

## Czy kultury *in vitro* gatunków roślin chronionych mogą być źródłem surowców do badań fitochemicznych i biologicznych?

### *Can in vitro cultures of protected plant species be a source of raw materials for phytochemical and biological studies?*

Małgorzata Kikowska, Natalia Turowska, Barbara Thiem

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Medyczny

im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

#### Streszczenie

Duże znaczenie w poszukiwaniu leków posiadają rośliny, które są źródłem ogromnej liczby metabolitów wtórnych. Większość badanych związków wyodrębniana jest z roślin pochodzących z upraw polowych, jednak nadal część surowców roślinnych pochodzi ze stanowisk naturalnych. Problem stwarzają gatunki roślin rzadkich i chronionych, których zbiór i uprawa są ograniczone lub niemożliwe. Dostęp do tych surowców jest możliwy dzięki zastosowaniu metod biotechnologicznych. Powodem wprowadzania do kultur *in vitro* roślin chronionych jest niedostępność materiału roślinnego, a przez to brak możliwości badań tych taksonów. Często bogaty zestaw związków o działaniu biologicznym pozostaje niezbadany, a potencjał roślin niewykorzystany. Metody mikrorozmnażania roślin i inne systemy wzrostowe *in vitro* pozwalają na namnożenie biomasy roślinnej z przeznaczeniem do badań fitochemicznych i biologicznych. Praca ma na celu przedstawienie problemów związanych z prowadzeniem badań z zakresu kultur *in vitro* roślin objętych w Polsce ochroną gatunkową, na przykładzie: mikołajka nadmorskiego, maliny moroszki oraz zimoziołu północnego. (*Farm Współ* 2019; 12: 210-217)

*Słowa kluczowe: kultury komórkowe i tkankowe, metabolity wtórne, Eryngium maritimum, Rubus chamaemorus, Linnaea borealis*

#### Abstract

Plants, which are the source of many secondary metabolites, are of great importance in the search for drugs. Most of the compounds are extracted from field crops, but still some of the plant raw materials come from natural sites. The collection and cultivation of rare and protected plants are limited or impossible. Access to these raw materials is possible due to the use of biotechnological methods. The reason for introducing protected plants into *in vitro* cultures is the inaccessibility of plant material, and thus the inability to study these taxa. Often, a rich set of compounds with a biological activity remains unexplored and the potential of plants unused. Micropropagation methods and other *in vitro* growth systems allow plant biomass to be multiplied for phytochemical and biological research. The aim of the work is to present problems related to conducting research in the field of *in vitro* cultures of plants under species protection in Poland, on the example of: sea holly, cloudberry and twinflower. (*Farm Współ* 2019; 12: 210-217)

*Keywords: cell and tissue cultures, secondary metabolites, Eryngium maritimum, Rubus chamaemorus, Linnaea borealis*

#### Wstęp

Przemysł farmaceutyczny odgrywa rolę ważnego sektora światowej gospodarki. Coraz głębsze zrozumienie mechanizmu wielu chorób, wzrost cen leków otrzymywanych na drodze pełnej syntezy lub półsyntezy

oraz nierzadko ich nieskuteczność stawia przed nim wyzwania i zmusza do poszukiwania alternatywnych źródeł pozyskiwania nowych substancji o aktywności farmakologicznej. Duże znaczenie w poszukiwaniu leków posiadają rośliny, które są źródłem ogromnej

liczby metabolitów wtórnych. Wśród dużej liczby nowych związków wyodrębnianych z roślin, część wykazuje obiecujące działanie biologiczne bądź farmakologiczne i wprowadzana jest do programów badań klinicznych [1]. Z obecnie znanych ponad 20 000 związków chemicznych pochodzenia roślinnego, to zwykle substancje o bardzo złożonej strukturze. Pozyskiwanie wyselekcjonowanych bioaktywnych związków na drodze syntezy chemicznej jest często procesem wieloetapowym i stąd nieopłacalnym. Rosnące zapotrzebowanie na produkty pochodzenia roślinnego skłania wiele ośrodków naukowych do poszukiwania nowych źródeł substancji o aktywności biologicznej [2].

W roślinach rosnących w warunkach naturalnych i uprawach polowych biosynteza wielu metabolitów wtórnych przebiega na ogół z bardzo małą wydajnością, zależną od sezonowości upraw. Ponadto dostępność surowców roślinnych może być ograniczona ze względu na specyfikę wymagań klimatycznych i siedliskowych, postępującą degradację środowiska naturalnego, a także powolny wzrost roślin i niekiedy kilkuletnie wykształcanie organów stanowiących wartościowy surowiec. Dostępność do szeregu roślin rosnących w środowisku naturalnym jest także mocno ograniczona z uwagi na ich ścisłą lub częściową ochronę gatunkową. Zwiększające się zanieczyszczenie i niekorzystne zmiany zachodzące w środowisku naturalnym, skutkują kurczeniem się zasobów roślinnych, a zbiór surowców z upraw polowych prowadzonych w takich rejonach staje się problematyczny. Alternatywnym rozwiązaniem tych ograniczeń może być produkcja pożądaných metabolitów w biomacie roślinnej otrzymywanej z zastosowaniem metod biotechnologicznych [3,4].

Aby można przeprowadzać badania nad gatunkami chronionymi w Polsce należy uzyskać specjalne zezwolenia od właściwych organów ochrony środowiska i od dyrekcji Parku Narodowego bądź Ogrodu Botanicznego, w zależności od miejsca pozyskania roślin. Takie zezwolenia w precyzyjny sposób określają liczbę pozyskanych roślin lub organów oraz czas prowadzenia badań nad chronionymi gatunkami. Ponadto, instytucje wydające te zezwolenia nakładają obowiązek przekazania sprawozdań z przeprowadzonych badań. Wszystkie regulacje dotyczące dostępu do zasobów genetycznych, sposobu oraz sprawiedliwego podziału korzyści z ich wykorzystania reguluje rozporządzenie opracowane zgodnie z postanowieniami

„Protokołu z Nagoi” i Konwencji o różnorodności biologicznej [5,6].

### **Roślinne kultury *in vitro* alternatywnym źródłem bioaktywnych związków**

Roślinne kultury *in vitro* szeregu gatunków roślin leczniczych umożliwiają produkcję odnawialnej biomasy, zwykle z wysoką zdolnością do biosyntezy pożądaných związków, o tej samej stereometrii optycznej co w naturze, dostarczając wartościowego surowca. W kulturach *in vitro* możliwa jest optymalizacja procesów biosyntezy, niezależnie od pór roku. Biomasa, będąca surowcem, otrzymywana jest w stałych kontrolowanych warunkach, w myśl Dobrej Praktyki Laboratoryjnej i Dobrej Praktyki Wytwarzania (GLP i GMP), co zapewnia wysoką jakość i dużą wartość potencjalnych biotechnologicznych surowców. Istotną zaletą kultur *in vitro* jest możliwość intensyfikacji biosyntezy oraz wpływania na zwiększenie akumulacji pożądaných metabolitów w biomacie, z wykorzystaniem różnych zabiegów biotechnologicznych. Najczęściej stosowane są: optymalizacja składu mineralnego i hormonalnego podłoża hodowlanego, selekcja wysokoproduktywnych linii oraz elicytacja kultur. W warunkach *in vitro* możliwe jest otrzymywanie biomasy w ciągłym procesie produkcyjnym na dużą skalę [7-10].

Roślinne kultury *in vitro*, niezależne od wymienionych ograniczeń, pozwalają na wykorzystanie potencjału biochemicznego komórek w różnych systemach wzrostowych i stają się alternatywnym i obiecującym źródłem produkcji metabolitów wtórnych o komercyjnym znaczeniu. Szybka produkcja jednorodnej i odnawialnej biomasy zdolnej do biosyntezy substancji o aktywności farmakologicznej, a co najważniejsze możliwości ścisłego kontrolowania tego procesu i wpływania na zwiększenie akumulacji tych związków wskazują na możliwość szerszego stosowania metod biotechnologii w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym [2,11-13].

W wielu ośrodkach naukowych na świecie i w szeregu koncernach farmaceutycznych prowadzone są badania nad możliwością pozyskiwania związków z surowców roślin leczniczych otrzymywanych metodami biotechnologicznymi, a także programy badawcze w kierunku przemysłowego wytwarzania metabolitów wtórnych o właściwościach terapeutycznych w różnych roślinnych systemach *in vitro*, głównie w kulturach komórkowych. Ponadto, kultury roślinne

*in vitro* oraz dostępne narzędzia współczesnej biotechnologii mogą stanowić cenną metodę prowadzącą do ochrony zasobów genowych oraz dają możliwość namnożenia roślin rzadkich, ginących i chronionych o niezmięnionej wartości biologicznej [4,14,15].

Kultury *in vitro* roślin leczniczych mogą stanowić odnawialne źródło materiału roślinnego bogatego w metabolity wtórne, których produkcja w naturze zależna jest od zmieniających się warunków temperaturowych, oświetleniowych, czynników stresowych, infekcji lub roślinnych patogenów. Stosowanie pomieszczeń hodowlanych o kontrolowanych parametrach (fitotronów) zmniejsza problem zależności produkcji bioaktywnych związków od zmiennych warunków klimatycznych spowodowanych porami roku. Ponadto hodowle *in vitro* pozwalają uniknąć problemów związanych ze zbiorem, transportem i przechowywaniem materiału roślinnego do ekstrakcji – jednolity materiał dostępny jest przez cały rok. Jednym z aspektów wykorzystywania biotechnologii roślin jest mikrorozmnażanie, które stanowi alternatywną metodę otrzymywania mikrosadzonek wartościowych roślin, szybkie namnożenie klonalne ich elitarnych okazów [3,9]. Technika ta ma na celu otrzymywanie dużej liczby jednorodnych roślin, wykorzystując tylko niewielki fragment rośliny macierzystej. Mikrorozmnażanie roślin może dostarczyć odnawialną, niewyczerpalną ilość surowca, pozwalającą na ocenę profilu fitochemicznego, analizy ilościowe i zbadanie aktywności biologicznych ekstraktów, frakcji czy wyizolowanych związków, co jest szczególnie istotne w przypadku gatunków rzadkich, endemitów, roślin ginących i podlegających ochronie gatunkowej. Ponadto, stanowi alternatywną metodę mnożenia klonalnego roślin pochodzących z innej strefy klimatycznej, również takich, które nie zawiązują nasion lub posiadają niską siłę kiełkowania. Te taksony są zwykle słabo poznane, a mogą stanowić źródło cennych metabolitów wtórnych. Metoda rozmnażania klonalnego *in vitro* jest stosowana w celu szybkiego rozmnażania wielu gatunków roślin leczniczych, ich elitarnych okazów o dużej wartości jednostkowej [3,9].

W kulturach prowadzonych w warunkach *in vitro*, istnieje ryzyko wystąpienia tzw. zmienności somaklonalnej, która może prowadzić do zmian zawartości pożądaných związków i tym samym obniżać wartość surowca leczniczego. W przypadku roślin leczniczych szczególnie ważne jest zachowanie genetycznej stabilności i otrzymanie jednorodnego materiału

o tym samym chemotypie. Aby wykluczyć pojawienie się takiej zmienności, kultury i rośliny otrzymane w wyniku mikrorozmnażania powinny podlegać ocenie morfologicznej, fizjologicznej, cytogenetycznej, biochemicznej lub fitochemicznej [9].

Kultury komórkowe *in vitro* mogą być traktowane jako „biofabryki” do produkcji ważnych biofarmaceutyków, oferując szereg zalet w porównaniu z konwencjonalnym stosowaniem roślin jako źródła metabolitów wtórnych [7].

### ***Eryngium maritimum* L. – mikołajek nadmorski**

Mikołajek nadmorski z podrodziny *Saniculoideae* rodziny *Apiaceae* (selerowate) występuje wzdłuż wybrzeży Europy, Azji Mniejszej i północnej Afryki. W Polsce jego występowanie ograniczone jest do wąskiego odcinka wzdłuż wybrzeża Morza Bałtyckiego [16]. Mikołajek nadmorski uznawany jest w Polsce za roślinę zagrożoną wyginięciem i jest objęty całkowitą ochroną gatunkową [17]. Poważnymi zagrożeniami dla populacji tego gatunku są: zalesianie szarych wydym, kolekcjonowanie kwiatostanów do suchych bukietów oraz niszczenie siedlisk roślinnych przez postępujący rozwój gospodarczy [18].

W medycynie tradycyjnej i ziołolecznictwie europejskim korzenie mikołajka nadmorskiego i ich przetwory uznawane są: za środki moczopędne, napotne, wzmacniające, wykrztuśne a nawet afrodyzjaki. Surowiec stosowano jako preparat ułatwiający odkrzuszenie w zaawansowanej gruźlicy. Mikołajek pomagał prawdopodobnie w zapaleniu pęcherza i cewki moczowej, spowalniał formowanie kamieni nerkowych, także w przeroście lub zapaleniu prostaty. W badaniach naukowych udowodniono aktywność antyoksydacyjną, przeciwbakteryjną, przeciwwgrzybiczą, przeciwwzapalną i przeciwbólową mikołajka nadmorskiego [16].

Dotychczasowe badania fitochemiczne *Eryngium maritimum* wykazały obecność szeregu grup związków o charakterze metabolitów wtórnych: saponin triterpenowych, kwasów fenolowych, flawonoidów, olejków eterycznych, ekdysteroidów i betain. W latach 70-80-tych zespół Hillera po raz pierwszy wykrył i częściowo scharakteryzował kompleksy saponinowe w mikołajku. Čwierć wieku później badania Kowalczyka i współautorów pozwoliły na określenie struktury trzech dominujących saponin triterpenowych. Liczne saponiny występujące w kompleksach w ilościach śladowych

wymagają analiz z większej ilości surowca, który ze względu na ochronę gatunkową mikołajka jest niedostępny. Ponadto w *E. maritimum* wykryto obecność kwasu rozmarynowego, chlorogenowego i kawowego. Flawonoidy obecne w *E. maritimum* są nieliczne – występuje astragalina, 3-β-D-glukopiranozydo7-O-L-ramnopyranozyd kemferolu oraz izokwercytryna. Gatunek ten jest bogaty w liczne bioaktywne związki, wymagające szczegółowszych badań fitochemicznych i biologicznych, których przeprowadzenie będzie możliwe dzięki dostępności surowców otrzymanych metodami biotechnologicznymi [16,19].

Ponieważ owoce mikołajków szybko przechodzą w stan spoczynku do założenia kultur *in vitro* mikołajka nadmorskiego zastosowano fragmenty pędów z pąkami wierzchołkowymi i bocznymi rośliny rosnącej na sztucznej wydmy w Ogrodzie Botanicznym UAM w Poznaniu. Trudne warunki siedliskowe preferowane przez *E. maritimum*, jakimi są ubogie w składniki odżywcze wydmy nadmorskie, sugerowały zastosowanie pożywki Murashige i Skoog (MS) ze zredukowanymi o połowę stężeniami soli mineralnych i witamin oraz warianty o pełnym składzie. Mimo to najefektywniejsze mnożenie mikołajka nadmorskiego zaobserwowano na pełnych pożywkach MS uzupełnionych w 6-benzyloaminopurynę (1,0 mg l<sup>-1</sup> BAP) i kwas indolilo-3-octowy (1,0 mg l<sup>-1</sup> IAA). Najwyższy współczynnik mnożenia pędów wyniósł średnio 4 pędy potomne na eksplantat, co w porównaniu z innymi krajowymi gatunkami mikołajków jest wartością relatywnie niską. Ryzyko pojawienia się zmienności somaklonalnej wymusiło konieczność przeprowadzenia kontroli zregenerowanych w kulturach *in vitro* roślin, jednakże pędy mikołajka nadmorskiego, charakteryzowały się stabilnością genetyczną, co wykazała analiza cytogenetyczna metodą cytometrii przepływowej. Pędy mikołajka ukorzeniały się z dużą wydajnością, zależną od zastosowanego wariantu pożywki. 100% pędów na pożywce ½ MS w obecności IAA i 15 g l<sup>-1</sup> sacharozy tworzyło korzonki, a przeżywalność roślin przeniesionych do warunków *ex vitro* wynosiła 90%. Rośliny otrzymane w wyniku mikrorozmnażania wysadzone na poletko doświadczalne były zdrowe, żywotne, jednakowe morfologicznie w obrębie gatunku. W drugim roku wegetacji wytwarzały pędy kwiatostanowe, a następnie owoce [16,19, Figura 1].

Zawartość sumy kwasu rozmarynowego i chlorogenowego oznaczana metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) była prawie

12-krotnie wyższa w korzeniach roślin regenerowanych *in vitro* (8,668 mg g<sup>-1</sup> s.m.) niż w korzeniach roślin z gruntu (0,722 mg g<sup>-1</sup> s.m.). Suma obu kwasów w pędach z roślin hodowanych w warunkach *in vitro* (3,049 mg g<sup>-1</sup> s.m.) była ponad 6,7-razy wyższa niż w pędach rośliny gruntowej (0,452 mg g<sup>-1</sup> s.m.). Warunki hodowli *in vitro* wpłynęły również na zwiększenie akumulacji saponin triterpenowych, 4,4-krotnie w pędach (0,216 mg g<sup>-1</sup> s.m.) i 3,2-krotnie w korzeniach (2,124 mg g<sup>-1</sup> s.m.) mikrorozmnażanych roślin w porównaniu z analogicznymi organami roślin gruntowych (odpowiednio 0,049 mg g<sup>-1</sup> s.m., 0,667 mg g<sup>-1</sup> s.m.). Pod względem jakościowym i ilościowym korzenie są najlepszym źródłem bioaktywnych związków dla tego gatunku, z czego hodowla w warunkach *in vitro* dodatkowo zwiększyła ich zawartość [16,19].

### ***Rubus chamaemorus* L. – malina moroszka**

Malina moroszka (z rodziny *Rosaceae*) jest rośliną strefy borealno-arktycznej Eurazji i Ameryki Północnej. W Europie występuje głównie w krajach półwyspu skandynawskiego, na Wyspach Brytyjskich oraz w Estonii i na Łotwie. W Polsce posiada kilka rozproszonych stanowisk na Pomorzu, Warmii i Mazurach oraz w Sudetach. Na tych obszarach jako relikwit epoki lodowcowej, jest bardzo rzadka, zagrożona wyginięciem i z tego względu objęta ścisłą ochroną gatunkową. Gatunek wpisany jest do Polskiej Czerwonej Księgi Roślin [20]. Głównym źródłem zagrożenia nielicznych stanowisk taksonu jest osuszanie i eksploatacja torfowisk, jego naturalnych siedlisk [21].

W medycynie tradycyjnej krajów północnej Europy malina moroszka była często stosowana do leczenia szkorbutu, a także jako środek pomocniczy w leczeniu gorączki i biegunki. Obecnie napary z liści malin stosuje się w terapii neurastenii i nerwic na terenach Tybetu. Liście i owoce wykazują właściwości przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, hepatoprotekcyjne, antymutagenne i przeciwnowotworowe [21].

W Skandynawii jadalne owoce maliny moroszki mają duże znaczenie ekonomiczne, dlatego ich skład został już poznany. Owoce charakteryzują się wyjątkowo dużą zawartością kwasu elagowego (KE). Inne związki obecne w owocach to kwasy fenolowe i flawonole, glikozydy kwercetyny, kemferolu i mirycetyny. Owoce maliny moroszki zawierają olejek eteryczny,



w którym występuje wanilina i jej pochodne. W oleju wyzolowanym z nasion obecne są trójglicerole oraz kwasy tłuszczowe – linolowy, alfa-linolenowy, oleinowy, a także karoteny i tokoferole. Pomarańczowo zabarwione owoce zawierają rubiksantynę, pochodną karotenu oraz fitoestrogeny, witaminy A, B, C, D i E oraz związki mineralne. Kwas elagowy i elagotaniny, stanowiące dominującą grupę związków obecnych w owocach *R. chamaemorus*, charakteryzują się szerokim spektrum aktywności farmakologicznej [21,22].

Niekorzystne zmiany zachodzące na stanowiskach występowania *R. chamaemorus* powodują kurczenie się populacji tego gatunku na terenie Europy. Konwencjonalne rozmnażanie maliny moroszki jest nieefektywne, a jej uprawa jest praktycznie niemożliwa z uwagi na specyficzne wymaganie glebowo-wodne. Dlatego w ośrodkach naukowych w Polsce, Norwegii i Kanadzie podjęto próby rozmnażania maliny moroszki metodą kultur *in vitro*, techniką klonalnego rozmnażania *in vitro* ze szczytów pędów. Ta metoda pozwala zachować stabilność genetyczną rozmnażanych roślin i ich profil chemiczny [23-25].

Materiałem inicjalnym do założenia kultur *in vitro* były ok. 5 mm wierzchołki aseptycznych siewek otrzymanych z nasion norweskich roślin. Do namnażania pędów metodą pobudzania do rozwoju pąków bocznych zastosowano pożywkę MS uzupełnioną BAP i IBA (kwas indolilo-3-masłowy) w różnych stężeniach oraz suplementowaną siarczanem adeniny (SA). Najbardziej skuteczną była pożywka MS zawierająca 0,2 mg l<sup>-1</sup> BAP i 0,1 mg l<sup>-1</sup> IBA wzbogacona 80 mg l<sup>-1</sup> SA, o pH = 4,0, na której z jednego eksplantatu rozwijało się 12 mikropędów. W trudnym procesie ukorzeniania przyjęto dwuetapową procedurę indukcji korzeni. Pędy potraktowane auksyną umieszczono na podłożu pozbawionym regulatorów wzrostu i rozwoju roślin oraz obniżoną o połowę zawartością soli mineralnych – ½ MS. Dla otrzymanych w kulturze *in vitro* roślin przeprowadzono próby introdukcji na poletko doświadczalne Ogrodu Botanicznego UAM [23] (Rycina 1). Inni autorzy prowadzili próby reintrodukcji mikrorozmnażanych roślin na stanowiska naturalne w północnej Norwegii [24]. Dla maliny moroszki opracowano także procedurę namnażania pędów w bioreaktorze, wskazując na możliwość rozmnażania tego gatunku na dużą skalę [25].

Z uwagi na interesujący zestaw bioaktywnych związków i duży potencjał leczniczy owoców gatunku, a jednocześnie ogromny wpływ zmian pogodowych na

wzrost i owocowanie maliny moroszki, zainicjowano badania nad otrzymywaniem i mnożeniem kultur tkankowych i komórkowych w zawiesinie, w których stwierdzono zdolność do biosyntezy metabolitów wtórnych i oznaczono zawartość KE [26]. Opracowano także metodę kultur komórkowych *R. chamaemorus* na skalę przemysłową. Hodowane w bioreaktorach komórki zachowały zdolność do biosyntezy metabolitów wtórnych charakterystycznych dla roślin rosnących na naturalnych stanowiskach. Autorzy pracy podkreślają, że ekstrakty i izolowane związki z kalusa i kultury komórkowej maliny moroszki mogą znaleźć szerokie zastosowanie w przemyśle kosmetycznym i spożywczym [27].

Pozyskany z kultur *in vitro* materiał roślinny pozwolił na przeprowadzenie analizy HPLC zawartości sumy związanego i wolnego KE w pędach i korzeniach zregenerowanych roślin. Wyniki wskazały na większą zawartość KE w pędach niż w korzeniach zregenerowanych roślin *in vitro*. Wprawdzie w kulturach pędowych oznaczono 2,6-krotnie niższą zawartość związku (1,734 g 100g<sup>-1</sup> s.m.) w porównaniu do wysokiej zawartości w liściach ze środowiska naturalnego (6,996 g 100g<sup>-1</sup> s.m.), ale wyższą niż w owocach (0,690 g 100g<sup>-1</sup> s.m.) [26,28]. Kalus otrzymany z maliny moroszki wykazywał zdolność do biosyntezy KE, jednak na bardzo niskim poziomie (0,057 g 100 g<sup>-1</sup> s.m.) [26]. Uzyskana metodami biotechnologicznymi biomasa z kultur pędowych pozwoliła na opracowanie metody oznaczania KE w liściach [29] oraz przeprowadzenie badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej [30]. Badania dowiodły, że kultury pędowe maliny moroszki mogą być nowym źródłem KE. Ponadto, umożliwiły opracowanie metody pozwalającej zachowanie gatunku *ex situ* [31].

Opracowane metody rozmnażania *in vitro* oraz otrzymywania kultur komórkowych *R. chamaemorus* wskazują na możliwość pozyskiwania nowych surowców do otrzymywania ekstraktów i izolowanych związków z tego rzadkiego i trudno dostępnego z naturalnych stanowisk taksonu [13,27].

### ***Linnaea borealis* L. – zimozioł północny**

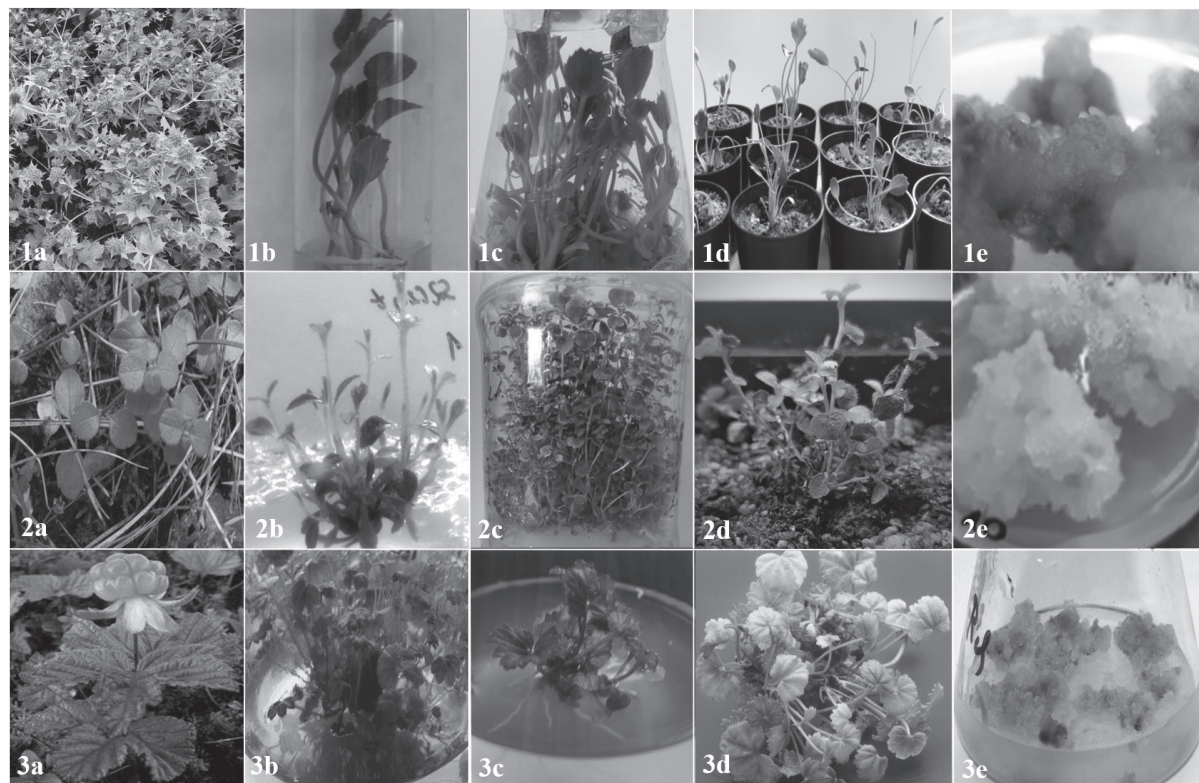
Zimozioł północny (*Linnaea borealis*) z rodziny *Linnaeaceae* to gatunek występujący w krajach półkuli północnej o rozmieszczeniu okołobiegunowym. W Polsce *L. borealis* objęty jest częściową ochroną gatunkową [32] i rośnie na nielicznych, rozproszonych stanowiskach. W krajach skandynawskich zimozioł

stosowano w medycynie tradycyjnej w leczeniu chorób reumatycznych oraz skórnych, tj. wysypki, odry, pokrzywki, grzybicy i świađu. W Norwegii roślina była wykorzystywana także w terapii półpaśca. Znane są również doniesienia o użyciu tego gatunku w Polsce jako remedium na dolegliwości menstruacyjne oraz jako środek na wzmocnienie dla kobiet ciężarnych. Obecnie *L. borealis* znajduje zastosowanie w kosmologii jako składnik preparatów poprawiających kondycję skóry [33].

Profil chemiczny europejskiego podgatunku zimoziołu północnego nie został dotychczas zbadany, natomiast skład chemiczny amerykańskiego podgatunku *L. borealis* opisano krótko w rozprawie doktorskiej z Uniwersytetu Kolumbii [34]. W ekstraktach etanolowych z liści wykryto flawonoidy: glikozydy

kwercetyny i kemferolu, a także pochodne apigeniny i luteoliny: kwasy fenolowe: kwas p-kumarowy, kwas p-hydroksybenzoesowy, kwas kawowy, kwas ferulowy, kwas protokatechowy, kwas wanilinowy, kwas floretowy i cztery izomery kwasu chlorogenowego [34]. Obecność metabolitów wtórnych wskazuje na duży potencjał leczniczy taksonu, który wymaga dalszych nowoczesnych analiz fitochemicznych i badań potencjalnych właściwości leczniczych.

Materiał roślinny do zainicjowania kultur *in vitro* *L. borealis* został pozyskany w 2017 roku z Wolińskiego Parku Narodowego za zgodą dyrekcji WPN oraz Ministra Środowiska. Najlepsze rezultaty klonalnego namnażania pędów zimoziołu zaobserwowano na pożywce MS + BAP 1,0 mg l<sup>-1</sup>, IAA 0,1 mg l<sup>-1</sup> i GA<sub>3</sub> (kwas giberelowy) 1,0 mg l<sup>-1</sup>. Uzyskano średnio 10



Rycina 1. Różne systemy wzrostowe *in vitro* badanych gatunków krajowych roślin chronionych: *Eryngium maritimum* (1a-1e), *Linnaea borealis* (2a-2e) i *Rubus chamaemorus* (3a-3e). Rośliny *in vivo* (1a,2a,3a), mikrorozmnazane rośliny (1b-1d, 2b-2d, 3b-3d), kultury kalusa (1e,2e,3e)

Figure 1. Different *in vitro* growth systems of studied domestic species of endangered plants: *Eryngium maritimum* (1a-1e), *Linnaea borealis* (2a-2e) and *Rubus chamaemorus* (3a-3e). *In vivo* plants (1a,2a,3a), micropropagated plantlets (1b-1d, 2b-2d, 3b-3d), callus cultures (1e,2e,3e)

nowych pędów z pojedynczego eksplantatu. *L. borealis* jest małą krzewinką trudno tworzącą korzenie *in vitro*, dlatego podjęto liczne próby ukorzenia na pożywce MS z różnymi auksynami. W efekcie, na podłożu MS z wysoką zawartością auksyn IBA 2,0 mg l<sup>-1</sup> i IAA 5,0 mg l<sup>-1</sup> wielopędy wytwarzały średnio 14 korzeni [35, Figura 1].

Badania fitochemiczne możliwe były do przeprowadzenia dzięki zastosowaniu techniki mnożenia klonalnego w warunkach *in vitro*. Metodą chromatografii cienkowarstwowej oraz metodą wysokosprawną chromatografii cieczowej sprzężonej z spektrometrią mas (HPLC/MS-MS) potwierdzono obecność kwasów fenolowych oraz flawonoidów w metanolowych ekstraktach z biomasy kultur pędowych, wcześniej opisanych dla podgatunku amerykańskiego. Ponadto, po raz pierwszy w gatunku stwierdzono obecność związków irydoidowych. Tym samym wykazano, że biomasa z kultur *in vitro* zdolna jest do biosyntezy metabolitów wtórnych naturalnie występujących w *L. borealis* i może stanowić surowiec do dalszych badań [35].

## Podsumowanie

Podjęcie prac badawczych nad roślinami chronionymi narzucało konieczność uzyskania zezwoleń z odpowiednich krajowych organów ochrony środowiska. Podstawowym celem przedstawionych badań było rozstrzygnięcie czy i w jakim stopniu zregenerowane w kulturach *in vitro* krajowe gatunki roślin chronionych mogą stanowić źródło biologicznie czynnych metabolitów wtórnych, charakterystycznych dla roślin gruntowych, których surowce są niedostępne. Opracowano protokoły mikrorozmnażania tych

gatunków i opisano metody hodowli różnych typów kultur *in vitro*. Analiza obecności i poziomu akumulacji wybranych związków bioaktywnych w mikrorozmnażanych roślinach w porównaniu z analogicznymi organami roślin gruntowych wykazała, że materiał roślinny otrzymany w warunkach *in vitro* może stanowić wysokiej jakości surowiec. Biotechnologiczne otrzymywanie biomasy roślin chronionych jest alternatywą umożliwiającą prowadzenie badań fitochemicznych i biologicznych, bez niszczenia ich naturalnych stanowisk. Techniki kultur *in vitro* pozwalają także na zainicjowanie hodowli z niewielkich fragmentów roślin lub z nasion i namnożenie materiału roślinnego na odpowiednich pożywkach z fitohormonami. Dodatkową zaletą opracowanych protokołów mikrorozmnażania i otrzymywania różnych systemów wzrostowych *in vitro* rzadkich gatunków roślin jest możliwość zachowania różnorodności flory i ochrony zasobów genowych. Ponadto, laboratoryjne kolekcje kultur *in vitro* roślin chronionych stanowią ochronę gatunków *ex situ*.

Konflikt interesów / Conflict of interest

Brak/None

Adres do korespondencji / Correspondence address

✉ Barbara Thiem

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

ul. Św. Marii Magdaleny 14; 61-861 Poznań

☎ (+48 61) 668 78 47

✉ bthiem@ump.edu.pl

## Piśmiennictwo/References

- Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig E-M, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol Adv.* 2015;33(8):1582-614.
- Thiem B, Budzianowski J, Kikowska M, i wsp. Znaczenie biotechnologii roślin w poszukiwaniu leków. W: Jelińska A, Muszalska I (red.). *Kierunki rozwoju chemii leków*. Poznań: Wydawnictwo Naukowe UMP. 2017; ss. 71-78.
- Debnath M, Malik CP, Bisen PS. Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. *Curr Pharm Biotechnol.* 2006;7:33-49.
- Tasheva K, Kosturkova G. Role of biotechnology for protection of endangered medicinal plants. In: Petre M (editor). *Environmental Biotechnology – New Approaches and Prospective Applications*. Rijeka: InTech; 2013.
- Ustawa z dnia 19 lipca 2016r. o dostępie do zasobów genetycznych i podziale korzyści z ich wykorzystania. *Dz.U.* 2016, 19.1594.
- Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) z dnia 13 października 2015 r. ustanawiające szczegółowe zasady wykonania rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 511/2014 w odniesieniu do rejestru kolekcji, monitorowania zgodności użytkowników i najlepszych praktyk. *Dziennik Urzędowy UE* 2015; 275/4.
- Rao S, Ravishankar GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv.* 2002;20:101-53.
- Smetanska I. Production of Secondary Metabolites Using Plant Cell Cultures. *Adv Biochem Engin/Biotechnol.* 2008;111:187-228.

9. Thiem B, Kikowska M. Zapewnienie jakości roślin leczniczych rozmnażanych w kulturach in vitro. *Herba Pol.* 2008;54(4):168-78.
10. Filova A. Production of secondary metabolites in plants tissue cultures. *Res J Agric Sci.* 2014;46(1):236-45.
11. Verpoorte R, Contin A, Memelnik J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem Rev.* 2002;1:13-25.
12. Mulabagal V, Chen-Yue L, Shu-Fung L, et al. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot Bull Acad Sinica.* 2004;45(1):1-22.
13. Kikowska M, Nahorska A, Thiem B. Potencjał roślinnych kultur komórkowych jako źródła bioaktywnych związków dla zastosowań kosmetycznych. *Pol J Cosmetol.* 2015;18(3):170-5.
14. Rybczyński J, Mikuła A. Biotechnologia w zachowaniu różnorodności flory Polski. W: Mirek Z, Cieślak E, Paszko B, Paul W, Ronikier M (red.). Rzadkie, ginące i reliktowe gatunki roślin i grzybów. Problemy zagrożenia i ochrony różnorodności flory Polski. Materiały ogólnopolskiej konferencji naukowej. Kraków; 2006. s. 31.
15. Thiem B, Budzianowski J, Wesołowska M, i wsp. Secondary metabolites of in vitro cultures of selected Polish rare and endangered plants. *Herba Pol.* 2008;54(4):158-167.
16. Kikowska M, Thiem B. In vitro systems of selected *Eryngium* species (*E. planum*, *E. campestre*, *E. maritimum*, and *E. alpinum*) for studying production of desired secondary metabolites (phenolic acids, flavonoids, triterpenoid saponins, and essential oil). In: Ramawat K, Ekiert H, Goyas S (eds.). *Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites. Reference series in Phytochemistry.* Springer, Cham; 2020. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-11253-0\\_29-1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-11253-0_29-1).
17. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 października 2014 r. w sprawie ochrony gatunkowej roślin. *Dz.U.* z 2014 r. poz. 1409.
18. Łabuz TA. Evaluation of past and present sea holly (*Eryngium maritimum*) habitats on Polish coastal dunes. *Acta Univ Latviensis.* 2007;723:99-114.
19. Kikowska M, Thiem B, Śliwińska E i wsp. The effect of nutritional factors and plant growth regulators on micropropagation and production of phenolic acids and saponins from plantlets and adventitious root cultures of *Eryngium maritimum* L. *J Plant Growth Regul.* 2014;33(4):809-819.
20. Kruszelnicki J, Fabiszewski J. *Rubus chamaemorus* L. Malina moroszka. W: Kaźmierczakowa R, Zarzycki K (red.). *Polska czerwona księga roślin.* Kraków: Instytut Botaniki im. W. Szafera, Polska Akademia Nauk; 2001. ss. 192-194.
21. Thiem B. *Rubus chamaemorus* L. – a boreal plant rich in biologically active metabolites: a review. *Biol Lett.* 2003;40(1):3-13.
22. Thiem B, Berge V. Multe – viktig kilde til antioksidantten ellaginsyre. Cloudberry: an important source of ellagic acid, an anti-oxidant. *Tidsskr Nor Lægeforen.* 2003;123:1856-7.
23. Thiem B. Micropropagation of Cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) by initiation of axillary shoots. *Acta Soc Bot Pol.* 2001;70(1):11-6.
24. Martinussen I, Nilsen G, Svenson L, et al. In vitro Propagation of Cloudberry (*Rubus chamaemorus*). *Plant Cell Tiss Org.* 2004;8(1): 43-9.
25. Debnath SC. A two-step procedure for in vitro multiplication of cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) shoots using bioreactor. *Plant Cell Tiss Org.* 2007;88:185-91.
26. Thiem B, Krawczyk A. Ellagic acid in in vitro cultures of *Rubus chamaemorus* L. *Herba Pol.* 2003;49(3-4):202-8.
27. Nohynek L, Bailey M, Tähtiharju J, et al. Cloudberry (*Rubus chamaemorus*) cell culture with bioactive substances: Establishment and mass propagation for industrial use. *Eng Life Sci.* 2014;14(6):667-75.
28. Thiem B, Duda G, Krawczyk A. Malina moroszka (*Rubus chamaemorus* L.) - bogate żywieniowe źródło kwasu elagowego. *Bromat Chem Toksykol.* 2006;39:151-3.
29. Krawczyk A, Thiem B, Szkudlarek M. High-performance liquid chromatography of ellagic acid from the leaves of *Rubus chamaemorus* L. *Chem Anal.* 2003;48(6):891-9.
30. Thiem B, Goślińska O. Antimicrobial activity of *Rubus chamaemorus* L. *Fitoterapia.* 2004;75:93-5.
31. Thiem B. In vitro culture techniques in conservation of *Rubus chamaemorus* L. *Acta Biol Cracov Bot.* 2002;44:181-8.
32. Ustawa z dnia 16 kwietnia 2004 r. o ochronie przyrody. *Dz. U.* Nr 92, poz. 880, z 2004r.
33. Thiem B, Buk-Berge E. Twinflower (*Linnaea borealis* L.) – plant species of potential medicinal properties. *Herba Pol.* 2017;63(3):56-64.
34. Glennie CW. A comparative phytochemical study of Caprifoliaceae. A thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in the Department of The Botany. The University of British Columbia; 1969.
35. Tomaszewska M. Mikrorozmnażanie *Linnaea borealis* L. Praca magisterska wykonana w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin. Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu; 2019.