

## Kultury pędowe *Pinguicula vulgaris* L. w tworzeniu kolekcji *in vitro* chronionego gatunku

### *Pinguicula vulgaris* L. shoot cultures in form of *in vitro* collection of protected species

Dorota Tondowska, Michał P. Maliński, Barbara Thiem

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

#### Streszczenie

**Wstęp.** Badania dotyczą założenia roślinnej kolekcji *in vitro* gatunku *Pinguicula vulgaris*, stanowiącej bank genów. Zastosowano kultury *in vitro* jako strategię w celu utrzymywania *ex situ* chronionego gatunku a jednocześnie otrzymywania odnawialnej biomasy rzadkiego taksonu z przeznaczeniem do badań fitochemicznych i biologicznych. **Material i metody.** Kultury *in vitro* tustosza zwyczajnego prowadzono dwiema technikami rozmnażania klonalnego: metodą stymulacji rozwoju pąków apikalnych i bocznych z wierzchołków rozetek oraz metodą organogenezy bezpośredniej z liści. Zastosowano dwie pożywki wg Murashige i Skooga (MS i ½MS o połowie składników mineralnych i witamin). Oceniano zdolność kultur pędowych do wzrostu i rozwoju w trzech systemach hodowlanych *in vitro*: stacjonarnym w pożywce stałej i półpłynnej oraz wytrząsanym w pożywce płynnej. Do wstępnej oceny fitochemicznej otrzymanej biomasy zastosowano metodę chromatografii cienkowarstwowej TLC. **Wyniki.** Pożywka MS o pełnym składzie, bez dodatku regulatorów wzrostu, była optymalna dla namnażania kultur pędowych wytrząsanych (w systemie płynnym). W systemie stałym i półpłynnym największą wydajność mnożenia osiągnięto w podłożu ½MS bez fitohormonów. Analiza fitochemiczna wyciągów z *P. vulgaris* potwierdziła obecność w ekstraktach z biomasy namnożonej w kulturze *in vitro* związków z grup metabolitów wtórnych charakterystycznych dla gatunku, w tym akteozydu oraz katalpolu o aktywności biologicznej. **Wnioski.** Stwierdzono, że obie techniki mikrorozmnażania tustosza są wydajnymi metodami, szczególnie w systemach półpłynnym i płynnym, a namnażanie nowych pędów potomnych zachodzi szybciej w wyniku organogenezy bezpośredniej z liścia. Obie metody zapewniają efektywne namnażanie *P. vulgaris*, a otrzymane kultury pędowe stanowią odnawialną kolekcję *in vitro* rzadkiego, chronionego gatunku oraz formę jego ochrony *ex situ*. Ponadto, rośliny te są potencjalnym źródłem akteozydu i katalpolu. (*Farm Współ* 2021; 14: 241-250) doi: 10.53139/FW.20211430

**Słowa kluczowe:** tustosz pospolity, kultury *in vitro*, mikrorozmnażanie, ochrona rzadkiego gatunku, metabolity wtórne

#### Abstract

**Introduction.** The goal of the research was to establish an *in vitro* plant collection of *Pinguicula vulgaris*, constituting a gene bank. Plant *in vitro* cultures were used as a strategy to maintain the protected species *ex situ*, and to obtain renewable biomass of this rare taxon for further phytochemical analysis and biological activity research. **Materials and methods.** *In vitro* cultures of *P. vulgaris* were maintained using two methods of clonal propagation: by a method of stimulating the development of apical and lateral buds from the tips of rosettes and by direct organogenesis from leaves. Two variants of Murashige and Skoog medium were used (MS and ½MS containing half of mineral salts and vitamins). The growth and development capacity were evaluated in three *in vitro* systems: stationary cultures in solid and semisolid medium and agitated cultures in liquid medium. Preliminary phytochemical analysis of the obtained biomass was performed using thin-layer chromatography. **Results.** Full strength MS medium without plant growth regulators was optimal for the propagation of agitated shoot cultures in liquid medium. For solid and semisolid systems, the highest propagation rate was achieved on half-strength medium without phytohormones. The preliminary phytochemical analysis of *P. vulgaris* extracts of biomass obtained from *in vitro* cultures confirmed the presence of secondary metabolites characteristic for the species, including acteoside and catalpol, compounds with known biological activities. **Conclusions.** Both techniques used

are efficient methods for micropropagation of *P. vulgaris*, especially those utilizing semisolid and liquid systems. The formation of new shoots by direct organogenesis from leaves is a quicker method. Both methods ensure rapid propagation of *P. vulgaris*, and the obtained shoot cultures constitute a renewable *in vitro* collection of this rare protected species and a form of *ex situ* protection. Moreover, the cultures are potential source of acteoside and catalpol. (*Farm Współ* 2021; 14: 241-250) doi: 10.53139/FW.20211430

**Keywords:** *Butterwort, in vitro cultures, micropropagation, conservation of rare plant species, secondary metabolites*

## Wstęp

W obecnych czasach działalność człowieka, zanieczyszczenie środowiska oraz zmiany klimatu wpływają negatywnie na rozwój wielu gatunków roślin w ich warunkach naturalnych. Wycinanie lasów oraz osuszenie bagien i torfowisk powodują stopniowe zanikanie wielu populacji roślin rzadkich, w wyniku czego szereg gatunków jest zagrożonych wyginięciem. Metody ochrony bioróżnorodności opierają się na zachowaniu gatunków w miejscu ich występowania (*in situ*), a także poza naturalnymi siedliskami (*ex situ*). Wśród różnych form aktywnej ochrony ginących gatunków, należy wymienić tworzenie banków genów w formie roślinnych kolekcji *in vitro* [1,2]. Prowadzenie kultur *in vitro* taksonów objętych ochroną jest strategią w celu zachowania *ex situ* gatunków, a jednocześnie otrzymywania odnawialnej biomasy z przeznaczeniem do badań fitochemicznych i badań aktywności biologicznej [3,4]. Kultury *in vitro* umożliwiają szybkie namnażanie znacznej liczby jednorodnych wyselekcjonowanych roślin potomnych w procesie mikrorozmnażania i wytworzenie wartościowej biomasy [5]. Klonalne mnożenie *in vitro* jest istotne zwłaszcza w przypadku gatunków potencjalnie leczniczych, znanych tylko z medycyny tradycyjnej, których skład chemiczny i działanie biologiczne jest słabo poznane i powinno być zweryfikowane, z zastosowaniem współczesnych technik badawczych. Różne roślinne systemy hodowlane *in vitro* (kultury organów, kalus, kultury komórkowe) produkują w biomasie wartościowe metabolity wtórne, nierzadko w większych ilościach niż organy roślin ze stanu naturalnego lub z uprawy. Takie kultury roślin leczniczych mogą stać się alternatywnym źródłem interesujących związków o aktywności biologicznej [6,7]. Namnożona biomasa umożliwia prowadzenie badań nad roślinami rzadkimi, chronionymi lub endemitami, których nie można pozyskiwać ze środowiska naturalnego. Ponadto, namnożone w kontrolowanych warunkach *in vitro* rośliny, po ocenie morfologicznej i genetycznej, mogą być reintrodukowane na natu-

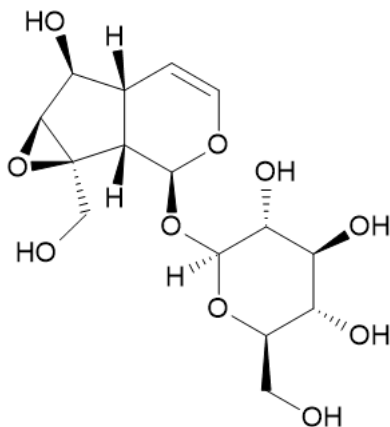
ralne stanowiska lub transplątowane do ogrodów botanicznych [5].

Jednym z takich rzadkich i chronionych gatunków jest tłuścisz pospolity (*Pinguicula vulgaris* L., ang. Butterwort), roślina owadożerna z rodziny pływaczowatych (*Lentibulariaceae*). Gatunek ten charakteryzuje się niewielkim wzrostem (do 25 cm), posiada jasnozielone liście w kształcie szerokiej elipsy, które tworzą różyczkę (rozetę). Na ich górnej powierzchni występują gruczoły, posiadające dwie funkcje: są pułapką dla owadów oraz pełnią funkcje trawienne. Pułapki adhezyjne znajdujące się na liściach mają gruczoły szypułkowe, z których każdy zawiera dużą kroplę śluzu zatrzymującego owady [8]. Kwiaty barwy niebieskofioletowej wyrastają pojedynczo na długich szypułkach. Owocem jest kulisto-jajowata torebka [9]. Takson *Pinguicula vulgaris* L. obejmuje dwa podgatunki: *P. vulgaris* ssp. *macroceras* – tłuścisz pospolity kalifornijski oraz *P. vulgaris* ssp. *vulgaris* – tłuścisz pospolity typowy [10]. *P. vulgaris* występuje w Europie, Azji i Ameryce Północnej. Rośnie na terenach wilgotnych i podmokłych, głównie na torfowiskach. Dobrze rozwija się w środowisku ubogim w składniki mineralne [11]. W Polsce od 2001 r. tłuścisz objęty jest ścisłą ochroną gatunkową i jest wpisany na listę taksonów krytycznie zagrożonych [9,12,13].

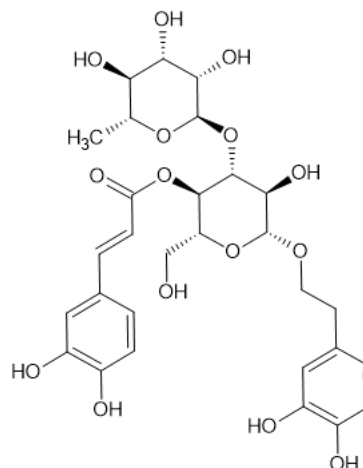
Współcześnie *P. vulgaris* nie jest stosowany w lecznictwie. Dawniej gatunek był używany w tradycyjnej medycynie, z uwagi na obecność interesujących metabolitów wtórnych – kwasu cynamonowego, glikozydów irydoidowych i glikozydów fenyloetanoidowych [14]. Ekstrakty z liści tłuściszka, wykazujące efekt spazmolityczny, były stosowane m.in. w leczeniu krztuśca, gruźlicy czy bólu związanego ze skurczami jelit [11]. Główne zastosowanie taksonu to surowiec do przetwarzania żywności [14]. W Skandynawii gatunek wykorzystywano w przetwórstwie mleczarskim do produkcji gęstego i sfermentowanego mleka, natomiast w Niemczech, na początku XX w., używany był w celu zmiękczenia świeżo ubitego i twardego mięsa. Oba

wspomniane zastosowania w przetwórstwie wynikają z obecności w tłuszczoszu proteaz rozkładających białka na skutek hydrolizy wiązań peptydowych. W tłuszczoszu występują liczne enzymy z klasy hydrolaz: proteazy, fosfatazy kwaśne, amylazy, esterazy i rybonukleazy [14].

Nieliczne badania fitochemiczne *P. vulgaris* wskazują na obecność metabolitów wtórnych z kilku grup związków. Są to: flawonoidy, glikozydy fenyletanolowe, kwasy fenolowe, irydoidy oraz karotenoidy [8,14,15]. Charakterystycznymi dla tego taksonu są związki posiadające interesujące właściwości farmakologiczne, akteozyd i katalpol. Akteozyd (= werbaskozyd, rycina 1) należy do fenyletanolidów, które są glikozydowymi połączeniami pochodnych kwasów cynamonowego i alkoholu fenyletylowego. Związki te posiadają m.in. właściwości przeciwbakteryjne, przeciwnowotworowe, przeciwutleniające, jak również wiele innych. Akteozyd wykazuje silne działanie antyoksydacyjne przeciwko wolnym rodnikom. Ponadto ma właściwości przeciwzapalne, przeciwbólowe, immunosupresyjne, immunomodulujące. Działa także hepatoprotekcyjnie, przeciwdrobnoustrojowo oraz przeciwnowotworowo [16-18]. W badanym gatunku występuje także katalpol (rycina 2), należący do grupy irydoidów, które składają się z dwóch skondensowanych pierścieni: heterocyklicznego  $\alpha$ -pironu i cyklopentanu. Związek posiada właściwości uspokajające, przeciwgorączkowe, przeciwkaszlowe, a także jest stosowany jako środek gojący rany i w schorzeniach skóry [19].



Rycina 1. Struktura chemiczna akteozydu  
Figure 1. Chemical structure of acteoside



Rycina 2. Struktura chemiczna katalpolu  
Figure 2. Chemical structure of catalpol

Obecne biotechnologiczne badania nad gatunkiem *P. vulgaris* podjęto w celu odnowienia kultur *in vitro* oraz utworzenia kolekcji *in vitro* ze zdrowych, wyselekcjonowanych roślin, rozmnażanych wydajną metodą mikrorozmnażania. Porównano efektywność dwóch technik mikrorozmnażania – przez stymulację rozwoju pąków wierzchołkowych i bocznych oraz metodą organogenezy bezpośredniej z liścia. Prowadzono hodowle stacjonarne w pożywce stałej, półpłynnej oraz kultury wytrząsane w podłożu płynnym. Celem badań była ocena zdolności kultur pędowych do rozmnażania i dalszego prawidłowego wzrostu i rozwoju w trzech różnych systemach *in vitro* na wybranej pożywce o pełnym i obniżonym składzie soli mineralnych i witamin.

## Materiał i metody

Materiałem badawczym był gatunek *Pinguicula vulgaris* L. – tłuszczos pospolity, utrzymywany w wieloletniej kulturze *in vitro* w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin UMP. W pracy stosowano metody z zakresu roślinnych kultur *in vitro* i wstępnej analizy fitochemicznej.

**Kultury *in vitro*** prowadzono w warunkach jałowych, w łoży z laminarnym nawiewem powietrza. Zastosowano dwie techniki mikrorozmnażania roślin:

- metodę otrzymywania pędów potomnych drogą pobudzania do rozwoju pączków kątowych z eksplantatów wierzchołkowych zawierających tkankę merystematyczną

b) metodę organogenezy bezpośredniej z eksplantatów liściowych w celu regeneracji przybyszowych pędów.

Kultury *in vitro* prowadzono na pożywce Murashige i Skoog'a (MS) [20] w trzech systemach hodowlanych *in vitro*: płynnym, półpłynnym oraz stałym o pH 5,7-5,8. Sporządzono trzy rodzaje podłoży o różnym stopniu zestalenia: pożywkę stałą (7,2 g/l agaru), półpłynną (3,6 g/l agaru) i płynną. Naczynia hodowlane z pożywką poddano sterylizacji w autoklawie.

Klonalne rozmnażanie *in vitro* tkustosza pospolitego zapoczątkowano z części wierzchołkowych pojedynczych rozet (skrótowe pędy w postaci rozetek) oraz liści z donorowej kultury pędowej *P. vulgaris*. Wybrane eksplantaty pasażowano na podłoża o pełnym (MS) lub zmniejszonym o połowę ( $\frac{1}{2}$ MS) składzie soli mineralnych i witamin. Eksplantatami wykładanymi na pożywki były rozety o średnicy ok.  $2 \pm 0,5$  cm oraz liście o średnicy  $3 \pm 1$  cm. Kultury utrzymywano w kontrolowanych warunkach w fitotronie ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , wilgotność względna 60-70%, fotoperiod 16/8 godz., lampy jarzeniowe o natężeniu  $60 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ ). Kultury pędowe w płynnej pożywce prowadzono na wytrząsarce rotacyjnej (110 obr/min). Pędy namnażano w subkulturach (pasażowano na świeżą pożywkę) w odstępach 8-tygodniowych. Doświadczenia zakładano czterokrotnie, łącznie wykorzystując 168 eksplantatów (rozetek i liści).

Obserwowanymi parametrami były: wydajność mikrorozmnażania na podłożach stałym, płynnym i półpłynnym, jak również szybkość zachodzenia tego procesu. Porównywano także wydajność dwóch zastosowanych metod klonalnego rozmnażania kultur. Określano liczbę regenerantów zregenerowanych z jednego eksplantatu, wielkość nowych potomnych rozetek i szybkość zachodzenia procesu mikrorozmnażania w danym systemie *in vitro*. Pomiary wykonywano po 8 tygodniach od założenia kultur. Rozmnożone *in vitro* rośliny były poddane ocenie morfologicznej i fitochemicznej.

Namnożona w kulturze *in vitro* biomasa tkustosza pospolitego oceniana była pod kątem zdolności do biosyntezy głównych grup związków, charakterystycznych dla gatunku. Wstępną analizę fitochemiczną wybranych regenerantów przeprowadzono metodą chromatografii cienkowarstwowej: jednokierunkowej kochromatografii ze wzorcem (1D-TLC) oraz chromatografii dwukierunkowej (2D-TLC). Badaną biomasę

stanowiły kultury pędowe *P. vulgaris* otrzymane w wyniku mikrorozmnażania z rozetek. Przygotowano wyciąg 80% metanolowy (MeOH) z wysuszonych pędów (0,7 g) oraz 80% etanolowy (EtOH) intrakt ze świeżych pędów (16 g). Świeży surowiec poddano maceracji zalewając etanolem i rozdrabniając przy użyciu blendera, aby inaktywować enzymy hydrolityczne występujące w tkustoszu pospolitym, mogące wpływać na chemizm surowca podczas suszenia. Ekstrakcję prowadzono w temperaturze  $85^\circ\text{C}$  na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną ( $3 \times 1$  godz.). Otrzymane wyciągi zagęszczono do sucha i rozpuszczono w ekstrakcie (80% EtOH lub 80% MeOH), otrzymując próbki o jednolitym stężeniu 0,1 g/ml. Do analizy metodą TLC wykorzystano gotowe płytki pokryte żel krzemionkowym lub celulozą (Merck). Wykonano kochromatografię z wzorcami – akteozydem (werbaskozydem) i katalpolem. Zastosowane fazy rozwijające to odpowiednio: OFW (octan etylu – kwas mrówkowy – woda, 8:1:1) i OMW (octan etylu – metanol – woda, 77:15:8). Chromatogramy 2D-TLC rozwijano w BAW (butanol – kwas octowy – woda, 4:1:5 $\uparrow$ ), a następnie w 15% kwasie octowym. Do wizualizacji kwasów fenolowych i akteozydu użyto 0,2% roztwór NA (difenylboran-2-etanolaminy) natomiast kochromatogram z katalpolem wywołano 1% roztworem waniliny w EtOH oraz w 5% roztworze  $\text{H}_2\text{SO}_4$  w EtOH. Chromatogramy dokumentowano przy użyciu skanera Reprostar z pakietem oprogramowania WinCATS (CAMAG).

Parametry mierzone podczas mikrorozmnażania poddano analizie statystycznej – jednokierunkowej analizie wariancji (ANOVA) oraz testowi post-hoc Duncana. Do ustalenia istotności statystycznej zastosowano wartość  $P = 0,05$ . Obliczenia przeprowadzono przy pomocy pakietu oprogramowania Statistica 13 (Statsoft).

## Omówienie wyników i dyskusja

Do rozmnażania klonalnego *P. vulgaris* zastosowano dwie techniki: metodę stymulacji rozwoju pąków bocznych z eksplantatów zawierających tkankę merystematyczną (z rozet) oraz metodę różnicowania się pąków przybyszowych bez pośrednictwa tkanki kalusowej, w wyniku organogenezy bezpośredniej z liści. Pierwsza z metod zapewnia otrzymywanie jednakowych roślin potomnych z merystemów, w wyniku drugiej – otrzymywane są pędy przybyszowe. Klony roślin uzyskanych tymi metodami są zwykle wyrów-

nane fenotypowo i wykazują stabilność genetyczną [21].

W pracy porównywano wydajność i tempo propagacji oraz obserwowano dalszy rozwój kultur w trzech systemach *in vitro*. Systemy hodowlane w pożywce płynnej i półpłynnej zastosowano po raz pierwszy dla gatunku. Badano wpływ stanu zestalenia pożywki (stała, półpłynna, płynna) oraz stężenia składników mineralnych i witamin pożywki MS i ½MS (bez regulatorów wzrostu i rozwoju roślin), na rozmnażanie *P. vulgaris*. Określone parametry biotechnologiczne wzrostu przedstawiają tabela I i tabela II.

Otrzymane wyniki wskazują, że dwie zastosowane metody mikrorozmnażania tłustosza pospolitego są efektywne. Różnią się wydajnością w zależności od stosowanego systemu hodowlanego.

W metodzie z zastosowaniem całych rozetek, zaobserwowano, że ich wielkość wpływa na badane parametry. Duże rozety (2,5 cm) wyłożone na pożywkę najszybciej podejmują wzrost, rozwijają więcej liści i tworzą korzenie przybyszowe (we wszystkich 3 systemach), jednakże najczęściej nie namnażają roślin potomnych. Mniejsze rozetki (1 cm) proliferują, indu-

kując nowe, liczne pędy potomne poprzez stymulację istniejących w eksplantacie merystemów (Fotografia 1c-e). Całe pędy, w kształcie rozetki, na podłożach MS i ½MS rozwijają nowe pędy z pączków kątowych w trzech systemach stałym, półpłynnym i płynnym. W eksperymencie, w którym porównano namnażanie rozet potomnych w systemie płynnym metodą mikrorozmnażania poprzez stymulację pąków bocznych, liczba namnożonych pędów różniła się w zależności od zastosowanego stężenia soli mineralnych i witamin w pożywce. W podłożu ½MS, z jednego eksplantatu, rozwinęło się średnio 21 rozet potomnych, głównie jednakowych rozmiarów (ok. 3 ± 1 cm). Regeneranty otrzymane na tym podłożu były większe, miały większą średnicę. Natomiast w podłożu MS o pełnej zawartości składników formowały się liczne (średnio 34) rozety potomne o różnych rozmiarach (od 0,5 do 3 cm). Wynik ten wskazuje na optymalne warunki hodowli *in vitro* tłustosza pospolitego (tabela I).

W tej metodzie zaobserwowano, że rozety szybciej podejmują proces formowania nowych pędów na podłożu półpłynnym niż stałym, a najpóźniej w systemie

Tabela I. Liczba pędów potomnych powstałych z pojedynczego eksplantatu (rozetki) w trzech systemach *in vitro* na pożywce MS i ½MS (po 8 tygodniach kultury)

Table I. Number of shoots obtained from single explant (rosettes) in three *in vitro* systems using MS and ½MS medium (after 8 weeks of culture)

Pożywka	MS			½MS		
	stała	półpłynna	płynna	stała	półpłynna	płynna
liczba rozet potomnych [cm] ± SD	7 ± 2,93 a	8 ± 1,36 a	34 ± 0,83 e	11 ± 4,26 b	18 ± 6,98 c	21 ± 1,12 d
średnica rozet potomnych [cm] ± SD	0,8 ± 0,35 a	1,6 ± 0,57 b	1,2 ± 0,45 a	1,4 ± 0,62 a	1,8 ± 0,66 b	1,2 ± 0,64 a

MS – podłoże pełne Murashige i Skoog'a. ½MS – podłoże Murashige i Skoog'a o połowie zawartości związków mineralnych i witamin. Liczba prób n=10. Między wartościami średnimi oznaczonymi tą samą literą nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic przy P=0,05 z użyciem testu Duncana.

MS – Full strength Murashige and Skoog medium. ½MS – Murashige and Skoog medium with halved mineral salt and vitamin content. Sample size n=10. Mean values with the same letter are not significantly different at P = 0.05 using Duncan's Multiple Range test.

Tabela II. Liczba regenerantów otrzymanych metodą organogenezy bezpośredniej z pojedynczego eksplantatu (liść) oraz wielkość potomnych rozet (po 8 tygodniach kultury)

Table II. Number of regenerants obtained by direct organogenesis from single explant (leaf) and the size of daughter rosettes (after 8 weeks of culture)

	Pożywka ½MS		
	Stała	Półpłynna	Płynna
Liczba rozet ± SD	18 ± 5,22 a	29 ± 3,55 b	30 ± 1,02 b
Średnica rozet ± SD	0,86 ± 0,38 a	0,67 ± 0,24 a	0,56 ± 0,28 a

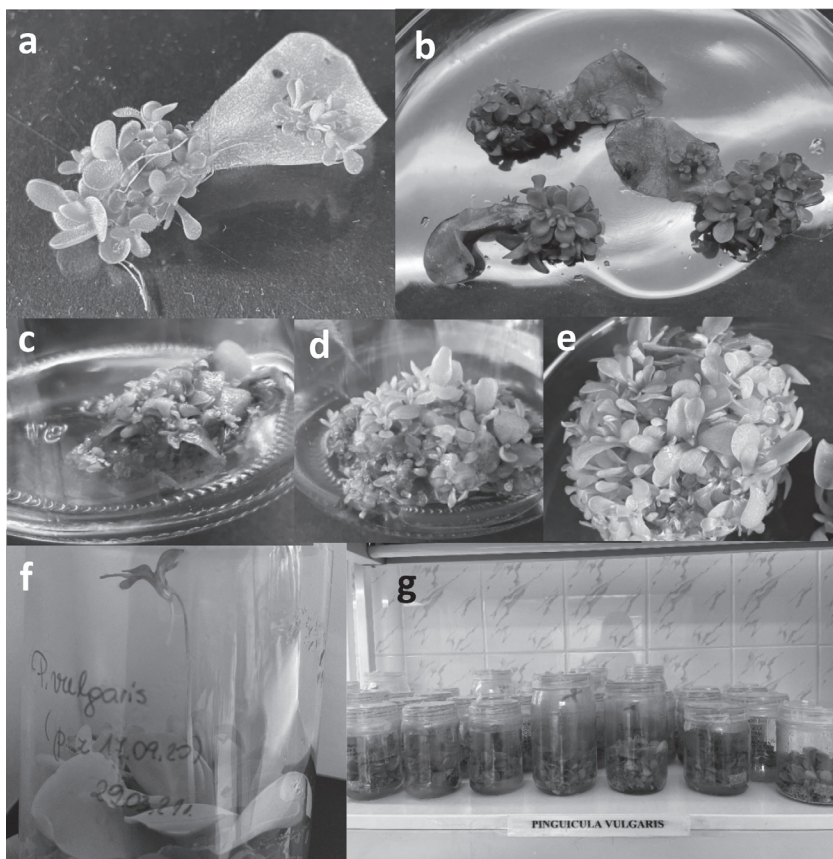
½MS – pożywka Murashige i Skoog'a o połowie zawartości związków mineralnych i witamin. Liczba prób n=10. Między wartościami średnimi oznaczonymi tą samą literą nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic przy P=0,05 z użyciem testu Duncana.

½MS – Murashige and Skoog medium with halved mineral salt and vitamin content. Sample size n=10. Mean values with the same letter are not significantly different at P = 0.05 using Duncan's Multiple Range test.

kultur wytrząsanych, w pożywce płynnej. Pomimo dłuższego indukowania i rozwoju nowych pąków w systemie płynnym *in vitro* metoda ta okazała się najbardziej wydajna pod względem ilościowej regeneracji rozet potomnych. Z pojedynczej rozetki macierzystej, po 10 tygodniach kultury, uzyskano w tym systemie hodowlanym około 150 rozetek potomnych (zdjęcie 1c-e). Tak wysoką wydajność mikrorozmnażania można wytłumaczyć specyfiką kultury w płynnym wytrząsanym podłożu, gdzie rozwój nowych pąków zachodził głównie z istniejących w rozetkach merystemów, ale

również możliwe było formowanie pąków przybyszowych z liści, „obmywanych” pożywką. W kulturach wytrząsanych zaobserwowano dwa rodzaje wegetatywnego rozmnażania *in vitro*.

Wydajną metodą rozmnażania *in vitro* *P. vulgaris* jest także organogeneza bezpośrednia z liścia. Różnicowanie pąków przybyszowych bez pośrednictwa tkanki kalusowej zachodziło najkorzystniej, gdy eksplantatami były duże, dobrze rozwinięte liście o średnicy około 4 cm (zdjęcie 1a,b). Zaobserwowano, że indukcja nowych rozetek potomnych zachodzi naj-



Zdjęcie 1. Kultury *in vitro* *Pinguicula vulgaris*: zregenerowane pędy rozmnażane w wyniku organogenezy bezpośredniej z liścia na stałej pożywce  $\frac{1}{2}$ MS (1a), na podłożu półpłynnym (1b), kultury wytrząsane w podłożu płynnym MS – liczne pędy zregenerowane z całej rozetki, po 4,6 i 8 tygodniach kultury (1c-1e), kwitnąca roślina (1f), kolekcja kultur *in vitro* chronionego gatunku w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin UMP (1g)

Photo 1. *In vitro* cultures of *Pinguicula vulgaris*: regenerated shoots propagated by direct organogenesis from leaf on  $\frac{1}{2}$ MS solid medium (1a), on semiliquid medium (1b), agitated cultures in MS liquid medium – shoots regenerated from whole rosette, after 4,6 and 8 weeks of culture (1c-1e), flowering plants *in vitro* (1f), collection of *in vitro* cultures in Department of Pharmaceutical Botany and Plant Biotechnology PUMS (1g)

szybciej w hodowli w pożywce półpłynnej, następnie na pożywce stałej i w systemie kultur wytrząsanych w pożywce płynnej. Tempo w jakim następowała regeneracja rozet potomnych w badanych systemach nie świadczyła o ilościowym wyniku doświadczenia. Liczba regenerantów rozwijających się z jednego eksplantatu liściowego była wyższa na pożywce ½MS półpłynnej i płynnej (około 30 rozetek), niż na podłożu stałym (tabela II).

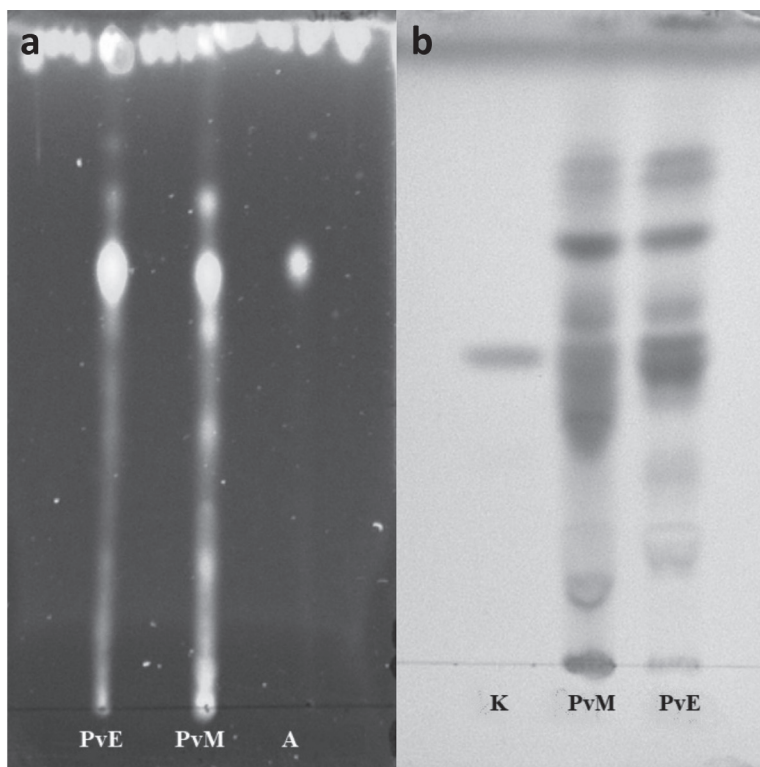
Wszystkie namnożone *in vitro* rośliny charakteryzowały się prawidłową morfologią, posiadały wyrównany pokrój i charakteryzowały się dobrą kondycją fizjologiczną.

Wydajne rozmnażanie oraz szybszy wzrost *P. vulgaris* na pożywce uboższej w sole mineralne i witaminy

opisali także inni autorzy [11,22]. Takie wyniki są zgodne z biologią tłuścioza, który w warunkach naturalnych występuje głównie na torfowiskach, glebach ubogich w składniki mineralne. Zastosowany po raz pierwszy dla tłuścioza półpłynny system hodowlany *in vitro* także odpowiada biologii gatunku, który *in vivo* występuje często na podmokłych terenach [11].

Z przeprowadzonych badań wynika, że efektywną metodą mikropropagacji gatunku *P. vulgaris* jest prowadzenie kultur wytrząsanych w systemie płynnym. Ten system hodowlany jest coraz częściej stosowany do propagacji *in vitro* różnych gatunków roślin leczniczych [23,24].

W badaniach własnych prowadzono mikropropagację tłuścioza na pożywkach MS i ½MS, bez

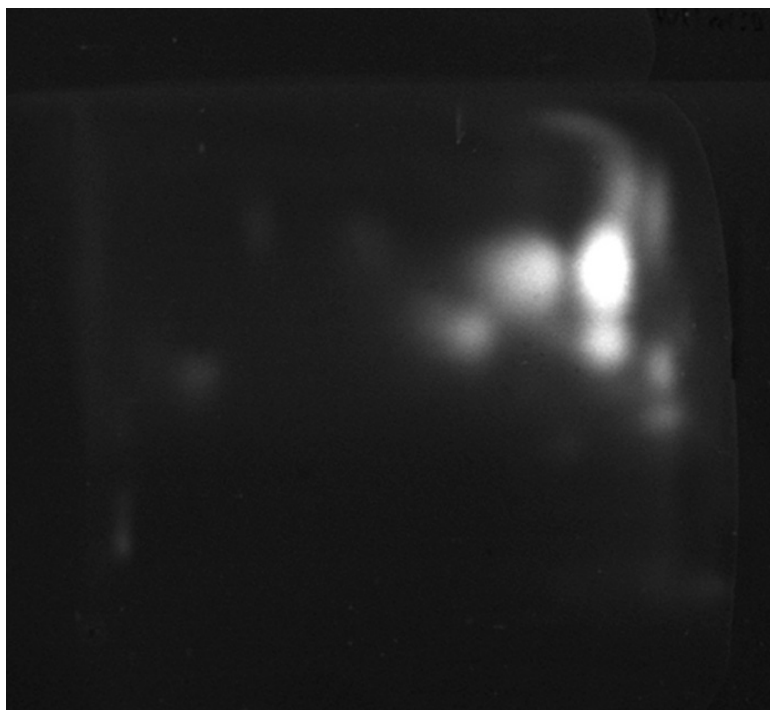


Zdjęcie 2. Chromatogramy TLC ekstraktów metanolowego (PvM) i etanolowego (PvE) *Pinguicula vulgaris* z kultury *in vitro* ze wzorcem akteozydu (A), po wywołaniu 0,2% roztworem NA (UV 366 nm) (2a), ze wzorcem katalpolu (K) po wywołaniu 1% r-r waniliny w EtOH + 5% r-r H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> w EtOH (VIS) (2b). Faza stacjonarna: żel krzemionkowy

Photo 2. TLC plates of methanolic (PvM) and ethanolic (PvE) extracts of *Pinguicula vulgaris* *in vitro* cultures: with acteoside sample (A) detected with 0.2% NA solution (UV 366 nm) (2a); with catalpol sample (K) detected with 1% vanillin ethanol solution + 5% sulfuric acid ethanol solution (VIS) (2b). Stationary phase: silica gel

wzbogacania podłoża w fitohormony, otrzymując wysoką wydajność mnożenia. Wyniki potwierdzają dotychczasowe badania nad *P. vulgaris*, że pożywka agarowa ½MS jest bardziej odpowiednia pod względem wydajności do hodowli stacjonarnej tego gatunku niż podłoże o pełnym składzie [11,22]. Natomiast w innych badaniach autorzy stosowali agarowe pożywki MS, zarówno bez dodatku regulatorów wzrostu i rozwoju roślin, jak i z dodatkiem cytokinin: benzyloadeniny (BA), zeatyny (ZEA), kinetyny (KIN) lub w kombinacji z auksyną – kwasem indolilo-3-masłowym (IBA). W tych pracach stwierdzono, że najkorzystniejszym podłożem jest podstawowa pożywka ¼MS [11,22]. Wysoką wydajność namnażania w kulturach *in vitro* tłośosza metodami organogenezy bezpośredniej i z wierzchołków pędów na pożywkach agarowych MS i ½MS uzyskali też inni autorzy [15,25].

W pracy przeprowadzono wstępną analizę fitochemiczną biomasy tłośosza, aby potwierdzić obecność metabolitów wtórnych w materiale namnożonym w kulturach *in vitro*. Metodą chromatografii cienkowarstwowej 1D-TLC i 2D-TLC, w tym kochromatografii ze wzorcami, potwierdzono w biomacie z kultur *in vitro* obecność grup związków charakterystycznych dla gatunku. Na chromatogramach zaobserwowano wyraźne plamy związków fenolowych – kwasów fenolowych i akteozydu oraz irydydu. Analiza biomasy metodą kochromatografii ze wzorcami: akteozydu (zdjęcie 2a) i katalpolu (zdjęcie 2b) potwierdziła ich obecność w etanolowym oraz metanolowym wyciągu z biomasy *P. vulgaris*. Obecność związków fenolowych przedstawia zdjęcie 3. Otrzymane wyniki wskazują, że rozmnażane *in vitro* rośliny mogą dostarczyć wartościowy surowiec zawierający charakterystyczne dla



Zdjęcie 3. Dwukierunkowy chromatogram cienkowarstwowy (2D-TLC) ekstraktu metanolowego (PvM) z kultur *in vitro* *Pinguicula vulgaris*, po wywołaniu 0,2% roztworem NA (difenylboran 2-etanolaminy) obserwowany w UV 366 nm. Faza stacjonarna: celuloza. Fazy rozwijające: BAW (butanol – kwas octowy – woda, 4:1:5↑) – pierwszy kierunek, 15% kwas octowy – drugi kierunek

Photh 3. Two-dimensional thin-layer chromatogram (2D-TLC) of methanolic extract (PvM) of *Pinguicula vulgaris* *in vitro* cultures. Detected with 0.2% NA solution (2-ethanolamine diphenylborate), observed under UV 366 nm. Stationary phase: cellulose. Mobile phases: BAW (butanol – acetic acid – water, 4:1:5↑) – first direction, 15% acetic acid – second direction



gatunku metabolity wtórne, zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami [15,16]

Gatunki z rodziny *Lentibulariaceae*, w tym *P. vulgaris*, nie były dotychczas szeroko badane pod kątem składu chemicznego. Nieliczne dane literaturowe donoszą o obecności kilku grup związków, w tym kwasów fenolowych, flawonoidów, irydoidów, fenylotanoidów. Związki te zidentyfikowano z zastosowaniem technik chromatograficznych oraz spektralnych [15,26]. W pokrewnym gatunku *P. lusitanica*, w ekstrakcie metanolowym, przy użyciu nowoczesnych technik chromatograficznych sprofilowano metabolity z grupy glikozydów irydoidowych, w tym akteozyd [27].

Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że szereg taksonów roślin leczniczych narażonych na wyginiecie jest utrzymywanych w kolekcjach *in vitro* i w ten sposób realizowana jest aktywna ochrona tych gatunków *ex situ* [28]. Kultury *in vitro* roślin chronionych są także ważnym narzędziem w ciągłej produkcji biomasy, będącej źródłem metabolitów wtórnych o aktywności biologicznej i farmakologicznej [7,29-31].

## Podsumowanie

W przedstawionej pracy wykazano, że wydajne namnażanie *P. vulgaris* w kulturze *in vitro* może zachodzić zarówno poprzez stymulację z pąków kątowych z rozet, jak i drogą organogenezy bezpośredniej z liścia na pożywkach MS i ½MS, bez stosowania regulatorów wzrostu i rozwoju roślin w trzech systemach wzrostowych. Obie metody zapewniają szybkie namnażanie tłustosza, a otrzymane kultury pędowe stanowią odnawialną kolekcję *in vitro*. Po raz pierwszy założono kultury tłustosza w systemie półpłynnym i płynnym, wskazując, że kultury pędowe *P. vulgaris* namnażają się najszybciej na podłożu półpłynnym ½MS, natomiast kultury pędowe wytrząsane są najbardziej wydajne przy zastosowaniu pełnego składu pożywki MS. Otrzymane w opisanych warunkach *in vitro* liczne pędy *P. vulgaris* były wyrównane fenotypowo i zawierały charakterystyczne metabolity wtórne, akteozyd i katalpol.

Kultury *in vitro* *P. vulgaris* mogą być stosowane do zachowania tego rzadkiego, chronionego gatunku, co podkreślają również inni autorzy [11,22]. Założona kolekcja kultur pędowych chronionego taksonu *P. vulgaris*, utrzymywana długoterminowo w warunkach hodowli *in vitro*, może być traktowana jako forma ochrony gatunkowej *ex situ* (zdjęcie 1g). Namnożone kultury *in vitro* tłustosza mogą stanowić odnawialne źródło wybranych związków (akteozydu i katalpolu) o aktywności biologicznej, dostarczać biomasy bogatej w metabolity wtórne, z przeznaczeniem do dalszych analiz fitochemicznych i badań aktywności biologicznej i farmakologicznej.

## Wnioski

1. Wydajne namnażanie *Pinguicula vulgaris* w kulturze *in vitro* zachodzi drogą organogenezy bezpośredniej z liścia oraz poprzez stymulację z pąków kątowych rozet.
2. Namnożone w kulturze *in vitro* pędy zachowały zdolność do biosyntezy grup związków charakterystycznych dla gatunku *P. vulgaris*.
3. Kultury pędowe chronionego taksonu *P. vulgaris*, stanowiące kolekcję *in vitro* są:
  - potencjalnym źródłem biomasy bogatej w metabolity wtórne,
  - źródłem surowca do badań aktywności biologicznej,
  - stanowią formę ochrony gatunkowej *ex situ*.

Konflikt interesów / Conflict of interest  
Brak/None

Adres do korespondencji / Correspondence address

✉ Michał P. Maliński

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

☎ (+48 61) 668 78 47

✉ mpmalinski@ump.edu.pl

## Piśmiennictwo/References

1. Mikuła A, Makowski D, Tomiczak K i wsp. Kultury *in vitro* i krioprezerwacja w zachowaniu różnorodności roślin – standardy dla banku genów. *Polish J Agron.* 2013;14:3–17.
2. Rybczyński JJ, Mikuła A. Biotechnologia w zachowaniu różnorodności flory Polski. W: Rzadkie, ginące i reliktowe gatunki roślin i grzybów. Konferencja. Kraków; 2006. ss. 31–2.

3. Thiem B, Budzianowski J, Wesołowska M, i wsp. Rośliny rzadkie i ginące w kulturach in vitro obiektem badań fitochemicznych. W: Rzadkie, ginące i reliktowe gatunki roślin i grzybów. Konferencja. Kraków; 2006. ss. 152.
4. 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):158–67.
5. Thiem B, Kikowska M. Zapewnienie jakości roślin leczniczych rozmnażanych w kulturach in vitro. *Herba Pol.* 2008;54(4):168–78.
6. Espinosa-Leal C, Puente-Garza C, García – Lara S. In vitro plant tissue culture : means for production of biological active compounds. *Planta.* 2018;248(1):1–18.
7. Smetanska I. Production of Secondary Metabolites Using Plant Cell Production of Secondary Metabolites Using Plant Cell Cultures. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2017;111(March):187–228.
8. Juniper BE, Robins RJ, Joel DM. Trapping Mechanisms; Phytochemicals. W: Juniper BE, Robins RJ, Joel DM (red.). *The Carnivorous Plants.* Oxford: Academic Press; 1989. ss. 88, 232–3.
9. Bodziarczyk J, Gazda A, Bednarz Z. Tłustosz pospolity dwubarwny *Pinguicula vulgaris* L. ssp. *bicolor* L. (Woł.) Á. Löve & D. Löve na nowo odkrytym stanowisku w Beskidzie Niskim. *Chrońmy Przyr. Ojczystą.* 2009;65(6):431–40.
10. ITIS: Integrated Taxonomic Information System. <https://www.itis.gov/>, data wejścia: 31.05.2021
11. Grevenstuk T, Romano A. In vitro plantlet production of the endangered *Pinguicula vulgaris*. *CEJB.* 2012;7(1):48–53.
12. Różycki A. *Pinguicula vulgaris* subsp. *bicolor*. W: Kaźmierczakowa R, Zarzycki K (red.). *Polska Czerwona Księga Roślin Paprotniki i rośliny kwiatowe.* Kraków: Instytut Botaniki im. W Szafera PAN, Instytut Ochrony Przyrody PAN; 2001. s. 343–5.
13. Piękoś-Mirkowa H, Mirek Z. Tłustosz pospolity. *Pinguicula vulgaris*. W: Piękoś-Mirkowa H, Mirek Z (red.). *Flora Polski Atlas Roślin Chronionych.* Warszawa: MULTICO Oficyna Wydawnicza; 2003. ss. 194–5.
14. Legendre L. The genus *Pinguicula* L. (Lentibulariaceae): An overview. *Acta Bot Gall.* 2000;147(1):77–95.
15. Ratajczak L. Metabolity wtórne w *Pinguicula vulgaris* L. z kultur in vitro. Rozprawa doktorska. Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu; 2006.
16. Jiménez C, Riguera R. Phenylethanoid glycosides in plants: Structure and biological activity. *Nat Prod Rep.* 1994;11(6):591–606.
17. Wilczańska-Barska A, Chmura B, Krauze-Baranowska M. Akteozyd – fenylopropanoid o cennych właściwościach farmakologicznych. *Postępy Fitoter.* 2010;3:157–61.
18. Ma D, Wang J, Liu L, Chen M, Wang Z. Acteoside as a potential therapeutic option for primary hepatocellular carcinoma: a preclinical study. *BMC Cancer.* 2020;20(1):936.
19. Zhang L, Chen K, Li Y. Bioactivities of Natural Catalpol Derivatives. *Curr Med Chem.* 2019;26:6149–73.
20. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 1962;15(3):473–97.
21. Bajaj YPS, Furmanowa M, Olszowska O. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. W: Bajaj YPS (red.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol.4. Medicinal and Aromatic Plants I.* Springer- Verlag; 1988. Berlin, Heidelberg, ss. 60-103.
22. Coelho N. In vitro propagation of insectivorous plants for phytochemical purposes In vitro propagation of insectivorous plants for phytochemical purposes. Master thesis. Universidade do Algarve; 2009.
23. Szopa A, Kokotkiewicz A, Marzec-Wróblewska U, i wsp. Accumulation of dibenzocyclooctadiene lignans in agar cultures and in stationary and agitated liquid cultures of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(9):3965–77.
24. Grzegorzczak-Karolak I, Rytczak P, Bielecki S. The influence of liquid systems for shoot multiplication , secondary metabolite production and plant regeneration of *Scutellaria alpina*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 2017;128(2):479–86.
25. Clapa D, Fira A, Pacurar I. In Vitro Propagation of *Pinguicula vulgaris*. *Bull Univ Agric Sci Vet Med Cluj-Napoca Hortic.* 2010;67(1):330–5.
26. Ratajczak L, Budzianowski J. Wstępna analiza związków fenolowych w *Pinguicula vulgaris* L. z kultur in vitro. W: XVIII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego „Farmacja w XXI wieku”. Poznań, 19-22 IX 2001. Streszczenia. T. 1, s.233
27. Grevenstuk T. Phytochemical studies and biological activity of carnivorous plants from the Mediterranean region. Rozprawa doktorska. Universidade do Algarve; 2010.
28. Liao Z, Chen M, Sun X, i wsp. Micropropagation of Endangered Plant Species. W: Loyola-Vargas VM., Vázquez-Flota F. *Plant Cell Culture Protocols.* New Jersey: Humana Press; 2006. ss. 179–86.
29. Lemma D, Banjaw D, Megersa H. Micropropagation of Medicinal Plants: a Review. *Int J Econ Plants.* 2020;7(2):796–802.
30. Kikowska M, Turowska N, Thiem B. Czy kultury in vitro gatunków roślin chronionych mogą być źródłem surowców do badań fitochemicznych i biologicznych? *Farm Współ.* 2019;4:210-7.
31. Tondowska D. Kultury pędowe wybranych roślin leczniczych. Praca magisterska. Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu; 2021