

Streszczenie

Rodzaj tłustosz *Pinguicula* to grupa monofiletyczna, która obejmuje około 116 gatunków roślin mięsożernych. Rodzaj ten stanowi linię siostrzaną względem bardziej zaawansowanych ewolucyjnie rodzajów *Utricularia* oraz *Genlisea*, które wspólnie zaliczane są do rodziny pływaczowatych Lentibulariaceae. Centrum bioróżnorodności *Pinguicula* położone jest w Ameryce Centralnej, występuje tam niemal połowa wszystkich poznanych gatunków tego rodzaju. Gatunki *Pinguicula* z Ameryki Centralnej charakteryzują się dużą różnorodnością kwiatów, w kontekście: koloru i kształtu korony, długości i szerokości gardzieli, a także długości i kształtu ostrogi. Ponadto, gatunki te wykazują różne strategie zapylania. Możemy wyróżnić gatunki zapylane przez: muchówki i/lub błonkoskrzydłe, motyle oraz prawdopodobnie kolibry. W ubiegłym wieku różnorodność kwiatów *Pinguicula*, badano intensywnie w kontekście ich potencjalnego zastosowania w systematyce oraz taksonomii. Profesor Jost S. Casper zaproponował wewnątrz rodzajową klasyfikację *Pinguicula*, opartą na podstawie morfologii kwiatów. Rodzaj *Pinguicula* został podzielony do trzech podrodzajów i dalej do poszczególnych sekcji. Jednak, w ostatnim czasie ukazały się prace filogenetyczne, których wyniki porównania sekwencji poszczególnych genów (*ITS*; *matK*; *trnK*), podważają tradycyjną klasyfikację. Badania molekularne wykazały, że rzeczywiście w obrębie *Pinguicula* występują trzy główne linie ewolucyjne, jednak w poprzedniej klasyfikacji *sensu* Caspera część taksonów z Ameryki Centralnej była przydzielona do niewłaściwych sekcji, a nawet podrodzajów. Wszystkie obecne rekonstrukcje filogenetyczne rodzaju *Pinguicula* wskazują, że gatunki z Ameryki Centralnej pochodzą od wspólnego przodka i zalicza się je do podrodzaju *Temnoceras*.

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie różnorodności budowy kwiatów oraz nagród kwiatowych u wybranych gatunków *Pinguicula* pochodzących z Ameryki Centralnej, które różnią się pod względem strategii zapylania. Praca ta dostarcza wszechstronnej wiedzy na temat: i) anatomii oraz morfologii ostrogi wliczając w to budowę włosków nektarowych; ii) struktury oraz roli jaką pełnią włoski niegruczołowe oraz iii) mikromorfologii kwiatów gatunków *Pinguicula* z Ameryki Centralnej. Badania mikromorfologiczne oraz anatomiczne kwiatów przeprowadzono odpowiednio za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego oraz mikroskopu świetlnego. Strukturę włosków nektarowych badano za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Procedury histochemiczne wykorzystano do sprawdzenia obecności białek, tłuszczu i cukrów w

komórkach włosków niegruczołowych. Dodatkowo, wybrane cechy kwiatowe oraz zespoły zapylania zostały zmapowane na rekonstrukcje filogenetyczne, obejmujące badane gatunki. Pozwoliło to zweryfikować, czy na pojawienie się poszczególnych cech kwiatowych większy wpływ miała adaptacja do określonej grupy zapylaczy, czy też obecność ich jest wynikiem pokrewieństwa pomiędzy badanymi gatunkami.

Badania morfologiczno-anatomiczne wykazały podobną budowę ostrogi, a także włosków nektarowych u zbadanych gatunków *Pinguicula*. Analiza ultrastruktury komórek włosków nektarowych, ujawniła wiele cech wspólnych pomiędzy gatunkami *Pinguicula*, a gatunkami *Utricularia*: komórka bazalna oraz trzoneczka były silnie zwakuolizowane; komórka endodermalna (barierowa) posiadała ściany boczne silnie wysyczone kutyną; komórki terminalne charakteryzowały się gęstą cytoplazmą z licznymi mitochondriami oraz plastydami, dobrze rozwiniętym labiryntem ściennym (u *P. esseriana*), grubą kutykulą, a także przestrzenią subkutykularną w której gromadzi się nektar.

Analiza histochemiczna wykazała obecność ziaren skrobi w komórkach kwiatowych włosków niegruczołowych wśród gatunków występujących w Ameryce Centralnej, które są zapylane przez muchówki/błonkoskrzydłe i należą do podrodzaju *Temnoceras* (brak ziaren skrobi w komórkach włosków u *P. alpina*). Włoski te mogą pełnić funkcję włosków jadalnych. Co ciekawe, kwiatowe włoski niegruczołowe gatunków zapylanych przez muchówki/błonkoskrzydłe z podrodzajów *Isoloba* oraz *Pinguicula*, a także gatunków zapylanych przez motyle i kolibry z podrodzaju *Temnoceras* nie zawierały materiałów zapasowych. Z filogenetycznego punktu widzenia, włoski jadalne są cechą symplezjomorficzną dla rodzaju *Pinguicula*.

Badania mikromorfologiczne wykazały, wiele podobieństw w budowie kwiatów gatunków zapylanych przez motyle i kolibry, w przeciwieństwie do gatunków zapylanych przez muchówki/błonkoskrzydłe, których budowa kwiatów była odmienna. Gatunki zapylane przez motyle i kolibry charakteryzowały się małą różnorodnością włosków niegruczołowych (1-2 typy włosków w obrębie gatunku). Występowanie włosków niegruczołowych ograniczone było do gardzieli oraz bazalnej części ostrogi, z największym ich zagęszczeniem przy wejściu do ostrogi. Z kolei, gatunki zapylane przez muchówki/błonkoskrzydłe charakteryzowały się dużym zróżnicowaniem włosków niegruczołowych (3-4 typy włosków w obrębie gatunku). Włoski niegruczołowe rozmieszczone były na niemal całej powierzchni korony oraz gardzieli. Ich zagęszczenie było większe na wejściu do gardzieli oraz wewnątrz gardzieli, niż w obrębie płatków korony. Śledzenie ewolucji mikromorfologicznych cech

kwiatowych wykazało, że występowanie większości cech wydaje się być związane z konkretnym syndromem zapylania, podczas gdy tylko niewielka liczba cech jest wspólna dla wszystkich badanych gatunków *Pinguicula*.

Podsumowując, wyniki przedstawionych badań wskazują, że różnorodność morfologiczna kwiatów, która charakteryzuje gatunki *Pinguicula* pochodzące z Ameryki Centralnej, jest najprawdopodobniej wynikiem ich adaptacji do poszczególnych grup zapylaczy. Pojawienie się włosków jadalnych wśród gatunków pochodzących z Ameryki Centralnej, zapylanych przez muchówki/błonkoskrzydłe również może być związane ze specjalizacją kwiatów względem zapylaczy, gdzie włoski stanowią dla nich dodatkową nagrodę kwiatową. Z kolei budowa ostrogi oraz włosków nektarowych okazała się być silnie konserwatywna wśród zbadanych gatunków *Pinguicula* z Ameryki Centralnej. Występowanie podobnych główkowatych włosków nektarowych wewnątrz ostrogi opisano oraz udokumentowano również dla przedstawicieli pozostałych rodzajów w obrębie rodziny Lentibulariaceae. Włoski nektarowe u gatunków *Pinguicula* oraz *Utricularia* posiadały wiele cech wspólnych. Jednak w przeciwieństwie do gatunków *Utricularia* u *P. moctezumae*, *P. moranensis* oraz *P. emarginata* (z wyjątkiem *P. esseriana*) w komórkach gruczołowych brak było labiryntu ściennego (lub był on słabo rozwinięty), co może wskazywać na inny mechanizm sekrecji nektaru, niż u *Utricularia*.

Bal P

Krzysztof Duszyński

Abstract

Butterwort *Pinguicula* genus is a monophyletic group and is comprised of about 116 carnivorous plant species. *Pinguicula* constitute sister lineage to a more advanced evolutionary genera *Utricularia* and *Genlisea*, which together belong to Lentibulariaceae family. The main biodiversity center of *Pinguicula* is located in Central America, where almost half of all species of this genus occur. Central American *Pinguicula* species are characterized by the great variety of flowers with respect to color and shape of the corolla, length and width of the tube, as well as length and shape of the spur. Moreover, Central American *Pinguicula* species display different pollination strategies. We can distinguish species pollinated by: flies and/or bees (myophily/mellitophily syndrome), butterflies (psychophily syndrome) and possibly by hummingbirds (ornithophily syndrome). In the last century, the variety of *Pinguicula* flowers have been extensively studied in the context of their potential significance in systematic and taxonomy. Professor Jost S. Casper proposed the infrageneric classification of *Pinguicula* genus based on floral morphology. *Pinguicula* species were classified into three subgenera and further into particular sections. However, recently released phylogenetic works based on the comparison of genes sequences (*ITS*; *matK*; *trnK*), question traditional classification. Phylogenetic analyses show that, indeed, there occur three main evolutionary lineages within *Pinguicula* genus. However, previous classification *sensu* Casper assigned part of Central American *Pinguicula* taxa into wrong sections or even wrong subgenus. Phylogenetic reconstructions of *Pinguicula* genus indicate that Central American species descended from a common ancestor and belong to *Temnoceras* subgenus.

The main objective of the doctoral dissertation was to study the diversification of flower structure and floral rewards of chosen Central American *Pinguicula* species, which differ in terms of pollination strategies. This doctoral dissertation provides a comprehensive knowledge concerning: i) the anatomy and morphology of the spur including the structure of the nectary trichomes; ii) the structure and functions of the non-glandular trichomes, and iii) the detailed micromorphology of flowers of *Pinguicula* species from Central America. The micromorphological and anatomical studies of flowers were performed by means of scanning electron and light microscope, respectively. Nectary trichomes structure was examined by transmission electron microscope. Histochemical procedures were used to determine the presence of protein bodies, lipid droplets or starch grains in the cells of nonglandular trichomes. Additionally, selected floral traits and pollination syndromes have been mapped

onto the phylogenetic reconstructions of examined *Pinguicula* species. This allowed me to verify whether the emergence of particular floral traits were more influenced by adaptation to particular group of pollinators or were more related with their phylogenetic position.

Results showed that morphology and anatomy of the spur and structure of nectary trichome were the same across examined *Pinguicula* species. Ultrastructural analysis revealed many similarities between *Pinguicula* and *Utricularia* nectary trichomes, such as: highly vacuolated basal cell and stalk cell; pedestal cell had heavily impregnated lateral walls with cutin; terminal cells characterized by dense cytoplasm with numerous mitochondria and plastids, the occurrence of well-developed cell wall ingrowths (in the case of *P. esseriana*), a thick cuticle and a subcuticular space for accumulating nectar.

Histochemical analysis revealed occurrence of starch grains, in the cells of nonglandular trichomes of Central American species with myophily/mellitophily syndrome, which belongs to *Temnoceras* subgenus (lack of starch grains in trichomes of *P. alpina*). Interestingly, species pollinated by flies/bees from *Isoloba* and *Pinguicula* subgenera, as well as species from *Temnoceras* subgenus with psychophily and ornithophily syndromes did not contain any of food material in the cells of trichomes. From phylogenetic perspective edible trichomes are symplesiomorphic for *Pinguicula*.

Micromorphological studies, showed similar floral structure of species pollinated by butterflies and birds, in opposition to species pollinated by flies/bees, which had different flower structure. Psychophily and ornithophily species contained low diversity of nonglandular trichomes (1-2 types per species), distributed within tube and basal spur, with highest density at the entrance to the spur. In turn, myophily/mellitophily species were characterized by the high diversity of nonglandular trichomes (3-4 types per species), distributed on most of the corolla surface and tube. Their density was higher at the entrance to the tube and within tube, than on corolla petals. Character tracing analysis revealed that most of micromorphological floral traits appear to be associated with pollination syndromes, whereas only a small number of characteristics are shared among all species of *Pinguicula*.

In conclusion, the results presented in the thesis indicate that variety of floral morphological features, which characterize Central American *Pinguicula* species, most likely results from their adaptation to a specific group of pollinators. Similarly, edible trichomes which emerged only for myophily/mellitophily species native to Central America are probably related with specialization for fly and bee pollinators and constitute an additional

floral reward. In turn, the structure of the spur and nectary trichomes are conservative among examined *Pinguicula* species. Similar nectary capitate trichomes within spur have been also described and recorded for members of other Lentibulariaceae genera. Many ultrastructural similarities within nectary trichomes of *Pinguicula* and *Utricularia* species have been found. However, in opposition to *Utricularia* species in *P. moctezumae*, *P. moranensis* and *P. emarginata* (except *P. esseriana*) terminal cells did not contain cell wall ingrowths (or were poorly developed), which may indicate a different mode of secretion than in *Utricularia* species.

30/12

Kryzstof Jusztajin