrzymywaniu wydajnych i długożyjących kultur, zwłaszcza roślin jednoliściennych, technologie *in vitro* stanowią dziś nie tylko wsparcie dla przemysłu, ale też realną szansę na zachowanie zasobów przyrody dla przyszłych pokoleń.

Słowa kluczowe: bioróżnorodność, kalus, kultury *in vitro*, mikrorozmnażanie, rośliny, zarodki somatyczne

Abstract

In vitro plant cultures are becoming an increasingly important tool in biodiversity conservation and sustainable development. They not only enable the extraction of valuable substances without destroying plants in their natural environment and regardless of climatic conditions, but also the propagation of endangered species and their reintroduction. The article presents an overview of the applications of various types of *in vitro* cultures in medicine (production of drugs, therapeutic proteins), agriculture (biostimulants, micropropagation), the food industry (colorants, enzymes), and modern technologies (nanomaterials). Particular attention is paid to the use of *in vitro* cultures in the protection of endangered, wild and cultivated species. The article emphasizes the importance of an integrated approach combining knowledge in the fields of biotechnology, chemistry, and environmental protection. Despite the difficulties in obtaining efficient and long-lived cultures, especially of monocotyledonous plants, *in vitro* technologies today not only support industry, but also offer a real opportunity to preserve natural resources for future generations.

Key words: biodiversity, callus, *in vitro* cultures, micropropagation, plants, somatic embryos

WPROWADZENIE

Rośliny od tysięcy lat stanowiły podstawowe źródło leków, barwników, środków konserwujących i substancji zapachowych. Ich metabolity wtórne mają różnorodne działanie biologiczne, w tym właściwości przeciwutleniające, cytotoksyczne, przeciwwirusowe, przeciwzapalne i antybakteryjne (Hasnain i in., 2022). Współczesna farmakologia, kosmetologia i przemysł spożywczy nadal intensywnie korzystają z bogactwa związków naturalnych pochodzenia roślinnego. Jednak coraz częściej ich pozyskiwanie metodami tradycyjnymi napotyka poważne ograniczenia. Postępujące zmiany klimatyczne, coraz bardziej intensywne rolnictwo, rozwój miast i zanieczyszczenia oraz nadmierna eksploatacja surowców roślinnych doprowadziły do dramatycznego wzrostu liczby gatunków zagrożonych wyginięciem (Walters i Pence, 2021). Zwłaszcza rośliny lecznicze i aromatyczne, często rosnące w wyspecjalizowanych siedliskach i pozyskiwane z dzikich populacji, są szczególnie narażone na nadmierny zbiór i presję rynkową (Kougioumoutzis i in., 2024). Zagroza to bioróżnorodności, definiowanej jako zróżnicowanie życia na wszystkich poziomach organizacji biologicznej, od genów po całe ekosystemy, co jest fundamentem stabilności przyrody oraz przetrwania człowieka (Corlett, 2016; Corlett 2024). W Polsce, podobnie jak w wielu krajach europejskich, obserwuje się zanik lokal-

nych populacji roślin dzikich i endemicznych. Część z nich figuruje już na czerwonych listach gatunków zagrożonych, zarówno krajowych, jak i międzynarodowych (Perzanowska i Korzeniak, 2020). Problemy te nie ograniczają się do ekosystemów naturalnych – dotyczą również zasobów rolniczych, leczniczych i ozdobnych, które mają ogromne znaczenie gospodarcze i kulturowe.

W odpowiedzi na rosnące zagrożenia, rozwijane są różne strategie ochrony bioróżnorodności, w tym działania *in situ* (ochrona gatunków w ich naturalnym środowisku) oraz *ex situ* (poza miejscem naturalnego występowania). Jedną z najbardziej obiecujących i dynamicznie rozwijających się metod ochrony *ex situ* są kultury *in vitro*, czyli techniki hodowli komórek, tkanek i organów roślinnych w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych (Bonga i in., 2010; Loyola-Vargas i Ochoa-Alejo, 2024). Pozwalają na uzyskanie roślin lub ich metabolitów niezależnie od sezonu, klimatu czy lokalizacji geograficznej (Miroshnichenko i in., 2017). Dzięki możliwościom sterowania warunkami środowiskowymi i zastosowania stymulatorów, możliwe jest zwiększenie wydajności biosyntezy cennych farmaceutyków, nutraceutyków, enzymów czy bioaktywnych składników kosmetycznych (Babich i in., 2020), bez niszczenia roślin w ich naturalnych środowiskach. Technologie *in vitro* umożliwiają także skalowanie produkcji – od kultur w kolbach laboratoryjnych, po bioreaktory prze-

mysłowe, co jest już stosowane komercyjnie w wielu branżach: od medycyny i rolnictwa po kosmologię i produkcję nanomateriałów (Krsteva i in., 2020; Wang i in., 2022).

Zastosowanie kultur *in vitro* do ochrony obejmuje obecnie szeroki zakres działań: od rozmnażania gatunków zagrożonych wyginięciem, przez tworzenie banków genów i syntetycznych nasion, po wykorzystanie krioprezervacji w zachowaniu unikatowych odmian roślin (Custódio i in., 2022, Radomir i in., 2023; Tripathi i in., 2021; Walters i Pence, 2021). Stanowią więc nie tylko źródło wartościowych metabolitów, ale i ważny element globalnej strategii ochrony bioróżnorodności. Szczególną wartość mają te technologie w krajach o wysokim udziale endemitów, gdzie rozwijane są narodowe banki kriogeniczne i programy mikrorozmnażania roślin użytkowych i dzikich (Agrawal i in., 2022; Mikula i in., 2022).

Celem niniejszego artykułu jest przegląd aktualnych zastosowań kultur *in vitro* dla ochrony środowiska i zachowania bioróżnorodności. Wykorzystanie technologii *in vitro* w ochronie roślin, zarówno dzikich, jak i użytkowych, (w tym leczniczych, rolniczych i ozdobnych) to nie tylko namnażanie roślin i ich reintrodukcja czy przechowywanie genotypów. Techniki *in vitro* także dają unikatową możliwość zachowania roślin w naturalnym środowisku, zastępując ich zbieranie – produkcją roślinnych związków aktywnych w bioreaktorach. Dlatego warto używać tej technologii jako narzędzia wspierającego ochronę bogactwa przyrody w ujęciu lokalnym i globalnym.

TYPY KULTUR *IN VITRO* I METODY ICH TWORZENIA

Techniki kultur *in vitro* umożliwiają prowadzenie różnych hodowli komórek, tkanek i organów roślinnych w warunkach sterylnych i ściśle kontrolowanych; przykłady niektórych form kultur pokazano w Tabeli 1. W zależności od wieku i rodzaju materiału wyjściowego (eksplantatu), celu hodowli i zastosowanych warunków środowiskowych, m.in. składników pożywek czy fitohormonów, uzyskuje się różne typy kultur (Tabela 2). Poniżej przedstawiono krótki przegląd

najważniejszych systemów kultur roślinnych stosowanych w laboratoriach i przemyśle i ich potencjał biotechnologiczny.

Kultury Kalusa (Callus Cultures)

Kalus to niezorganizowana, proliferująca masa komórek parenchymatycznych, powstająca wskutek dedyferencjacji komórek roślinnych pod wpływem regulatorów wzrostu. Proces indukcji kalusa najczęściej inicjuje się na pożywkach stałych, zawierających odpowiedni stosunek auksyn do cytokinin (Miroshnichenko i in., 2017). Eksplantatami mogą być praktycznie wszystkie fragmenty roślin: liście, hipokotyle, korzenie, łodygi lub zarodki somatyczne (Ikeuchi i in., 2013; Custódio i in., 2022). Kalus może być później wykorzystany do regeneracji całych roślin (organogeneza, embriogeneza) lub do uzyskania zawiesin komórkowych. Jego zaletą jest szybki wzrost i możliwość łatwego pobierania materiału do dalszych etapów kultury (Efferth 2019; Babich i in., 2020).

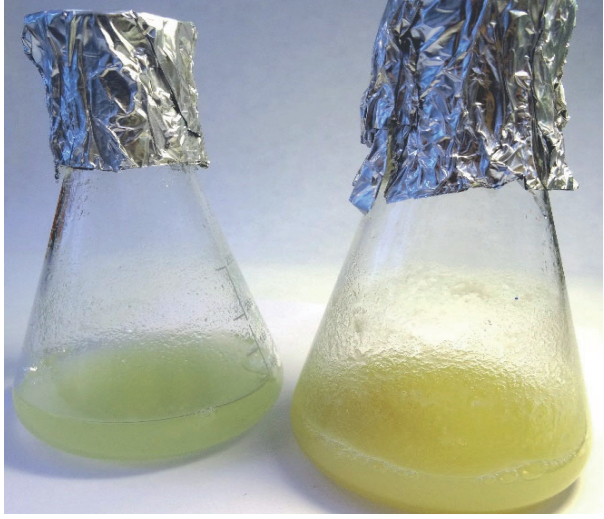
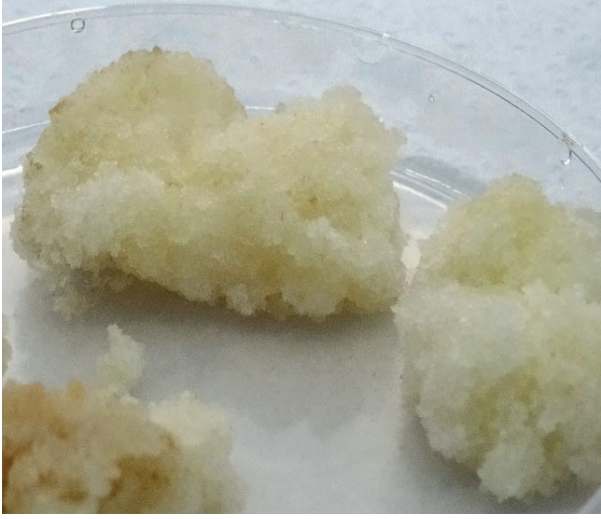
Zawiesiny komórkowe (Cell Suspension Cultures)

Zawiesiny komórkowe tworzy się przez rozdrobnienie kalusa i przeniesienie go do płynnej pożywki. Zaletą zawiesin jest wysoka jednorodność kultury i łatwość skalowania (przejścia z niewielkich objętości laboratoryjnych do produkcji na skalę przemysłową w bioreaktorach), co czyni je efektywnym narzędziem do produkcji metabolitów wtórnych, barwników, enzymów i białek (Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002; Gupta i in., 2024). Są jednak bardziej wrażliwe na zakażenia niż kultury na pożywkach stałych oraz wymagają optymalizacji warunków hodowli (pH pożywki, stężenia cukru, dodatku fitohormonów). Zastosowanie elicytorów, takich jak jasmonian metylu, kwas salicylowy, chitozan czy nanosrebro, może również zwiększyć syntezę metabolitów (Hasnain i in., 2022).

Kultury korzeni włóśnikowatych (Hairy Root Cultures)

Kultury te powstają w wyniku infekcji materiału roślinnego przez bakterie *Agrobacterium*

Tab. 1. Przykłady różnych typów roślinnych kultur *in vitro*. Zdjęcia własne

	
Kalus marchwi odmiany Deep Purple z powstającymi zarodkami somatycznymi	Kalus marchwi odmiany Deep Purple z rozwijającymi się zarodkami somatycznymi oraz młodymi roślinami
	
Powstające zarodki somatyczne storczyka <i>Dendrobium</i> berry Oda	Młode rośliny storczyka <i>Dendrobium</i> berry Oda, powstałe z zarodków somatycznych
	
Kultura zawiesinowa BY2 komórek tytoniu	Kalus komórek tytoniu kultury BY2

Tab. 2. Rodzaje kultur roślinnych *in vitro* i ich zastosowanie

Typ kultury	Postać	Zastosowania główne	Przykłady roślin
Kalus	Tkanka niezróżnicowana	Produkcja metabolitów, transformacja genetyczna	<i>Taxus</i> , <i>Daucus</i> , <i>Panax</i>
Zawiesina komórkowa	Komórki i ich agregaty w płynnej pożywce	Produkcja związków aktywnych w bioreaktorach	<i>Ginkgo</i> , <i>Vitis</i> , <i>Linum</i>
Korzenie transformowane <i>Agrobacterium</i>	Korzenie włośnikowate	Produkcja związków aktywnych w bioreaktorach	<i>Salvia</i> , <i>Withania</i> , <i>Rubia</i>
Mikrorozmnażanie	Eksplantaty pędów, korzeni, merystemy	Rozmnażanie gatunków i odmian	<i>Musa</i> , <i>Solanum</i> , <i>Allium</i>
Zarodki somatyczne	Tworzenie zarodków z komórek somatycznych	Odtwarzanie roślin i produkcja na dużą skalę	<i>Coffea</i> , <i>Theobroma</i> , <i>Citrus</i>

rhizogenes, które przenoszą do rośliny tzw. plazmid Ri (root-inducing), powodujący intensywny rozwój korzeni bocznych. Tego typu kultury charakteryzują się stabilnym i szybkim wzrostem, wysoką genetyczną i biochemiczną stabilnością oraz zdolnością do kontrolowanej produkcji wielu metabolitów wtórnych typowych dla organów podziemnych (np. alkaloidów, saponin, lignanów, Babich i in., 2020).

Kultury pędów i mikrorozmnażanie

Mikrorozmnażanie (mikropropagacja) pozwala szybko rozmnażać rośliny o tych samych cechach. Bazuje na zdolności roślinnych komórek totipotencjalnych do regeneracji całego organizmu. Mikrorozmnażanie stosuje się szeroko w ogrodnictwie i w ochronie zasobów genetycznych (Kulus i Tymoszek, 2024; Bettoni i in., 2024).

Embriogeneza somatyczna i kultury zarodków

Embriogeneza somatyczna to wieloetapowy proces tworzenia zarodków z komórek somatycznych (czyli innych niż gamety). Można ją indukować poprzez aplikację auksyn, warunki stresowe (np. stres osmotyczny lub temperatury) czy dodatek elicytorów. Zarodki somatyczne są użyteczne m.in. w mikroklonalnym rozmnażaniu roślin, zwłaszcza jednoliściennych i w przechowywaniu zasobów genetycznych (Coelho i in., 2020; Rajan i Singh, 2021; Kauschal i in., 2023).

TRUDNOŚCI I OGRANICZENIA W KULTURACH *IN VITRO*

Mimo ogromnego potencjału, jaki niosą ze sobą roślinne kultury *in vitro*, ich tworzenie oraz praktyczne zastosowanie wciąż napotyka na trudności i ograniczenia, zarówno technologiczne, jak i biologiczne. Jednym z najczęstszych problemów, zwłaszcza w przypadku pracy z materiałem roślinnym ze środowiska naturalnego, są trudności z uzyskaniem sterylności. Rośliny dziko rosnące często są już skolonizowane przez mikroorganizmy, których eliminacja bywa wyjątkowo trudna i wymaga precyzyjnie dobranych procedur sterylizacji. Nawet niewielkie zakażenia mogą prowadzić do całkowitego zniszczenia kultury, szczególnie w przypadku zawiesin komórkowych, gdzie infekcje rozprzestrzeniają się błyskawicznie (Gupta i in., 2024; Churikova i in., 2015).

Kolejnym istotnym wyzwaniem jest tzw. „oporność” (ang. *recalcitrance*), czyli niska podatność określonych gatunków lub odmian na ponowne różnicowanie (dedyferencjację) i regenerację. Niektóre rośliny nie reagują na standardowe zestawy regulatorów wzrostu, co skutkuje brakiem formowania kalusa, niezdolnością do inicjacji organogenezy lub embriogenezy somatycznej. Dotyczy to szczególnie roślin jednoliściennych (o czym dalej), ale także licznych gatunków roślin drzewiastych czy tropikalnych (Bonga i in., 2010; Custódio i in., 2024,

Bennur i in., 2025). Wymaga to czasochłonnego i kosztownego dostosowania warunków kultury, do typu eksplantatu, fazy rozwojowej tkanki oraz parametrów środowiskowych (Babich i in., 2020; Solís-Ramos i in., 2012).

Nawet jeśli uda się uzyskać skuteczną indukcję wzrostu kalusa lub pędów, proces ten nie zawsze przebiega stabilnie. Częstym zjawiskiem towarzyszącym długoterminowym hodowlom jest zmienność somaklonalna – czyli pojawianie się niezamierzonych, spontanicznych zmian genetycznych lub epigenetycznych, które mogą prowadzić do modyfikacji cech fenotypowych roślin (Bettoni i in., 2024). Zjawisko to ma zarówno potencjał użytkowy (jako źródło zmienności do selekcji), jak i negatywne konsekwencje, gdy celem hodowli jest zachowanie pożądanych cech roślin, np. do dalszej uprawy w skali przemysłowej (Hasnain i in., 2022).

Odrębnym wyzwaniem pozostaje długoterminowe przechowywanie aktywnych kultur. Choć regularne pasażowanie umożliwia zachowanie żywotności komórek, wiąże się jednak z ryzykiem stopniowej akumulacji mutacji i obniżenia jakości kultury. Alternatywne metody, takie jak krioprezerwacja, wymagają drogiej infrastruktury oraz precyzyjnych, często gatunkowo specyficznych protokołów (Babich i in., 2020; Custódio i in., 2022). W efekcie, mimo wysokiej wydajności i wszechstronności technologii *in vitro*, jej efektywne zastosowanie wymaga dobrze zaplanowanego i przemyślanego podejścia łączącego wiedzę z zakresu fizjologii roślin, mikrobiologii, chemii analitycznej i inżynierii procesowej.

Kultury in vitro z roślin jednoliściennych

Pomimo postępu w lepszym zrozumieniu fizjologii, działania regulatorów wzrostu oraz mimo wdrażania narzędzi molekularnych i epigenetycznych, wiele gatunków roślin jednoliściennych nadal pozostaje trudnych do regeneracji. Ich zmienność somatyczna również stanowi istotny problem, wpływając na jakość uzyskanych roślin i ograniczając ich dalsze wykorzystanie w hodowli lub produkcji (Bairu i Kane, 2011). Ponieważ do tej grupy należą rośliny bardzo ważne gospodarczo (np. zboża)

i zagrożone wyginięciem (np. storczyki), konieczne jest dalsze doskonalenie procedur kultur *in vitro*, oparte na precyzyjnej regulacji szlaków hormonalnych oraz doborze odpowiednich eksplantatów w określonym stadium rozwoju. Historia opracowywania skutecznych metod hodowli roślin jednoliściennych *in vitro* to zarazem historia przełamywania ograniczeń technologicznych i biologicznych, z jakimi zmagala się biotechnologia roślinna od lat 60. XX wieku (Schenk i Hildebrandt 1972; Gautheret 1983; Thorpe 2000).

Zjawisko oporności wiąże się również z tendencją komórek jednoliściennych do szybkiej utraty potencjału embriogenego w czasie trwania kultury, co stwierdzono np. w badaniach nad *Brachypodium distachyon* – modelowym gatunkiem dla traw. W miarę wydłużania czasu kultury dochodzi do zmian w ekspresji genów odpowiedzialnych za totipotencję, co ogranicza możliwość dalszej regeneracji (Betekhtin i in., 2020). Dodatkowym utrudnieniem są trudności w integracji materiału genetycznego (np. za pomocą *Agrobacterium tumefaciens*), co ogranicza wydajność transformacji. Wreszcie, wiele protokołów dla jednoliściennych wymaga szeregu kosztownych i czasochłonnych etapów, z użyciem pożywek o bardzo złożonym składzie i skuteczności zależnej od genotypu (Zhu i in., 2024).

Na przykład owies (*Avena sativa* L.), zboże o bardzo szerokim zastosowaniu w uprawach, wciąż nie ma opracowanego efektywnego systemu regeneracji, co utrudnia jego modyfikację genetyczną i wykorzystanie w programach ulepszania odmian (Custódio i in., 2024; Hasnain i in., 2022). Zjawisko to potwierdzają także badania nad pszenicą jednoziarnową (pszenica samopsza, *Triticum monococcum* L.), która, podobnie jak owies, uchodzi za trudną w regeneracji. Mimo rozwoju metod embriogenezy somatycznej i zastosowania różnorodnych regulatorów wzrostu, skuteczność regeneracji u tego gatunku pozostaje niska i nieprzewidywalna. Dopiero zastosowanie złożonych kombinacji regulatorów wzrostu oraz ścisła kontrola stanu rozwojowego eksplantatu (w tym użycie niedojrzałych zarodków) pozwala uzyskać zadowalające efekty (Miroschnichenko i in., 2017).

ZASTOSOWANIE KULTUR *IN VITRO*

Techniki kultur *in vitro* znajdują szerokie zastosowanie w różnych dziedzinach biologii i rolnictwa, w tym w produkcji materiału roślinnego, zachowaniu zasobów genowych, pozyskiwaniu metabolitów wtórnych oraz ochronie środowiska (Ryc. 1). Ich znaczenie wykracza daleko poza laboratorium – są narzędziem nie tylko dla naukowców, lecz również dla praktyków zajmujących się rolnictwem, w tym ogrodnictwem, i ochroną bioróżnorodności.

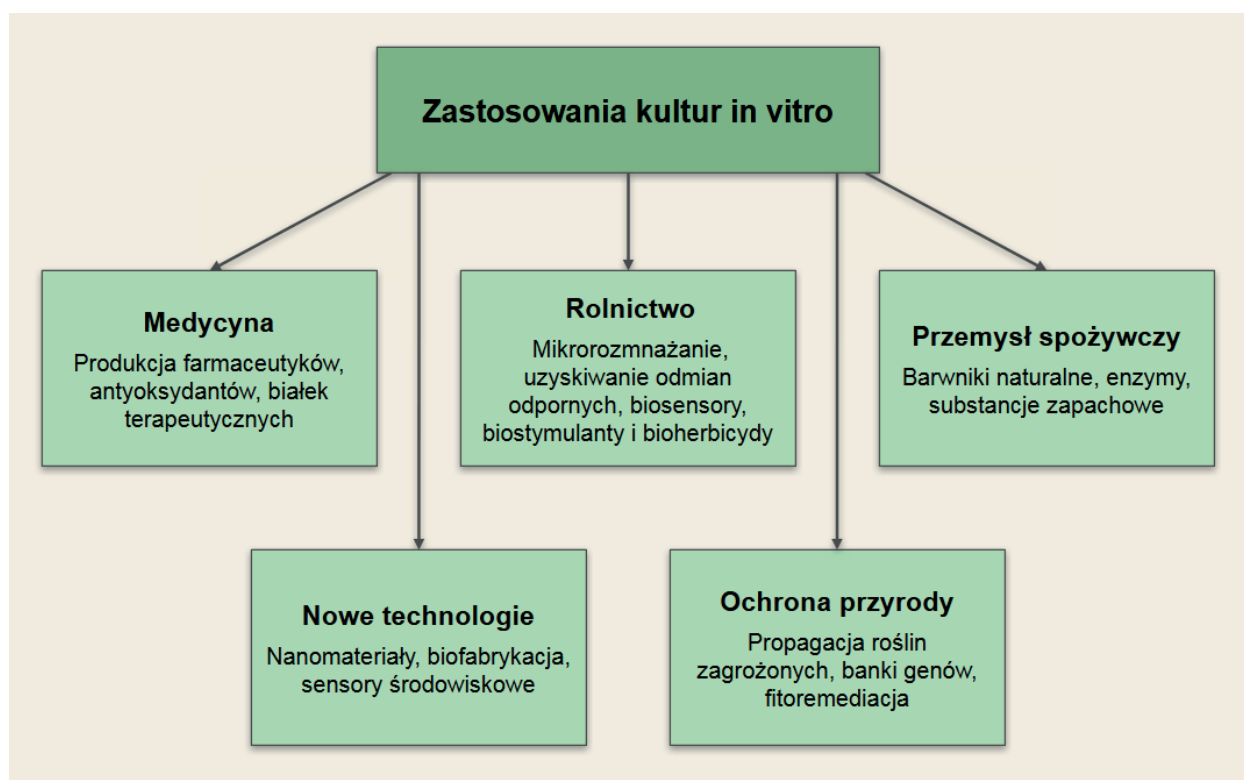
Kultury in vitro w medycynie – źródło leków, białek i związków bioaktywnych

W ostatnich latach znacząco wzrosło zainteresowanie technologiami *in vitro* w pozyskiwaniu związków o wysokiej aktywności biologicznej (Agrawal i in., 2022). Ich głównym atutem, w porównaniu z tradycyjnymi metodami pozyskiwania materiału, jest możliwość kontrolowanej produkcji metabolitów (Tab. 3). W warunkach hodowli komórkowej można nie tylko utrzymać stabilną linię produkcyjną, ale także znacznie zwiększyć wydajność syntezy, stosując odpowiednie stymu-

latory i techniki inżynierii metabolicznej (Ramachandra Rao i Ravishankar 2002). Równie ważnym aspektem jest ochrona naturalnych zasobów roślin leczniczych, ponieważ namnażanie kultur *in vitro*, otrzymanych z minimalnej ilości pobranego materiału roślinnego, eliminuje konieczność kolejnych zbiorów takich roślin.

Szczególne znaczenie mają kultury komórek kalusowych i zawieszinowych z gatunków takich jak *Taxus spp.*, *Catharanthus roseus*, *Podophyllum hexandrum*, *Panax ginseng*, *Digitalis lanata*, *Artemisia annua* czy *Scutellaria baicalensis* – wszystkie uznane za cenne źródła związków przeciwnowotworowych, przeciwbakteryjnych i neuroprotektynowych (Bhattacharyya i in., 2016; Miroshnichenko i in., 2017; Babich i in., 2020).

Jednym z najlepiej poznanych przypadków medycznego i komercyjnego wykorzystania kultur komórkowych w medycynie jest produkcja taksolu (paklitakselu) – diterpenowego alkaloidu o działaniu cytotoksycznym, izolowanego pierwotnie z kory cisu (*Taxus brevifolia*). Z powodu ograniczonej dostępności rośliny i ogromnego zapotrzebowania na ten lek w terapii no-



Ryc. 1. Zastosowania kultur *in vitro*

Tab. 3. Porównanie pozyskiwania związków aktywnych metodami tradycyjnymi i z kultur *in vitro*

Aspekt	Tradycyjne pozyskiwanie	Kultury <i>in vitro</i>
Wpływ na populacje roślin	Często destrukcyjny	Ochronny, bez niszczenia
Uzależnienie od sezonu	Wysokie	Brak – całoroczna produkcja
Czystość i standaryzacja	Trudna	Łatwa do kontroli
Produkcja substancji rzadkich	Ograniczona	Możliwa na dużą skalę

wotworów jajnika, piersi i płuc, opracowano metodę pozyskiwania taksolu w hodowlach komórek zawieszinowych w bioreaktorach (Kraśteva i in., 2020). Użycie elicytorów pozwala na zwiększenie produkcji taksolu nawet 4–5-krotnie w porównaniu do poziomu bazowego. Podobne efekty uzyskano także dla artemizyny (lakton o silnym działaniu przeciwmalarycznym) i innych cennych związków terapeutycznych (Hasnain i in., 2022).

Poza klasycznymi metabolitami wtórnymi, systemy *in vitro* są wykorzystywane do produkcji rekombinowanych białek – enzymów, peptydów immunomodulujących, przeciwciał i szczepionek. W odróżnieniu od systemów mikrobiologicznych, komórki roślinne są zdolne do wprowadzania modyfikacji posttranslacyjnych zgodnych z systemem eukariotycznym, co jest kluczowe dla stabilności i aktywności funkcjonalnej tych cząsteczek (Gupta i in., 2024). W literaturze opisano m.in. produkcję czynnika wzrostu EGF, szczepionek przeciwko HPV czy nawet fragmentów przeciwciał neutralizujących wirusa HIV, SARS-CoV-2 i Ebolę (Yusibov i in., 2016; Peyret i in., 2021; Venkataraman i in., 2023). Ciekawym przykładem jest wykorzystanie kultur *Medicago truncatula* do produkcji wirusopodobnych cząsteczek (VLP – virus-like particles), które mogą pełnić rolę nowej generacji nośników szczepionek (Wang i in., 2022).

Kultury komórkowe stają się coraz częściej również źródłem mniej oczywistych substancji – takich jak inhibitory enzymów proteolitycznych, substancje o działaniu przeciwdepresyjnym, leków hormonalnych lub immunomodulatorów (Babich i in., 2020). Z kultur *Scutellaria baicalensis* uzyskiwano m.in. bajkaleinę i wogoninę – flawony o działaniu neuroprotektynym

i uspokajającym, zaś z korzeni *Withania somnifera* – witanolidy o potencjale antynowotworowym, adaptogennym i przeciwzapalnym (Dziurka i in., 2021; Ahmad i in., 2024).

Kultury *in vitro* w rolnictwie

Kultury *in vitro* są jednym z filarów nowoczesnej biotechnologii rolniczej. Umożliwiają masowe rozmnażanie roślin o pożądanym cechach, uzyskiwanie materiału wolnego od patogenów, regenerację roślin transgenicznych, rozwój hodowli opartych na kulturach haploidalnych oraz testowanie reakcji roślin na stresy abiotyczne i biotyczne w warunkach kontrolowanych. Szczególne znaczenie mają tu technologie mikrorozmnażania, embriogenezy somatycznej, transformacji genetycznej oraz kultur mikrospor i kalusa.

Najpowszechniejszym zastosowaniem kultur *in vitro* w rolnictwie jest mikrorozmnażanie roślin użytkowych – czyli szybkie, beznasienne namnażanie roślin na drodze klonalnej z zachowaniem identyczności genetycznej (Moraes i in., 2021; Podwyszyńska i in., 2022; Hasnain i in., 2022; Kulus i Tymoszek, 2024). Stosuje się je rutynowo w produkcji materiału wyjściowego m.in. ziemniaka, czosnku, truskawek, winorośli, chmielu, ananasa, bananowców i wielu gatunków roślin ozdobnych i tropikalnych (Escobedo-GraciaMedrano i in., 2016; Hasnain i in., 2022). Technologia ta pozwala w krótkim czasie uzyskać dziesiątki tysięcy sadzonek z jednego pędu lub merystemu, co znacząco obniża koszty uprawy i skraca czas potrzebny na wdrożenie nowej odmiany do produkcji polowej. Dodatkowo możliwe jest utrzymanie materiału matecznego w warunkach sterylnych, wolnych od bakterii, wirusów, grzybów i fitoplazm,

co ma ogromne znaczenie w ochronie roślin i ograniczaniu strat w plonie (Gupta i in., 2024). Przykładowo, w systemach bananowców, ananasa i manioku mikrorozmnażanie w bioreaktorach zanurzeniowych TIS (Temporary Immersion Systems) pozwoliło na zmniejszenie kosztów produkcji materiału szkółkarskiego o ponad 60% oraz ograniczenie zużycia środków ochrony roślin (Hasnain i in., 2022; Patiño i Figueroa, 2025; Solórzano-Acosta i Guerrero-Padilla, 2020). W dodatku hodowle komórek zawieszinowych lub kalusa można poddawać działaniu określonych stresorów, a następnie selekcjonować linie najbardziej odporne lub o podwyższonej ekspresji genów obronnych (Gupta i in., 2024; Custódio i in., 2022). Tego typu podejścia są wykorzystywane m.in. w hodowli odmian tolerujących suszę (np. w przypadku ryżu, jęczmienia, słonecznika), metale ciężkie (np. gorczyca, rącznik, lucerna), zasolenie (pszenica, ziemniak) czy infekcje. Dzięki takim systemom można przeprowadzać selekcję wstępną na poziomie komórkowym, co znacznie skraca czas tworzenia odmian użytkowych o zwiększonej odporności (Zhang i Zhu 2018; Saha i in. 2022).

Kultury roślinne *in vitro* stały się nieodzownym narzędziem w sadownictwie, umożliwiając szybkie i precyzyjne namnażanie zarówno zrazów, jak i podkładek drzew owocowych, takich jak jabłoni czy śliwa (Alanagh i in., 2014; Teixeira da Silva i in., 2019). W warunkach sterylnych można uzyskać rośliny wolne od patogenów, o jednorodnych cechach genetycznych, co ma ogromne znaczenie dla nowoczesnych szkółek i programów hodowlanych. W przypadku jabłoni (*Malus × domestica*) techniki mikropropagacji pozwalają zachować czystość odmian oraz utrwaląć pożądane cechy podkładek, które decydują o wigorze, plonowaniu czy odporności drzew na stresy środowiskowe (Teixeira da Silva i in., 2019). Równie ważne postępy odnotowano w rozmnażaniu podkładek śliwy i innych gatunków z rodzaju *Prunus*. Badania z zastosowaniem modeli sztucznej inteligencji wykazały np., że skuteczność mikropropagacji *in vitro* podkładek takich jak GF677 (brzoskwinia × migdał) silnie zależy od składu mineralne-

go pożywki. Zoptymalizowane pożywki zapewniają szybki wzrost zdrowych pędów, które po ukorzenieniu służą do szczepienia odmian szlachetnych (Alanagh i in., 2014). Połączenie doświadczenia klasycznej hodowli z technikami *in vitro* otwiera nowe możliwości uszlachetniania drzew owocowych. Uzyskane tą drogą kłony podkładek i zrazów są nie tylko genetycznie jednolite, ale również łatwo dostępne przez cały rok, niezależnie od sezonu wegetacyjnego. Mikropropagacja jabłoni i śliwy z wykorzystaniem technik kultur *in vitro* przyczynia się więc do zwiększenia efektywności produkcji szkółkarskiej, ochrony zasobów genetycznych oraz rozwoju nowoczesnego sadownictwa.

Kultury mikrospor i pylników to zaawansowana forma kultur *in vitro*, wykorzystywana do uzyskiwania roślin haploidalnych – czyli posiadających pojedynczy zestaw chromosomów. Takie linie po podwojeniu (np. przez kolchicynę lub stres termiczny) stają się „podwojonymi haploidami” (DH – doubled haploids), które są całkowicie homozygotyczne i mogą być natychmiast włączone do hodowli odmianowej (Wang i in., 2023). Metoda ta zrewolucjonizowała hodowlę roślin takich jak jęczmień, pszenica, ryż, rzepak czy tytoń. Pozwala skrócić proces selekcji odmian z 8–10 lat do zaledwie 2–3 sezonów. Przełomem było zastosowanie tzw. markera RUBY w kukurydzy i pomidorze, umożliwiającego identyfikację roślin haploidalnych bez konieczności genotypowania – tylko na podstawie czerwonego zabarwienia tkanek (Wang i in., 2023).

Kultury *in vitro* są nieodzownym etapem transformacji genetycznej roślin. Eksplantaty poddaje się działaniu *Agrobacterium tumefaciens* lub mikrowstrzeliwaniu DNA, a następnie regeneruje nowe rośliny z wykorzystaniem embriogenezy somatycznej lub organogenezy. Tak uzyskano pierwsze transgeniczne odmiany ziemniaka, kukurydzy, soi, bawełny i rzepaku (np. Garrocho-Villegas i in., 2012, McFarland i in., 2025). Obecnie techniki te są integrowane z edycją genomu CRISPR/Cas9. Kultura kalusa lub zawiesina komórkowa służą jako materiał do modyfikacji genomowej, a następnie regeneruje się z niej edytowane rośliny o wyciszonym genie odporności na herbicyd, o pod-

wyższej zawartości skrobi lub tolerancji na suszę (Hasnain i in., 2022).

Bioreaktory roślinne jako źródło biostymulatorów i bioherbicydów

Kultury *in vitro*, szczególnie komórkowe i korzeni transformowanych (*hairy roots*), stanowią wydajne, niezależne od warunków polowych źródło naturalnych biostymulatorów wzrostu i rozwoju roślin, takich jak auksyny, cytokiny, kwas salicylowy, kwas jasmonowy czy poliaminy, które poprawiają parametry fizjologiczne i odporność roślin uprawnych (Posmyk i Szafrńska 2016).

Ekstrakty z kultur *in vitro* wielu roślin, m.in. *Azadirachta indica*, *Moringa oleifera*, *Ocimum sanctum* czy *Daucus carota*, nie tylko mogą działać jako naturalne promotory wzrostu roślin (Gupta i in., 2024; Hasnain i in., 2022), ale można je łatwo dostosowywać do konkretnych potrzeb upraw: inne będą profilaktyczne środki wzmacniające odporność pomidora w stresie suszy, a inne stymulatory zakorzenienia dla sadzonek truskawki. W przeciwieństwie do syntetycznych regulatorów wzrostu, preparaty pochodzenia roślinnego nie kumulują się w środowisku i nie naruszają równowagi mikrobiologicznej gleby. Obiecującym kierunkiem są również bioherbicydy (np. lignany, kumaryny, taniny czy alkaloidy), produkowane w systemach *in vitro*, które mogą hamować wzrost chwastów bez negatywnego wpływu na rośliny użytkowe (Babich i in., 2020). W dobie rosnącego oporu społecznego wobec chemicznych środków ochrony roślin i konieczności wdrażania strategii zrównoważonego rolnictwa, produkcja biostymulatorów i bioherbicydów z kultur *in vitro* staje się kierunkiem o szczególnym znaczeniu aplikacyjnym i ekologicznym.

Hodowle grzybów mikoryzowych, zwłaszcza arbuskularnych (np. z rodzaju *Glomus*, *Gigaspora* czy *Rhizophagus*), prowadzone na kulturach korzeni *in vitro*, otworzyły zupełnie nowe możliwości wykorzystania ich w rolnictwie jako naturalnych biostymulantów wzrostu roślin. Dzięki opracowanym przez zespół S. Declercka (Cranenbrouck i in., 2005) hodowli monoksenicznej (współkultury *in vitro* grzyba

i zainfekowanego korzenia), możliwe stało się namnażanie tych grzybów na skalę przemysłową, w postaci czystych inokulantów, wolnych od patogenów i innych mikroorganizmów glebowych. Ponieważ w naturze grzyby mikoryzowe tworzą symbiozę z korzeniami większości roślin lądowych, poprawiając ich zdolność pobierania wody oraz pierwiastków takich jak fosfor, azot, czy mikroelementy, stosowanie takich inokulantów w rolnictwie i ogrodnictwie poprawia żyzność gleby, ogranicza konieczność stosowania nawozów mineralnych i pestycydów oraz zwiększa odporność roślin na stres suszy i zasolenia.

Przemysł spożywczy i żywność funkcjonalna

Roślinne kultury *in vitro* stanowią coraz bardziej atrakcyjne źródło dodatków do żywności, które pełnią funkcje zarówno sensoryczne (smak, zapach, barwa), jak i funkcjonalne (działanie prozdrowotne, przeciwutleniające, prebiotyczne). Dzięki możliwości prowadzenia hodowli niezależnie od sezonu, pogody i zmienności genetycznej, uzyskiwany materiał jest jednorodny, czysty mikrobiologicznie i może być produkowany na skalę przemysłową w bioreaktorach.

W dobie ograniczania syntetycznych dodatków do żywności rośnie zainteresowanie naturalnymi barwnikami pochodzenia roślinnego. Kultury *in vitro* umożliwiają wydajną syntezę i stabilizację tych barwników bez konieczności uprawy roślin w polu. Przykładem mogą być antocyjaniny, produkowane m.in. w kulturach *Vitis vinifera*, *Daucus carota*, *Solanum melongena*, *Brassica oleracea* oraz *Vaccinium spp.* (Miroshnichenko i in., 2023). Inną grupą barwników są betalainy (w tym betacyjaniny i betaksantyny) – barwniki charakterystyczne dla buraka ćwikłowego (*Beta vulgaris*), amarantusa i opuncji (*Opuntia ficus-indica*), czy karotenoidy, takie jak β -karoten, luteina, astaksantyna, zeaksantyna i likopen, syntetyzowane w kulturach komórek *Daucus carota*, *Tagetes erecta*, *Capsicum annuum*, *Haematococcus pluvialis* (glon) i *Lycopersicon esculentum* (Babich i in., 2020). Barwniki te wykorzystywane są nie tylko jako składniki dodające koloru w sokach, napojach, lodach czy deserach, ale również jako naturalne

przeciwutleniacze, o działaniu stabilizującym lipidy i neutralizującym wolne rodniki (Brudzyńska i in., 2021). W kulturach *in vitro* możliwa jest również biosynteza wielu związków aromatycznych i smakowych: waniliny (główny związek zapachowy wanilii, *Vanilla planifolia*), mentolu, nadającego zapach ekstraktom z mięty, czy limonenu, geraniolu i eugenolu, odpowiedzialnych za zapachy cytrusowe, różane i goździkowe (Gupta i in., 2024).

Oprócz barwników czy aromatów, kultury roślinne *in vitro* mogą syntetyzować enzymy, wykorzystywane w przemyśle mleczarskim, browarniczym, piekarskim i przetwórstwie owoców. Często stosowane są pektynazy i celulazy (do klarowania soków i win), amylazy i inwertazy (stosowane w piekarnictwie i browarnictwie) czy fitazy (wykorzystywane do obniżania poziomu trudno trawionych fitynianów w mąkach i paszach). Zaletą tych enzymów jest brak alergenów charakterystycznych dla enzymów pochodzenia zwierzęcego lub mikrobiologicznego, przy zachowaniu ich pełnej funkcjonalności (Hasnain i in., 2022). Z tego względu coraz więcej producentów żywności wegańskiej i bio sięga po enzymy uzyskiwane w bioreaktorach komórkowych z kultur *Helianthus*, *Brassica* czy *Daucus*.

Kultury *in vitro* mogą służyć także do produkcji prebiotyków, np. polisacharydów i oligosacharydów z *Cichorium intybus*, *Helianthus tuberosus* i *Allium sativum*, wspierających florę jelitową, związków funkcjonalnych (np. saponin z *Panax ginseng*, fitosteroli z *Brassica napus*, tanin i lignanów z *Linum usitatissimum*), stosowanych w suplementach diety czy alkaloidów i flawonoidów (np. katechiny z *Camellia sinensis*, resweratrolu z winorośli, kurkuminy z *Curcuma longa*), które działają przeciwzapalnie, przeciwutleniająco i kardioprotekcyjnie (Morales i in., 2021).

Kultury roślinne w produkcji biomateriałów o zastosowaniach technologicznych

Poza sektorem spożywczym, kultury *in vitro* pełnią coraz ważniejszą funkcję w nowych technologiach przemysłowych, stanowiąc źródło ekologicznych enzymów, biodegradowal-

nych materiałów i nanocząstek o precyzyjnie projektowanej aktywności, na przykład nanocząstek srebra (AgNP), złota (AuNP), tlenków cynku, krzemu czy selenu. To tzw. zielone nanotechnologie, uznawane za bezpieczniejsze i bardziej zrównoważone od tradycyjnych metod chemicznych (Hasnain i in., 2022). Tak wytwarzane nanomateriały mają szerokie zastosowanie – w opakowaniach aktywnych (np. z właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi), w kosmetyce (kremy z nanosrebrem), w tekstyliach technicznych (odzież antybakteryjna), a nawet jako nośniki leków w medycynie celowanej (Hano i Abbasi 2021).

Kultury roślinne w ochronie i oczyszczaniu środowiska

Bardzo interesującym zastosowaniem kultur roślinnych dla ochrony środowiska jest ich użycie w fitoremediacji i tworzeniu biosensorów. Niektóre rośliny są zdolne do akumulowania, rozkładu lub immobilizacji zanieczyszczeń środowiskowych – metali ciężkich, pestycydów, azotanów. Kultury komórek kalusowych i korzeni transformowanych (np. *Nicotiana tabacum*, *Brassica juncea*, *Lemna minor*) pozwalają nie tylko prowadzić badania nad tymi mechanizmami, ale także tworzyć biosensory, które reagują zmianą fluorescencji, koloru lub ekspresji genu na obecność określonych toksyn (Hasnain i in., 2022). W przyszłości takie linie komórek mogą służyć do monitorowania jakości wody i gleby, a także być używane w zintegrowanych systemach biologicznego oczyszczania ścieków i gleb skażonych.

KULTURY IN VITRO W OCHRONIE I ZACHOWANIU BIORÓŻNORODNOŚCI

Wraz z postępującą degradacją siedlisk naturalnych, urbanizacją, intensyfikacją rolnictwa i zmianami klimatycznymi, świat stoi wobec gwałtownej utraty bioróżnorodności. Według raportów IUCN, co najmniej 40% gatunków roślin naczyniowych na świecie jest zagrożonych wyginięciem. W tym kontekście technologie *in vitro* stają się nie tylko narzędziem produkcyjnym, ale również strategiczną metodą zachowa-

nia i odtwarzania zasobów roślinnych, które nie mogą być skutecznie chronione klasycznymi metodami (Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002). Metody te są istotnym elementem strategii *ex situ*, uzupełniając banki nasion, kolekcje ogrodów botanicznych oraz konwencjonalne zachowanie upraw (Walters i Pence, 2021). Dzięki możliwościom mikrorozmnażania, krioprezervacji, tworzenia „sztucznych nasion” (synseeds), a także prowadzenia długotrwałych kultur zawieszinowych lub kalusowych, można nie tylko zachować unikalne genotypy, ale też zapewnić materiał do reintrodukcji i odbudowy populacji w warunkach naturalnych (Tripathi i in., 2021; Mikuła i in., 2022; Gupta i in., 2024). Jest to szczególnie ważne dla roślin, które nie tworzą nasion (np. rośliny triploidalne, niektóre klony i mutacje hodowlane), tworzą nasiona wrażliwe na wysuszenie (recalcitrant seeds), wytwarzają nasiona trudne do przechowywania (np. oleiste nasiona roślin tropikalnych) lub rozmnażają się wyłącznie wegetatywnie (Ebert i Engels 2020).

Zastosowanie hodowli *in vitro* umożliwia utrzymanie w niewielkich objętościach (np. w probówkach lub mikropłytkach) unikatowych genotypów, populacji lokalnych i odmian o znaczeniu kulturowym, które często są marginalizowane w oficjalnych programach banków genów. Przykładem może być kolekcja *Solanum tuberosum* i *Allium sativum* w USDA Clonal Repository (Custódio i in., 2022), czy programy ochrony czosnku niedźwiedziego (*Allium ursinum*) prowadzone w Europie Środkowej (Bernaś i in., 2023).

Kultury *in vitro* umożliwiają także masowe rozmnażanie rzadkich roślin z minimalnej ilości materiału źródłowego. W przypadku gatunków objętych ścisłą ochroną (np. storczyki, rośliny torfowiskowe, górskie endemity) możliwe jest pozyskanie eksplantatu z jednego liścia, pąka, a nawet komórki, bez konieczności niszczenia całego osobnika. Dzięki metodom mikrorozmnażania, organogenezy i embriogenezy somatycznej, można w krótkim czasie uzyskać setki lub tysiące genetycznie jednorodnych i zdrowych roślin, które mogą być wykorzysta-

ne na przykład do reintrodukcji (Sarmah i in., 2017; Żabicki i in., 2019).

Szczególnie skuteczne okazały się te techniki w rozmnażaniu m.in. storczyków europejskich (*Orchis mascula*, *Dactylorhiza incarnata*, *Gymnadenia conopsea*, Churikova, 2015), roślin górskich i torfowiskowych (*Drosera rotundifolia*, *Pinguicula vulgaris*, *Gentiana pneumonanthe*, Petrova i in., 2021; Tienaho i in., 2021; Podwyszyńska i in., 2022) czy endemicznych roślin stepowych i sucholubnych (Monder i in., 2024).

Rośliny lecznicze są grupą szczególnie narażoną na wyginięcie z powodu nadmiernego pozyskiwania z naturalnych siedlisk. W dodatku wiele z nich jest endemitami lub gatunkami o wąskim zasięgu występowania. Zmiany klimatyczne mogą powodować dodatkowe ograniczenie zasięgu a tym samym utratę zasobów farmakologicznych (Behera i in., 2022). Techniki kultur *in vitro* umożliwiają zarówno ich rozmnażanie, jak i pozyskiwanie metabolitów wtórnych w warunkach kontrolowanych. Przykładami skutecznego zastosowania kultur zarówno do ochrony samych roślin, jak i przemysłowej produkcji ich metabolitów są np. *Withania somnifera* (ashwagandha, witanolidy, Ahmad i in., 2024), *Catharanthus roseus* (barwinek różowaty, pozyskiwanie przeciwnowotworowych alkaloidów winblastyny i winkrystyny, Loyola-Vargas i Ochoa-Alejo, 2018), *Panax ginseng* (żeńszeń, namnażanie z tkanek korzeniowych i kontrolowana synteza ginsenozydów, Miroshnichenko i in., 2017), *Nothapodytes nimmoniana* (krytycznie zagrożony producent kamptotecyny, leku antynowotworowego, Castillo-Pérez i in., 2018) czy *Gentiana lutea* i *Valeriana officinalis*, których ochroną i utrzymaniem linii w bankach *in vitro* zajmują się laboratoria w Polsce (Mikuła i in., 2022; Zimnoch-Guzowska i in., 2022). Techniki *in vitro* dla roślin leczniczych stosowane są z powodzeniem np. w Indiach, Chinach, Bułgarii, Niemczech, Polsce i na Litwie, gdzie utworzono specjalistyczne centra ochrony farmakoekologicznej (Krasteva i in., 2020; Walters i Pence, 2021).

Bioróżnorodność rolnicza, obejmująca lokalne odmiany, podgatunki oraz dzikich krew-

niaków roślin uprawnych, wymaga szczególnej troski. Jest to tym bardziej ważne w kontekście stosowania na świecie ogromnych arealów monokultur (np. pszenica, kukurydza, ryż) i zachodzących zmian klimatu. W dodatku wiele z tych form rozmnaża się wegetatywnie, przez co nie może być zachowane w postaci nasion. Wykorzystanie różnych form kultur i technologii *in vitro* pozwala m.in. na mikrorozmnażanie odmian lokalnych, zagrożonych wyparciem przez odmiany stosowane do produkcji wielkotowarowej (np. czosnek, ziemniak, Gupta i in., 2024), ochronę roślin uprawnych i ich dzikich krewniaków (np. *Triticum dicoccum* i *Avena strigosa*, przechowywane w postaci kallusów, Castillo-Pérez i in., 2018; Ruta i in., 2020). Takie metody można też stosować do utrwalania czystych, wolnych od patogenów linii odmianowych (np. ziemniak, czosnek, topinambur, Mikula i in., 2022) czy dla długoterminowego przechowywania roślin pastewnych i sadowniczych metodami krioprezervacji (Tripathi i in., 2021; Walters i Pence, 2021).

W Polsce instytucje takie jak IHAR w Radzikowie czy ogrody botaniczne i banki tkanek w Poznaniu i Powsinie prowadzą aktywne programy *in vitro* dla linii czosnku, cebuli, ziemniaka i żyta (Mikula i in., 2022; Zimnoch-Guzowska i in., 2022). W Korei i Japonii stosuje się pożywki z dodatkiem sorbitolu i maltodekstryny do długoterminowego utrzymania merystemów ryżu i pszenicy w niskiej temperaturze (Gupta i in., 2024; Loyola-Vargas i Ochoa-Alejo, 2018). W Ameryce Południowej i Azji prowadzi się intensywne prace nad zachowaniem dzikich i uprawnych roślin bananowców oraz otrzymaniem odmian odpornych na zagrażające im patogeny (Gogoi i in., 2020). Techniki te wspierają nie tylko konserwację genotypów, ale również ich praktyczne wykorzystanie w programach hodowlanych, adaptacyjnych i klimatycznych (Kaviani i Kulus, 2022; Priyanka i in., 2021).

W krajach takich jak Japonia, Finlandia czy Brazylia programy restytucji rzadkich roślin z zastosowaniem mikrorozmnażania *in vitro* stanowią oficjalną część polityki ochrony przyrody, zwłaszcza dla roślin trudnych w rozmnażaniu konwencjonalnym, np. *Paphiopedilum* spp.,

Primula spp., *Fritillaria meleagris*, a także zagrożonych drzew tropikalnych, takich jak *Shorea robusta* czy *Swietenia macrophylla* (Chokheli i in., 2022; Custódio i in., 2022; Sochacki i in., 2024). Opracowanie technologii tworzenia tzw. sztucznych nasion (synthetic seeds, synseeds), struktur funkcjonalnie analogicznych do nasion oraz zastosowanie zarodków somatycznych jako eksplantatów zdolnych do dalszego rozwoju, usprawniło przechowywanie, transport, a nawet zautomatyzowało siew roślin zagrożonych. Technologia synseeds wykazuje wysoką przeżywalność (>80% po 6 miesiącach przechowywania) i umożliwia wymianę materiału między bankami tkanek w różnych krajach bez ryzyka zakażeń patogenami (Walters, 2020; Gupta i in., 2024). Ta technika jest badana jako metoda „szybkiej regeneracji populacji” i rozwijana w coraz większym stopniu.

Rośliny ozdobne, zwłaszcza storczykowate (*Orchidaceae*), należą do najbardziej zagrożonych grup ze względu na atrakcyjny wygląd i wysoką wartość rynkową (Tiwari i in., 2024). Większość z nich występuje naturalnie w niewielkich, izolowanych populacjach a niekontrolowane wykorzystywanie i zbieranie oraz bardzo skomplikowane cykle życiowe storczyków stanowią kluczowe wyzwanie w ich ochronie. Według statystyk Globalnej Czerwonej Listy IUCN (Międzynarodowa Unia Ochrony Przyrody) dla 948 gatunków storczyków, 56,5% zostało sklasyfikowanych jako zagrożone. Dlatego mikrorozmnażanie i kultury *in vitro* stały się podstawową strategią w zintegrowanych działaniach ochronnych (Tiwari i in., 2024). Przykładami mogą być utworzone kolekcje linii *Vanilla planifolia* (Castillo-Pérez i in., 2018), *Dactylorhiza majalis*, *Ophrys apifera*, *Cattleya* spp. czy *Paphiopedilum* spp. (Tripathi i in., 2021; Walters i Pence, 2021; Mikula i in., 2022). Oczywiście, kolekcje są tworzone nie tylko dla storczyków, ale dla coraz większej liczby gatunków, w tym endemicznych, takich jak *Aloe polyphylla* (Lesotho), *Primula scotica* (Szkocja) czy *Silene polypetala* (USA), często w połączeniu z tworzeniem banków DNA i nasion (Walters i Pence, 2021).

Największą siłą technologii *in vitro* jest możliwość zachowania i przywrócenia popula-

cji dzikich gatunków. W ten sposób próbuje się przywrócić naturze zagrożone wyginięciem populacje *Eryngium alpinum*, *Pulsatilla patens*, (Żabicka i in., 2021; Mikula i in., 2022), *Podophyllum hexandrum* (Gupta i in., 2024), *Artemisia laciniata* (Miroshnichenko i in., 2017), czy roślin owadożernych (np. *Dionaea muscipula*) w ramach programów edukacyjnych i ochronnych w UE i USA (Singh i Chokheli, 2025). Banki tkanek i krioprezervacja są skutecznie wdrażane m.in. przez Millennium Seed Bank (UK), Kostrzyńskie Centrum Roślin Zielarskich, Laboratorium Biotechnologii w Kórniku oraz europejskie banki regionalne (Mikula i in., 2022; Walters i Pence, 2021; Zimnoch-Guzowska i in., 2022).

Hodowle komórkowe roślin zagrożonych są nie tylko narzędziem ich zachowania, ale także doskonałą platformą do badania ich metabolitów wtórnych i potencjału leczniczego, monitorowania zmienności genetycznej i epigenetycznej między populacjami, czy testowania tolerancji na czynniki abiotyczne (np. suszę, zasolenie). Przykładem są kultury *Scutellaria baicalensis* (potencjał przeciwnowotworowy), *Hypericum perforatum* (hiperycyna), czy *Taxus wallichiana* (taksol), gdzie udało się zachować produkcję cennych związków farmakologicznych nawet po wieloletniej hodowli *in vitro* (Babich i in., 2020; Gupta i in., 2024).

PERSPEKTYWY ZASTOSOWAŃ KULTUR *IN VITRO* W PRZYSZŁOŚCI

W ciągu ostatnich kilku dekad technologie kultur *in vitro* ewoluowały od narzędzi badawczych wykorzystywanych głównie w laboratoriach akademickich, do zaawansowanych platform biotechnologicznych o coraz większym znaczeniu przemysłowym (Babich i in., 2020; Chandana i in., 2018; Espinosa-Leal i in., 2018; Wawrosch i Zotchev 2021). Obecnie rosnące zapotrzebowanie na zrównoważoną produkcję biomasy, roślin leczniczych i funkcjonalnych, a także na ochronę zagrożonych ekosystemów, kieruje uwagę ku kulturze komórkowej jako kluczowemu elementowi przyszłościowej bioekonomii.

Jednym z najważniejszych trendów jest rozwój biofabryk roślinnych, czyli zautomatyzowanych systemów produkcji wykorzystujących komórki, tkanki lub organoidy roślinne do wytwarzania związków aktywnych na skalę przemysłową. Takie „zielone fabryki” działają niezależnie od sezonowości, zmian klimatu czy presji patogenów, a ich produkty są bardziej jednolite i wolne od zanieczyszczeń rolniczych. Już dziś bioreaktory z kulturami *Panax ginseng*, *Taxus spp.*, *Nicotiana tabacum* czy *Hypericum perforatum* są wykorzystywane do produkcji suplementów, kosmetyków, związków immunomodulujących i neuroaktywnych (Krasteva i in., 2020; Babich i in., 2020). W najbliższych latach spodziewać się można miniaturyzacji tych systemów i integracji z algorytmami sterowania opartymi na sztucznej inteligencji.

Równolegle rozwija się wykorzystanie kultur *in vitro* do biosyntezy białek terapeutycznych, takich jak przeciwciała monoklonalne, enzymy, hormony roślinne i szczepionki. Transformowane komórki tytoniu, marchwi czy ziemniaka mogą produkować rekombinowane białka identyczne z ludzkimi, a ich ekspresję można regulować światłem lub chemicznymi induktorami. Technologia ta, znana jako „plant molecular farming”, już została zastosowana do produkcji szczepionki przeciw COVID-19 (*Medicago*), a także leków na choroby rzadkie. Udoskonalona kontrola nad ekspresją genów, w połączeniu z systemami oczyszczania białek z pożywki hodowlanej, może zrewolucjonizować rynek biofarmaceutyków (Singh i in., 2025).

W obszarze ochrony środowiska i rolnictwa, kultury *in vitro* odgrywają coraz większą rolę w tzw. biotechnologii regeneratywnej, która stawia sobie za cel nie tylko produkcję, ale i odbudowę zasobów biologicznych. Umożliwia to np. odtworzenie populacji roślin stepowych i torfowiskowych, bez ryzyka nadmiernej eksploatacji siedlisk naturalnych. Rośliny uzyskane *in vitro* mogą być wprowadzane na obszary zdegradowane, jako czynniki umożliwiające fitoremediację i regenerację gleby, a ich produkcja nie wymaga eksploatacji zasobów naturalnych (Custódio i in., 2022). Coraz więcej badań wskazuje, że podobne podejście można zastosować

także w odniesieniu do komercyjnego zastosowania w rolnictwie mikroorganizmów glebowych, w tym bakterii i grzybów mikoryzowych, które mogą być utrzymywane i namnażane w kulturach *in vitro*. Umożliwia to kontrolowane namnażanie szczepów korzystnych dla roślin i ich aplikację w rolnictwie jako biostymulantów poprawiających wzrost, dostępność składników pokarmowych i odporność roślin na stres. Jak podkreślają Sharma i Jain (2022), rozwój takich technologii może znacząco ograniczyć zużycie nawozów mineralnych i przyczynić się do odbudowy mikrobiomu glebowego w rolnictwie ekologicznym. Nowe możliwości otwiera także rozwój biosensorów roślinnych, czyli kultur komórkowych reagujących ekspresją genów reporterowych na obecność związków toksycznych, pestycydów, metali ciężkich lub mikroorganizmów. Linie takie mogą być wykorzystywane do szybkiej oceny jakości gleby, wody czy żywności – zarówno w laboratoriach, jak i w mobilnych systemach terenowych (Oluwaseun Adegunji i in., 2022).

Istotną perspektywą jest także rosnące znaczenie kultur *in vitro* w kontekście zmian klimatu. Dzięki możliwości selekcji linii odpornych na suszę, zasolenie czy ekstremalne temperatury, możliwe będzie tworzenie roślin uprawnych przystosowanych do zmieniających się warunków agroklimatycznych. Już teraz w warunkach *in vitro* testowane są prototypy odmian *Oryza sativa*, *Solanum tuberosum* i *Zea mays* zdolnych do wydajnej fotosyntezy przy niedoborze wody lub nadmiarze jonów metali (Gupta i in., 2024; Mansinhos i in., 2024).

Wreszcie, rosnąca świadomość społeczna i naciski ekologiczne będą sprzyjały wykorzystaniu kultur *in vitro* do produkcji surowców kosmetycznych, spożywczych i suplementów, które nie wymagają niszczenia populacji dzikich roślin. Już dziś niektóre marki kosmetyczne deklarują całkowite przejście na ekstrakty z hodowli komórkowych zamiast ekstraktów z roślin dziko rosnących, na przykład fenoli czy alkaloidów (Bennur i in., 2025; Krasteva i in., 2020).

Można przypuszczać, że technologie *in vitro* będą także sprzęgane z narzędziami bioinformatycznymi, analizą „big data” i modelowaniem

metabolicznym, co pozwoli jeszcze skuteczniej projektować linie komórkowe o pożądanych cechach. Ich potencjał jako narzędzi badawczych, produkcyjnych i środowiskowych będzie tylko rósł – czyniąc z kultur *in vitro* jeden z filarów zielonej biotechnologii XXI wieku.

PODSUMOWANIE

Kultury *in vitro* roślin stanowią dziś jedno z najważniejszych narzędzi współczesnej biotechnologii – zarówno w badaniach podstawowych, jak i w zastosowaniach przemysłowych, medycznych, rolniczych czy środowiskowych. Dzięki zdolności do kontrolowanej regeneracji tkanek i komórek, systemy te pozwalają nie tylko na masowe rozmnażanie roślin i pozyskiwanie metabolitów wtórnych o wysokiej wartości biologicznej, ale także na ochronę zagrożonych gatunków, rekultywację terenów zdegradowanych oraz projektowanie nowych biosystemów o określonych funkcjach.

Rozwój technik mikrorozmnażania, elicytacji, inżynierii metabolicznej i bioreaktorów zanurzeniowych pozwolił znacząco zwiększyć wydajność produkcji związków aktywnych, takich jak alkaloidy, flawonoidy, terpenoidy czy antocyjany. W połączeniu z możliwościami transformacji genetycznej i precyzyjnego kierowania ekspresją genów, kultury *in vitro* stają się realną alternatywą dla konwencjonalnych upraw – szczególnie w kontekście globalnych wyzwań: zmian klimatu, degradacji gleb, kurczenia się bioróżnorodności oraz rosnącego zapotrzebowania na zielone technologie.

Z uwagi na swoją elastyczność, skalowalność i ekologiczny charakter, kultury komórek roślinnych mogą odegrać kluczową rolę w kształtowaniu przyszłości bioekonomii. Wydaje się, że ich potencjał nie został jeszcze w pełni wykorzystany – ale rozwój automatyzacji, narzędzi bioinformatycznych, biosensorów i bioreaktorów nowej generacji sprawia, że technologie *in vitro* wchodzą dziś w fazę dynamicznej ekspansji. Są one nie tylko odpowiedzią na współczesne problemy cywilizacyjne, ale też propozycją zrównoważonej drogi rozwoju opartej na biologii, precyzji i szacunku dla zasobów przyrody.

BIBLIOGRAFIA

- Agrawal, A., Gowthami, R., Chander, S., Srivastava, V., 2022. Sustainability of in vitro genebanks and cryogenebanks, 180–184. <https://doi.org/10.5958/0976-1926.2022.00065.1>
- Ahmad, Z., Shareen Ganie, I.B., Firdaus, F., Ramakrishnan, M., Shahzad, A. i in., 2024. Enhancing Withanolide Production in the Withania Species: Advances in In Vitro Culture and Synthetic Biology Approaches. *Plants*, 13(15), 2171. <https://doi.org/10.3390/plants13152171>
- Alanagh, E.N., Garoosi, G.A., Haddad, R., Maleki, S., Landín, M., i in., 2014. Design of tissue culture media for efficient *Prunus* rootstock micropropagation using artificial intelligence models. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 117(3), 349–359. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0444-1>
- Babich, O., Sukhikh, S., Pungin, A., Ivanova, S., Asyakina, L. i in., 2020. Modern trends in the in vitro production and use of callus, suspension cells and root cultures of medicinal plants. *Molecules*, 25(24), 5805. <https://doi.org/10.3390/molecules25245805>
- Bairu, M.W., Kane, M.E., 2011. Physiological and developmental problems encountered by in vitro cultured plants. *Plant Growth Regulators*, 63, 101–103. <https://doi.org/10.1007/s10725-011-9565-2>
- Behera, P.P., Sivasankarreddy, K., Prasanna, V.S.S.V., 2022. Somatic embryogenesis and plant regeneration in horticultural crops. *W: Commercial scale tissue culture for horticulture and plantation crops*, pp. 197–217. Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-19-0055-6_9
- Bennur, P. L., O'Brien, M., Fernando, S. C., Doblin, M. S., 2025. Improving transformation and regeneration efficiency in medicinal plants: insights from other recalcitrant species. *Journal of Experimental Botany*, 76(1), 52–75. <https://doi.org/10.1093/jxb/erae189>
- Bernaś, E., Słupski, J., Gębczyński, P., Rażná, K., Žiarovská, J., 2023. Chemical Composition and Genome Pattern as a Means of Identifying the Origin of Preserved Wild Garlic (*Allium ursinum* L.) in Poland. *Agriculture*, 14(1), 20. <https://doi.org/10.3390/agriculture14010020>
- Betekhtin, A., Hus, K., Rojek-Jelonek, M., Kurczynska, E., Nibau, C., Doonan, J. H., i Hasterok, R. (2020). In vitro tissue culture in *Brachypodium*: applications and challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 1037. <https://doi.org/10.3390/ijms21031037>
- Bettoni, J.C., Wang, M.R., Wang, Q.C., 2024. In vitro regeneration, micropropagation and germplasm conservation of horticultural plants. *Horticulturae*, 10(1), 45. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10010045>
- Bhattacharyya, P., Kumaria, S., Tandon, P., 2016. High frequency regeneration protocol for *Dendrobium nobile*: a model tissue culture approach for propagation of medicinally important orchid species. *South African Journal of Botany*, 104, 232–243. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.11.013>
- Bonga, M., J., Klimaszewska, K., K., Aderkas, V., 2010. Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 100, 241–254. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9647-2>
- Brudzyńska, P., Sionkowska, A., Grisel, 2021. Plant-derived colorants for food, cosmetic and textile industries: A review. *Materials*, 14(13), 3484. <https://doi.org/10.3390/ma14133484>
- Chandana, B.C., Kumari Nagaveni, H.C., Lakshmana, D., Shashikala, S.K., Heena, M.S., 2018. Role of plant tissue culture in micropropagation, secondary metabolites production and conservation of some endangered medicinal crops. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3, 246–251.
- Chen, J.Y., Yue, R.Q., Xu, H.X., Chen, X.J., 2006. Study on plant regeneration of wheat mature embryos under endosperm-supported culture. *Agricultural Sciences in China*, 5(8), 572–578. [https://doi.org/10.1016/s1671-2927\(06\)60094-1](https://doi.org/10.1016/s1671-2927(06)60094-1)
- Chokheli, V.A., Dmitriev, P.A., Rajput, V.D., Bakulin, S.D., Azarov, A.S., 2020. Recent development in micropropagation techniques

- for rare plant species. *Plants*, 9(12), 1733. <https://doi.org/10.3390/plants9121733>
- Coelho, N., Gonçalves, S., Romano, A., 2020. Endemic plant species conservation: Biotechnological Approaches. *Plants*, 9(3), 345. <https://doi.org/10.3390/plants9030345>
- Corlett, T.R., 2016. Plant diversity in a changing world: status, trends, and conservation needs. *Plant Diversity*, 38(1), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2016.01.001>
- Corlett, T.R., 2024. The ecology of plant extinctions. *Trends in Ecology i Evolution*, 40(3), 286–295. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2024.11.007>
- Cranenbrouck, S., Voets, L., Bivort, C., Renard, L., Strullu, DG., Declerck, S., 2005. Methodologies for in Vitro Cultivation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi with Root Organs. W: Declerck, S., Fortin, J.A., Strullu, DG. (red.) *In Vitro Culture of Mycorrhizas*. Soil Biology, vol 4. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-27331-X_18
- Custódio, L., Charles, G., Magné, C., Barba-Espín, G., Piqueras, A., i in., 2022. Application of in vitro plant tissue culture techniques to halophyte species: A review. *Plants*, 12(1), 126. <https://doi.org/10.3390/plants12010126>
- Custódio, L., Cziáky, Z., Castañeda-Loaiza, V., Rodrigues, M.J., 2024. Establishment and elicitation of liquid adventitious root cultures of *Inula crithmoides* L. for increased caffeoylquinic acids production and hepatoprotective properties. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 156(2), 59. <https://doi.org/10.1007/s11240-024-02690-z>
- Dziurka, M., Kubica, P., Kwiecień, I., Biesaga-Kościelniak, J., Ekiert, H. i in., 2021. In vitro cultures of some medicinal plant species (*Cistus*× *incanus*, *Verbena officinalis*, *Scutellaria lateriflora*, and *Scutellaria baicalensis*) as a rich potential source of antioxidants – Evaluation by CUPRAC and QUENCHER-CUPRAC assays. *Plants*, 10(3), 454. <https://doi.org/10.3390/plants1003045>
- Ebert, W.A., Engels, M.J., 2020. Plant biodiversity and genetic resources matter!. *Plants*, 9(12), 1706. <https://doi.org/10.3390/plants9121706>
- Efferth, T., 2019. Biotechnology applications of plant callus cultures. *Engineering*, 5(1), 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>
- Escobedo-GraciaMedrano, R.M., Enríquez-Valencia, A.J., Youssef, M., López-Gómez, P., Cruz-Cárdenas, C.I. i in., 2016. Somatic Embryogenesis in Banana, *Musa ssp.* W: *Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications*, 381–400. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_21
- Espinosa-Leal, A.C., Puente-Garza, A.C., García-Lara, 2018. In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
- Garrocho-Villegas, V., Jesús-Olivera, T.M., Quintanar, E.S., 2012. Maize somatic embryogenesis: recent features to improve plant regeneration. *Plant Cell Culture Protocols*, 173–182. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4_14
- Gautheret, J.R., 1983. Plant tissue culture: A history. *The Botanical Magazine= Shokubutsu-gaku-zasshi*, 96, 393–410.
- Gogoi, M.B., Chetia, I., Sarmah, B.K., Nath, T., Bhowal, S. i in., 2020. Study of androgenesis in (*Musa balbisiana*) cv. Bhimkol banana and in vitro regeneration of haploids using isolated microspore culture. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9, 2555–2565. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.909.320>
- Gupta, N., Bhattacharya, S., Dutta, A., Cusimamani, E.F., Milella, L., 2024. In vitro synthetic polyploidization in medicinal and aromatic plants for enhanced phytochemical efficacy – a mini-review. *Agronomy*, 14(8), 1830. <https://doi.org/10.3390/agronomy14081830>
- Hano, C., Abbasi, H.B., 2021. Plant-based green synthesis of nanoparticles: Production, characterization and applications. *Biomolecules*, 12(1), 31. <https://doi.org/10.3390/biom12010031>
- Hasnain, A., Naqvi, S.A.H., Ayesha, S.I., Khalid, F., Ellahi, M. i in., 2022. Plants in vitro propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches.

- Frontiers in Plant Science, 13, 1009395. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1009395>
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., Iwase, 2013. Plant callus: mechanisms of induction and repression. *Plant Cell*, 25(9), 3159–3173. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>
- Kaushal, N., Srivastava, V., Singh, S., Gangwar, R., Singh, P. i in., 2023. A comprehensive review on role of plant tissue culture in ornamental crops: cultivation factors, applications and future aspects. *International Journal of Environment and Climate Change*, 13(11), 1802–1815. <https://doi.org/10.9734/ijec/2023/v13i113337>
- Kaviani, B., Kulus, D., 2022. Cryopreservation of endangered ornamental plants and fruit crops from tropical and subtropical regions. *Biology*, 11(6), 847. <https://doi.org/10.3390/biology11060847>
- Kougioumoutzis, K., Tsakiri, M., Kokkoris, I.P., Trigas, P., Iatrou, G. i in., 2024. Assessing the vulnerability of medicinal and aromatic plants to climate and land-use changes in a Mediterranean biodiversity hotspot. *Land*, 13(2), 133. <https://doi.org/10.3390/land13020133>
- Krasteva, G., Georgiev, V., Pavlov, A., 2020. Recent applications of plant cell culture technology in cosmetics and food industries. *Engineering in Life Sciences*, 20(12), 531–540. <https://doi.org/10.1002/elsc.202000078>
- Kulus, D., Tymoszek, A., 2024. Advancements in In Vitro Technology: A Comprehensive Exploration of Micropropagated Plants. *Horticulturae*, 10(1), 88. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10010088>
- Loyola-Vargas, M.V., Ochoa-Alejo, N., 2018. An introduction to plant tissue culture: advances and perspectives. *Plant Cell Culture Protocols*, 3–13. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_1
- Loyola-Vargas, M.V., Ochoa-Alejo, N., 2024. An Introduction to Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Current Status and Perspectives. *Plant Cell Culture Protocols*, 1–13. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3954-2_1
- Mansinhos, I., Gonçalves, S., Romano, A., 2024. How climate change-related abiotic factors affect the production of industrial valuable compounds in Lamiaceae plant species: a review. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1370810. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1370810>
- McFarland, L.F., Kaeppeler, F.H., 2025. History and current status of embryogenic culture-based tissue culture, transformation and gene editing of maize (*Zea mays* L.). *Plant Genome*, 18(1), e20451. <https://doi.org/10.1002/tpg2.20451>
- Mikuła, A., Chmielarz, P., Hazubska-Przybył, T., Kulus, D., Maślanka, M. i in., 2022. Cryopreservation of Plant Tissues in Poland: Research Contributions, Current Status, and Applications. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 91. <https://doi.org/10.5586/asbp.9132>
- Miroshnichenko, D., Chaban, I., Chernobrovkina, M., Dolgov, S., 2017. Protocol for efficient regulation of in vitro morphogenesis in einkorn (*Triticum monococcum* L.), a recalcitrant diploid wheat species. *PLoS One*, 12(3), e0173533. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173533>
- Miroshnichenko, T.M., Ivchenko, T.V., Bashatan, N.O., Mozgovska, H.V., 2023. Medium Composition For In Vitro Mid-Term Storage Of *Solanum Habrochaites* Test-Tube Plants. *Vegetable and Melon Growing*, (74), 6–18. <https://doi.org/10.32717/0131-0062-2023-74-6-18>
- Monder, J.M., Pacholczak, A., Zajączkowska, M., 2024. Directions in Ornamental Herbaceous Plant Selection in the Central European Temperate Zone in the Time of Climate Change: Benefits and Threats. *Agriculture*, 14(12), 2328. <https://doi.org/10.3390/agriculture14122328>
- Moraes, M.R., Cerdeira, L.A., Lourenço, M.V., 2021. Using micropropagation to develop medicinal plants into crops. *Molecules*, 26(6), 1752. <https://doi.org/10.3390/molecules26061752>
- Oluwaseun Adetunji, C., Mathew, J.T., Inobeme, A., Olaniyan, O.T., RB Singh, K. i in., 2022. Microbial and plant cell biosensors for environmental monitoring. W: *Nano-*

- biosensors for Environmental Monitoring, Singh, R.P., Ukhurebor, K.E., Singh, J., Ade-tunji, C.O., Singh, K.R. (red.), pp. 175–190. Springer International Publishing, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-16106-3_9
- Patiño, D., Figueroa, L.T., 2025. Micropropagation of banana cv. Williams through temporary immersion system: Response to explant density and plant growth regulators. *Agroindustrial Science*, 15(1), 49–54. <https://doi.org/10.17268/agroind.sci.2025.01.05>
- Perzanowska, J., Korzeniak, J., 2020. Red list of Natura 2000 habitat types of Poland. *Journal for Nature Conservation*, 56, 125834. <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2020.125834>
- Petrova, M., Zayova, E., Geneva, M., Dimitrova, L., Vitkova, A. i in., 2021. Multiplication and conservation of threatened medicinal plant *Arnica montana* L. by in vitro techniques. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 86(1), 57–65.
- Peyret, H., Steele, J.F., Jung, J.W., Thuene-mann, E.C., Meshcheriakova, Y. i in., 2021. Producing vaccines against enveloped viruses in plants: Making the impossible, difficult. *Vaccines*, 9(7), 780. <https://doi.org/10.3390/vaccines9070780>
- Podwyszyńska, M., Orlikowska, T., Trojak-Goluch, A., Wojtania, A., 2022. Application and improvement of in vitro culture systems for commercial production of ornamental, fruit, and industrial plants in Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 91(1), 914. <https://doi.org/10.5586/asbp.914>
- Posmyk, M.M., Szafrńska, K., 2016. Biostimulators: a new trend towards solving an old problem. *Frontiers in Plant Science* 7, 748. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00748>
- Priyanka, V., Kumar, R., Dhaliwal, I., Kaushik, P., 2021. Germplasm conservation: instrumental in agricultural biodiversity—a review. *Sustainability*, 13(12), 6743. <https://doi.org/10.3390/su13126743>
- Radomir, A.M., Stan, R., Florea, A., Ciobotea, C.M., Bănuță, F.M. i in., 2023. Overview of the success of in vitro culture for ex situ conservation and sustainable utilization of endemic and subendemic native plants of Romania. *Sustainability*, 15(3), 2581. <https://doi.org/10.3390/su15032581>
- Rajan, R.P., Singh, G.U.R.P.R.E.E.T., 2021. A review on application of somaclonal variation in important horticulture crops. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 22, 161–175. <https://doi.org/10.51470/plantarchives.2021.v21.s1.103>
- Ramachandra Rao, S., Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2), 101–153. [https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(02\)00007-1](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(02)00007-1)
- Ruta, C., Lambardi, M., Ozudogru, E.A., 2020. Biobanking of vegetable genetic resources by in vitro conservation and cryopreservation. *Biodiversity and Conservation*, 29, 3495–3532. <https://doi.org/10.1007/s10531-020-02051-0>
- Saha, S., Chowdhury, T., Ghosh, P., 2022. Micropropagation for Stress Tolerance in Crop Plants: An Overview. W: *Response of Field Crops to Abiotic Stress*, 241–249, CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003258063-20>
- Sarmah, D., Kolukunde, S., Sutradhar, M., Singh, B. K., Mandal, T. i in., 2017. A review on: in vitro cloning of orchids. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(9), 1909–27. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.609.235>
- Schenk, R.U., Hildebrandt, A.C., 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, 50(1), 199–204.
- Singh, D., Srivastava, S., Verma, S.K., Singh, V., 2025. *Advances in Medicinal Plant Biotechnology and Future Directions*. W: *Biotechnology, Multiple Omics, and Precision Breeding in Medicinal Plants*, pp. 258–269, CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003475491-19>
- Singh, R.K., Chokheli, V.A., 2025. *Plant Biotechnology: Applications in In Vitro Plant Conservation and Micropropagation*. *Horticulturae*, 11(4), 358. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11040358>

- Sharma, P., i Jain, S.M., 2024. Micropropagation Applications in Conservation of Horticultural Crops. Sustainable Utilization and Conservation of Plant Genetic Diversity (pp. 683–710). Singapore: Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-99-5245-8_20
- Sochacki, D., Marciniak, P., Zajączkowska, M., Treder, J., Kowalicka, P., 2024. In situ and ex situ conservation of Ornamental Geophytes in Poland. Sustainability, 16(13), 5375. <https://doi.org/10.3390/su16135375>
- Solís-Ramos, L.Y., Andrade-Torres, A., Carbonell, L.A.S., Salín, C.M.O., de la Serna, E.C., 2012. Somatic embryogenesis in recalcitrant plants. W: Embryogenesis. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/35967>
- Solórzano-Acosta, R., Guerrero-Padilla, M., 2020. Design and Construction of a Pneumatic Temporary Immersion Bioreactor System for the Multiplication of Ananas comosus var. Trujillana Red. American Journal of Plant Sciences, 11(9), 1429–1442. <https://doi.org/10.4236/ajps.2020.119103>
- Teixeira da Silva, J.A., Gulyás, A., Magyar-Tábori, K., Wang, M.R., Wang, Q.C., i in., 2019. In vitro tissue culture of apple and other Malus species: recent advances and applications. Planta, 249(4), 975–1006. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03100-x>
- Thorpe, A.T., 2000. History of plant cell culture. W: Loyola-Vargas, V.M., Vázquez-Flota, F. (red.), Plant Cell Tissue Culture. Techniques and Experiments, 1–32, Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-959-1:009>
- Tienaho, J., Reshamwala, D., Karonen, M., Silvan, N., Korpela, L. i in., 2021. Field-grown and in vitro propagated round-leaved sundew (*Drosera rotundifolia* L.) show differences in metabolic profiles and biological activities. Molecules, 26(12), 3581. <https://doi.org/10.3390/molecules26123581>
- Tiwari, P., Sharma, A., Bose, S.K., Park, K. I., 2024. Advances in orchid biology: biotechnological achievements, translational success, and commercial outcomes. Horticulturae, 10(2), 152. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10020152>
- Tripathi, M.K., Tiwari, S., Tripathi, N., Tiwari, G., Bhatt, D. i in., 2021. Plant tissue culture techniques for conservation of biodiversity of some plants appropriate propagation in degraded and temperate areas. Current Topics in Agricultural Sciences; BP International Publisher: Bhanjipur, India, 4, 30–60. <https://doi.org/10.9734/bpi/ctas/v4/2119c>
- Venkataraman, S., Khan, I., Habibi, P., Le, M., Lippert, R. i in., 2023. Recent advances in expression and purification strategies for plant made vaccines. Frontiers in Plant Science, 14, 1273958. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1273958>
- Walters, C., Pence, V.C., 2021. The unique role of seed banking and cryobiotechnologies in plant conservation. Plants, People, Planet, 3(1), 83–91. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10121>
- Wang, M.R., Bettoni, J.C., Zhang, A.L., Lu, X., Zhang, D. i in., 2022. In vitro micrografting of horticultural plants: Method development and the use for micropropagation. Horticulturae, 8(7), 576. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8070576>
- Wang, Z., Xing, Y., Zhao, C., Ren, S., Wu, J. i in., 2023. The RUBY reporter enables efficient haploid identification in maize and tomato. Plant Biotechnology Journal, 21(3), 654–656. <https://doi.org/10.1111/pbi.14071>
- Wawrosch, C., Zotchev, S.B., 2021. Production of bioactive plant secondary metabolites through in vitro technologies—status and outlook. Applied Microbiology and Biotechnology, 105(18), 6649–6668. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11539-w>
- Yusibov, V., Kushnir, N., Streatfield, S.J., 2016. Antibody production in plants and green algae. Annual Review of Plant Biology, 67(1), 669–701. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111812>
- Zhang, H., Li, Y., Zhu, J.K., 2018. Developing naturally stress-resistant crops for a sustainable agriculture. Nature Plants, 4(12), 989–996. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0309-4>
- Zhu, L., Zhou, L., Li, J., Chen, Z., Wang, M. i in., 2024. Regeneration of ornamental plants:

- current status and prospects. *Ornamental Plant Research*, 4: e022. <https://doi.org/10.48130/opr-0024-0022>
- Zimnoch-Guzowska, E., Chmielarz, P., Wawrzyniak, M.K., Plitta-Michalak, B.P., Michalak, M. i in., 2022. Polish cryobanks: Research and conservation of plant genetic resources. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 91, 9121. <https://doi.org/10.5586/asbp.9121>
- Żabicka, J., Żabicki, P., Słomka, A., Jędrzejczyk-Korycińska, M., Nowak, T. i in., 2021. Genotype-dependent mass somatic embryogenesis: a chance to recover extinct populations of *Pulsatilla vulgaris* Mill. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 146, 345–355. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02074-7>
- Żabicki, P., Sliwinska, E., Mitka, J., Sutkowska, A., Tuleja, M. i in., 2019. Does somaclonal variation play advantageous role in conservation practice of endangered species?: comprehensive genetic studies of in vitro propagated plantlets of *Viola stagnina* Kit. (Violaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 136, 339–352. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1519-1>

STRESZCZENIE GRAFICZNE



