



ROZPRAWA DOKTORSKA

Małgorzata Kikowska

**Krajowe gatunki rodzaju *Eryngium* L. w kulturze *in vitro* –
mikrorozmnażanie, kultury organów, ocena fitochemiczna
i aktywność biologiczna**

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin

Wydział Farmaceutyczny

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Promotor: dr hab. Barbara Thiem

Badania prowadzono w ramach projektu N N405683340 na lata 2011-2014 oraz częściowo projektu N N405065334 na lata 2008-2011 finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

Poznań, 2014



DOCTORAL THESIS

Małgorzata Kikowska

***In vitro* cultures of Polish *Eryngium* L. species –
micropropagation, organ cultures, phytochemical
investigation and biological activity**

Department of Pharmaceutical Botany and Plant Biotechnology

Faculty of Pharmacy

Poznan University of Medical Sciences

Supervisor: dr hab. Barbara Thiem

The study was realized as a part of the research projects N N405683340 in 2011-2014 and N N405065334 in 2008-2011 supported by the Ministry of Science and Higher Education

Poznan, 2014

Słowa kluczowe: *Eryngium planum*, *Eryngium maritimum*, *Eryngium campestre*, mikropropagacja, kultury *in vitro* korzeni i pędów, akumulacja metabolitów wtórnych, aktywność biologiczna

Key words: *Eryngium planum*, *Eryngium maritimum*, *Eryngium campestre*, mikropropagation, *in vitro* root and shoot cultures, secondary metabolites accumulation, biological activity

*Za możliwość wykonania części badań, pomoc w interpretacji wyników
i konsultacje naukowe
serdeczne podziękowania składam*

Dr. hab. Markowi Muriasowi
Dr. hab. Adamowi Matkowskiemu

*Za pomoc w realizacji części badań, pomoc w interpretacji wyników
i konsultacje naukowe
serdeczne podziękowania składam*

Prof. dr hab. Elwirze Śliwińskiej
Prof. dr hab. Annie Stochmal
Dr Jolancie Długaszewskiej

Pragnę serdecznie podziękować

Pani dr hab. Barbarze Thiem

za włączenie do tematyki kultur *in vitro* polskich gatunków mikołajków
cenne uwagi merytoryczne
oraz pomoc w realizacji pracy doktorskiej

Panu prof. dr. hab. Jaromirowi Budzianowskiemu

za umożliwienie wykonania niniejszej pracy
oraz cenne uwagi merytoryczne

oraz

Koleżankom i Kolegom

z Katedry i Zakładu Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin
za dobrą współpracę i życzliwą atmosferę

Rozprawa doktorska obejmuje wyniki prac doświadczalnych dotychczas niepublikowanych oraz zawartych w następujących publikacjach:

Kikowska M, Thiem B, Krawczyk A. Rosmarinic acid accumulation in the cell suspension culture of *Eryngium planum* L. Acta Biochim Pol 2009:56 suppl. 2:71-73

Thiem B, **Kikowska M**. Hairy roots and untransformed root culture of *Eryngium* L. species. Acta Biochim Pol 2009:56 suppl. 2:78-79

Kikowska M, Budzianowski J, Krawczyk A, Thiem B. Accumulation of rosmarinic, chlorogenic and caffeic acids in *in vitro* cultures of *Eryngium planum* L. Acta Physiol Plant 2012:34(6):2425-2433, **KBN=25.000, IF=1.305**

Thiem B, **Kikowska M**, Krawczyk A, Więckowska B, Sliwiska E. Phenolic acids and DNA contents of micropropagated *Eryngium planum* L. Plant Cell Tiss Organ Cult 2013:114(2):197-206, **KBN=35.00, IF=3.633**

Kikowska M, Thiem B, Sliwiska E, Rewers M, Kowalczyk M, Stochmal A, Oleszek W. Micropropagation and production of phenolic acids and saponins from plantlets and adventitious root cultures of *Eryngium maritimum* L. (manuskrypt przyjęty do publikacji w JPGR) **KBN=35.00, IF=1.990**

Częściowe wyniki zaprezentowane zostały w postaci komunikatów i streszczeń zjazdowych:

Thiem B, **Kikowska M**, Paluch I (2009) Accumulation of bioactive secondary metabolites in *in vitro* cultures of *Eryngium planum* L. Young Scientist Meeting – Future Trends in Phytochemistry in the Global Era of Agri-food and Health, Los Narejos, Spain, Book of Abstracts, p. 108

Kikowska M, Thiem B (2009) Characteristic of the cell suspension culture of *Eryngium planum* L. 12th National Conference: *In vitro* cultures, Poznań 2009. Acta Biol Cracov Ser Bot 51(1), p. 45

Kikowska M (2009) Kwas rozmarynowy w kulturach *in vitro* gatunków z rodzaju *Eryngium* L. Conference of Bioactive Plant Compounds – Structural and Applicative Aspects, Puławy, Poland (prezentacja ustna)

Kikowska M, Thiem B (2010) Biotechnologiczna ocena kultur komórkowych *Eryngium planum* L. Ogólnopolska Konferencja Naukowa: Postęp w ocenie jakości substancji i produktów leczniczych; Poznań, Wydaw Nauk Uniw Med im Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, s. 123

Thiem B, **Kikowska M** (2010) Ocena jakości biomasy kultur *in vitro* *Eryngium planum* L. Ogólnopolska Konferencja Naukowa: Postęp w ocenie jakości substancji i produktów leczniczych; Poznań, Wydaw Nauk Uniw Med im Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, s. 124

Kikowska M, Thiem B (2010) Micropropagation of rare and protected species - *Eryngium maritimum* L. Proceedings of the 55th Meeting of the Polish Botanical Society - Planta in vivo, in vitro et in silico; Poznań, Poland; Acta Soc Bot Pol, 79, suppl. 1, p. 110

Thiem B, **Kikowska M**, Plauch I, Krawczyk A (2011) Effect of osmotic stress and yeast extract on accumulation of rosmarinic acid in shoot cultures of *Eryngium planum* L. II Conference of Bioactive Plant Compounds - Structural and Applicative Aspects. Puławy, Poland; Abstracts pp. 37-39

Thiem B, Budzianowski J, **Kikowska M**, Budzianowska A, Derda M, Hadaś E, Goślińska O, Murias Kucińska M, Piotrowska H, Ożarowski M, Mikołajczak P (2011) *Eryngium planum* L. - a search for biological activities. 6th Polish-German Symposium on Pharmaceutical Sciences, Perspectives for a new decade, Düsseldorf, Germany; Abstracts P035

Thiem B, **Kikowska M** (2012) Kultury *in vitro* gatunków *Eryngium* L. jako alternatywne źródła kwasu rozmarynowego i kompleksu triterpenowych saponin. V Krajowe Sympozjum, Naturalne i syntetyczne produkty zapachowe i kosmetyczne, Łódź, Poland; Streszczenie referatów s. 39 (prezentacja ustna)

Thiem B, **Kikowska M**, Matkowski A, Jęderek D, Kowalczyk M (2012) UPLC-MS/MS determination of phenolic acids from selected raw material of *Eryngium* species. 8th International Symposium on Chromatography of Natural Products (ISCNP), The application of analytical methods for the development of natural products, Lublin, Poland, Book of Abstracts p. 170

Kikowska M, Thiem B (2013) Organ cultures of *Eryngium* L. as an alternative source of bioactive compounds. Interdyscyplinarne i aplikacyjne znaczenie nauk botanicznych. 56. Zjazd Polskiego Towarzystwa Botanicznego; Olsztyn, Poland. Streszczenia wystąpień ustnych i plakatów, str. 304

SPIS TREŚCI

WSTĘP I ZAŁOŻENIA PRACY	14
CZEŚĆ TEORETYCZNA	17
1. Charakterystyka botaniczna i występowanie krajowych gatunków z rodzaju <i>Eryngium</i> L.	17
1.1. Klasyfikacja taksonomiczna	17
1.2. Charakterystyka botaniczna rodzaju <i>Eryngium</i>	21
1.3. Rozmieszczenie geograficzne i warunki siedliskowe	23
1.4. Szczegółowa charakterystyka gatunków z rodzaju <i>Eryngium</i>	24
1.4.1. <i>Eryngium planum</i> L.	24
1.4.2. <i>Eryngium maritimum</i> L.	26
1.4.3. <i>Eryngium campestre</i> L.	29
2. Związki chemiczne występujące w gatunkach z rodzaju <i>Eryngium</i> L.	32
2.1. Saponiny triterpenowe	32
2.1.1. Występowanie i struktura chemiczna	32
2.1.2. Saponiny triterpenowe w rodzaju <i>Eryngium</i>	33
2.1.3. Właściwości biologiczne i farmakologiczne saponin triterpenowych	37
2.1.4. Zastosowanie saponin w lecznictwie	41
2.2. Kwasy fenolowe	42
2.2.1. Kwas rozmarynowy	42
2.2.1.1. Występowanie i struktura chemiczna	42
2.2.1.2. Kwas rozmarynowy w rodzaju <i>Eryngium</i>	43
2.2.1.3. Właściwości biologiczne i farmakologiczne kwasu rozmarynowego	44
2.2.2. Kwas chlorogenowy	46
2.2.2.1. Występowanie i struktura chemiczna	46
2.2.2.2. Kwas chlorogenowy w rodzaju <i>Eryngium</i>	46
2.2.2.3. Właściwości biologiczne i farmakologiczne kwasu chlorogenowego	46
2.2.3. Kwas kawowy	48
2.2.3.1. Występowanie i struktura chemiczna	48
2.2.3.2. Właściwości biologiczne i farmakologiczne kwasu kawowego	48
2.3. Flawonoidy	50
2.3.1. Występowanie i struktura chemiczna	50

2.3.2. Flawonoidy w rodzaju <i>Eryngium</i>	50
2.3.3. Właściwości biologiczne i farmakologiczne wybranych flawonoidów	51
2.4. Inne związki chemiczne	54
2.4.1. Olejki eteryczne	54
2.4.1.1. Występowanie i struktura chemiczna	54
2.4.1.2. Olejki eteryczne w rodzaju <i>Eryngium</i>	55
2.4.1.3. Właściwości biologiczne i farmakologiczne olejków eterycznych	56
2.4.2. Kumaryny	57
2.4.2.1. Występowanie i struktura chemiczna	57
2.4.2.2. Kumaryny w rodzaju <i>Eryngium</i>	58
2.4.2.3. Właściwości biologiczne i farmakologiczne wybranych kumaryn	58
2.4.3. Poliacetyleny	60
2.4.3.1. Występowanie i struktura chemiczna	60
2.4.3.2. Poliacetyleny w rodzaju <i>Eryngium</i>	60
2.4.3.3. Właściwości biologiczne i farmakologiczne poliacetylenów	61
2.4.4. Fitosterole	62
2.4.4.1. Występowanie i struktura chemiczna	62
2.4.4.2. Fitosterole w rodzaju <i>Eryngium</i>	62
2.4.4.3. Właściwości biologiczne i farmakologiczne fitosteroli	62
2.4.5. Ekdysteroidy	63
2.4.6. Betainy	64
3. Właściwości, działanie lecznicze i zastosowanie surowców <i>Eryngium</i> L	65
4. Wybrane roślinne kultury <i>in vitro</i>	72
4.1. Mikrorozmnażanie roślin leczniczych	73
4.2. Kultury organów normalnych (nietransformowanych)	75
4.2.1. Kultury korzeniowe	76
4.2.2. Kultury pędowe	79
4.3. Kultury komórkowe	81
5. Zabiegi biotechnologiczne stosowane w celu zwiększenia akumulacji metabolitów wtórnych w kulturach <i>in vitro</i>	82
SKRÓTY STOSOWANE W PRACY	86
CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	89
1. Materiał i metody badawcze stosowane w kulturach <i>in vitro</i>	89

1.1. Materiał badawczy	89
1.2. Pożywki i roztwory	90
1.3. Zabiegi biotechnologiczne stosowane w kulturach <i>in vitro</i>	95
1.4. Warunki sterylizacji i pracy w warunkach aseptycznych	96
1.5. Warunki prowadzenia kultur <i>in vitro</i>	96
1.6. Metody badawcze	97
1.6.1. Indukcja sterylnych siewek	97
1.6.2. Namnażanie pędów i optymalizacja warunków kultur pędowych	98
1.6.3. Analizy cytogenetyczne	99
1.6.4. Ukorzenianie pędów	99
1.6.5. Hartowanie roślin	100
1.6.6. Zapoczątkowanie i optymalizacja warunków kultur korzeniowych	101
1.6.7. Kultury pędowe w płynnych pożywkach	101
1.6.8. Indukcja i stabilizacja kultur komórkowych	102
2. Materiał i metody stosowane w analizach fitochemicznych	103
2.1. Chromatografia cienkowarstwowa (1D TLC i 2D TLC)	103
2.1.1. Ekstrakcja materiału roślinnego do wstępnych analiz fitochemicznych	103
2.1.2. Wstępne analizy chromatograficzne	103
2.1.3. Frakcjonowanie ekstraktów do analiz TLC	106
2.1.4. Frakcjonowanie ekstraktów do badań biologicznych	106
2.1.5. Wstępne analizy densytometryczne	107
2.2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)	108
2.2.1. Ekstrakcja materiału roślinnego	108
2.2.2. Analizy chromatograficzne	108
2.3. Ultrasprawa chromatografia cieczowa (UPLC)	109
2.3.1. Ekstrakcja materiału roślinnego	109
2.3.2. Analizy chromatograficzne	109
2.4. Metoda spektrofotometryczna	110
2.4.1. Wykreślenie krzywej kalibracyjnej dla wzorcowego kwasu galusowego	110
2.4.2. Ekstrakcja materiału roślinnego	111
2.4.3. Oznaczenie zawartości sumy polifenoli	112
3. Materiał i metody stosowane w badaniach aktywności biologicznych	113
3.1. Aktywność cytotoksyczna i proapoptotyczna	113

3.1.1. Test LDH	114
3.1.2. Test SRB	114
3.1.3. Test z kaspazą 3	115
3.1.4. Aneksyna V i jodek propidyny	115
3.1.5. Technika PCR-array	116
3.2. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa	118
3.2.1. Metoda seryjnych rozcieńczeń	118
3.3. Aktywność antyoksydacyjna	120
3.3.1. Test DPPH	120
3.3.2. Test PMo	121
3.3.3. Test z deoksyrybozą	122
4. Obliczenia statystyczne	124
WYNIKI	125
1. Wybrane kultury <i>in vitro</i> krajowych gatunków <i>Eryngium</i> L.	125
1.1. Mikrorozmnażanie	125
1.1.1. Indukcja sterylnych siewek	125
1.1.2. Namnażanie pędów poprzez rozwój pąków szczytowych i bocznych oraz optymalizacja warunków kultur pędowych	127
1.1.3. Analizy cytogenetyczne	132
1.1.4. Ukorzenianie pędów	135
1.1.5. Hartowanie roślin	139
1.2. Kultury korzeniowe	142
1.3. Kultury pędowe	167
1.4. Kultury komórkowe	173
2. Akumulacja metabolitów wtórnych w organach z roślin gruntowych i wybranych kultur <i>in vitro</i> <i>Eryngium planum</i> L., <i>E. maritimum</i> L. i <i>E. campestre</i> L	175
2.1. Wstępne analizy TLC	175
2.1.1. Wstępne analizy TLC obecności metabolitów wtórnych w organach roślin gruntowych i roślin zregenerowanych w kulturach <i>in vitro</i>	175
2.1.2. Wstępne analizy TLC metabolitów wtórnych w kulturach korzeniowych	183
2.1.3. Wstępne analizy TLC metabolitów wtórnych w elicytowanych kulturach	187

pędowych	
2.1.4. Wstępne analizy TLC metabolitów wtórnych w kulturach niezróżnicowanych	190
2.2. Analizy HPLC i UPLC	192
2.2.1. Ocena fitochemiczna biomasy z organów roślin gruntowych i z roślin zregenerowanych w kulturach <i>in vitro</i>	192
2.2.2. Ocena fitochemiczna biomasy z kultur korzeniowych <i>E. maritimum</i>	200
2.2.3. Ocena fitochemiczna biomasy z kultur pędowych <i>E. planum</i> po zabiegach biotechnologicznych	202
2.2.4. Ocena fitochemiczna biomasy z kultur komórkowych <i>E. planum</i> po zabiegach biotechnologicznych	204
2.2.5. Oznaczenie całkowitej sumy polifenoli	205
3. Aktywność biologiczna ekstraktów i frakcji roślin gruntowych i kultur <i>in vitro</i> <i>Eryngium L</i>	207
3.1. Aktywność cytotoksyczna i proapoptotyczna frakcji <i>E. planum</i>	207
3.1.1. Ocena stopnia cytotoksyczności badanych frakcji testami LDH i SRB	208
3.1.2. Ocena zdolności frakcji saponinowych do indukcji apoptozy	210
3.1.3. Ocena wpływu frakcji saponinowych na aktywność kaspazy 3	213
3.1.4. Oznaczenie wpływu frakcji saponinowej na ekspresję genów pro- i antyapoptotycznych	214
3.2. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa ekstraktów i ich frakcji <i>Eryngium L</i> .	217
3.2.1. Ocena aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej	217
3.3. Aktywność antyoksydacyjna ekstraktów <i>Eryngium L</i>	217
3.3.1. Ocena zdolności zmiatania wolnego rodnika DPPH	222
3.3.2. Ocena zdolności redukcji jonów molibdenu w teście fosfomolibdenowym	226
3.3.3. Ocena zdolności zahamowania degradacji oksydacyjnej 2-deoksyrybozy przez rodnik hydroksylowy	227
DYSKUSJA	229
WNIOSKI	265
STRESZCZENIE	267
SUMMARY	269
WYKAZ FOTOGRAFII, RYCIN I TABEL	271
PIŚMIENNICTWO	280

WSTĘP I ZAŁOŻENIA PRACY

Jednym z ważniejszych obszarów biotechnologii roślin jest produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro*. Z obecnie znanych, około 20 000 roślinnych związków chemicznych to substancje roślinne, o bardzo złożonej budowie, możliwe do otrzymania poprzez niezwykle trudną i kosztowną syntezę chemiczną. W warunkach naturalnych biosynteza metabolitów wtórnych przebiega powoli i na ogół z bardzo małą wydajnością. Ponadto dostępność materiału roślinnego może być ograniczona ze względu na specyfikę wymagań klimatycznych, postępującą degradację środowiska naturalnego, ścisłą ochronę niektórych gatunków czy powolny wzrost roślin. W świetle tych ograniczeń produkcja metabolitów wtórnych o cennej aktywności terapeutycznej z użyciem kultur *in vitro* może być alternatywnym rozwiązaniem. Szerokie zapotrzebowanie na naturalne produkty pochodzenia roślinnego skłania do poszukiwania nowych, alternatywnych źródeł substancji o aktywności biologicznej. Metody roślinnych kultur *in vitro* umożliwiają ścisłą kontrolę i optymalizację procesów biosyntezy. Mimo problemów związanych z wysokimi kosztami inwestycji uważa się, że produkcja metabolitów wtórnych tą metodą ma dużą przyszłość. Wiele koncernów farmaceutycznych i kosmetycznych prowadzi szerokie programy badawcze w tym zakresie. W ostatnich latach obserwuje się ogromną liczbę publikacji świadczących o biotechnologicznych metodach pozyskiwania substancji leczniczych. Ponadto, kultury *in vitro* są wydajną metodą szybkiego, klonalnego mnożenia wartościowych roślin, w tym gatunków leczniczych i produkcji certyfikowanych mikrosadzonek, spełniających wymogi GLP (Good Laboratory Practice), GMP (Good Manufacturing Practice) and GAP (Good Agricultural Practice).

Obiekt badań stanowiły nieznane szerzej krajowe gatunki mikołajków: *Eryngium planum* L. (mikołajek płaskolistny), *E. maritimum* L. (m. nadmorski) i *E. campestre* L. (m. polny), zawierające bogaty zestaw metabolitów wtórnych. Gatunki te były dotąd znane tylko z medycyny tradycyjnej w Polsce i Europie. Ich działanie lecznicze uzasadniają nieliczne badania fitochemiczne i aktywności biologicznej. Ostatnio w świecie obserwuje się zwiększone zainteresowanie gatunkami z rodzaju *Eryngium*. Szereg publikacji wskazuje na szeroki wachlarz aktywności biologicznych i farmakologicznych wielu gatunków tego najliczniejszego taksonu rodziny *Apiaceae*. Gatunki mikołajków występujące w Polsce charakteryzują się relatywnie niską zawartością metabolitów wtórnych o aktywności biologicznej. Roślinne kultury *in vitro*

umożliwiłyby produkcję biomasy charakteryzującej się wysoką zdolnością do biosyntezy pożądaných metabolitów, niezależnie od pór roku i warunków klimatycznych, dostarczając w sposób ciągły wartościowego surowca.

Podjęcie w niniejszym projekcie badań dotyczących gatunków leczniczych *Eryngium* występujących w Polsce wynikało ze skąpych informacji w piśmiennictwie na temat zawartości głównych metabolitów i aktywności biologicznej tych taksonów, szczególnie *E. planum*. W publikacjach istnieją dowody na aktywność biologiczną saponin triterpenowych i kwasów fenolowych, co wskazuje na potencjalne prozdrowotne właściwości związków obecnych w badanych gatunkach.

Badania objęte rozprawą są kontynuacją wcześniejszego zainteresowania w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin krajowymi gatunkami mikołajków i ich wstępnych badań w zakresie kultur *in vitro*. Stan wiedzy na temat krajowych gatunków *Eryngium* zachęcił do przeprowadzenia w niniejszej rozprawie trzech rodzajów badań, które kolejno miały na celu:

- biotechnologiczne opracowanie wydajnych systemów mikropropagacji mikołajków, z uwagi na ich ograniczony obszar występowania oraz status ochrony gatunkowej mikołajka nadmorskiego. Cel ten realizowano poprzez modyfikację składu pożywek podstawowych w zakresie stężeń soli mineralnych i sacharozy oraz typu i stężeń regulatorów wzrostu i rozwoju roślin.
- porównanie potencjału roślin w zakresie produkcji wybranych związków w warunkach *in vitro*. Zamierzano wyprowadzić kultury organów i kultury komórkowe oraz wyselekcjonować, wysoko-produktywne kultury dla każdego taksonu. Po ocenie zdolności kultur do biosyntezy głównych metabolitów wtórnych, namnożoną w warunkach *in vitro* biomasę elicytowano wybranymi czynnikami: jasmonianem metylu, ekstraktem drożdżowym oraz sacharozą o podwyższonym stężeniu. Badano wpływ rodzaju elicytora i czasu ekspozycji materiału roślinnego na zawartość bioaktywnych związków w wybranych kulturach. Równoległe do doświadczeń z zakresu roślinnych kultur *in vitro* prowadzono skryningowe badania fitochemiczne materiału roślinnego, potwierdzając skład jakościowy i oceniając zawartość wybranych metabolitów wtórnych, przed i po zabiegach biotechnologicznych.

- ocenę aktywności biologicznych: cytotoksycznych i proapoptotycznych, przeciwutleniających oraz przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych wybranych ekstraktów z organów z roślin gruntowych lub/ i kultur *in vitro* gatunków z rodzaju *Eryngium* L.

W efekcie zamierzano uzyskać stałą i odnawialną biomasę roślinną o podobnym profilu metabolicznym do roślin gruntowych, ukierunkowaną na wyższą akumulację określonych saponin triterpenowych i fenolokwasów oraz przeprowadzić badania w zakresie wybranych aktywności biologicznych ekstraktów organów roślin gruntowych i pochodzących z kultur *in vitro*.

Dla krajowych gatunków mikołajków nie opracowano dotychczas protokołów mikrorozmnażania i wyprowadzania różnych typów kultur *in vitro*, jak również taksony te w niewielkim stopniu stanowiły przedmiot badań fitochemicznych i biologicznych.

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Charakterystyka botaniczna i występowanie krajowych gatunków z rodzaju

Eryngium L.

1.1. Klasyfikacja taksonomiczna

Przedstawiona taksonomia gatunków z rodzaju *Eryngium* L. zestawiona została przez uzupełnienie klasyfikacji zaproponowanej przez Wolffa [1913] o późniejsze dane bibliograficzne [Wörz 2005; Calvino i wsp. 2008].

KRÓLESTWO:	<i>Eukaryota</i>	Jądrowe
PODKRÓLESTWO:	<i>Phytobionta</i>	Rośliny
GROMADA:	<i>Telomophyta</i> (<i>Embryophyta</i>)	Rośliny telomowe (Rośliny osiowe)
PODGROMADA:	<i>Magnoliophytina</i> (<i>Angiospermae</i>)	Okrytozalążkowe (Okrytonasienne)
KLASA:	<i>Magnoliopsida</i> (<i>Dicotyledones</i>)	Dwuliścienne
PODKLASA:	<i>Rosidae</i>	Różowe
NADRZĄD:	<i>Cornanae</i>	Dereniopodobne
RZĄD:	<i>Apiales</i> (<i>Umbelliflorae, Araliales</i>)	Selerowce (Baldachokwiatowce)
RODZINA:	<i>Apiaceae</i> (<i>Umbelliferae</i>)	Selerowate (Baldaszkowate)
PODRODZINA:	<i>Saniculoideae</i>	
RODZAJ:	<i>Eryngium</i> L.	Mikołajek
PODRODZAJ:	<i>Eryngium</i> L.	Mikołajek
GATUNEK:	<i>Eryngium planum</i> L.	Mikołajek płaskolistny
	<i>Eryngium maritimum</i> L.	Mikołajek nadmorski
	<i>Eryngium campestre</i> L.	Mikołajek polny

[Wolff 1913; Wörz 2005; Calvino i wsp. 2008]

Opracowana przez Wolffa monografia *Eryngium* jest podwaliną dzisiejszej klasyfikacji. Wolff, na podstawie danych morfologicznych i anatomicznych, sklasyfikował gatunki mikołajków w 34 sekcje i liczne podsekcje. Wyróżnił dwie główne, nieformalne grupy: gatunki gerontologiczne występujące w tzw. Starym Świecie (12 sekcji) oraz gatunki amerykańskie i australijskie (22 sekcje). Badania doprowadziły do wyodrębnienia podrodziny *Saniculoideae*, do której należą następujące rodzaje: *Eryngium*, *Sanicula*, *Astrantia* [Wolff 1913]. Od tego czasu zrewidowano cały rodzaj, wykorzystując w tym celu nowoczesne badania molekularne, analizy liczby chromosomów oraz dane ekologiczne i chorologiczne. Początkowo Wörz stworzył nową klasyfikację rodzaju *Eryngium* odzwierciedlającą główne rodowody ewolucyjne, w której wyodrębnił 5 podrodzajów: *Eryngium*, *Eryngium Fruticosa*, *Eryngium Monocotyloidea*, *Eryngium Semiaquatica*, *Eryngium Foetida*. Badania te, oparte o dane morfologiczne, nie uwzględniały ustalenia relacji pokrewieństwa pomiędzy gatunkami [Wörz 2005]. W kolejnych latach pojawiły się dwie hipotezy pochodzenia rodzaju *Eryngium*. Pierwsza zakładała, że gatunki Nowego Świata wywodzą się bezpośrednio od przodków ze Starego Świata posiadających rodowód w południowo-wschodniej części Azji. Natomiast druga hipoteza sugerowała, iż gatunki Nowego Świata pochodzą od przodków zajmujących wschodnie stanowiska basenu Śródziemnomorskiego. Badania DNA chloroplastowego i jądrowego potwierdzają monofiletyczne pochodzenie rodzaju i dzielą go na 2 podrodzaje. Do podrodzaju *Eryngium* należy większość gatunków afrykańskich, europejskich, i azjatyckich (zaliczanych do Starego Świata), do podrodzaju *Monocotyloidea* gatunki Ameryki i Australii (przypisanych Nowemu Światu) [Calvino i wsp. 2008].

Eryngium jest najliczniejszym rodzajem rodziny *Apiaceae*, obejmującym trzy czwarte gatunków podrodziny *Saniculoideae* [Calvino i wsp. 2008; Wörz, Diekmann 2010]. Liczba gatunków zaliczanych do tego rodzaju jest różna w zależności od opracowania i najczęściej waha się w przedziale od 230 do 250 gatunków [Cullen i wsp. 1997; Wörz, Diekmann 2010; Calvino i wsp. 2008], a wliczając dodatkowo podgatunki i odmiany, rodzaj *Eryngium* liczy nawet 317 taksonów [Wörz 1999].

System klasyfikacji roślin okrytonasiennych Reveala uwzględnia nieco inne ujęcie systematyczne gatunków *Eryngium*.

Pozycja gatunków z rodzaju *Eryngium* w systemie Reveala [1999]:

DOMENA:	<i>Eukaryota</i>	Jądrowe
KRÓLESTWO:	<i>Phytobionta</i>	Rośliny
PODKRÓLESTWO:	<i>Tracheophyta</i>	Rośliny naczyniowe
NADGROMADA:	<i>Spermatophyta</i>	Nasienne
GROMADA:	<i>Magnoliophyta</i>	Okrytonasienne
KLASA:	<i>Rosopsida</i>	
PODKLASA:	<i>Rosidae</i>	Różowe
NADRZĄD:	<i>Aralianae</i>	
RZĄD:	<i>Araliales</i>	Araliowce
RODZINA:	<i>Apiaceae</i>	Selerowate
PLEMIĘ:	<i>Eryngieae</i>	
RODZAJ:	<i>Eryngium</i> L.	Mikołajek
GATUNEK:	<i>Eryngium planum</i> L.	Mikołajek płaskolistny
	<i>Eryngium maritimum</i> L.	Mikołajek nadmorski
	<i>Eryngium campestre</i> L.	Mikołajek polny

[wg www.plantsystematics.org/reveal]

Z kolei w systemie AGP (ang. *Angiosperm Phylogeny Group*), nowoczesnym i aktualizowanym systemie klasyfikacji roślin okrytonasiennych, gatunki z rodzaju *Eryngium* przyporządkowane zostały według pokrewieństwa ustalonego na podstawie danych molekularnych (geny DNA chloroplastowego i gen kodujący rybosomy) oraz z wykorzystaniem danych z zakresu morfologii, anatomii, chemotaksonomii oraz fitogeografii [AGP 2009].

DOMENA:	<i>Eukaryota</i>	Jądrowe
KRÓLESTWO:	<i>Phytobionta</i>	Rośliny
KLAD:	Tracheophyta	Rośliny naczyniowe
KLAD:	Spermatophyta	Rośliny nasienne
KLAD:	Magnolialesinae	
KLAD:	Eudicots (Ranunculalesinae)	Dwuliścienne właściwe
KLAD:	Core eudicots (Berberidopsidalesinae)	Późne dwuliścienne właściwe
KLAD:	Asteridae	Astrowe
KLAD:	Euasterids	Astrowe właściwe
KLAD:	Euasterids II	Astrowe właściwe II
KLAD:	Asteralesinae	
RZĄD:	Apiales	Selerowce
RODZINA:	<i>Apiaceae</i> (<i>Umbelliferae</i>)	Selerowate (Baldaszkowate)
PODRODZINA:	<i>Saniculoideae</i>	
RODZAJ:	<i>Eryngium</i> L.	Mikołajek
GATUNEK:	<i>Eryngium planum</i> L.	Mikołajek płaskolistny
	<i>Eryngium maritimum</i> L.	Mikołajek nadmorski
	<i>Eryngium campestre</i> L.	Mikołajek polny

[wg AGP 2009; www.plantsystematics.org]

1.2. Charakterystyka botaniczna rodzaju *Eryngium*

Gatunki z rodzaju *Eryngium* L. to rośliny jednoroczne lub wieloletnie byliny, rzadziej krzewy [Fot.1].



Fot. 1 Pokroje roślin z rodzaju *Eryngium*: A *E. planum* B *E. maritimum* C *E. campestre*

Niektóre dorastają zaledwie do kilku centymetrów wysokości, inne osiągają nawet 3 metry. Charakteryzują się dużą zmiennością morfologiczną. Różnice w morfologii blaszek liściowych zależą głównie od środowiska bytowania rośliny. Gatunki europejskie posiadają liście zaokrąglone, błyszczące, zielononiebieskie, podczas gdy taksony kontynentu amerykańskiego cechują liście kolczaste, sztywne, wąskie i długie [Cullen i wsp. 1997]. Skórzaste bądź pergaminowe liście dzielą się na górne siedzące i dolne ogonkowe o pierzastej, dłoniastej, rzadziej równoległej nerwacji [Szafer, Pawłowski 1960; Calvino i wsp. 2008].

Na szczycie łodygi główkowate kwiatostany tworzą 3-5-promieniowy baldach pozorny. Pod kwiatostanami znajdują się podsadki, które u niektórych gatunków mogą być bardzo okazałe. Niebieskie, zielone lub białe kwiaty są obupłciowe, siedzące [Fot. 2] [Szafer, Pawłowski 1960; Calvino i wsp. 2008].



Fot. 2 Kwiatostany gatunków z rodzaju *Eryngium*: A *E. planum* B *E. maritimum* C *E. campestre*

Rośliny z rodzaju *Eryngium* posiadają suche owoce zwane dwurozłupnią (*schizocarpium*) [Fot. 3], charakterystyczne dla rodziny *Apiaceae*. Owoce składają się z dwóch jednonasiennych niełupek. Półowoce (owocki) wzniesione na karpoforze w zależności od gatunku są nagie, owłosione, bądź kolczaste. Na powierzchni owoce pokryte są skórką o gładkim lub prążkowanym nabłonku, pokrytym szczecinią. Owocnia zbudowana głównie z miękiszu kolenchymatycznego lub aerenchymatycznego zrosnięta jest z łupiną nasienną. Na szczycie każdego owocku znajduje się zarodek w bielmie płaskim, zgiętym lub wydrążonym [Heywood 1978; Szafer, Pawłowski 1960].



Fot. 3 Owoce gatunków z rodzaju *Eryngium*: A *E. planum* B *E. maritimum* C *E. campestre* (skala 1cm)

Gatunki z rodzaju *Eryngium* rozmnażają się poprzez owoce, niekiedy za pośrednictwem pędów przybyszowych. Dojrzałe nasiona kiełkują stosunkowo łatwo gdy są świeże i stają się nieaktywne krótko po zbiorach, ponieważ szybko wchodzą w stan spoczynku. Aby przełamać spoczynek nasion stosuje się odpowiednie zabiegi eliminujące czynniki blokujące kiełkowanie, m.in. ciepłą, a następnie zimną stratyfikację [Atwater 1980; Njenga 1995].

1.3. Rozmieszczenie geograficzne i warunki siedliskowe

Rośliny rodzaju *Eryngium* występują w warunkach klimatu tropikalnego oraz umiarkowanego. Powszechnie spotykane w zachodniej i południowo-zachodniej Eurazji, północnej Afryce, w Australii, północnej i wschodniej Ameryce - najczęściej w Meksyku, Brazylii i Argentynie [Wörz, Diekmann 2010]. Europę zasiedla około 26 przedstawicieli tego taksonu.

Flora Polska [Szafer, Pawłowski 1960] podaje, że w kraju występują cztery gatunki mikołajków:

- *E. planum* L. (mikołajek płaskolistny)
- *E. maritimum* L. (mikołajek nadmorski)
- *E. campestre* L. (mikołajek polny)
- *E. alpinum* L. (mikołajek alpejski) obecnie o wątpliwym występowaniu w Polsce

Mikołajki to rośliny rzadko występujące w Polsce, a w niektórych regionach zagrożone wyginięciem [Piękoś-Mirkowa, Mirek 2003]. *E. maritimum* objęty jest całkowitą ochroną gatunkową [Żukowski, Jackowiak 1995]. *E. alpinum* podawany w piśmiennictwie, jako takson mający swoje stanowisko w Tatrach, obecnie prawdopodobnie nie występuje w Polsce. Jest to gatunek alpejski, objęty ochroną gatunkową w Europie [Le Claire i wsp. 2005].

Gatunki z rodzaju *Eryngium* rosną na terenach suchych, piaszczystych a nawet skalistych. Zasiedlają nasłonecznione stoki, suche łąki, stepy, nadmorskie wydmy czy ugory. Dobrze funkcjonują na glebach średnio i mało żyznych, ubogo żwirowych, zdrenowanych oraz bogatych w wapień [Tutin i wsp. 1968; Cullen i wsp. 1997].

1.4. Szczegółowa charakterystyka gatunków z rodzaju *Eryngium*

1.4.1. *Eryngium planum* L.

Mikołajek płaskolistny to gatunek rośliny wieloletniej. Wzniesiona łodyga, pokryta warstwą ochronnego wosku, osiąga wysokość 30-60 cm [Fot. 4A]. Na szczycie 3-5 gałęzistego baldachu pozornego znajdują się liczne, główkowate kwiatostany o wymiarach 1-2 × 1,5 cm, złożone z wielu szaroniebieskich, bardzo drobnych kwiatów [Fot. 3B]. Kwiaty owadopylne zapylane są przez trzmiele, pszczoły i motyle. Pod kwiatostanami występują lancetowato-równowąskie pokrywy z kolcami. Liście charakteryzują się wyraźnie zaznaczoną heterofilią. Niebiesko-sine liście górne są 3-5-sieczne, kolczasto-piłkowane, bezogonkowe [Fot. 4C]. Długoogonkowe liście odziomkowe, tworzące rozetkę, wytwarzane w pierwszym roku wegetacji są niepodzielone, jajowato-okrągłe lub sercowate z wyraźnie zaznaczoną nerwacją [Fot. 4D]. Wielkość blaszki liściowej mieści się w granicach 5-10×3-6 cm [Szafer, Pawłowski 1960].



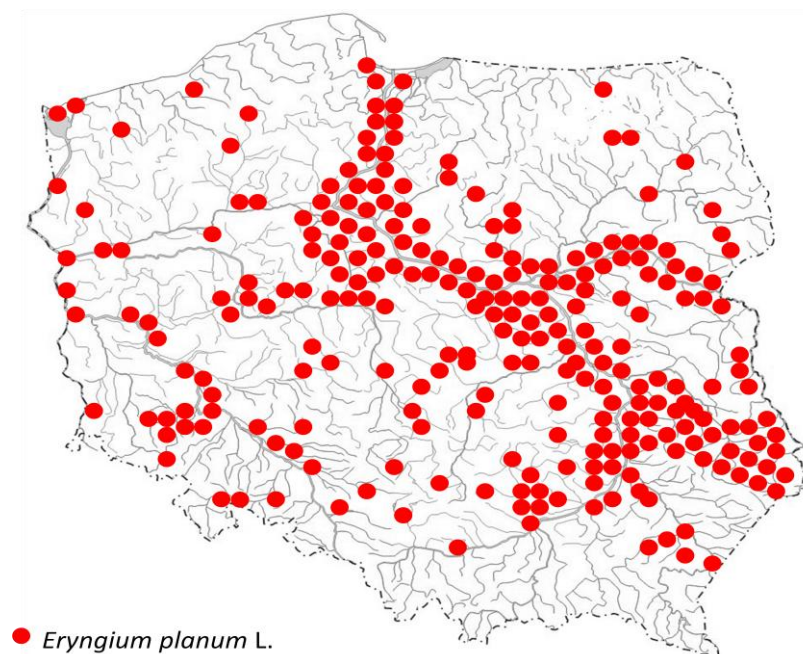
Fot. 4 *E. planum* A pokrój rośliny B kwiatostan C liść łodygowy D liść odziomkowy

Owoce jest jajowata dwurozłupnia o długości całkowitej (wraz z działkami kielicha) od 5 do 6 mm. Spłaszczone bądź półokrągłe owocki pokryte są licznymi łuskami [Fot. 3A]. Owoce rozsiewają zwierzęta.

Mikołajek płaskolistny charakteryzuje się kariotypem o 16 chromosomach (forma diploidalna $2n=16$) [Szafer, Pawłowski 1960].

Gatunek ten występuje w klimacie tropikalnym i umiarkowanym, na stanowiskach suchych, nasłonecznionych, stepach, ugorach, pastwiskach [Szafer, Pawłowski 1960].

Rodzimy obszar występowania tego taksonu to środkowa i południowa Europa, Kaukaz, zachodnia Syberia, Kazachstan i Chiny. W Polsce jest gatunkiem stosunkowo rzadkim, w niektórych rejonach kraju potencjalnie zagrożonym wyginięciem. Występuje na obszarach wzdłuż Odry, Wisły i Bugu [Żukowski, Jackowiak 2005]. Stanowiska naturalne mikołajka płaskolistnego znajdują się na Dolnym Śląsku, w Górach Świętokrzyskich, na Kujawach, na Pomorzu i Pojezierzu Mazurskim [Ryc. 1] [Szafer, Pawłowski 1960].



Ryc. 1 Występowanie *E. planum* na terenie Polski

1.4.2. *Eryngium maritimum* L.

Mikołajek nadmorski to wieloletnia roślina zielna o mocnej, ulistnionej, mięsistej, silnie rozgałęzionej łodydze [Fot. 5A]. Jej wysokość dochodzi do 50-100 cm. Na szczycie łodygi występuje główkowaty kwiatostan złożony z licznych, drobnych niebieskawych kwiatów z pięcioma płatkami [Fot. 5B]. U podstawy kwiatostanu znajdują się kolczaste, lancetowate, liścio-kształtne podsadki. Cała roślina mikołajka nadmorskiego jest koloru intensywnie zielonego, stopniowo pokrywając się sinoniebieskim nalotem. Liście grube i sztywne, odporne są na wysychanie dzięki warstwie wosku. Liście *E. maritimum* charakteryzują się heterofilią: posiadające długie ogonki liście odziomkowe, zebrane w rozetkę są okrągławe, na brzegu zatokowo-ząbkowane, 3-5 wrębne, silnie kolczaste [Fot. 5C]; siedzące liście łodygowe obejmują łodygę [Szafer, Pawłowski 1960; Wiland-Szymańska 1999; Piękoś-Mirkowa, Mirek 2003].



Fot. 5 *E. maritimum* A pokrój rośliny B kwiatostan C liście odziomkowe

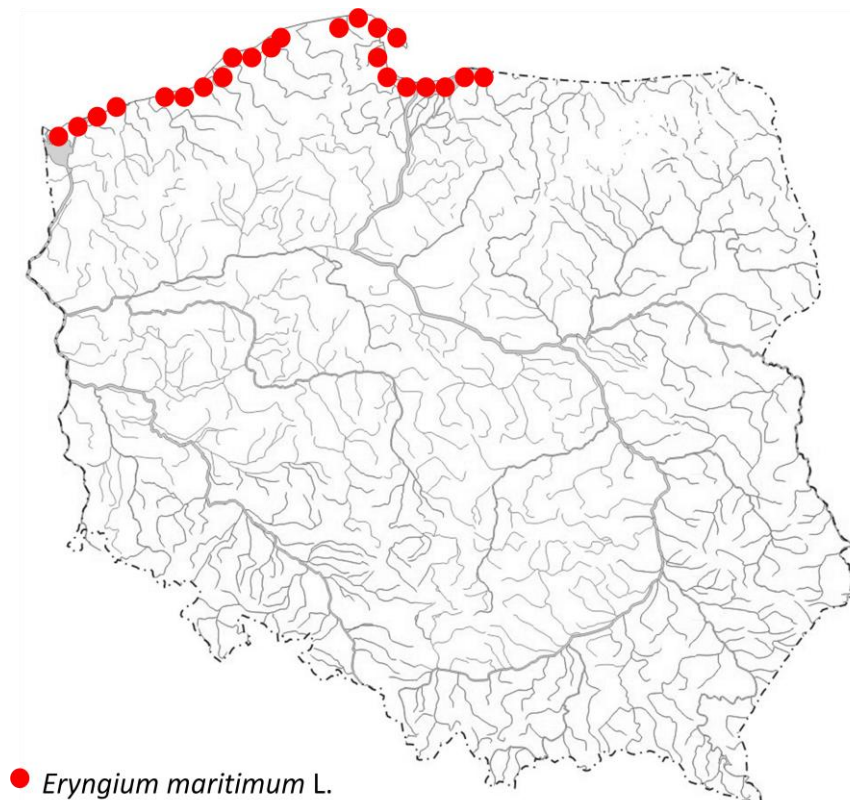
Bylina ta tworzy pod powierzchnią gleby zdrewniałe, pełzające kłącze, z którego wyrasta, długi, smukły, cylindryczny korzeń palowy.

Mikołajek odgrywa ważną biocenotyczną rolę urozmaicając i utrwalając wydmy głębokim, wrastającym w grunt na 4 m systemem korzeniowym. Jest to przystosowanie do trudnych warunków bytowania mikołajka [Wiland-Szymańska 1999; Piękoś-Mirkowa, Mirek 2003; Wörz 2004]. Owocem jest jajowata, spłaszczona dwurozłupnia o długości 13-15 mm, owocki pokryte łuskami, silnie spłaszczone [Fot. 3B]. Okres kwitnienia przypada od lipca do września. Rośliny zapylane są za pośrednictwem owadów, najczęściej przez pszczoły i trzmiele. Owoce rozsiewane są przez zwierzęta. W środowisku naturalnym rozmnażają się głównie wegetatywnie, gdyż większość siewek ginie w pierwszym roku [Szafer, Pawłowski 1960].

E. maritimum występuje w formie diploidalnej, gdzie całkowita liczba chromosomów wynosi 16 ($2n=2\times 8$) [Calvino i wsp. 2008].

Gatunek ten preferuje tereny suche, nasłonecznione, występuje głównie na wydmach nadmorskich tzw. białych i bardziej ustabilizowanych wydmach szarych. Może utrzymywać się na plażach dzięki silnemu systemowi korzeniowemu, ponadto jest odporny na zasypywanie przez piasek, słonawą glebę i niekorzystne działanie rozgrzanego od słońca piasku. Mikołajek nadmorski może rozwijać się w warunkach ubogich w składniki odżywcze [Szafer, Pawłowski 1960].

Mikołajek nadmorski występuje wzdłuż wybrzeży Europy, Azji Mniejszej i Afryki północnej, w basenie Morza Śródziemnego, Czarnego, Północnego a także Atlantyku, nie zasiedla terenów znajdujących się w głębi lądu. W Polsce jego występowanie jest rzadkie, ograniczone do wąskiego odcinka wzdłuż wybrzeży Morza Bałtyckiego [Ryc. 2], gdzie spotyka się nieliczne osobniki [Szafer, Pawłowski 1960; Tutin i wsp. 1968; Piękoś-Mirkowa, Mirek 2003].



Ryc. 2 Występowanie *E. maritimum* na terenie Polski

Obecnie mikołajek nadmorski uznawany jest w Polsce za roślinę zagrożoną wyginięciem i jest objęty całkowitą ochroną gatunkową [Dz. U. Nr 41, poz. 214, z 1995 r.]. Najwcześniej w Europie mikołajek objęty został ochroną nad Zatoką Gdańską, na mocy "Rozporządzenia policyjnego dotyczącego mikołajka", obowiązującego od 1902 roku. Poważnym zagrożeniem dla populacji tego gatunku jest zalesianie szarych wydm przez szczególnie ekspansywne wierzby. Ekspansja drzew wiąże się ze zwiększaniem zacielenia, którego mikołajek nie toleruje. Ponadto z uwagi na swoje walory dekoracyjne jest często zrywany i kolekcjonowany, co dodatkowo przyczynia się do zaniku jego naturalnych stanowisk. Niszczenie siedlisk roślinnych związane jest także z szybko postępującym rozwojem gospodarczym, który powoduje trwałe, nieodwracalne przekształcenia w systemie ekologicznym. Ochrona mikołajka nadmorskiego ze względu na konflikt pomiędzy ochroną gatunkową a ochroną wybrzeża jest skomplikowana – zabiegi ochrony ekosystemów wydmy kolidują z zaleceniami nasadzeń mikołajków [Wiland-Szmańska 1999; Łabuz 2007].

1.4.3. *Eryngium campestre* L.

Mikołajek polny jest 30-100 cm byliną koloru szarzielonego lub białawego [Fot. 6A]. Kwiaty drobne, zebrane w główkowate kwiatostany o długości około 1-2 cm, charakteryzują się kolorem zielonoszarym lub białym [Fot. 6B]. Pod jajowato-kulistymi kwiatostanami znajdują się charakterystyczne podsadki - wąskie, lancetowate, odstające, ostro zakończone, całobrzężne, bądź kolczaste. Podsadki występują w liczbie 6 lub 7, a ich długość waha się zazwyczaj w granicach 5 cm. Przylistki są całe, rzadko peryferyjne trójkolczyste i równowąsko-szydlaste. Liście mikołajka polnego są morfologicznie zróżnicowane. Liście odziomkowe, tworzące rozetę, są tęgie i sztywne, o długich ogonkach liściowych, charakteryzują się jajowato trójkątnym kształtem, z brzegami kolczastymi, nacinane pierzasto lub dłoniasto, zawsze o pierzastym żyłkowaniu [Fot. 6C]. Natomiast liście łodygowe są siedzące lub krótkoogonkowe o uszatej nasadzie, posiadają powierzchnię kolczastą i podwójnie pierzastą blaszkę [Szafer, Pawłowski 1960; Wörz 2004; Thiem, Wiatrowska 2007].



Fot. 6 *E. campestre* A pokrój rośliny B kwiatostan C liść odziomkowy

Gatunek ten wykształca kłącze walcowato-wrzecionowate, z którego wyrasta, niekiedy znacznej długości, korzeń palowy. Cały system korzeniowy jest zdrewniały, o obrączkowanej strukturze koloru brązowego [Szafer, Pawłowski 1960].

Owoce jest spłaszczona, odwrotnie jajowata dwurozłupnia; na powierzchni posiada równowąsko-szydlaste łuski [Fot. 3C] [Szafer, Pawłowski 1960; Lipert, Podlech 1995].

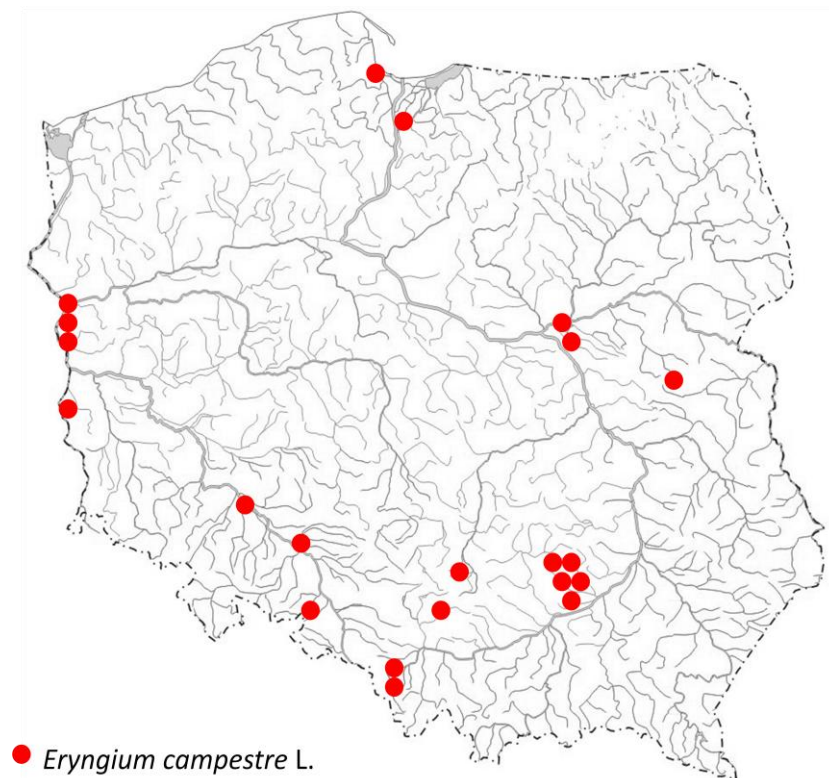
E. campestre posiada 7 chromosomów, co odróżnia go od większości mikołajków, których podstawowa, haploidalna liczba chromosomów wynosi 8. Najczęściej występuje w formie diploidalnej (14 chromosomów), niekiedy znajdują się także rośliny o tetraploidalnej (28) liczbie chromosomów [Wörz 2004].

Łodyga rozgałęziona u podstawy jest elementem przystosowania do rozsiewania nasion w warunkach stepowych, w których zazwyczaj występuje. Gdy nasiona dojrzeją roślina usycha. Dzięki odpowiedniej budowie, podmuch wiatru łatwo odrywa całą roślinę lub jej fragment od podłoża, tocząc go na znaczne odległości, po drodze następuje rozsiewanie nasion. Rośliny rozmnażające się w ten sposób nazywamy potocznie „biegaczami stepowymi” [Wiland-Szymańska 1999; Thiem, Wiatrowska 2007].

E. campestre rośnie na terenach suchych, nasłonecznionych i otwartych, gdzie panują stosunkowo trudne warunki do bytowania. Jego stanowiska często znajdują się na ugorach, nieużytkach, suchych zboczach, przydrożach, a także na terenach kamienistych, nasypach kolejowych, czy stepie [Szafer, Pawłowski 1960; Lipert, Podlech 1995; Strzelecka, Kowalski 2000; Thiem, Wiatrowska 2007].

E. campestre występuje niemal na całym terenie Europy, głównie w regionach centralnych i na południu. Ponadto można go także znaleźć w Azji Mniejszej, północnej części Afryki oraz w Ameryce Północnej [Strzelecka, Kowalski 2000].

W Polsce mikołajek polny występuje bardzo rzadko, głównie na stepach w południowej części niżu, na inne regiony został zawleczony. Jego stanowiska są nieliczne, można go najczęściej spotkać na Śląsku w okolicach Cieszyna, na Wyżynie Małopolskiej, na nizinie Gdańskiej oraz w zbiorowiskach roślinności stepowej rezerwatu przyrodniczego Pamięcin położonego u ujścia Warty nieopodal Kostrzyna nad Odrą [Ryc. 3][Szafer, Pawłowski 1960; Strzelecka, Kowalski 2000; Thiem, Wiatrowska 2007].



Ryc. 3 Występowanie *E. campestre* na terenie Polski

E. campestre jest kenofitem, czyli rośliną obcego pochodzenia, która przybyła i zadomowiła się na naszych terenach dopiero po 1500 roku. Mikołajek ten dotarł do Polski najprawdopodobniej z południowej Europy [Wiland-Szmańska 1999].

2. Związki chemiczne występujące w gatunkach z rodzaju *Eryngium* L.

Dotychczasowe badania fitochemiczne gatunków z rodzaju *Eryngium* wykazały obecność szeregu grup związków o charakterze metabolitów wtórnych: saponin triterpenowych, kwasów fenolowych, flawonoidów, olejków eterycznych, poliacylenów, kumaryn, garbników, oligosacharydów, kwasów organicznych.

2.1. Saponiny triterpenowe

2.1.1. Występowanie i struktura chemiczna

Saponiny to niejednorodna grupa związków chemicznych, szeroko rozpowszechniona głównie w królestwie roślin (około 500 gatunków roślin z 90 rodzin), ale także odnaleziona w królestwie zwierząt, u morskich szkarłupni (*Echinodermata*). Saponiny triterpenowe występują u roślin okrytozalążkowych, w klasie roślin dwuliściennych – charakterystyczne są dla rodzin: *Araliaceae*, *Fabaceae*, *Hippocastanaceae* czy *Primulaceae*. Sapogeniny R1 i A1 saponin triterpenowych zostały wyizolowane z roślin należących do rodzajów rodziny *Apiaceae*: *Eryngium*, *Hydrocotyle*, *Hacquetia*, *Steganotaenia*, *Sanicula* [Kartal i wsp. 2005].

Saponiny to glikozydy triterpenoidów lub steroli, składające się z niepolarnego aglikonu (sapogeniny) i polarnego komponentu cukrowego, połączonych wiązaniem eterowym lub estrowym. Część niecukrowa jest układem złożonym z 4-6 pierścieni węglowych. Część cukrowa to 1-3 proste lub rozgałęzione łańcuchy monosacharydowe, w których może występować od 1 do 6 cząsteczek cukru prostego. Grupy hydroksylowe cukrów są często acylowane. Ze względu na rodzaj i liczbę pierścieni wchodzących w skład aglikonu, saponiny dzieli się na triterpenowe i steroidowe. Obie grupy saponin (triterpenowe i steroidowe) stanowią pochodne zawierające 30 atomów węgla w cząsteczce, którego prekursorem jest oksydoskwalen. Grupy te różnią się tym, że saponiny triterpenowe posiadają najczęściej aglikon typu α -amyryny lub β -amyryny o 30 atomach węgla, natomiast saponiny steroidowe posiadają pierścień steranu o 27 atomach węgla z bocznym ugrupowaniem cyklicznym w pozycji C17. W obu grupach mogą występować mono-, bi-, tridesmozydy (odpowiednio o łańcuchach cukrowych przyłączonych w jednej, dwóch lub trzech pozycjach aglikonu) [Oleszek 2002; Sparg i wsp. 2004; Man i wsp. 2010; Podolak i wsp. 2010; Dinda i wsp. 2010; Wang i wsp. 2012; Kowalczyk i wsp. 2013; Parus 2013a].

Do najczęściej występujących należą związki o pięciu 6-węglowych pierścieniach, pochodne kwasu oleanolowego i kwasu ursolowego. Część cukrowa złożona jest z kilku (do 12) cukrów prostych, wśród których spotyka się D-glukozę, D-galaktozę, D-ksylozę, L-arabinozę, L-fukozę, D-chinowozę, L-ramnozę, D-apiozę a także kwasy uronowe – kwas D-glukuronowy i D-galakturonowy [Oleszek 2002; Sparg i wsp. 2004; Hänsel, Sticher 2010; Man i wsp. 2010; Dinda i wsp. 2010; Podolak i wsp. 2010; Wang i wsp. 2012; Kowalczyk i wsp. 2013; Negi i wsp. 2013].

2.1.2. Saponiny triterpenowe w rodzaju *Eryngium*

W całych roślinach *E. planum* stwierdzono obecność kompleksu saponin. Analizy jakościowe saponin triterpenowych w organach wykazały różnorodność budowy tych związków w zależności od organu roślinnego. W liściach mikołajka płaskolistnego występują głównie eryngiumsaponiny A1 i A2, ale także eryngiumsaponiny A i B. Natomiast eryngiumsaponiny C i D znajdują się przede wszystkim w korzeniach, w których również wykazano obecność eryngiumsaponiny A i B. W organach podziemnych zdecydowana większość saponin to eryngiumsaponina B [Hiller i wsp. 1969; Hiller i wsp. 1972; Hiller i wsp. 1974].

Współczesne badania [Kowalczyk i wsp. 2013] oparte o analizy chromatograficzne sprzężone z spektrometrią mas wykazały obecność w korzeniach *E. planum* sześciu saponin triterpenowych, z których dla trzech określono strukturę [Ryc. 4]:

- (1) 3-*O*-β-D-glukopiranozylo-(1→2)-β-D-glukouronopiranozylo-21-*O*-acetylo-22-*O*-angeloilo-R1-barygenolu
- (2) 3-*O*-β-D-glukopiranozylo-(1→2)-β-D-glukouronopiranozylo-22-*O*-angeloilo-R1-barygenolu
- (3) 3-*O*-β-D-glukopiranozylo-(1→2)-β-D-glukouronopiranozylo-22-*O*-angeloilo-A1-barygenolu

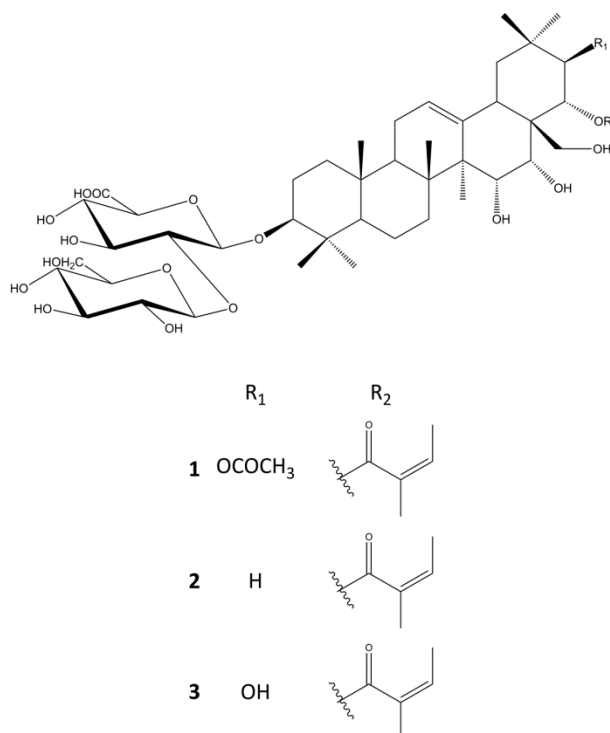
Trzy pozostałe niezidentyfikowane saponiny triterpenowe są także pochodnymi barygenolu.

Analizy fitochemiczne *E. maritimum* wykazały, że w częściach nadziemnych roślin znajdują się kompleksy saponinowe, które posiadają w części aglikonowej następujące geniny, oznaczone przez autora jako: A, B, C, C1, C2, D, E, E1, E2, F, G, I, J, K. Są one monoestrami kwasów tyglinowego lub angelikowego oraz sapogenin podstawowych. A1-barygenol ilościowo przeważa nad R1-barygenolem [Hiller i wsp. 1976; Hiller, Voigt 1977; Wang i wsp. 2012].

Badania Kowalczyka i współautorów [2013] wykazały obecność w korzeniach *E. maritimum* trzech dominujących saponin triterpenowych, dla których określono strukturę [Ryc. 4]:

- (1) 3-*O*-β-D-glukopiranozylo-(1→2)-β-D-glukouronopiranozylo-21-*O*-acetylo-22-*O*-angeloilo-R1-barygenolu
- (2) 3-*O*-β-D-glukopiranozylo-(1→2)-β-D-glukouronopiranozylo-22-*O*-angeloilo-R1-barygenolu
- (3) 3-*O*-β-D-glukopiranozylo-(1→2)-β-D-glukouronopiranozylo-22-*O*-angeloilo-A1-barygenolu

Są to te same saponiny, które zidentyfikowano w korzeniu *E. planum*.

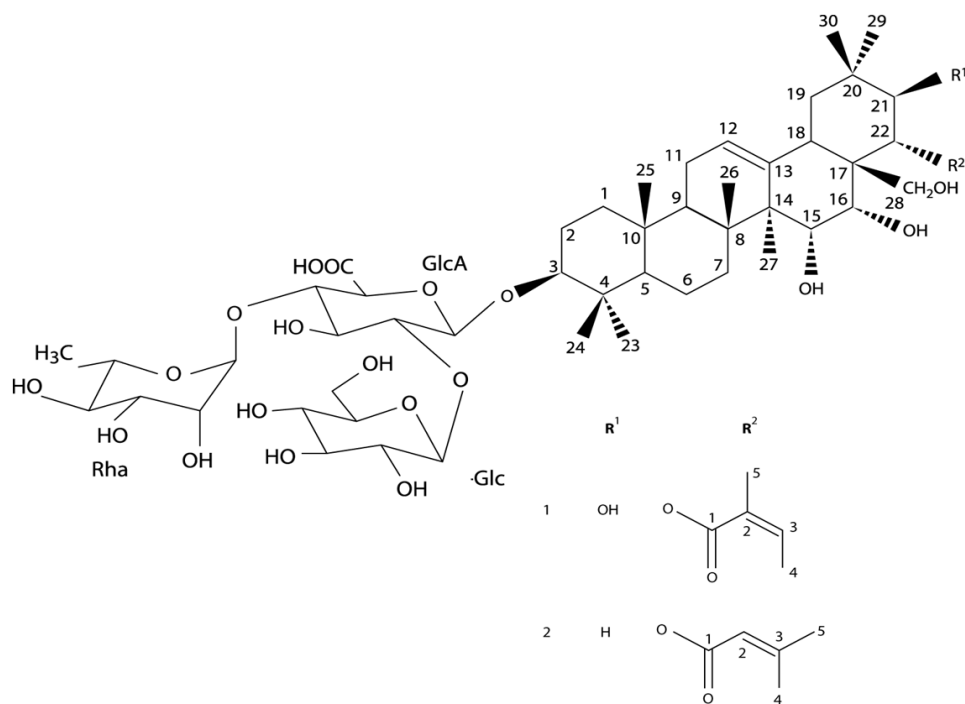


Ryc. 4 Struktury chemiczne saponin z korzeni *E. planum* i *E. maritimum* [Kowalczyk i wsp. 2013]

Badania saponin w gatunku *E. campestre* prowadzili Kartal i wsp. w latach 2005-2006. Autorzy wykazali obecność siedmiu saponin triterpenowych w korzeniach:

- 3-*O*-β-D-glukopiranozylo-(1→2)-[α-L-ramnopiranozylo-(1→4)]-β-D-glukuronopiranozyd-22-*O*-angeloilo-R1-barygenolu
- 3-*O*-β-D-glukopiranozylo-(1→2)-[α-L-ramnopiranozylo-(1→4)]-β-D-glukuronopiranozyd-22-β,β-dimetyloakryloilo-A1-barygenolu
- 3-*O*-α-l-ramnopiranozylo-(1→2)-β-d-glukuronopiranozylo-22-*O*-β,β-dimetylakryloilo-A1-barygenolu
- 3-*O*-α-l-ramnopiranozylo-(1→2)-β-d-glukuronopiranozylo-22-*O*-angeloilo-R1-barygenolu
- 3-*O*-α-l-ramnopiranozylo-(1→2)-β-d-glukuronopiranozylo-21-*O*-acetylo-22-*O*-angeloilo-R1-barygenolu
- 3-*O*-α-l-ramnopiranozylo-(1→2)-β-d-glukuronopiranozylo-21-*O*-acetylo-22-*O*-β,β-dimetylacryloilo-R1-barygenolu
- 3-*O*-α-l-ramnopiranozylo-(1→2)-β-d-glukuronopiranozylo-22-*O*-angeloilo-28-*O*-acetylo-R1-barygenolu

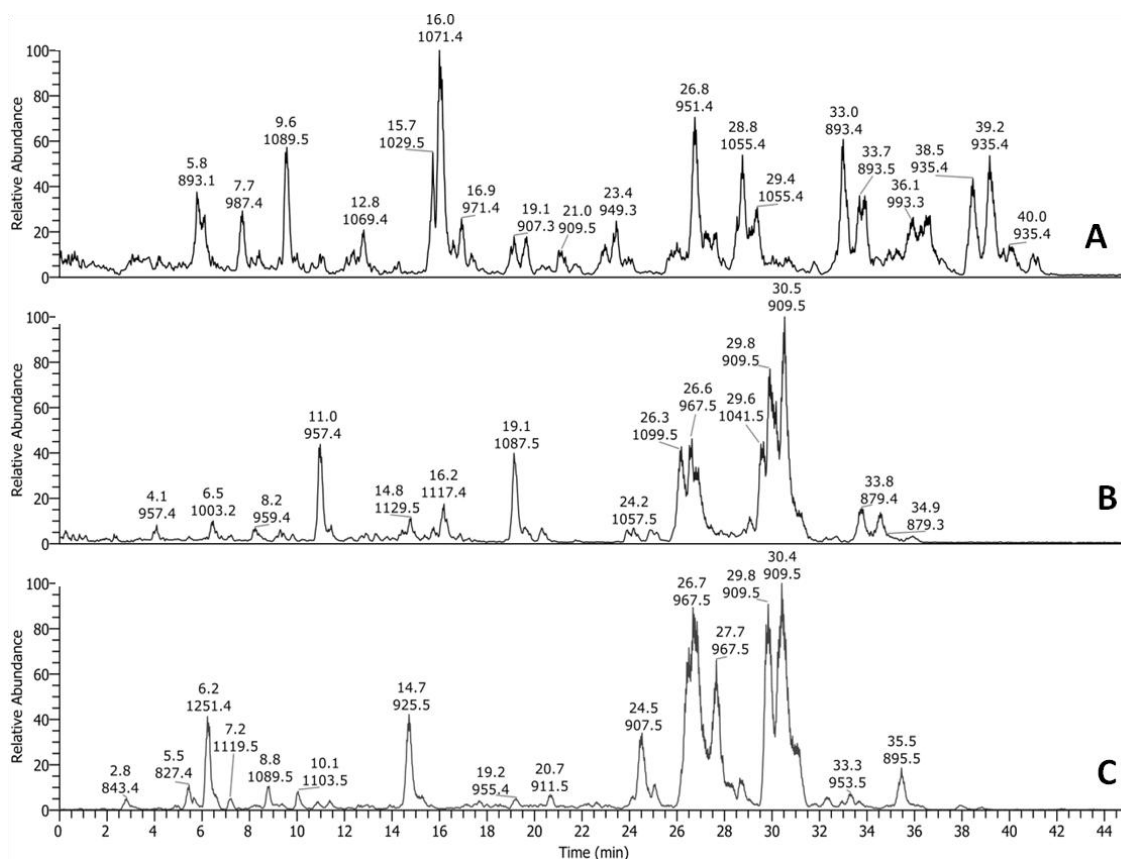
Część cukrowa tych saponin zbudowana jest z dwóch cząsteczek glukozy oraz cząsteczki ramnozy, natomiast sapogeniny to odpowiednio R1-barygenol oraz A1-barygenol [Ryc. 5] [Kartal i wsp. 2005; Kartal i wsp. 2006].



Ryc. 5 Struktury chemiczne saponin triterpenowych *E. campestre* [Kartal i wsp. 2005]

Porównanie saponin triterpenowych trzech gatunków *Eryngium*

Kowalczyk i współautorzy [2013] przeanalizowali i porównali saponiny triterpenowe występujące w trzech krajowych gatunkach z rodzaju *Eryngium*. Wykonane profile wskazywały na duże zróżnicowanie, zarówno jakościowe jak i ilościowe, w składzie saponin pomiędzy badanymi gatunkami [Ryc. 6].



Ryc. 6 Chromatogramy LC-MS metanolowych frakcji z korzeni **A** *E. campestre* **B** *E. maritimum* **C** *E. planum*
 [Kowalczyk i wsp. 2013]

W metanolowym wyciągu z korzenia *E. campestre* zidentyfikowano pochodne barygenolu, opisane wcześniej przez zespół Kartala [2005; 2006]. Jednakże na chromatogramie LC-MS zauważono piki wskazujące na obecność nieznanych jeszcze saponin w korzeniu mikołajka polnego. Saponiny wykryte w *E. campestre* są nieobecne w ekstraktach z korzeni *E. maritimum* i *E. planum*. Chociaż zidentyfikowane i wyizolowane aglikony saponin z *E. planum* i *E. maritimum* są podobne lub takie same jak te odnotowane dla *E. campestre* (acylowane pochodne R1-i A1-barygenolu), ich części cukrowe zawierają D-glukozę zamiast L-ramnozy jako końcowe węglowodany. Saponin zawierających L-ramnozę nie wykryto w ekstraktach z dwóch innych badanych gatunków. Wyniki badań pojedynczych związków z ekstraktów *E. maritimum* wykazały, że zawiera on te same związki, co *E. planum*. Oprócz różnic w budowie saponin pomiędzy trzema gatunkami mikołajków, organy z roślin rosnących w ich naturalnym środowisku, zawierały zróżnicowane ilości saponin. Różnice ilościowe w dużym stopniu zależały także od gatunku. Organy *E. maritimum* zawierały względnie małą ilość saponin [Kowalczyk i wsp. 2013].

2.1.3. Właściwości biologiczne i farmakologiczne saponin triterpenowych

Saponiny triterpenowe ze względu na dużą różnorodność budowy wykazują szerokie spektrum działania biologicznego i farmakologicznego. Poniżej przedstawiono przykładową aktywność saponin triterpenowych, najczęściej o aglikonie typu oleananu.

· *Aktywność hemolityczna*

Triterpenowe monodesmozydy wykazują wysoką zdolność do hemolizowania erytrocytów, procesu, w którym zniszczenie błon jest nieodwracalne. Największą aktywność hemolityczną wykazują saponiny triterpenowe o aglikonie typu kwasu oleanolowego lub hederageniny [Sparg i wsp. 2004; Gauthier i wsp. 2009; Hänsel, Sticher 2010; Parus 2013a].

· *Aktywność przeciwzapalna*

Wiele saponin wyizolowanych z surowców roślinnych wykazuje właściwości przeciwzapalne. Uważa się, że ich aktywność przeciwzapalna zachodzi poprzez stymulację wydzielania kortykotropiny, co powoduje wzrost wydzielania kortykosteroidów lub bezpośrednią interakcję z błoną komórkową, zablokowanie zależnego od kinazy C szlaku sygnalizującego prowadzącego do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [Sparg i wsp. 2004]. Spośród sześciu saponin z krzyżownicy *Polygala japonica* tylko wybrane saponiny hamują reakcję zapalną, co wykazano w teście obrzęku łapy myszy wywołanego karageniną. Postuluje się, że występowanie silnych właściwości przeciwzapalnych tych związków warunkuje obecność grup –OH przy C23 i COOH przy C17 w szkielecie aglikonu [Wang i wsp. 2006]. Escyna 1a i 1b, izoescyna 1a i 1b z nasion *Aesculus chinensis* Bunge wykazują aktywność przeciwzapalną w badaniu reakcji zapalnych w obrębie uszu myszy drażnionych benzenem dimetylu [Wei i wsp. 2004]. Działanie przeciwzapalne wyciągu z nasion kasztanowca (*Aesculus hippocastanum* L.) związane jest z działaniem przeciwobrzękowym, za który odpowiada jego główny składnik – escyna, będąca mieszaniną saponin triterpenowych. Przeciwoobrzękowe działanie escyny wykazano w licznych modelach doświadczalnych. Escyna przeciwdziała wystąpieniu obrzęku łapy szczura indukowanego przez albuminę, owoalbuminę, dekstran, karageninę, bradykininę oraz waciki wszczepiane podskórnice [Piechal i wsp. 2005].

· *Aktywność przeciwwirusowa*

Saponina z korzeni rozwaru wielkokwiatowego - *Platycodon grandiflorum* (Jacq) A.DC. wykazuje słabe właściwości przeciwwirusowe w stosunku do wirusa syncytium nabłonka oddechowego (RSV) [He i wsp. 2005]. Wspomniane już wcześniej saponiny wyizolowane kasztanowca chińskiego (escyna 1a i 1b) wpływają hamująco na aktywność proteazy wirusa niedoboru odporności (HIV-1) [Yang i wsp. 1999]. Mieszanina sześciu saponin wyizolowanych z *Maesa lanceolata* Forssk. inaktywowała wirus opryszczki pospolitej w 99,9%, gdy czas inkubacji wynosił 30 min a stężenie saponin 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ [Sindambiwe i wsp. 1998].

· *Aktywność przeciwgrzybicza*

Udokumentowano działanie hamujące saponin triterpenowych na wzrost wybranych gatunków grzybów należących do różnych grup: drożdżaków, grzybów drożdżakopodobnych, kropidlaków. Saponina wyizolowana z liści endemicznej winorośli *Buddleja madagascariensis* Lam. wykazuje aktywność przeciwko ośmiu gatunkom drożdżaków: *Candida albicans*, *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. zeylanoides*, *Cryptococcus neoformans* i jednemu gatunkowi grzyba drożdżakopodobnego *Trichosporon asahii* [Emam i wsp. 1996]. Trzy saponiny otrzymane z nasion łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.) wykazują umiarkowaną aktywność przeciw drożdżakowi *C. albicans* [Woldemichael, Wink 2002]. Saponina wyizolowana z korzeni migdałecznika *Terminalia arjuna* (Roxb.) Wight & Arn., rośliny wykorzystywanej przez ajurwedyjskich lekarzy, hamuje wzrost takich grzybów jak *Aspergillus niger* i *C. albicans* [Chouksey, Srivastava 2001]. Mieszanina saponin wyizolowanych z *Maesa lanceolata* Forssk. znacznie wpływa na zahamowanie wzrostu *Epidermophyton floccosum*, *Microides interdigitalis* oraz *Trichophyton rubrum* [Sindambiwe i wsp. 1998]. W innych badaniach hederagenina oraz frakcja saponinowa z *Medicago arabica* (L.) Huds. wpływały hamująco na rozwój jednokomórkowych drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [Avato i wsp. 2006].

· *Aktywność przeciwbakteryjna*

Znane są właściwości saponin triterpenowych przeciwko bakteriom, zwłaszcza Gram-dodatnim. Saponina wyizolowana z korzeni *T. arjuna* hamuje wzrost laseczek bakterii *Bacillus oryzae* [Chouksey, Srivastava 2001]. Natomiast hederagenina wyizolowana z *Medicago* sp. wpływała w znacznym stopniu na inhibicję rozwoju laseczki siennej (*B. subtilis*) oraz w mniejszym stopniu hamowała wzrost *B. cereus* i *Staphylococcus*

aureus. Większą aktywność hamującą niż hederagenina względem bakterii gronkowca złocistego, wykazywał ekstrakt z części nadziemnych *M. arabica*, bogaty w zestaw różnych saponin [Avato i wsp. 2006].

· *Aktywność przeciw pasożytnicza*

Leiszmanioza trzewna, jedna z najgroźniejszych odmian choroby, wywołana jest przez grupę wiciowców, do których należy także *Leishmania infantum*. Dwie saponiny triterpenowe wyizolowane z liści *Maesa balansae* Mez. wykazują działanie przeciw *L. infantum*. Saponiny te są około 300-razy bardziej efektywne niż standardowo wykorzystywany lek Pentosam [Germonprez i wsp. 2005]. Saponina z *B. madascariensis* wykazuje słabą aktywność przeciwko *L. infantum* [Emam i wsp. 1996].

· *Aktywność antykoncepcyjna*

Dwie saponiny triterpenowe wyizolowane z owoców *Vaccaria segetalis* (Neck.) Garcke ex Asch hamują komórki lutealne w zakresie od 60 do 100%, w zależności od rodzaju saponiny [Sang i wsp. 2002].

· *Aktywność neuroprotekcyjna*

Prowadzone są badania wskazujące na działanie neuroprotekcyjne saponin, zwłaszcza w kontekście leczenia choroby Alzheimera. Saponiny triterpenowe z korzenia *Platycodium* wykazują działanie ochronne na mysie komórki korowe podlegające stresowi wywołanemu poprzez wysokie stężenie glutaminianu [Son i wsp. 2007].

· *Aktywność przeciwwrobacza*

Toksyczny wpływ saponin na organizmy zmiennocieplne badano w kontekście zwalczania chorób wywoływanych przywrami z rodzaju *Schistosoma*. Ze względu na fakt, iż ślimaki są żywicielami pośrednimi w cyklu życiowym przywra, kontrolowano ich populacje na obszarach objętych zakażeniami przywrami. Wysoką skuteczność przeciw gatunkowi *Biomphalaria glabrata* wykazują saponiny z *Maesa lanceolata* Forssk. [Sindambiwe i wsp., 1998; Apers i wsp., 2001].

· *Aktywność cytotoksyczna, proapoptotyczna, przeciwnowotworowa*

Wiele prac wskazuje na aktywność cytotoksyczną i proapoptotyczną saponin triterpenowych. Mechanizm działania cytotoksycznego saponin triterpenowych jest bardzo różny i zależy od charakteru związku. Silna zależność pomiędzy

właściwościami cytotoksycznymi a budową saponin wynika z faktu, że obecność lub brak podstawników w aglikonie saponiny oraz liczba, rodzaj i układ łańcuchów cukrowych, determinują ich hydrofilowość, zdolność wiązania z błoną komórki docelowej lub zdolność przenikania do wnętrza komórki. Sapogenina escyny z kasztanowca (*A. hippocastanum* L.) działa cytotoksycznie na rakowe komórki nabłonka nosowo-gardłowego, podczas gdy sama saponina takiego działania nie wykazuje [Sędek, Michalik 2005]. Natomiast saponiny triterpenowe typu oleananu wyodrębnione z *Akebia quinata* (Houtt.) Decne. posiadające podstawniki di- i trisacharydowe przy węglu C3 posiadają zróżnicowaną aktywność cytotoksyczną w stosunku do różnych nowotworowych linii komórkowych (A-549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498, HCT 15). Saponiny posiadały najwyższą cytotoksyczność, gdy przy węglu C3 występowała reszta cukrowa w konfiguracji β lub konfiguracji α , jak α -L-ramnopyranozylo(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoza. Obecność ksylozy w reszcie cukrowej znacznie obniża aktywność cytotoksyczną saponin [Jung i wsp. 2004]. Saponiny wyizolowane z owoców *Acacia concinna* DC posiadają aktywność cytotoksyczną w stosunku do ludzkich komórek włókniaka HT-1080. Postuluje się, że w aktywności cytotoksycznej, znaczącą rolę odgrywa obecność grupy estrowej przy węglu C21 aglikonu [Tezuka i wsp. 2000]. Z kolei saponiny z innego gatunku *Acacia tenuifolia* (L.) Wild. przejawiają wysoką cytotoksyczność przeciwko ssaczym komórkom nowotworu płuc M-109 [Seo i wsp. 2002]. Główna saponina – β -escyna z *A. hippocastanum* L. wpływa cytotoksycznie na ludzkie komórki rakowe jelita grubego HT-29 [Patlolla i wsp. 2006]. Trzy saponiny wyizolowane z *Albizia grandibracteata* Taub. wykazują aktywność przeciw linii komórek nowotworu jamy nosowo-gardłowej oraz gruczołakoraka piersi [Krief i wsp. 2005]. Przebadano 21 saponin izolowanych z *Ardisia japonica* (Thund.) Bl. w kierunku działania cytotoksycznego – cztery z nich wykazują znaczną aktywność przeciwko liniom komórek nowotworowych HL-60, KATO-III i A549 [Chang i wsp. 2007].

2.1.4. Zastosowanie saponin w lecznictwie

Surowce saponinowe z kilku gatunków roślin stosowane są w przemyśle farmaceutycznym do produkcji leków. Preparaty zawierające ginsenozydy z korzenia żeń-szenia (*Panax ginseng* C.A. Meyer, *Araliaceae*) stosowane są w terapii stanów osłabienia psychicznego i fizycznego, zwłaszcza u osób starszych i rekonwalescentów. Surowiec jest składnikiem mieszanek ziołowych np. herbata Ginsamix (Herbapol) czy kapsulek Żeń-Szeń (Olimp Labs.). Standaryzowany wyciąg wchodzi w skład tabletek m.in. Doppelherz Active Ginseng (Queisser Pharma), Geriavit Pharmaton (Boehringer Ingelheim) oraz płynów m.in. Ginseng Vital Tonicum (Roche Consumer Health). Z kolei prymulasaponiny z korzenia pierwiosnki (*Primula* sp.), ekstrakt zawierający gipsozyd A z korzenia łyszczawiechowego (*Gypsophyla paniculata* L.) czy ekstrakt bogaty w saponazyd A z korzenia mydlnicy lekarskiej (*Saponaria officinalis* L.) zawarte w wielu preparatach (sól amonowa saponiny pierwiosnka – Tussipect / Herbapol, wyciąg z korzenia mydlnicy – Pectosol / Herbapol) działają wykrztuśnie, dzięki czemu mogą być stosowane w leczeniu przewlekłych nieżytów górnych dróg oddechowych. Sól wapniowo-potasowa glicyryzyny z korzenia lukrecji gładkiej (*Glycyrrhiza gabra* L.) używana jest w terapii choroby wrzodowej żołądka i innych stanów zapalnych układu pokarmowego. Sól amonowa kwasu glicyryzynowego wchodzi w skład pastylek Bronchicum (A. Nattermann & Cie.), stosowanych w schorzeniach górnych dróg oddechowych oraz drażetek Udenol / Herbapol i Ulventrol / Herbapol, stosowanych w chorobie wrzodowej dwunastnicy i żołądka [Matławaska 2006].

2.2. Kwasy fenolowe

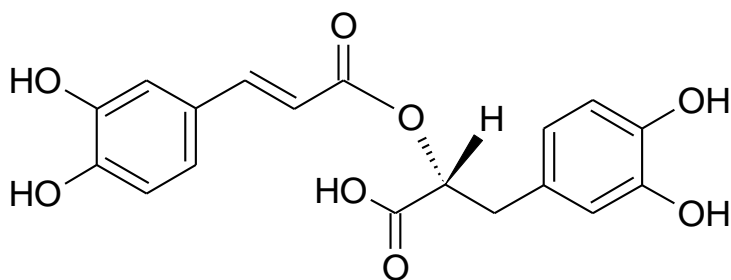
Kwasy fenolowe to grupa związków szeroko rozpowszechniona w świecie roślin. Wzrost zainteresowania fenolokwasami, związany jest z ich szeroką aktywnością biologiczną oraz potencjalnymi możliwościami wykorzystania ich jako środków farmaceutycznych, chemicznych, kosmetycznych czy dodatków do żywności. W świecie rozpowszechnione są pochodne kwasu benzoowego i cynamonowego. Wśród roślin kwiatowych i porostów występują depsydy, których przykładami są kwas rozmarynowy i chlorogenowy. Kwasy fenolowe wykazują silne właściwości przeciwutleniające, które opierają się na różnym mechanizmie działania. Wykazują charakter związków o właściwościach redukujących, wiążących wolne rodniki, chelatujących jony metali enzymów katalizujących reakcje utleniania, inhibitorów oksydaz czy stabilizatorów wolnych rodników powstających w reakcjach oksydacyjnych. Substancje przeciwutleniające, w tym kwasy fenolowe, odgrywają znaczną rolę w organizmie człowieka, gdyż aktywność wolnych rodników może prowadzić do takich schorzeń jak choroby neurodegeneracyjne (choroba Parkinsona czy Alzheimer), astma oskrzelowa, cukrzyca oraz miażdżyca [Parus 2013b].

2.2.1. Kwas rozmarynowy

2.2.1.1. Występowanie i struktura chemiczna

Kwas rozmarynowy powszechnie występuje u roślin należących do rodziny *Lamiaceae* i *Boraginaceae*, a także *Apiaceae*; spotykany jest również w porostach, paprociach z rodziny *Blechnaceae* i w skrzypach. Ze względu na fakt, iż jest powszechnie syntetyzowany przez rośliny nie może być wyznacznikiem chemotaksonomicznym dla rodzin botanicznych [Petersen, Simmonds 2003; Petersen i wsp. 2009].

Kwas rozmarynowy (RA) to depsydy kwasu kawowego i α -hydroksydihydrokawowego [Ryc. 7] zaliczany do kawotanoidów, grupy związków pokrewnych garbnikom. Po raz pierwszy wyizolowany został z liści rozmarynu lekarskiego w 1958 roku przez włoskie uczono Scarpati i Oriente [Petersen i Simmonds 2003; Petersen i wsp. 2009]. W świecie roślin kwas ten występuje w formie wolnej, zestryfikowanej, glikozydowej oraz w formie połączeń o charakterze oligomerów.



Ryc. 7 Struktura chemiczna kwasu rozmarynowego

2.2.1.2. Kwas rozmarynowy w rodzaju *Eryngium*

Kwasy fenolowe stanowią w mikołajkach główne metabolity z grupy polifenoli. Dzięki szerokiej aktywności biologicznej na szczególną uwagę zasługuje kwas rozmarynowy. Obecność kwasu rozmarynowego została stwierdzona w gatunkach z rodzaju *Eryngium*. Krajowe gatunki z rodzaju *Eryngium* zawierają stosunkowo niską zawartość kwasu rozmarynowego w korzeniach, natomiast wysokie stężenie R-(+)-3'-O-β-D-glukopiranozydu kwasu rozmarynowego zaobserwowano w korzeniach mikołajka płaskolistnego [Le Claire i wsp. 2005]. Zawartość tego kwasu i jego pochodnej glukozydowej w poszczególnych gatunkach *Eryngium* przedstawia tabela 1.

Tab. 1 Zawartość kwasu R-(+)-rozmarynowego oraz R-(+)-3'-O-β-D-glukopiranozydu kwasu rozmarynowego w gatunkach z rodzaju *Eryngium* L. [Le Claire i wsp. 2005]

Gatunek z rodzaju <i>Eryngium</i>	Zawartość kwasu rozmarynowego [mg g ⁻¹]	Zawartość glukozydu kw. rozmarynowego [mg g ⁻¹]
<i>E. agavifolium</i> L.	124	0
<i>E. alpinum</i> L.	27	11
<i>E. bourgatii</i> L.	15	0,7
<i>E. campestre</i>	0,6	0,4
<i>E. eburneum</i> L.	272	0,9
<i>E. giganteum</i> L.	12	0
<i>E. pandanifolium</i> L.	103	0,3
<i>E. planum</i> L.	0,4	15
<i>E. spinalba</i> L.	8,8	0,2
<i>E. tripartitum</i> L.	2	10
<i>E. varifolium</i> L.	39	0,1
<i>E. yuccifolium</i> L.	297	11

2.2.1.3. Właściwości biologiczne i farmakologiczne kwasu rozmarynowego

Kwas rozmarynowy charakteryzuje się dużym potencjałem terapeutycznym, dzięki czemu znalazł zastosowanie w zapobieganiu i leczeniu wielu chorób [Park i wsp. 2008].

Kwas ten wykazuje silne działanie przeciwutleniające; chroni przed szkodliwym wpływem na organizm wolnych rodników, reaktywnych form tlenu, a także przed promieniowaniem UV i promieniowaniem jonizującym, które powodują uszkodzenie komórkowego DNA oraz fotostarzenie skóry. W związku z tymi właściwościami RA wykazuje potencjalne działanie przeciwnowotworowe [Sánchez-Campillo i wsp. 2009; Ślusarczyk i wsp. 2009]. Kwas rozmarynowy blokuje powstawanie wolnych rodników przez co stabilizuje i chroni błony biologiczne przed uszkodzeniami oksydacyjnymi [Perez-Fons i wsp. 2010] oraz wpływa na wzrost stabilności liposomów poddawanych procesowi utleniania [Panya i wsp. 2010].

W wielu doświadczeniach związek ten obniżał aktywność niektórych enzymów, w tym cyklooksygenazy (COX) i lipooksygenazy (LOX), co warunkuje jego właściwości przeciwzapalne, przeciwbrzękowe i przeciwalergiczne. W wyniku niespecyficznego hamowania enzymów prostanoidów (COX, LOX) oraz enzymów uczestniczących w degradacji kwasu hialuronowego, RA zmniejsza przepuszczalność naczyń kapilarnych, zapobiegając wnikaniu toksyn i drobnoustrojów. Kwas rozmarynowy obniża poziom syntezy mediatorów stanu zapalnego (prostaglandyn, prostacyklin i tromboksanu), zapobiega również agregacji trombocytów. Zaobserwowany pod wpływem RA efekt trombinowy powstaje w drodze zapobiegania agregacji płytek krwi lub ewentualnej promocji procesu fibrynolizy. Przeprowadzone zostały liczne badania farmakologiczne, których wyniki sugerują możliwość wykorzystania surowców z zawartością kwasu rozmarynowego w profilaktyce, terapii stanów chorobowych z towarzyszącym stanem zapalnym [Fecka i wsp. 2002].

Jak podają liczne prace przeglądowe, kwas rozmarynowy zawarty w ekstrakcie z *Melissa officinalis* L. działa także antyproliferacyjnie, przeciwbakteryjnie i przeciwwirusowo (*Herpes simplex*). Pochodne estrowe wykazują aktywność żółciotwórczą i żółciopędną [Fecka i wsp. 2002; Park i wsp. 2008; Petersen 2013].

Aktywność wirusostatyczna skierowana przeciwko wirusowi opryszczki typu 1 (HSV-1), a także wirusom ludzkiego niedoboru immunologicznego (HIV-1) powstaje

w wyniku utrudniania adsorpcji wirusa do powierzchni komórek lub też upośledzenia jego namnażania. Kwas rozmarynowy obniża *in vitro* aktywność kluczowych enzymów replikacji HIV, odwrotnej transkryptazy i integrazy, przez co zapobiega syntezie nici komplementarnego wirusowego DNA na matrycy RNA [Fecka i wsp. 2002].

Badania prowadzone na myszach wykazały, że kwas rozmarynowy, a także kwas kawowy działają sedatywnie na ośrodkowy układ nerwowy, zmniejszają zaburzenia emocjonalne wywołane przez nadmierny stres, dzięki czemu posiadają potencjalne właściwości antydepresyjne [Takeda i wsp. 2002]. Inne doświadczenia dotyczyły wpływu RA na pamięć, poczucie lęku oraz aktywność lokomotoryczną w modelu na szczurach. Zaobserwowano, że w większej dawce związek ten wykazywał działanie przeciwlękowe, bez wpływu na pamięć krótko- i długotrwałą [Pereira 2005]. Ponadto RA wykazuje zdolność hamowania agregacji β -amyloidu, dlatego rozpatruje się jego wykorzystanie w leczeniu choroby Alzheimera [Ożarowski i wsp. 2013].

Kwas rozmarynowy może mieć znaczenie terapeutyczne przy hamowaniu ostrego i przewlekłego uszkodzenia nerek wywołanego cisplatyną [Tian, Jiang 2006].

Niektóre badania sugerują możliwość zastosowania kwasu rozmarynowego w terapii reumatoidalnego zapalenia stawów. Związane jest to ze stymulowaniem apoptozy limfocytów T odpowiedzialnych za rozwój choroby. Te same właściwości kwasu rozmarynowego są rozpatrywane z punktu widzenia wyciszenia reakcji układu odpornościowego w transplantologii [Hur i wsp. 2007].

Zaobserwowano, że kwas rozmarynowy przyczyniał się do zwiększenia zawartości melaniny w badanych komórkach. W oparciu o te rezultaty stwierdzono, że RA indukuje melanogenezę poprzez aktywację kinazy białkowej A. Na podstawie wyników wyciągnięto wnioski, iż kwas rozmarynowy mógłby znaleźć zastosowanie w terapii wspomagającej leczenie chorób związanych z niedoborem melaniny w skórze, np. bielactwo nabyte [Lee 2007].

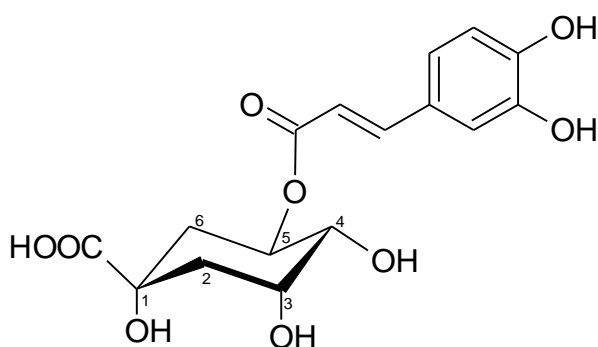
Kwas rozmarynowy ma również zastosowanie w kosmetologii. Dzięki właściwościom fotoochronnym może być stosowany w preparatach kosmetycznych przeznaczonych do pielęgnacji i ochrony skóry. RA chroni warstwę rogową naskórka oraz zapobiega podrażnieniom oraz starzeniu się skóry [Jabłońska, Czerpak, 2005/2006].

2.2.2. Kwas chlorogenowy

2.2.2.1. Występowanie i struktura chemiczna

Kwas chlorogenowy (CGA) jest związkiem fenolowym najczęściej występującym w roślinach, także w tych jadalnych (ziemniaki, jabłka, gruszki, winogrona, nasiona słonecznika, kawa - zwłaszcza zielona).

CGA to depsyd kwasu kawowego z kwasem chinowym [Ryc. 8]. Kwas kawowy połączony jest przez grupę karboksylową z grupą fenolową kwasu chinowego [Gawlik-Dziki 2004; Budryn, Nebesny 2006].



Ryc. 8 Struktura chemiczna kwasu chlorogenowego

2.2.2.2. Kwas chlorogenowy w rodzaju *Eryngium*

Obecność kwasu chlorogenowego została potwierdzona w *E. planum*, *E. maritimum* i *E. campestre* [Suciu i wsp. 2006].

2.2.2.3. Właściwości biologiczne i farmakologiczne kwasu chlorogenowego

Kwas chlorogenowy i jego pochodne posiadają głównie właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne. Działanie przeciwutleniające związane jest z naturalną zdolnością związków fenolowych do usuwania wolnych rodników. Ponadto CGA hamuje glikację białek, spowodowaną stresem oksydacyjnym, w efekcie obniża ryzyko wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych, powikłań mikronaczyniowych u cukrzyków, miażdżycy i chorób neurodegeneracyjnych. W badaniach hamowania nitracji tyrozyny przez nadtlenki azotanów (III) dowiedziono, że kwas chlorogenowy oraz kawowy, dihydroksypochodna kwasu cynamonowego, są bardziej aktywne niż ich pochodne monohydroksylowe (kwas ferulowy, kwas *p*-kumarowy). Zdolność kwasów do ochrony

komórek przed uszkodzeniami przez nadtlenek azotu (ONOO⁻) przedstawia się następująco: kwas chlorogenowy = kwas kawowy = kwas ferulowy > kwas *p*-kumarowy > kwas *o*-kumarowy > kwas *m*-kumarowy. Natomiast najsilniejsze właściwości przeciwutleniające posiadają kwas chlorogenowy i kwas kawowy [Gawlik-Dziki 2004 i cytowane tam piśmiennictwo].

W pracy przeglądowej na temat fenolokwasów, Gawlik-Dziki [2004] wymienia szereg innych właściwości kwasu chlorogenowego. Działanie przeciwzapalne związane jest głównie z hamowaniem aktywności lipooksygenaz (5-LOX i 12-LOX) i zmniejszeniem w ten sposób syntezy prozapalnych leukotrienów, co ma duże znaczenie w leczeniu astmy, czy innych stanów alergicznych. Kwas chlorogenowy (także kawowy, ferulowy, elagowy i galusowy) wykazują zdolność do blokowania kancerogenów powstających w wyniku przemian metabolicznych niektórych substancji rakotwórczych np. 4-nitrochinolino-1-tlenków. CGA wykazuje także właściwości przeciwbakteryjne w stosunku do *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*, oraz hamuje odwrotną transkryptazę wirusa HIV. Kwas chlorogenowy wykazuje właściwości żółciopędne, hamuje przemiany kwasu γ -aminomasłowego (GABA) w ośrodkowym układzie nerwowym. Stwierdzono, że pochodne CGA, powstałe w wyniku enzymatycznej oksydacji, posiadają aktywność przeciwko wirusowi opryszczki (Herpes I i Herpes II).

Istnieją także doniesienia, iż kwas ten relatywnie zmniejsza ryzyko wystąpienia cukrzycy typu 2 oraz obniża poziom cukru we krwi poprzez hamowanie syntezy glukozy w procesie glukoneogenezy i glikogenolizy w wyniku inhibicji glukozo-6-fosfatazy [Chkhikvishvili, Kharebava 2001].

W doświadczeniach z użyciem modelu zwierzęcego, wykazano wysoką skuteczność CGA, jako środka ochronnego komórek wątroby zwierząt laboratoryjnych przed czterochlorkiem węgla oraz izotopami kobaltu i kadmu [Olthof i wsp. 2001].

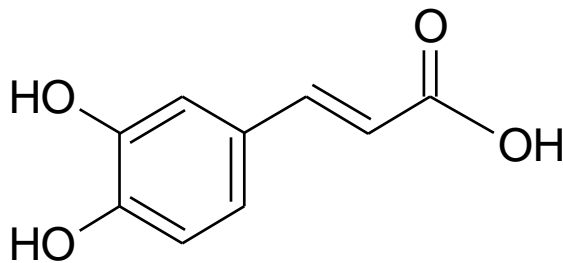
Według Bin i współautorów suplementacja kwasem chlorogenowym może stanowić strategię prewencji w chorobie XXI w – osteoporozie. W modelu *in vitro* wykazano wpływ CGA na osteogenezę w mezenchymatycznych komórkach macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej, co wiązało się z wzmożoną mineralizacją i wzrostem aktywności fosfatazy alkalicznej [Bin i wsp. 2013].

2.2.3. Kwas kawowy

2.2.3.1. Występowanie i struktura chemiczna

Kwas kawowy, jeden z najbardziej rozpowszechnionych kwasów hydroksycynamonowych, bardzo często spotykany w żywności pochodzenia roślinnego: występuje w kawie, jabłkach, ziemniakach, szpinaku, sałacie, oliwie z oliwek, winie, liściach tytoniu [Gawlik-Dziki 2004].

Kwas kawowy [CA] jest organicznym związkiem chemicznym z grupy hydroksykwasów [Ryc. 9]. Rzadko występuje w postaci wolnej, najczęściej w postaci depsydu z kwasem chinowym, czyli jako kwas chlorogenowy [Gawlik-Dziki 2004; Budryn, Nebesny 2006].



Ryc. 9 Struktura chemiczna kwasu kawowego

2.2.3.2. Właściwości biologiczne i farmakologiczne kwasu kawowego

Kwas kawowy wykazuje szerokie spektrum działania, posiada aktywność: antyoksydacyjną, przeciwzapalną, przeciwreumatyczną, przeciwalergiczną, przeciwbakteryjną oraz antydepresyjną. Związek ten przeciwdziała oksydacji lipoprotein i recykulacji α -tokoferolu do formy aktywnej. Chroni komórki endotelium przed uszkodzeniami wywołanymi przez utlenioną frakcję LDL [Gawlik-Dziki 2004; Budryn, Nebesny 2006].

Ostatnie prace naukowe dowodzą, że wywiera także działanie przeciwnowotworowe. Obecnie prowadzone są liczne badania *in vitro* w celu potwierdzenia tych właściwości i poznania ich dokładnego mechanizmu molekularnego. Kang i współautorzy sugerują, że CA przeciwdziała powstawaniu, indukowanym promieniowaniem UVB, zmian skórnych o charakterze nowotworów poprzez hamowanie aktywności kinazy Fyn. Natomiast zespół Stanifortha sądzi, że działanie kwasu kawowego związane jest z hamującym wpływem na produkcję immunosupresyjnej interleukiny IL-10

i fosforylacją kinazy MAPK. Wskazany mechanizm działania jest różny, ale badania potwierdzają, że kwas kawowy odgrywa istotną rolę w ochronie organizmu przed szkodliwym działaniem promieniowania UVB, które odpowiedzialne jest za fotostarzenie skóry, powstawanie zmian prokancerogennych, czy obniżanie aktywności układu immunologicznego. Dlatego CA może stać się potencjalnie użyteczny jako środek miejscowo chroniący przed szkodliwym wpływem promieniowania UVB, w prewencji raka skóry, czy zmian skórnych o innym charakterze. Kwas kawowy, a także chlorogenowy, elagowy i kurkumina, w testach na zwierzętach hamował inicjację jak i promocję chemicznie wywołanych nowotworów [Staniforth i wsp. 2006; Kang i wsp. 2009].

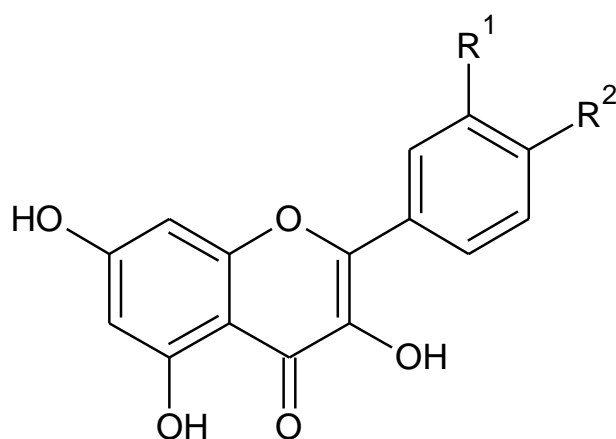
W modelu zwierzęcym, w badaniach na szczurzych komórkach guza chromochłonnego, kwas kawowy chronił przed toksycznym i zapalnym działaniem β -amyloidu, głównego czynnika odpowiedzialnego za patologię choroby Alzheimera. Mechanizm działania CA polegał na tłumieniu wewnątrzkomórkowego napływu jonów wapnia i hamowaniu fosforylacji białka tau przez redukcję aktywności GSK-3 β [Sul i wsp. 2009].

2.3. Flawonoidy

2.3.1. Występowanie i struktura chemiczna

Flawonoidy to związki o charakterze barwników, nadające kolor kwiatom, liściom, owocom. Najczęściej posiadają barwę żółtą, rzadziej są białe lub bezbarwne. Podstawą cząsteczki jest 15-węglowy szkielet aglikonu zbudowany z 2 pierścieni benzenowych (A i B) połączonych w układ C6-C3-C6 poprzez łańcuch propanowy. U większości flawonoidów między pierścieniami aromatycznymi A i B występuje układ heterocykliczny [Małolepsza, Urbanek 2000; Ostrowska, Skrzydlewska 2005].

W zależności od struktury chemicznej wśród flawonoidów wyróżniamy: flawony, flawonole, flawanony, flawanonole, antocyjanidyny, izoflawony i chalkony [Hänsel, Sticher 2010; Bołonkowska 2011].



R ¹	R ²	Nazwa związku
H	OH	Kemferol
OH	OH	Kwercetyna

Ryc. 10 Struktury chemiczne flawonoli - kemferolu i kwercetyny

2.3.2. Flawonoidy w rodzaju *Eryngium*

Flawonoidy obecne w nadziemnych częściach gatunków z rodzaju *Eryngium* L. występują w niewielkich ilościach. Zainicjonowane przez zespół Hillera w latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku wstępne badania fitochemiczne wykazały obecność w części nadziemnej *E. planum* dwóch pochodnych kemferolu (flawonoid z grupy flawonolu) o pełnych nazwach chemicznych:

3-*O*-(6-*O*- β -glukopiranozylo)- β -D-galaktopiranozyd kemferolu [Hiller i wsp. 1980] i 3,7-di-*O*- α -L-ramnopiranozyd kemferolu [Leokadia 1983].

W szerzej badanym gatunku *E. campestre* stwierdzono obecność następujących flawonoidów, należących do trzech grup [Karting, Wolf 1993; Hohmann i wsp. 1997; Liakoura i wsp. 2001; Głowniak i wsp. 2004; El-Kassem i wsp. 2013]:

- z grupy flawonolu [Ryc. 10]:

- 3,7-*O*-diramnozydoglukozyd kemferolu
- 3,7-*O*-diramnozyd kemferolu (kemferytryna)
- 3-*O*- β -glukozyd kemferolu (astragalina)
- 3-*O*- kawoiloglukozyd kemferolu
- 7-*O*- α - ramnozyd kemferolu
- 3-*O*-di-p- kumaroiloglukozyd kemferolu
- 3-*O*-rutynozyd kwercetyny (rutyna, rutozyd)
- 3-*O*- β -D- glukozyd kwercetyny (izokwercytryna)
- 3-*O*- α -L-ramnozyd kwercetyny (kwercytryna)
- 3-*O*-di-p- kumaroiloglukozyd kwercetyny
glukozyd izoramnetyny
- 3-*O*-galaktozyd kwercetyny (hiperozyd)

- z grupy flawanonu:

naryngenina

- z grupy flawonu:

7-*O*- β -D-glukozyd luteoliny

Natomiast gatunek *E. maritimum* zawiera głównie astragalinę, 3- β -D-glukopiranozydo-7-*O*-L-ramnopyranozyd kemferolu oraz izokwercytrynę [Hiller i wsp. 1981].

2.3.3. Właściwości biologiczne i farmakologiczne wybranych flawonoidów

Liczne publikacje cytowane w pracy przeglądowej Calderón-Montaño i współpracowników [2011] wskazują, że kemferol, glikozydy kemferolu oraz surowce roślinne bogate w kemferol posiadają szerokie spektrum właściwości biologicznych i farmakologicznych.

Wykazano, że kemferol w niskim stężeniu posiada zdolność zmiatania rodnika hydroksylogowego i nadtlenu azotu, wysoko reaktywnych form, które mogą powodować uszkodzenia DNA, białek i lipidów. Stwierdzono także, że kemferol może wywierać działanie przeciwutleniające poprzez inne mechanizmy działania m.in. hamowanie aktywności enzymów, które wytwarzają ROS, takich jak enzym oksydazy ksantynowej. Podobnie jak inne flawonoidy, kemferol może wpływać na hamowanie tworzenia rodników hydroksylogowych poprzez reakcję Fentona, chelatując jony żelaza lub miedzi. Związek ten może również działać poprzez zwiększenie ekspresji lub aktywności enzymów antyoksydacyjnych, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa czy katalaza. Inne badania wykazały, że kemferol i glikozydy kemferolu mogą zapobiegać peroksydacji lipidów.

Aktywność przeciwzapalna kemferolu najprawdopodobniej skorelowana jest z jego rolą pośredniczenia w szeregu mechanizmach działania. Aktywacja jądrowego czynnika kappa B (NF-kB) zwiększa ekspresję prozapalnych cytokin, chemokin i enzymów (np. TNF- α , IL-1, IL-6, IL8, inhibitory COX-2, iNOS), a kilka badań doświadczalnych wykazało, że kemferol hamuje aktywność NF-kB. W badaniach stwierdzono, że kemferol może hamować aktywność TNF i ekspresję IL-1 i IL-8. Ponadto związek ten może hamować aktywację AP-1, regulatora transkrypcyjnego złożonego z członków rodzin Fos i Jun, które uczestniczą w reakcjach zapalnych. Doniesienia sugerują, że kemferol wpływa na hamowanie cyklooksygenazy (COX-2) i lipoksygenazy (LOX).

Kemferol w niskim stężeniu może chronić DNA przed uszkodzeniami wywołanymi różnymi czynnikami rakotwórczymi. Uznaje się powszechnie, że tworzenie guza złośliwego wymaga, by komórki nowotworowe nabyły kilku właściwości takich jak: odporność na apoptozę, zwiększoną indukcję angiogenezy lub zdolność do inwazji i przerzutów. Wykazano, iż kemferol może indukować apoptozę, hamować angiogenezę i przerzuty nowotworów pierwotnych.

Stwierdzono również, że kemferol wykazuje aktywność przeciwwirusową w stosunku do *Herpes simplex*, cytomegalowirusa, wirusa grypy i ludzkiego wirusa niedoboru odporności (HIV). Aktywność tego związku prawdopodobnie związana jest ze zdolnością hamowania proteaz wirusowych.

W badaniach wykazano, że flawonoidom można przypisać działanie przeciw-cukrzycowe. Luteolina i 7-O-glukozyd luteoliny, hamując aktywność enzymów

α amylazy i α -glukozydazy, a glikozydy kwercetyny osłabiając działanie transporterów glukozy w enterocytach, mogą spowolnić wchłanianie glukozy w jelicie. Zapobiega to gwałtownemu zwiększeniu ilości glukozy we krwi po posiłku [Jachak 2002].

Przykładami flawonoidów o właściwościach przeciwalergicznymi są kwercetyna i luteolina, które oprócz obniżania syntezy mediatorów zapalnych hamują również uwalnianie histaminy z mastocytów pobudzonych wcześniej IgE [Jachak 2002].

Mechanizm działania przeciwzapalnego flawonoidów (np. kwercetyny) polega przede wszystkim na hamowaniu aktywności 5-lipooksygenazy (5-LOX) i cyklooksygenazy (COX, zwłaszcza COX-2). Enzymy te uczestniczą jako mediatory odpowiedzi zapalnej. Zahamowanie tych enzymów przez flawonoidy, np. COX-2 przez kwercetynę, zmniejsza syntezę między innymi prostaglandyny PGE₂, leukotrienu B₄ i tromboksanu A₂, co prowadzi do zahamowania napływu leukocytów, wyregulowania stanu napięcia naczyń włosowatych i zmniejszenia odczynu zapalnego [Yao i wsp. 2004].

Aktualny stan wiedzy wskazuje, że kwercetyna i inne flawonoidy mogą działać jak inhibitory odwrotnej transkryptazy – kluczowego enzymu koniecznego do rozwoju HIV. Kwercetyna może hamować aktywność wirusowego białka Vpr, odpowiedzialnego za zwiększenie wydajności namnażania wirusa w komórkach gospodarza oraz takich enzymów jak integrazy oraz proteinazy [Veljkovic i wsp. 2007].

Flawonoidy wywierają wpływ na wiele mechanizmów biorących udział w patogenezie nowotworów. Kwercetyna i kemferol hamują cytochrom P-450 podrodziny CYP1A, enzymy uczestniczące w aktywacji wielu kancerogenów. Natomiast naryngenina i kwercetyna blokują CYP3A4 [Arct, Pytkowska 2008; Bołonkowska i wsp. 2011].

Inny flawonoid, hiperozyd (3-O-galaktozyd kwercetyny) jest silnym inhibitorem sekrecji HBsAg i HBeAg (białko HBeAg, które nie ma bezpośredniego wpływu na replikację materiału genetycznego, pełni funkcję markera aktywności replikacji wirusa) w komórkach wątrobiaka ludzkiego linii Hep G 2.2.15 [Wu i wsp. 2007].

Aktywność farmakologiczna flawanonu naryngeniny i jej pochodnych przejawia się w działaniu słabo estrogenopodobnym, obniżającym poziom cholesterolu i przeciw-miażdżycowym, precizapalnym, rozkurczowym, przeciwutleniającym i ochronnym na skórę [Pobłocka-Olech i wsp., 2006 i zacytowane tam piśmiennictwo].

2.4. Inne związki chemiczne

2.4.1. Olejki eteryczne

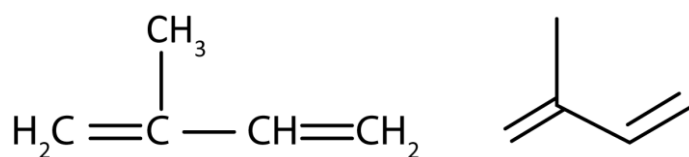
2.4.1.1. Występowanie i struktura chemiczna

Obecność olejków eterycznych charakterystyczna jest dla gatunków z rodzin: *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Araceae*, *Pinaceae*, *Piperaceae*, *Rutaceae*. Ich skład ilościowy i jakościowy może być różny, nawet w organach tego samego gatunku, zależy bowiem od wielu czynników, jak pochodzenie geograficzne, stanowisko, odmiana, czynniki genetyczne, stadium wegetacji rośliny [Góra, Lis 2005].

Olejki eteryczne należą do lotnych wydzielin roślinnych; większość z nich posiada przyjemny zapach i znalazła zastosowanie w produkcji perfum, kosmetyków i mydeł. Właściwościami fizykochemicznymi olejków są: płynna konsystencja, czynność optyczna, dobra rozpuszczalność w rozpuszczalnikach litofilnych. Olejki są bezbarwne, żółtawe, czasem brunatne, ciemnoniebieskie lub zielone. W roślinie zlokalizowane są w tworach tkanki wydzielniczej, zewnątrzkomórkowo we włoskach gruczołowych lub wewnątrzkomórkowo w komórkach, przewodach i zbiornikach [Góra, Lis 2005].

Olejki są mieszaniną różnorodnych związków chemicznych o charakterze węglowodorów, alkoholi, ketonów, aldehydów, estrów i tlenków. W skład olejków eterycznych wchodzi głównie terpeny, których struktura oparta jest na pięciowęglowych jednostkach izoprenu [Ryc. 11] oraz pochodnych fenylopropanu:

- *monoterpeny* (C₁₀): zbudowane z dwóch jednostek izoprenu (C₅), w formie acyklicznej, monocyklicznej lub dicyklicznej,
- *seskwiterpeny* (C₁₅): zbudowane z trzech jednostek izoprenu, formy acykliczne, monocykliczne, dicykliczne lub tricykliczne,
- *fenylopropanoidy* (C₆-C₃): wywodzące się od kwasu cynamonowego, aldehydy, fenole, fenoloetery



Ryc. 11 Struktura chemiczna izoprenu

Skład ilościowy olejku eterycznego może różnić się w zależności od części rośliny. Największą zawartość stwierdza się w częściach nadziemnych rośliny, jak kwiaty, liście czy pędy, natomiast znacznie mniej w korzeniach [Góra, Lis 2005].

2.4.1.2. Olejki eteryczne w rodzaju *Eryngium*

Badania olejków eterycznych w szeregu gatunkach z rodziny *Apiaceae* wykazały, że zawartość olejku jest stosunkowo niska w gatunkach z rodzaju *Eryngium*. Analizy składu olejków eterycznych przeprowadzono w wielu taksonach *Eryngium*.

W badaniach zawartości olejku eterycznego w różnych organach *E. planum* wykazano, że najwięcej olejku występuje w kwiatostanach (0,23%), następnie w liściach łodygowych i liściach rozetkowych z kultur *in vitro* (0,10%), liściach rozetkowych z roślin gruntowych (0,07%) a najmniej w korzeniach (0,05%) [Thiem i wsp. 2011].

Olejek eteryczny z *E. planum*, analizowany metodą GC-FID-MS, charakteryzuje się bardzo różnorodnym składem i zawiera 111 składników. Olejek z różnych organów posiada dużą ilość germakrenu D (44,9%) [Ayoub, Kubeczka 2001; Thiem i wsp. 2011]. Głównymi składnikami olejku pochodzącego z łodyg są monoterpny (limonen, α - i β - pinen) oraz seskwiterpenowe węglowodory. W kwiatostanach dominuje octan *cis*- chryzantenolu (43,2%), ponadto obecne są także inne estry (propionian, butanian, heksanian, oktanian) oraz liczne utlenione seskwiterpny. Natomiast olejek z korzeni zawiera głównie (*Z*)-falkarinol oraz 2,3,4-trimetylobenzaldehyd [Thiem i wsp. 2011]. Z olejku eterycznego z kwiatostanów *E. planum* wyizolowano dwa nowe związki, które zidentyfikowano jako *cis*-chryzantenyloestry heksanonian i oktanan [Korbel i wsp. 2008].

Natomiast Kubeczka i współautorzy [1999] w olejku z *E. campestre* stwierdzili głównie obecność węglowodorów seskwi- i monoterpnowych (44,9% i 23,4%) w tym germakrenu D (11,9%), mircenu (11,2%), α - pinenu (8,1%). Ponadto znaczne ilości β -elemenu wykryto w olejku pochodzącym z łodyg (14,1%) i liści (10,4%). Największe ilości germakrenu D znajdują się w olejku pozyskiwanym z łodyg (22,4%) i z owoców (20,7%) [Kubeczka i wsp. 1999].

Olejki w poszczególnych organach *E. maritimum* także różnią się składem. Olejek eteryczny pochodzący z nadziemnych części rośliny zawiera głównie germakren D (43,1-42,4 %) i rzadki związek seskwiterpenowy 9-muurolen-15-aldehyd (22,4 – 16,4

%). Natomiast w olejku z korzenia stwierdzono przede wszystkim obecność γ -gwajenu (40,2 %), 2,3,4-trimetylobenzaldehydu (24,5 %) i germakrenu D (10,6 %) [Brophy i wsp. 2003]. Najnowsze badania doprowadziły do wyizolowania z części nadziemnych mikołajka nadmorskiego nowego seskwiterpenu (4 β H-muurool-9-en-15-al) oraz trzech, niewykrytych dotychczas w olejku tej rośliny, utlenionych seskwiterpenów (4 β H-cadin-9-en-15-al, 4 β H-cadin-9-en-15-ol, 4 β H-muurool-9-en-15-ol) [Darriet i wsp. 2012].

2.4.1.3. Właściwości biologiczne i farmakologiczne olejków eterycznych

Olejki eteryczne i ich składniki, w zależności od źródła pochodzenia, wykazują wielokierunkowe działanie farmakologiczne: antyseptyczne, przeciwzapalne, rozkurczające na mięśniówkę gładką przewodu pokarmowego, rozgrzewające przy zewnętrznym stosowaniu w schorzeniach reumatycznych i nerwobólach, wykrztuśne, moczopędne, pobudzające na wydzielanie soków trawiennych, żółciopędne i żółciotwórcze, przeciwpasożytnicze [Góra, Lis 2005; Bakkali i wsp. 2008].

Ponadto olejki eteryczne oraz surowce olejkowe wykorzystywane są jako środki poprawiające smak leków, do produkcji preparatów kosmetycznych i higienicznych [Góra, Lis 2005; Bakkali i wsp. 2008].

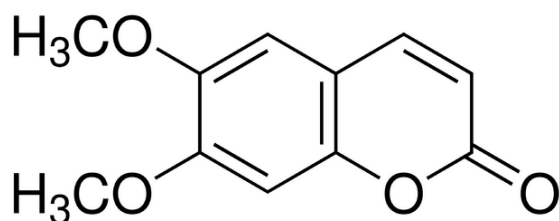
2.4.2. Kumaryny

2.4.2.1. Występowanie i struktura chemiczna

Kumaryny są dużą klasą związków fenolowych spotykanych w roślinach, występującą w ziele, nasionach, kwiatach, owocach i korzeniach. Surowcami bogatymi w kumaryny są: kasztanowiec zwyczajny, kora cynamonowca, ziele nostryka, ruty, bylicy oraz macierzanki, owoce aminka egipskiego, kwiaty i liście lawendy lekarskiej [Venugopala i wsp. 2013].

Związki kumarynowe najczęściej występują w roślinach jako glikozydy (w postaci glikozydu kwasu o-hydroksykumarynowego) oraz składniki olejków eterycznych.

Kumaryny to związki posiadające w budowie strukturę α -pironu skondensowanego z pierścieniem benzenowym [Ryc. 12]. Związki te mogą być zaliczane także do laktonów kwasu cis-o-hydroksycynamonowego lub do wewnętrznych eterów hydroksykwasów, gdyż ich szkielet podstawowy C6-C3 występuje w układzie laktonowym. W grupie tych związków można wyróżnić: kumaryny o rdzeniu benzo- α -pironu (kumaryna, hydroksykumaryny, metoksy-kumaryny), izokumaryny, furanokumaryny gdzie układ benzo- α -pironu skondensowany jest z pierścieniem furanu (typ psolarenu i typ angelicyny), piranokumaryny gdzie układ benzo- α -pironu skondensowany jest z pierścieniem piranu (typ seseliny, typ alloksatyletyny, typ ksantyletyny) [Venugopala i wsp. 2013].



Ryc. 12 Struktura chemiczna skoparonu

2.4.2.2. Kumaryny w rodzaju *Eryngium*

Dotychczasowe badania obecności kumaryn w gatunku z rodzaju *Eryngium* dotyczyły tylko wybranych surowców. Kumaryny obecne w owocach i korzeniach *E. campestre* to: umbeliferon (7-hydroksykumaryna), skoparon (6,7-dimetoksykumaryna), skopoletyna (6-metoksy-7-hydroksykumaryna), agasylina, benzoesan agasyliny, angeloilo-senecionyl-agasyliny, grandwityna i egelinol [Kamiński i wsp. 1978; Kartal i wsp. 2005]. Nieopublikowane dane z analiz NMR wyodrębnionego związku kumarynowego z liści *E. planum* sugerują, że w tym gatunku występuje skoparon [Budzianowski, informacja ustna].

2.4.2.3. Właściwości biologiczne i farmakologiczne wybranych kumaryn

Aktywność biologiczna i farmakologiczna kumaryn jest bardzo zróżnicowana i uzależniona od ich struktury chemicznej. Kumaryny wykazują działanie przeciwskurczowe, usprawniające przepływ płynów ustrojowych w żyłach i naczyniach limfatycznych, uszczelniające naczynia włosowate, światłochłonne, słabo uspokajające i hipotensyjne, zmniejszające krzepliwość krwi.

Kumaryny badane były pod kątem aktywności neuroprotekcijnej. Jako wymiatacze wolnych rodników kumaryny (m.in. umbeliferon) chronią komórki nerwowe przed uszkodzeniami oksydacyjnymi w badaniach *in vitro* [Epifano i wsp. 2008].

W badaniach wykazano właściwości przeciwzapalne kumaryn. Umbeliferon i kumaryna wykazywały działanie przeciwobrzękowe w modelu zwierzęcym, w doświadczeniu na łapach szczurów drażnionych karageniną [Lino i wsp. 1997].

Wyniki badań doświadczalnych w modelu zwierzęcym wykazały, że leczenie umbeliferonom zapobiegało uszkodzeniom wątroby, peroksydacji lipidów i chroniło system obrony antyoksydacyjnej wątroby szczurów w indukowanej karcenogenezie [Ramalingam, Vaiyapuri 2013].

Najnowsze badania w kierunku działania przeciwgrzybiczego umbeliferonu wykazały hamowanie wzrostu grzybów chorobotwórczych roślin: *Monilia fructigena*, *Fusarium moniliforme*, *Botrytis cinerea* i *Colletotrichum capsici*. Całkowite zahamowanie kiełkowania zarodników *M. fructigena* i *F. moniliforme* zaobserwowano, gdy stężenie umbeliferonu wynosiło do 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Na podstawie analiz skryningowej

i transmisyjnej mikroskopii elektronowej autorzy badań sugerują, iż przeciwgrzybiczy mechanizm działania umbeliferonu najprawdopodobniej polega na niszczeniu organeli komórkowych [Bai i wsp. 2012].

Kumaryny posiadają aktywność antybakteryjną, zarówno w stosunku do Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych bakterii. Agasylina i egelinol wykazywały znaczącą aktywność przeciwbakteryjną w stosunku do klinicznych szczepów, takich jak: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Enterobacter cloacae* i *E. aerogenes*. Natomiast umbeliferon i skopoletyna hamowały wzrost prątków gruźlicy (*Mycobacterium tuberculosis*) [Venugopala i wsp. 2013].

Grandwityna i agasylina, kumaryny wyizolowane z *Ferulago campestris*, wykazują słabe właściwości cytotoksyczne w stosunku do komórek linii nowotworu płuc A549 [Venugopala i wsp. 2013].

Badania wykazały wpływ skoparonu na uwalnianie dopaminy poprzez fosforylację synapsyny I i CaMKII wynikającą ze wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP i Ca²⁺ w PC12 [Yang i wsp. 2010].

Wyniki doświadczeń Kang'a i współpracowników sugerują, że skoparon tłumi indukowane D-galaktozaminą / lipopolisacharydem uszkodzenia wątroby myszy w wyniku hamowania szlaku zapalnego zależnego od receptora TLR 4 [Kang i wsp. 2013].

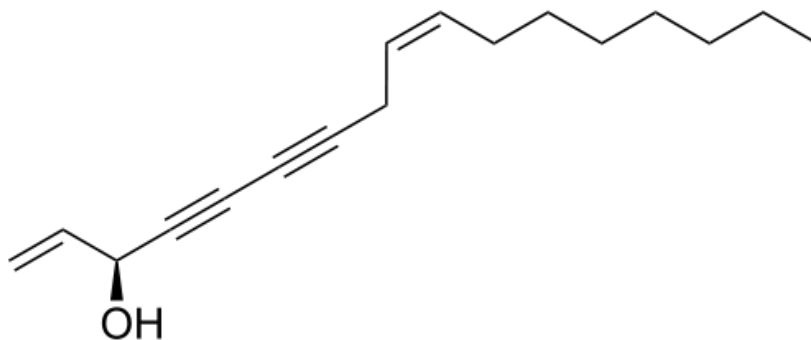
Wśród analizowanych pochodnych kumarynowych, skoparon posiada najsilniejsze właściwości indukcji melanogenezy w mysiej linii komórkowej czerniaka B16. Wyniki badań sugerują, że melanogeneza indukowana jest prawdopodobnie na poziomie transkrypcji enzymów związanych procesem melanogenezy, poprzez sygnalizację kinazy białkowej A [Yang i wsp. 2006].

2.4.3. Poliacetyleny

2.4.3.1. Występowanie i struktura chemiczna

Poliacetyleny charakterystyczne są dla świata roślinnego – roślin kwiatowych. Wyizolowano około 1400 poliacetylenów i związków pokrewnych z roślin wyższych, głównie rodzin *Apiaceae*, *Araliaceae* i *Asteraceae*. Alifatyczne poliacetyleny typu falkarinolu i falkarindiolu są szeroko rozpowszechnione w rodzinie baldaszkowatych. Jednakże związki te można odnaleźć także w królestwie grzybów (*Basidiomycetes*). U grzybów występują głównie alifatyczne poliacetyleny typu kwasów, alkoholi, aldehydów [Christensen, Brandt 2006; Christensen 2009].

Poliacetyleny są związkami powstającymi w wyniku polimeryzacji cząsteczek acetyleny i posiadają w swojej strukturze jedno lub kilka wiązań potrójnych [Ryc. 13]. Mogą występować w formie alifatycznej lub tworzyć związki o budowie cyklicznej, niekiedy posiadają również układy aromatyczne lub heterocykliczne, zawierające siarkę lub tlen. Ze względu na swój lipofilny charakter łatwo rozpuszczają się w rozpuszczalnikach lipofilnych i w związku z tym w roślinach występują w olejach tłustych lub w olejkach eterycznych [Harborne, Baxter 1993; Christensen 2009].



Ryc. 13 Struktura chemiczna falkarinolu

2.4.3.2. Poliacetyleny w rodzaju *Eryngium*

Poliacetyleny występują także w roślinach z rodzaju *Eryngium*. Poszczególne gatunki zawierają falkarinol, falkarinon, falkarinolon i falkarindiol. Analizy składu chemicznego nadziemnych części *E. campestre* wykazały obecność tej grupy związków w olejku. Dominującym składnikiem był falkarinol (60-83%). W tym samym gatunku

odkryto także występowanie innych poliacetylenów: falkarinonu oraz heptadeca-1,8-dien-5,6-diyń-3,9-diolu [Erdelmeier, Sticher 1986; Kubeczka i wsp. 1999]. Obecność falkarinolu stwierdzono również w innych gatunkach mikołajków, m.in. w *E. alpinum* i *E. planum* [Hegnauer 1973, Hegnauer 1990; Thiem i wsp. 2011]. Olejek eteryczny z korzenie mikołajka polnego zawierał 64,4 % falkarinolu [Thiem i wsp. 2011].

2.4.3.3. Właściwości biologiczne i farmakologiczne poliacetylenów

W pracach przeglądowych [Christensen, Brandt 2006], [Christensen 2009] podsumowano dotychczas małopoznaną aktywność farmakologiczną poliacetylenów.

Badania potwierdzają toksyczne działanie tej grupy związków na komórki grzybów i bakterii, dodatkowo wskazują na działanie toksyczne względem komórek ssaków. Szczególne nadzieje wiąże się z ich silną, wybiórczą aktywnością cytotoksyczną w stosunku do komórek zmienionych nowotworowo i związanym z tym potencjalnym działaniem przeciwnowotworowym. Ponadto niektóre poliacetyleny typu falkarinolu mogą posłużyć, jako związki w konstrukcji nowoczesnych antybiotyków.

Autorzy sugerują, że poliacetyleny mogą odgrywać rolę w prewencji i leczeniu neurodegeneracyjnych chorób układu nerwowego np. choroby Alzheimera. Jednak oprócz korzystnych właściwości leczniczych w wysokich stężeniach działają neurotoksycznie i w kontakcie ze skórą mogą wywołać silny stan zapalny o podłożu alergicznym.

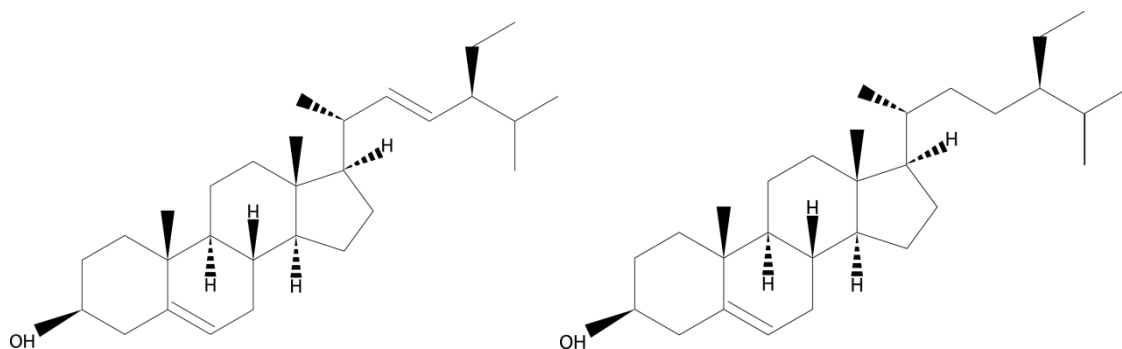
Inni autorzy dodają, iż falkarindiol wyizolowany z liści *Crithmum maritimum* L. posiada właściwości przeciwbakteryjne w stosunku do *Mycobacterium fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. aurum* i *M. abscessus*. Ponadto wykazuje właściwości cytotoksyczne na komórki IEC-6, L1210, CEM-C7H2 czy RPMI-8226 [Zidorn i wsp. 2005; Chen i wsp. 2007; Meot-Duros i wsp. 2010].

2.4.4. Fitosterole

2.4.4.1. Występowanie i struktura chemiczna

Sterole są grupą związków, których budowa strukturalna oparta jest na szkielecie cholestanu. Sterole naturalne charakteryzują się obecnością grupy hydroksylowej w pozycji β przy trzecim atomie węgla, natomiast atom 17-ty podstawiony jest ośmio- lub dziesięcio- węglowym łańcuchem bocznym, również w pozycji β .

Na szczególną uwagę zasługuje stigmasterol i jego zredukowana pochodna β - sitosterol (brak wiązania podwójnego w dziesięciowęglowym łańcuchu bocznym) [Ryc.14]. Występowanie tych dwóch fitosteroli jest rozpowszechnione w świecie roślinnym. Dobrym źródłem jest olej sojowy i olej otrzymany z kiełkujących nasion [Bartnikowska 2012; Santas i wsp. 2013].



Ryc. 14 Struktury chemiczne wybranych fitosteroli A stigmasterol B β -sitosterol

2.4.4.2. Fitosterole w rodzaju *Eryngium*

W gatunkach z rodzaju *Eryngium* występują fitosterole m.in. stigmasterol. Ich obecność stwierdzono w owocach i ziele krajowego gatunku *E. planum* [Madej i wsp. 2006].

2.4.4.3. Właściwości biologiczne i farmakologiczne fitosteroli

Fitosterole swoją budową przypominają cholesterol, w związku z tym mają duże znaczenie w żywieniu człowieka. Wykazują korzystny wpływ na profil lipidowy, stosowane są w hipercholesterolemii, jako środek zmniejszający wchłanianie cholesterolu z jelit. Pozytywne działanie fitosteroli opiera się na ich właściwościach immunomodulacyjnych i przeciwzapalnych. W piśmiennictwie fitosterole opisywane są jako związki odgrywające istotną rolę w profilaktyce wielu chorób, w szczególności

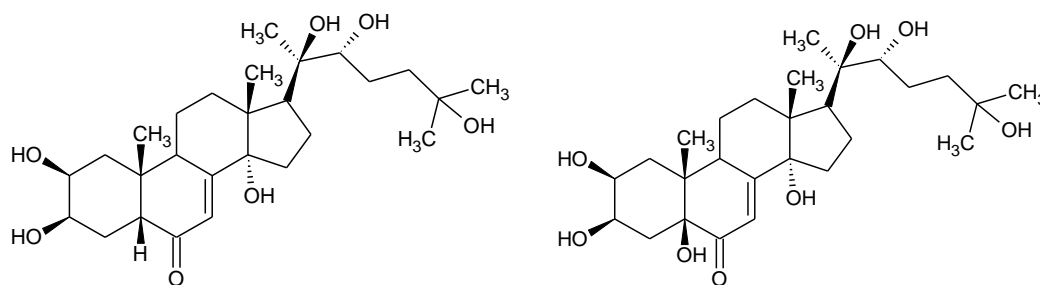
nowotworów i miażdżycy, chociaż mechanizm ich działania nie jest poznany. Szczególnie β - sitosterol, hamuje wchłanianie cholesterolu z jelit. Stigmasterol wykorzystywany jest w półsyntezie hormonów steroidowych [Bartnikowska 2012; Santas 2013].

2.4.5. Ekdysteroidy

Ekdysteroidy to grupa steroidowych pochodnych koprostanu [Ryc. 15], po raz pierwszy wyizolowana z organizmów owadów. W późniejszych latach ujawniono ich obecność u roślin, ostatnio również w owocach *E. maritimum* [Dinan i wsp. 2001]. Ilościowo więcej poznano związków pochodzenia roślinnego, których wykryto 250 przy tylko 100 zwierzęcych.

Te metabolity wtórne wytwarzane przez roślinę w celu obrony przed owadami, powodują zaburzenia hormonalne, których efektem może być utrata płodności, przedwczesne starzenie się lub śmierć tych organizmów [Dinan i wsp. 2001].

Na podstawie szeregu badań wskazuje się, że ekdysteroidy mogą znaleźć liczne zastosowania w medycynie: chronią nerki i wątrobę, stymulują pracę układu odpornościowego, działają anabolicznie, a także stymulują metabolizm cukrów i tłuszczu, mogą wykazywać efekt antyarytmiczny i działać jako przeciwutleniacze [Báthori, Pongrácz 2005; Nowak i wsp. 2012]. Istnieją doniesienia o ich wpływie na różnicowanie się keratynocytów *in vitro*, co może warunkować ich działanie wspomagające gojenie się ran [Detmar i wsp. 1994]. Obecnie pomimo braku odpowiednich badań dotyczących bezpieczeństwa stosowania, ekdysteroidy dodawane są do kosmetyków oraz suplementów diety mogących zwiększyć przyrost masy mięśniowej [Lafont, Dinan 2003].

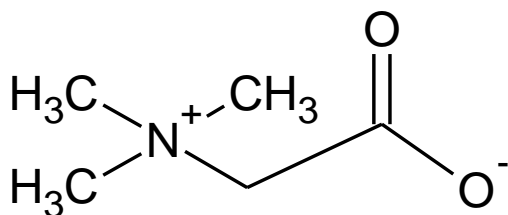


Ryc. 15 Struktury chemiczne wybranych ekdysteroidów **A** 20-hidroksyekdyson **B** polipodyna B

2.4.6. Betainy

Najczęściej spotykane betainy to związki amoniowe i fosfoniowe, zawierające azot lub fosfor jako atomy kationowe. Nazwa całej grupy związków pochodzi od betainy.

Betaina (N,N,N-trimetyloglicyna) [Ryc. 16], pochodna aminokwasu glicyny, to organiczny związek chemiczny o wzorze $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CO}_2^-$ po raz pierwszy wykryty w burakach cukrowych. Związek ten zawiera w sobie grupy o przeciwnych ładunkach (ujemnych i dodatnich) [Blunden i wsp. 2005].



Ryc. 16 Struktura chemiczna N,N,N- trimetyloglicyny

Betainy i ich trzeciorzędowe sulfonowe analogi pełnią w organizmach rolę adaptacyjną. Dzięki amfoterycznemu charakterowi chronią komórki przed silnymi wahaniami ciśnienia osmotycznego w zasolonym środowisku.

Betaina stosowana jest w leczeniu wysokiego poziomu homocysteiny. Badania ostatnich lat wykazały, że podwyższone stężenie homocysteiny we krwi jest szkodliwe m.in. dla naczyń krwionośnych i prowadzi do rozwoju zmian miażdżycowych [Holm i wsp. 2005]. Chlorowodorek betainy znalazł zastosowanie jako środek wspomagający trawienie, szczególnie skuteczny u osób z niedostatecznym wytwarzaniem kwasu solnego w żołądku. Ponadto betaina stosowana jest jako związek wspomagający w reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) [Rees i wsp. 1993].

Betainy zostały wyodrębnione z pędów halofitów *E. maritimum* [Adrian-Romero i wsp. 1998].

3. Właściwości, działanie lecznicze i zastosowanie surowców *Eryngium* L.

Gatunki z rodzaju *Eryngium* od dawna wykorzystywane są w medycynie tradycyjnej. W Europie najczęściej stosuje się surowce z *E. amethystinum* L., *E. campestre* L., *E. creticum* Lam., *E. foetidum* L., *E. maritimum* L. i *E. planum* L.. Podstawowymi surowcami leczniczymi są ziele (Eryngii herba) i korzeń (Eryngii radix). Mikołajki stosowane bywają jako środki przeciwzapalne, przeciwbólowe, przeciwastmatyczne, diuretyczne, przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciw pasożytnicze, hipotensyjne, żółciopędne i żółciotwórcze, przeciwgorączkowe, a nawet jako środki poprawiające potencję i płodność. W niektórych rejonach świata mikołajki traktowane są jako rośliny przyprawowe [PDR 2000; Duke 2002; Thiem, Wiatrowska 2007; Dinda i wsp. 2010; Wang i wsp. 2012].

W licznych publikacjach udowodniono działanie przeciwbakteryjne mikołajków: *E. maritimum* L., *E. caucaseum* Trautv., *E. bungei* Boiss., *E. palmatum* Pancic & Vis., *E. foetidum* L., *E. thurifolium* Boiss., *E. campestre* L., *E. creticum* Lam., *E. duriaei* J. Gay ex Boiss. Wyniki badań aktywności przeciwbakteryjnej wykazały, że ekstrakty z liści i korzeni *E. maritimum* hamują wzrost bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* i *Staphylococcus aureus* [Meot-Duros i wsp. 2008; Hołderna-Kędzia, Kędzia 2010; Kholkhal i wsp. 2012]. Natomiast etanolowe ekstrakty z *E. caucaseum* i *E. bungei* wykazują umiarkowaną aktywność hamującą wzrost *S. aureus* i *Streptococcus pyogenes* [Alipour, Khanmohammadi 2011]. Pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej przebadano także metanolowe ekstrakty z części nadziemnych i korzeni *E. palmatum*, które charakteryzuje znacząca aktywność hamująca rozwój *S. aureus* i *P. aeruginosa* [Marcetic i wsp. 2014]. Ekstrakt metanolowy z *E. foetidum* wykazuje słabe właściwości bójcze w stosunku do *Helicobacter* [Paul i wsp. 2011]. Badano również aktywność przeciwbakteryjną olejków roślin z rodzaju *Eryngium*. Wyniki eksperymentów sugerują, że olejek z *E. thurifolium* wykazuje wyższą aktywność przeciw bakteriom niż olejki z *E. campestre* i *E. creticum*, porównywalną nawet do antybiotyku wankomycyny w stosunku do *S. aureus* [Celik i wsp. 2011]. Lotne składniki ekstraktu z *E. duriaei* hamują wzrost dermatofitów *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Epidermophyton floccosum*, *T. verrucosum*, *Microsporium canis* i *M. gypseum* [Cavaleiro i wsp. 2011].

Pod kątem aktywności przeciwgrzybiczych badano *E. maritimum*, *E. palmatum* i *E. durami*. Niepolarna frakcja z korzeni *E. maritimum*, metanolowy ekstrakt z części nadziemnych i korzeni *E. palmatum* oraz lotne składniki ekstraktu z *E. durami* wykazują w różnym stopniu aktywność przeciwgrzybiczą w stosunku do drożdżaka *Candida albicans* [Meot-Duros i wsp. 2008; Cavaleiro i wsp. 2011; Marcetic i wsp. 2014]. Ponadto badano ekstrakty metanolowe i z eteru naftowego *E. creticum* przeciwko grzybom: *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium oxysporum* sp. *Melonis* i *Verticilium dalia*. Ekstrakty metanolowe w mniejszym stopniu hamowały rozwój spor wszystkich sześciu grzybów [Abou-Jawdah i wsp. 2002].

Właściwości przeciwpierwotniakowe: antymalaryczne przeciwko *Plasmodium falciparum* i przeciwko *Leishmania donovani* stwierdzono u mikołajków występujących na Krecie: *E. ternatum* Poir. i *E. amorginum* Rech. f. [Fokialakis i wsp. 2007]. Ostatnie badania wskazują, że etanolowe ekstrakty z *E. foetidum* posiadają aktywność w stosunku do *Plasmodium falciparum*, natomiast wodne w stosunku do *P. gallinaceum* [Paul i wsp. 2011]. Autorzy donoszą o silnym działaniu przeciworobaczym substancji pozyskiwanych z *E. foetidum* wobec larw *Strongyloides streccoralis* [Paul i wsp. 2011].

Dla wielu ekstraktów i związków wyizolowanych z mikołajków opisano zdolność zmiatania wolnych rodników i właściwości przeciwutleniające. W badaniach *E. alpinum*, *E. caucasicum*, *E. maritimum*, *E. campestre*, *E. creticum* potwierdzono te właściwości. Badania Le Claire i współpracowników wyjaśniły, iż za zmiatanie wolnych rodników przez ekstrakty z korzeni *E. alpinum* odpowiadają kwas rozmarynowy, glikozyd kwas rozmarynowego i kwas chlorogenowy [Le Claire i wsp. 2005]. Dla *E. caucasicum* zaobserwowano, iż ekstrakty etanolowe z części nadziemnych w okresie nie obejmującym kwitnienia wykazują silniejsze właściwości przeciwutleniające niż ekstrakty z liści i kwiatostanów [Ebrahimzadeh i wsp. 2009]. Ekstrakty z *E. maritimum* posiadają słabe właściwości antyoksydacyjne, co prawdopodobnie wiąże się niską zawartością polifenoli w surowcach [Meot-Duros i wsp. 2008]. W badaniach *in vitro* etanolowe ekstrakty z korzeni *E. campestre* wykazują silniejszą aktywność zmiatania wolnych rodników w porównaniu z ekstraktami z części nadziemnych rośliny [Nebija

i wsp. 2009]. Z kolei inne badania wykazały iż metanolowe ekstrakty z części nadziemnych *E. campestre* i flawonoidy posiadają spektrum działania antyoksydacyjnego od umiarkowanego do silnego [El-Kassem i wsp. 2013]. Farhan i współpracownicy dokonali analizy fitochemicznej i badali aktywność antyoksydacyjną *E. creticum*. Z badań wynika, iż liście posiadają bogatszy profil metabolitów i wyższą zawartość związków niż łodygi, podobnie zawierają wyższe stężenie witaminy C i zawartość sumy polifenoli, dlatego też właściwości przeciwutleniające dla tego gatunku różniły się w zależności od testowanego surowca [Farhan i wsp. 2012].

W ostatnich latach w piśmiennictwie zaczęły pojawiać się publikacje świadczące o właściwościach cytotoksycznych różnych gatunków mikołajków. Aktywność cytotoksyczna *in vitro* zbadana została dla: *E. planum*, *E. maritimum*, *E. kotschyi*, *E. creticum*, *E. campestre* oraz *E. yuccifolium*. Zauważono, że ekstrakt etanolowy z owoców *E. planum* wpływa na obniżenie żywotności komórek nowotworowych ludzkiej białaczki oraz indukuje apoptozę [Bogucka-Kocka i wsp. 2008a]. Aktywność liofilizowanych wodnych ekstraktów części nadziemnych i korzeni *E. maritimum* i *E. kotschyi* badana na różnych liniach komórek nowotworowych wahała się w szerokich granicach. Najwyższą aktywność cytotoksyczną w stosunku do linii Heg2 wykazywały ekstrakty korzeniowe obu gatunków mikołajków [Yurdakok, Baydan 2013]. Metanolowe ekstrakty z liści i łodyg *E. creticum* hamują proliferację komórek gruczolakoraka piersi [Hassan i wsp. 2013]. Szereg prac opisuje badania właściwości cytotoksycznych wyizolowanych z mikołajków saponin triterpenowych. Umiarkowaną aktywność cytotoksyczną w stosunku do komórek nowotworu jelita grubego HCT116 i HT29 wykazują saponiny wyizolowane z *E. campestre* [Kartal i wsp. 2006]. Podobnie, saponiny z *E. yuccifolium* wykazują umiarkowaną aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych nowotworu płuc A549 i białaczki HL60 [Wang i wsp. 2010].

Wyniki badań etanolowych wyciągów *E. creticum* sugerują, że czynnikiem odpowiedzialnym za anty-mutagenne działanie są saponiny triterpenowe. Co ważne, wyciąg nie stymulował nekrozy czy apoptozy, więc ma szansę odegrać rolę w prewencji nowotworów [Khader i wsp. 2010].

Ekstrakty z części nadziemnych i korzeni gatunków z rodzaju *Eryngium* stosowane są w medycynie tradycyjnej na całym świecie w leczeniu chorób z podłożem zapalnym.

Pod kątem działania przeciwzapalnego badaniom przesiewowym poddano 121 roślin charakterystycznych dla strefy śródziemnomorskiej. *E. campestre* zmniejszał poziom tlenu azotu i TNF-alfa w mysich komórkach śródbłonna monocyticznego pochodzenia oraz obniżał poziom mRNA aktywowany LPS lub iNOS [Strzelecka i wsp. 2005]. Badaniom na aktywność przeciwzapalną na modelu zwierzęcym poddano także ekstrakty etanolowe siedmiu gatunków tureckich mikołajków. Wyniki wskazywały na dużą rolę ekstraktów z nadziemnych i podziemnych części *E. maritimum* i *E. kotschyi* bez szkody dla żołądka myszy [Küpeli i wsp. 2006]. Mieszanina saponin wyizolowanych z *E. planum* zapobiegała stanom zapalnym indukowanym u myszy gdy była wstrzykiwana, a nie podawana doustnie [Jacker, Hiller 1976]. Wywar z liści *E. foetidum* wykazywał istotne działanie przeciwzapalne – hamował obrzęk łapy szczura wywołany drażnieniem karageniną [Saenz i wsp. 1997].

Na obszarach wiejskich Jordanii *E. creticum* stosowany był jako lekarstwo na ukąszenia skorpionów i węży. Wodne ekstrakty ze świeżych i suszonych korzeni całkowicie hamowały aktywność hemolityczną jadu węży i skorpionów. Natomiast etanolowe ekstrakty z liści i korzeni wpływały silniej na hemolizę czerwonych krwinek niż inaktywację jadów [Alkofahi i wsp. 1997].

Substancje pozyskane z *E. foetidum* weszły w skład preparatu wybielającego skórę stosowanego przy poparzeniach słonecznych, piegach, plamach wątrobowych i innych zaburzeniach pigmentacji naskórka [Paul i wsp. 2011].

Właściwości, działanie lecznicze i zastosowanie *E. planum* L.

Surowcami mikołajka płaskolistnego są ziele zbierane w czasie kwitnienia oraz korzeń pozyskany jesienią [Strzelecka, Kowalski 2000; Jędrzejko 2001]. Napary z surowców mikołajka wykorzystuje się w medycynie ludowej jako środek moczopędny, wykrztuśny, spazmolytyczny, a także stosowany jest jako afrodyzjak.

Udowodniono, że mikołajek płaskolistny dzięki zawartości saponin triterpenowych działa przeciwgrzybiczo i hamuje wzrost takich gatunków jak *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* i *Torulopsis glabrata* [Hiller, Friedrich 1974].

W innym eksperymencie prowadzonym na liniach komórkowych ludzkiej wątroby zbadano, że ekstrakt z mikołajka polnego przyczynia się do zmniejszenia istniejącego stanu zapalnego poprzez hamowanie aktywowanego przez cytokininę IL-1 czynnika NF- κ B [Stalińska i wsp. 2005].

Nowe doniesienia wskazują na potencjalne działanie przeciwnowotworowe tego gatunku. Bogucka-Kocka i współautorzy opublikowali pracę, w której opisali zdolność ekstraktu etanolowego z *E. planum* do indukcji apoptozy ludzkich komórek białaczki. Potwierdzenie tych cennych właściwości może przyczynić się do znacznego poszerzenia zastosowania tego gatunku w medycynie [Bogucka-Kocka i wsp. 2008a].

Właściwości, działanie lecznicze i zastosowanie *E. maritimum* L.

W medycynie tradycyjnej i ziołolecznictwie europejskim korzenie mikołajka nadmorskiego i ich przetwory są uznawane za środki moczopędne, napotne, wzmacniające, wykrztuśne, a nawet afrodyzjaki. Surowiec stosowano jako preparat ułatwiający odkrztuszanie w zaawansowanej gruźlicy. Pomagał prawdopodobnie w zapaleniu pęcherza i cewki moczowej, spowalniał formowanie kamieni nerkowych, także w przeroście lub zapaleniu prostaty. Okłady sporządzane ze sproszkowanego korzenia miały przyspieszać gojenie ran [www.pfaf.org].

W pracach naukowych udowodniono aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą mikołajka nadmorskiego w badaniach metodą krążków bibułowych. Frakcja niepolarna (chloroformowa) wyciągu *E. maritimum* najsilniej działała przeciw *Pseudomonas aeruginosa* i *P. fluorescens*. Autorzy zaobserwowali brak aktywności wobec *Escherichia coli*, *Pseudomonas marginalia*, *Listeria monocytogenes* [Meot-Duros i wsp. 2008]. Ekstrakty z korzeni *E. maritimum* wykazują zróżnicowaną aktywność przeciwgrzybiczą w stosunku do *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarium*, *Aspergillus fumigatus* i *A. flavus*. Najwyższą aktywnością charakteryzował się ekstrakt octanu metylowego w stosunku do *A. flavus*. Ekstrakty metanolowe, acetonowe, i butanolowe korzeni z tego gatunku przejawiają wysoką aktywność hamującą w stosunku do *C. herbarium* i *A. fumigatus*, natomiast nie działały na *A. alternata* i *A. flavus*. Wszystkie ekstrakty z korzeni *E. maritimum* wykazują najwyższą aktywność przeciwbakteryjną w stosunku do *Bacillus cereus* w porównaniu do innych szczepów:

Staphylococcus aureus, *Klebsiella pneumonia*, *L. monocytogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium* [Kholkhal i wsp. 2012].

Badania aktywności antyoksydacyjnej *E. maritimum* ukazują większą aktywność frakcji niepolarniej (chloroformowej) od polarnej (etanolowej). Według autorów mikołajek wykazuje silne działanie antyoksydacyjne w teście zdolności zmiatania wolnych rodników (ABTS) [Meot-Duros i wsp. 2008]. Z kolei w teście DPPH najwyższą zdolność zmiatania wolnych rodników posiadał ekstrakt butanolowy, którego aktywność jest nieznacznie niższa od kwasu askorbinowego [Kholkhal i wsp. 2012].

Udokumentowano także właściwości przeciwzapalne i przeciwbólowe mikołajka nadmorskiego w modelu zwierzęcym. Wodne i etanolowe ekstrakty z nadziemnych i podziemnych części mikołajka nadmorskiego (w stężeniu 200 mg na kg masy zwierzęcia i 0,5 mg na ucho) wykazały działanie przeciwzapalne i przeciwbólowe w doświadczeniu z wykorzystaniem szczurów, których tylne łapy drażniono karageniną lub uszy traktowano TPA (mirystynowy octan forbolu). Eksperyment wskazywał na konieczność przeprowadzenia dalszych badań w mających na celu wyodrębnienie czynnych składników o potencjalnym szerszym zastosowaniu [Küpeli i wsp. 2006].

Właściwości, działanie lecznicze i zastosowanie *E. campestre* L.

Właściwości lecznicze *E. campestre* znane są już od średniowiecza. W dokumentach z tamtego okresu można odnaleźć informacje na temat jego stosowania na rany, oparzenia, bóle, hemoroidy oraz zaburzenia seksualne. We współczesnej medycynie tradycyjnej wykorzystuje się zebrany jesienią i wysuszony w warunkach naturalnych korzeń mikołajka polnego (*Eryngii radix*) oraz zebrane wiosną ziele (*Eryngii herba*) [Küpeli i wsp. 2006]. Stosowany jest w postaci naparów, odwarów i nalewek, jako środek przeciwgorączkowy i napotny. Ze względu na gorzki smak pobudza trawienie oraz wykazuje działanie żółciotwórcze i żółciopędne. Ponadto *E. campestre* działa rozkurczająco na mięśnie gładkie, moczopędnie i wykrztuśnie. W medycynie ludowej znalazł zastosowanie w różnego typu schorzeniach układu moczowego, takich jak: kamica nerek i pęcherza moczowego, nerczyca, czy inne zaburzenia funkcji nerek. Wskazany w dysfunkcjach układu płciowego, przy braku miesiączki oraz przeroście

gruczołu krokowego. Stosowany także pomocniczo w przeziębieniu, gdyż redukuje gorączkę, kaszel i katar [Duke i wsp. 2002; Thiem, Wiatrowska 2007].

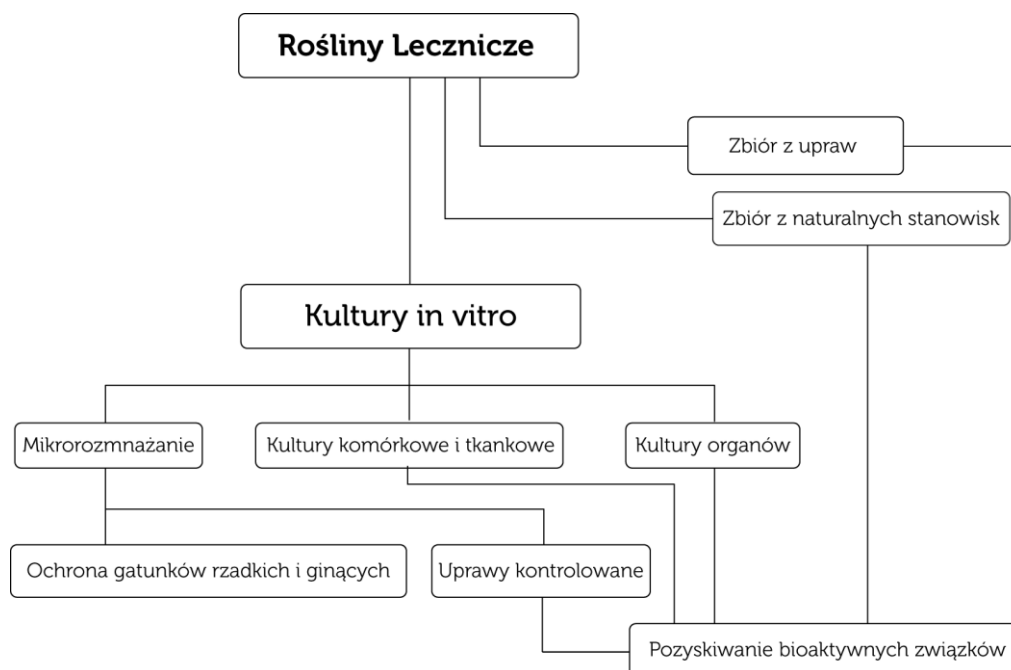
Do ważniejszych właściwości leczniczych gatunków z rodzaju *Eryngium* należy ich udokumentowane działanie przeciwzapalne. Stan zapalny leży u podłoża wielu schorzeń, takich jak: reumatoidalne zapalenie stawów, miażdżyca, zapalenia jelit różnego pochodzenia, czy stany alergiczne. Są to choroby coraz powszechniej występujące w starzejącej się populacji, w związku z tym coraz więcej uwagi poświęca się substancjom i surowcom o aktywności przeciwzapalnej. Działanie takie posiadają niektóre gatunki mikołajków. W badaniach z użyciem komórek śródbłonna naczyń włosowatych mózgu myszy, potwierdzono zdolność ekstraktu z *E. campestre* do hamowania aktywności cytokin ($\text{TNF}\alpha$ + $\text{IL-1}\beta$ lub $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\gamma$), które są bezpośrednimi mediatorami stanu zapalnego oraz pobudzają iNOS odpowiedzialną za syntezę tlenku azotu. W efekcie zmniejsza się stan zapalny wywołany przez cytokiny i ilość syntezowanego NO [Stalińska i wsp. 2005].

W ostatnich latach prowadzono badania właściwości przeciwutleniających *E. campestre*. Nebija i współpracownicy zanalizowali zawartość flawonoidów w ziele mikołajka polnego, aktywność hemolityczną korzenia oraz skład mineralny, zdolność do zmiatania wolnych rodników i aktywność antyoksydacyjną obu surowców. Zawartość flawonoidów w przeliczeniu na kwercetynę wynosiła 0,12-0,14%. Skład mineralny obu surowców różnił się znacząco – wyższą zawartość potasu odnotowano w ziele, natomiast korzeń akumulował dużo wyższe stężenia sodu i żelaza. W teście DPPH wyższą zdolność zmiatania wolnych rodników posiadał ekstrakt z korzeni niż ziele mikołajka polnego. Wysoka aktywność zmiatania wolnych rodników DPPH i OH nie korelowała z aktywnością antyoksydacyjną ekstraktów mierzoną systemem β -karoten/ kwas linolowy [Nebija i wsp. 2009]. W innych badaniach metanolowy ekstrakt z części nadziemnych *E. campestre* oraz izolowane flawonoidy badane były w kierunku potwierdzenia aktywności zmiatania wolnych rodników i przeciwutleniającej tego gatunku. Testami DPPH i RPA wykazano, iż ekstrakt i flawonoidy posiadają spektrum działania antyoksydacyjnego od umiarkowanego do silnego [El-Kassem i wsp. 2013].

4. Wybrane roślinne kultury *in vitro*

Kultury *in vitro* to aseptyczne hodowle protoplastów, komórek, tkanek lub organów na/w sztucznych pożywkach w ściśle kontrolowanych warunkach (temperatura, wilgotność, oświetlenie).

Roślinne kultury *in vitro* wykorzystywane są głównie do rozmnażania roślin, produkcji metabolitów wtórnych, otrzymywania roślin transgenicznych o wartościowych cechach użytkowych. Kultury komórkowe i tkankowe służą przede wszystkim celom naukowym np. badaniu szlaków biosyntezy, izolacji enzymów czy kwasów nukleinowych.



Ryc. 17 Pozyskiwanie metabolitów wtórnych z roślinnych kultur *in vitro* jako alternatywy do zbioru surowców z upraw i naturalnych stanowisk

Kultury *in vitro* roślin leczniczych mogą stanowić stałe źródło materiału roślinnego bogatego w metabolity wtórne [Ryc. 17], których produkcja w naturze zależna jest od zmieniających się warunków temperaturowych, oświetleniowych, czynników stresowych, infekcji lub roślinnych patogenów. Stosowanie komór wzrostowych o kontrolowanych parametrach wzrostu zmniejsza problem zależności produkcji bioaktywnych związków od zmiennych warunków klimatycznych spowodowanych porami roku i geograficzną specyfiką obszaru. Hodowle *in vitro* pozwalają uniknąć problemów związanych ze zbiorem, transportem i przechowywaniem materiału

roślinnego do ekstrakcji – jednolity materiał dostępny jest przez cały rok. Celem prowadzenia kultur *in vitro* jest zwiększenie potencjału ekstrakcji [Bhojwani, Razdan 1996; Mulabagal, Tsay 2004; Lucchesini, Mensuali-Sodi 2010].

4.1 Mikrorozmnażanie roślin leczniczych

Mikrorozmnażanie (rozmnażanie klonalne *in vitro*, mikropropagacja, rozmnażanie w warunkach *in vitro*) roślin stanowi alternatywną metodę otrzymywania mikrosadzonek wartościowych roślin. Technika ta ma na celu otrzymywanie dużej liczby jednorodnych, genetycznie wyrównanych roślin, w stosunkowo krótkim czasie. Rozmnażanie klonalne pozwala na uzyskanie gatunków rzadkich, chronionych oraz ginących, roślin pochodzących z innej strefy klimatycznej, również takich, które nie zawiązują nasion lub posiadają słabą siłę kiełkowania. Jednocześnie umożliwia otrzymywanie materiału roślinnego do badań fitochemicznych i biologicznych. Metoda ta jest stosowana w celu rozmnażania wielu gatunków roślin leczniczych, ich elitarnych okazów o dużej wartości jednostkowej. Dzięki rozmnażaniu *in vitro* można raz wyselekcjonowane rośliny utrzymywać przy życiu na wiele lat [Rout i wsp. 2000; George i wsp. 2008; Thiem i wsp. 2008].

Mikrorozmnażanie pozwala na długoterminowe przechowywanie cennych genotypów w kolekcji *in vitro* oraz zregenerowanego materiału roślinnego w niskich temperaturach i w postaci somatycznych nasion [Furmanowa 1992].

Etapy i metody mikrorozmnażania

W zależności od opracowania wyróżnia się zmienną liczbę etapów procesu mikropropagacji, jednakże można je sprowadzić do pięciu faz [Debergh, Maene 1981; Rout i wsp. 2000]:

Faza 0: Wybór rośliny donorowej, ocena jej zdrowotności, wykrywanie i eliminacja infekcji.

Faza 1: Izolacja eksplantatów, ich powierzchniowa dezynfekcja, stabilizacja kultury na wybranej pożywce i monitoring infekcji.

Faza 2: Powtarzane cyklicznie etapy wzrostu już istniejących i przybyszowych struktur eksplantatu, rozdzielanie powstających wielopędów i przenoszenie na świeżą pożywkę. Jest to etap namnażania materiału roślinnego.

Faza 3: Wydłużanie a następnie ukorzenianie pędów, ewentualne ponowne rozdzielanie wieloroślinek i biotyżacja.

Faza 4: Przeniesienie roślinek do doniczek, hartowanie, aklimatyzacja w szklarni i przeniesienie do gruntu.

Mikrorozmnażane roślin polega na pobudzaniu do rozwoju pąków szczytowych i bocznych, formowaniu pąków przybyszowych bezpośrednio lub pośrednio z kalusa lub poprzez embriogenezę somatyczną. Wskazany sposobem mikrorozmnażania roślin leczniczych jest pobudzanie do rozwoju pąków szczytowych i bocznych. Inicjalnymi eksplantatami mogą być merystemy pąków, wierzchołki pędów, pąki kątowe, a także fragmenty pędów z węzłem, parą liści i pąkiem bocznym. Za pomocą tej metody rozmnaża się rutynowo wiele gatunków roślin leczniczych a otrzymane sadzonki zachowują ten sam chemotyp. Natomiast proces organogenezy pędów przybyszowych jest wykorzystywany w namnażaniu roślin z trudem wytwarzających pąki boczne. Ponadto metoda indukcji pędów przybyszowych jest stosowana w rozmnażaniu roślin po transformacji genetycznej. Embriogeneza somatyczna znalazła zastosowanie w mikrorozmnażaniu ze względu na wysoki współczynnik rozmnażania i wysoką stabilność genetyczną otrzymanych roślin [Rout i wsp. 2000].

Bez względu na zastosowaną metodę mikrorozmnażania, w kulturach prowadzonych w warunkach *in vitro*, istnieje ryzyko wystąpienia tzw. zmienności somaklonalnej, która może prowadzić do zmian zawartości pożądaných związków i tym samym obniżyć wartość surowca leczniczego. W przypadku roślin leczniczych szczególnie ważne jest zachowanie genetycznej stabilności i otrzymanie jednorodnego materiału. Z tego powodu rośliny otrzymane poprzez mikrorozmnażanie powinny podlegać ocenie morfologicznej, fizjologicznej, cytogenetycznej, biochemicznej lub fitochemicznej [Thiem, Kikowska 2008].

Czynniki wpływające na proces mikrorozmnażania

Kondycja rośliny donorowej w znacznym stopniu wpływa na powodzenie prowadzonych kultur *in vitro*. Niezwykle ważnym czynnikiem jest podłoże genetyczne oraz przynależność taksonomiczna rośliny donorowej. Przy wyborze eksplantatu istotny jest wiek tkanek, lokalizacja w roślinie, wielkość czy termin izolacji.

Wpływ na proces mikrorozmnażania ma dobór pożywki, jej skład mineralny oraz wybór i wzajemna proporcja i stężenia regulatorów wzrostu i rozwoju. Cytokiny wpływają na morfogenezę hodowanego *in vitro* fragmentu pędu i rozwój merystemów bocznych poprzez znoszenie dominacji wierzchołkowej. Zastosowanie innych eksplantatów często indukuje powstawanie przybyszowych pędów. Przy niezbyt dużym stężeniu cytokinin następuje rozwój pojedynczych pędów, natomiast odpowiednie podniesienie stężenia stymuluje formowanie wieloroślinek [Rout i wsp. 2000].

4.2. Kultury organów normalnych (nietransformowanych)

Biosynteza i akumulacja wielu metabolitów wtórnych odbywa się tylko w kulturach zróżnicowanych, w określonych tkankach i organach. Kultury komórkowe posiadają często ograniczoną zdolność do biosyntezy niektórych metabolitów wtórnych. Niezróżnicowane komórki nie zawsze syntezują te same produkty, co rośliny, z których pochodzą, lub produkują jedynie związki pośrednie, nie przeprowadzając całkowitej, kompletnej biosyntezy. Przyczyną jest fakt, że biosynteza niektórych związków włączona jest w program specjalizacji, który nie może być uruchomiony w komórkach niewyspecjalizowanych. Jest to związane z izolacją komórek od naturalnej tkanki, w której normalnie rosną i w efekcie znacznym zmniejszeniem komunikacji międzykomórkowej odpowiedzialnej za procesy metaboliczne. Wiele szlaków biosyntezy metabolitów wtórnych jest tkankowo- i organospecyficzna. Ogólnie można powiedzieć, że prawdopodobieństwo wytwarzania metabolitu wtórnego w kulturze organu jest większe, gdy stopień organizacji organu zbliżony jest do stopnia jej organizacji w całej roślinie. Największy stopień organizacji wykazują kultury organów - korzeni i pędów. Ponadto kultury organów charakteryzują się większą stabilnością genetyczną niż kultury komórkowe. Kultury organów w płynnych pożywkach są dobrym systemem do zastosowania różnych zabiegów biotechnologicznych mających na celu podwyższenie akumulacji cennych metabolitów wtórnych w kulturach [Wysokińska, Chmiel 2006; Diettrich 2003].

4.2.1. **Kultury korzeniowe**

Częstym surowcem farmaceutycznym leków naturalnych jest korzeń roślin leczniczych. Rozwój metod *in vitro*, prowadzenie szybko wzrastających i nastawionych na zwiększoną produkcję kultur korzeni daje unikalną możliwość uniezależnienia od tradycyjnej, zwykle mniej wydajnej i ograniczonej uprawy gruntowej. W związku z tym kultury organów prowadzone w warunkach *in vitro* mogą stać się ważnym, alternatywnym źródłem substancji chemicznych, pozyskiwanych dotąd z bezpośredniej ekstrakcji z surowców roślinnych pochodzących z naturalnej uprawy [Wadegaonkar i wsp. 2006; Wysokińska, Chmiel 2006; Martin i wsp. 2008].

Indukcja korzeni normalnych w warunkach *in vitro*

Dzięki zastosowaniu optymalnego składu pożywki oraz zachowaniu odpowiednich warunków *in vitro* możliwe jest pobudzenie wytwarzania *de novo* korzeni przybyszowych z dowolnych eksplantatów. W zależności od wybranej metody, formowanie nowych korzeni może odbywać się na drodze bezpośredniej - poprzez rozwój korzeni siewki i ukorzenianie pędów wytworzonych w procesie mikrorozmnażania, lub pośrednio poprzez indukcję z kalusa w procesie organogenezy pośredniej. Eksplantatami wykorzystywanymi do założenia tego typu hodowli są odcinki korzeni głównych i bocznych siewek i roślin zawierające stożek wzrostu. Obejmują one zazwyczaj fragment z czapeczką i merystemem wierzchołkowym, niekiedy także strefę różnicowania się korzenia. Najczęściej w kulturach obserwuje się morfogenezę bezpośrednią - pobrany wierzchołek korzenia po przełożeniu na pożywkę z auksynami kontynuuje wzrost korzenia głównego i formuje korzenie boczne.

Początkowo kultury korzeniowe nastawione są na rozwój, umieszczone w płynnej pożywce fragmenty korzeni intensywnie się rozwijają, dochodzi do największego przyrostu biomasy i formowania korzonków bocznych. Produkcja metabolitów wtórnych na tym etapie jest znacznie zredukowana, gdyż kultura wykorzystuje większość dostępnych składników odżywczych głównie na intensywne powiększenie biomasy. Po osiągnięciu optymalnego stopnia rozwoju kultury korzeniowe znacznie zwiększają produktywność.

Czynniki wpływające na wzrost biomasy i produkcję metabolitów wtórnych w kulturach korzeniowych

Po etapie wzrostowym, kultury korzeniowe rozpoczynają zwiększoną biosyntezę metabolitów wtórnych [Baiza i wsp. 1998]. Pod tym względem najcenniejsze są kultury charakteryzujące się dużą liczbą korzonków bocznych, o znacznym potencjale produkcyjnym. Istotne jest opracowanie odpowiedniego protokołu szybko rosnących kultur, co znacznie zwiększa wydajność prowadzonej hodowli i jej skalę dzięki zastosowaniu bioreaktorów [Ekiert 2009].

Czynniki wpływającymi na wzrost i produktywność kultur korzeniowych są: wybór najbardziej produktywnej linii oraz eksplantatu o dużym współczynniku indukcji korzeni bocznych, selekcja i optymalizacja składu pożywki, warunki prowadzenia hodowli (np. światło/ciemność) oraz zabiegi biotechnologiczne (np. elicytacja) [Rout i wsp. 2000; Georgiev i wsp. 2007; Matkowski 2008].

W procesie formowania korzeni w warunkach *in vitro* główną rolę odgrywają auksyny. W okresie inicjacji, wysokie stężenie auksyny może sprzyjać formowaniu większej liczby zawiązków korzeniowych. Do najczęściej stosowanych auksyn należą IAA, IBA, NAA, rzadziej 2,4-D. Ich wybór zależy od wielu czynników, jak: gatunek rośliny, warunki hodowli czy stężenie innych substancji w pożywce [Orlikowska 1997].

W kulturach roślinnych, jako źródło węgla i energii stosuje się cukry, głównie sacharozę. Związki te wpływają na ciśnienie osmotyczne oraz odgrywają zasadniczą rolę w regulacji metabolizmu komórek roślinnych. Udowodniono, że stężenie cukru w pożywce wpływa na rozwój korzeni i produkcję niektórych substancji czynnych [MacGregor i wsp. 2008]. Korzystne efekty daje prowadzenie kultury dwu- lub wielo-stopniowej, gdzie stężenie cukru jest stopniowo zwiększane. W pierwszym etapie stężenie jest niskie, dochodzi do intensywnego przyrostu biomasy, formowania i rozwoju korzeni bocznych, których powstawanie byłoby stłumione przy dużych stężeniach sacharozy. W kolejnych etapach zwiększa się stężenie cukru, co sprzyja dalszemu rozwojowi wytworzonych już korzeni bocznych i znacznie zwiększa wydajność produkcji metabolitów wtórnych [Kusakari 2000].

Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach korzeniowych

W piśmiennictwie spotykane są prace świadczące o możliwościach otrzymywania wybranych metabolitów wtórnych z kultur korzeniowych szeregu gatunków roślin leczniczych. Przykłady wysokoproduktywnych kultur korzeniowych podano w tabeli 2.

Tab. 2 Przykłady wysokoproduktywnych korzeniowych kultur *in vitro*

Gatunek	Metabolity	Wydajność produkcji	Pożywka	
			+ Fitohormony [mg l ⁻¹]	Sacharoza [g l ⁻¹]
<i>Bupleurum falcatum</i>	saikosaponiny	większa niż w k. gruntowych >2,5% s.m.	B ₅ + 8,0 IBA + 40 S	Kusakari i wsp. 2000
<i>Decalepis hamiltonii</i>	2-hydroksy-4- metoksy- benzaldehyd	2,7 x większa od k. gruntowych	MS + 1,0 NAA + 30 S	Giridhar i wsp. 2005
<i>Echinacea purpurea</i>	kwas kawowy	3 x większa od k. gruntowych	½MS + 2,0 IBA + 50 S	Wu i wsp. 2007
<i>Panax ginseng</i>	ginsenozydy	ponad 7 x większa niż w kalusie	¾ MS + 5,0 IBA + 40 S	Huang i wsp. 2010
<i>Primula veris</i>	saponiny	ponad 8 x większa niż w kalusie i kulturze zawieszinowej	Andersona + 10,0 2,4-D + 1,0 Kin	Okršlar i wsp. 2007
<i>Raphanus sativus</i>	antocyjany	większa niż w k. gruntowych 0,15 vs 0,11% s.m.	½MS + 0,5 IBA	Betsui i wsp. 2004
<i>Salvia fruticosa</i>	kwas rozmarynowy	ponad 3,5x większa niż k. gruntowe	B ₅ + 0,5 NAA + 40 S	Karam i wsp. 2003
<i>Saussurea involucrata</i>	fenylo- propanoidy	ponad 6x większa niż k. gruntowe	½ MS + 0,5 IAA + 30 S	Fu i wsp. 2006
<i>Withania somniafera</i>	witanolid	ponad 30% większa niż k. gruntowe	½ MS + 0,5 IAA + 2,0 IBA	Wadegaonkar i wsp. 2006
<i>Withania somniafera</i>	witanolid A	21x większa niż w roślinie donorowej	½ MS + 0,5 IBA + 30 S	Praveen, Murthy 2010

B₅ – pożywka Gamborga; MS-pożywka Murashige i Skooga; 2,4-D - kwas dwuchlorofenoksyoctowy ; IAA – kwas indolo-3-octowy; IBA – kwas indolo-3-masłowy; NAA – kwas naftylo-1-octowy; Kin – kinetyna, S – sacharoza

Korzenie powstałe w wyniku transformacji szczepem bakterii glebowej *Agrobacterium rhizogenes* posiadają zdolność do syntezy metabolitów naturalnie występujących w korzeniach, a ich produkcja w biomacie może być nawet wielokrotnie wyższa i bardziej wydajna niż w innych kulturach lub w korzeniach roślin z tradycyjnej uprawy gruntowej. Ponadto korzenie transformowane niektórych gatunków posiadają zdolność do syntezy związków aktywnych, które nie występują w roślinie donorowej [Olszowska 2000; Guillon i wsp. 2006].

Gatunki roślin różnią się wrażliwością na zakażenia szczepami *A. rhizogenes*. Nie wszystkie taksony charakteryzują się jednakową odpowiedzią na tzw. agroinfekcję.

Kultury korzeni transformowanych różnią się od korzeni gruntowych oraz od kultur korzeni normalnych prowadzonych w warunkach *in vitro*. Kultury korzeni włósnikowatych charakteryzuje szybsze tempo wzrostu na pożywkach bez auksyn, silny rozrost korzeni bocznych, brak przyrostu wtórnego i geotropizmu. Dodatkową cechą wyróżniającą korzenie włósnikowate jest stabilność genetyczna i długotrwała wydajność utrzymująca się na stałym poziomie. Daje to przewagę nad innymi kulturami *in vitro*, jak kultury kalusa czy kultury komórkowe, w których może zachodzić zmienność somaklonalna, co może rzutować obniżeniem wytwarzania cennych metabolitów wtórnych [Olszowska 2000; Guillon i wsp. 2006; Chandra, Chandra 2011].

4.2.2. Kultury pędowe

Najważniejszym czynnikiem przemawiającym na korzyść kultur pędowych jest organospecyficzność, czyli produkcja metabolitów tylko w wyspecjalizowanych tkankach rośliny i brak możliwości uzyskania ich w pojedynczych, niezróżnicowanych komórkach. Ma to związek z faktem, że komórki niezróżnicowane nie tworzą tkanek i nie zachodzi komunikacja międzykomórkowa, odpowiedzialna za procesy metaboliczne. Najbardziej znanym przykładem jest produkcja hyperycyny i hyperforyny w gatunku *Hypericum perforatum* L. tylko w wyspecjalizowanej tkance liści, a akumulacja w zbiornikach olejkowych [Karuppusamy 2009]. Niektóre rośliny wytwarzają pożądane metabolity wtórne tylko w częściach nadziemnych, przy ich całkowitym braku w korzeniach czy niezróżnicowanych kulturach komórkowych. Do takich gatunków należy *Artemisia annua* L., w której biosynteza artemizyny zachodzi jedynie w pędach [Zhao, Liu 2007].

Założenie i hodowla kultur pędowych

Pędy do założenia kultury pędowej można uzyskać poprzez proces morfogenezy bezpośredniej – tzw. kulturę pąków bocznych (pachwinowych). W tym przypadku eksplantatem pierwotnym jest wierzchołkowa część pędu z pąkami kątowymi (bocznymi), która przeważnie zawiera merystem apikalny, zawiązki liści i merystemy boczne znajdujące się w kątach liści. Liczba merystemów w roślinie jest niewielka, więc wydajność procesu jest ograniczona. Zwykle w takiej kulturze, z jednego eksplantatu może rozwinąć się od 3 do 20 pędów [Bach, Pawłowska 2009].

Czynniki wpływające na wzrost biomasy i produkcję metabolitów wtórnych w pędach

Wyłożenie eksplantatu do pożywki bez regulatorów wzrostu i rozwoju skutkuje aktywnością endogennej auksyny wytwarzanej w wierzchołkach wzrostu i pąki boczne nie krzewią się lecz rozwijają w pojedynczą roślinę z merystemu apikalnego. Stąd też ważna jest obecność w pożywce cytokininy, która hamuje działanie auksyny i umożliwia rozwój pąków kątowych, co wpływa na powstawanie nowych pędów.

Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach pędowych

W piśmiennictwie spotykane są prace świadczące o możliwościach otrzymywania wybranych metabolitów wtórnych z kultur pędowych szeregu gatunków roślin leczniczych. Przykłady wysokoproduktywnych kultur pędowych podano w tabeli 3.

Tab. 3 Przykłady produkcji metabolitów wtórnych w kulturach pędów *in vitro* [wg Karuppusamy 2009]

Gatunek	Metabolity	Pożywka
<i>Adhatoda vasica</i>	wazyna	MS+BAP+IAA
<i>Centella asiatica</i>	azatiakozyd	MS+BAP+IAA
<i>Corydalis cava</i>	kordialina	MS+BAP+GA ₃
<i>Cymbopogon citratus</i>	olejek eteryczny	MS+IAA+GA ₃
<i>Drosera rotundifolia</i>	7-metylojuglon	MS+NAA+BAP
<i>Hemidesmus indicus</i>	lupeol, rutyna	MS+NAA+BAP
<i>Mentha arvensis</i>	terpenoidy	MS+BAP+NAA
<i>Ophiorrhiza rugosa</i>	kamptotecyna	MS+BAP+Kin
<i>Podophyllum hexandrum</i>	podofilotaksyna	MS+BAP+GA ₃
<i>Primula veris</i>	saponiny	MS+BAP+GA ₃
<i>Withania somnifera</i>	witaferyna A	MS+BAP

MS-pożywka Murashige i Skooga, IAA – kwas indolo-3-octowy, IBA – kwas indolo-3-masłowy, NAA – kwas naftylo-1-octowy Kin – kinetyna, BAP – 6-benzyloaminopuryna, GA₃ – kwas gibberelowy

4.3. Kultury komórkowe

Kalus to niezróżnicowana morfologicznie i histologicznie masa komórek o charakterze parenchymatycznym, zdolna do ciągłych podziałów. W zależności od gatunku rośliny, rodzaju eksplantatu i składu pożywki indukcyjnej może wykazywać odmienne cechy morfologiczne. Kalus może mieć zwartą lub luźną strukturę, jednolitą bądź grudkowatą, różną barwę, może być suchy lub wilgotny, a jego struktura gładka lub nierówna.

W kulturach *in vitro* można zainicjować proliferację kalusa morfogenego lub niemorfogenego. Pod wpływem pewnych regulatorów wzrostu i rozwoju roślin powstaje kalus morfogeny, w którym formują się zawiązki organów przybyszowych jednobiegunowych (pędy lub korzenie) lub dwubiegunowych (zawiązki zarodków somatycznych). Kalusy niemorfogenne nie posiadają zdolności do tworzenia nowych organów, zwiększają jedynie swoją masę poprzez proliferację komórek. Kompetencja lub jej brak nie jest cechą stałą kalusa i w dużej mierze zależy od pochodzenia i budowy eksplantatu, czasu trwania kultury, składu pożywki a w szczególności od rodzaju i stężenia regulatorów wzrostu i rozwoju roślin.

Kultury kalusa są wykorzystywane głównie do regeneracji roślin drogą morfogenezy przybyszowej oraz stanowią materiał wyjściowy do uzyskania kultury zawiesiny komórkowej [Mulabagal, Tsay 2004].

Prawidłowa, ustabilizowana zawiesina komórkowa to populacja pojedynczych komórek lub niewielkich agregatów komórkowych intensywnie rosnąca w rytmicznie wytrząsanej pożywce płynnej, charakteryzująca się powtarzalnymi parametrami wzrostu. Do inicjacji kultur zawiesinowych stosuje się najczęściej luźny, sypki, niezróżnicowany i podatny na rozbitcie kalus. W praktyce kultury zawiesinowe stosuje się do uzyskiwania i namnażania komórek embriogennych oraz organogennych a następnie do regeneracji z nich roślin oraz do wytwarzania na dużą skalę metabolitów wtórnych [Mulabagal, Tsay 2004].

Kultury komórkowe *in vitro* udało się uzyskać z wielu gatunków roślin, ale często nie produkują one istotnych ilości wartościowych metabolitów wtórnych bądź nie wytwarzają związków charakterystycznych dla roślin naturalnych. Skuteczną metodą podniesienia syntetyzowanych produkcji w wielu systemach roślinnych jest elicytacja [Mulabagal, Tsay 2004].

1. Zabiegi biotechnologiczne stosowane w celu zwiększania akumulacji metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro*

Jedną z zalet roślinnych kultur *in vitro* jest możliwość wpływania na zwiększanie akumulacji metabolitów wtórnych w biomacie roślinnej. Do zabiegów biotechnologicznych stosowanych w celu zwiększenia wydajności biosyntezy tych związków zalicza się: dodatek prekursorów biosyntetycznych do pożywki, agregację komórek, immobilizację komórek, skierowanie gromadzenia substancji do określonych przedziałów komórkowych czy zmianę parametrów kultury. W odpowiedzi na różne czynniki środowiskowe, które odbiegają od optymalnych warunków życiowych roślin, organizmy te rozpoczynają syntezę *de novo* lub zwiększają produkcję związków obronnych np. metabolitów wtórnych (antrachinony, benzoksazyny, kumaryny, furanokumaryny, furanoacetyleny, furanoseskwiterpeny, seskwiterpeny, izoflawony, pięciocykliczne triterpeny i poliacetyleny). Ze względu na fakt, że szlaki metabolizmu wtórnego wielu związków są aktywowane przez czynniki stresowe, w kulturach *in vitro* stosuje się zabiegi biotechnologiczne np. elicytory lub czynniki sygnałne, nazywane także elicytorami endogennymi. Elicytory to substancje będące fizycznymi lub chemicznymi czynnikami wyzwalającymi odpowiedź obronną komórek. Poprzez zastosowanie zabiegów biotechnologicznych, komórki rozpoczynają lub zwiększają produkcję metabolitów wtórnych, a także mogą być stymulowane do uwalniania wytworzonych substancji do pożywki [Goyal i wsp. 2012; Sharma, Shahzad 2013].

Ze względu na pochodzenie elicytory dzieli się na :

- biotyczne endogenne - produkowane w roślinach i uczestniczące w przekazywaniu sygnałów w organach roślinnych (kwas jasmonowy i jego pochodne, kwas salicylowy)
- biotyczne egzogenne - wytwarzane przez grzyby, bakterie
- abiotyczne
 - chemiczne np. sole metali ciężkich, jony wapnia, kadmu, miedzi, fluorek sodu, cyjanek potasu, detergenty, antybiotyki, peptydy syntetyczne oraz jady pszczoł i węży
 - fizyczne np. mechaniczne uszkodzenie, promieniowanie UV czy stres osmotyczny

[Szpitter, Królicka 2005; Goyal i wsp. 2012; Sharma, Shahzad 2013]

Wpływ jasmonianu metylu (MeJa) na podwyższenie akumulacji metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro*

Najczęściej stosowanym elicytorem w kulturach organów roślin leczniczych jest pochodna kwasu jasmonowego - jasmonian metylu.

Kwas jasmonowy i jego pochodne zalicza się do endogennych regulatorów wzrostu i rozwoju roślin - w tkankach roślinnych występują w niewielkich ilościach, są syntetyzowane pod wpływem czynników takich jak stres osmotyczny lub susza. Rola jasmonianów w procesie elicytacji polega na przekazywaniu sygnału do indukowania transkrypcji genów związanych z produkcją metabolitów wtórnych [Białecka, Kępczyński 1998; Zhang, Memelink 2009].

W piśmiennictwie istnieje wiele przykładów różnych kultur *in vitro* roślin leczniczych elicytowanych jasmonianami, zwykle w stężeniach od 50 do 200 μM przez okres 12 – 72 godz. Produkcja glicyryzyny - saponiny triterpenowej typu oleananu - w korzeniach *Glycyrrhiza gabra* L., pod wpływem elicytacji jasmonianem metylu (0,1-2 mM) roślin hodowanych w kulturach *in vitro*, wzrosła 3,8-krotnie [Shabani i wsp. 2009]. Natomiast zawartość glicyryzyny w kulturach korzeni transformowanych *Glycyrrhiza inflata* Bat. wzrastała w zależności od stężenia MeJa i czasu trwania elicytacji - najwyższa akumulacja tej saponiny (100 μM , 5 dni) była 5,7-krotnie wyższa niż w korzeniach kontrolnych [Wongwicha i wsp. 2011]. Elicytacja MeJa (50 mM) przez 48 godz. korzeni transformowanych *Plumbago indica* L. podwyższyła 5-krotnie akumulację plumbaginy - naftochinonu o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym [Martin i wsp. 2011]. Traktowanie kultur pędowych *Bacopa monnieri* (L.) Pennell MeJa (50 μM) przez 7 dni, skutkowało podwyższeniem zawartości bakozydu A - saponiny triterpenowej - 1,8-krotnie [Sharma i wsp. 2013]. Elicytacja MeJa (10 μM) kultur pędowych *Mitragyna speciosa* (Roxb.) Korth. przez 24 godz. wpływała na podwyższenie mitragyniny - alkaloidu indolowego, której zawartość w elicytowanych pędach wynosiła 0,11 mg g⁻¹ [Wungsintaweekul i wsp. 2012]. Jasmonian metylu (50 μM) aplikowany do kultur roślinnych *Drosera burmanii* Vahl. przez 6 dni podwyższył stężenie naftochinonu plumbaginy 3-krotnie w porównaniu z kontrolą [Putalun i wsp. 2010]. Z kolei 0,1 mM MeJa stymulował 1,53-krotnie wyższą produkcję azjatykozydu w kulturach *in vitro* roślin *Centella asiatica* (L.) Urban [Kim i wsp. 2004].

Wpływ sacharozy (S) na podwyższenie akumulacji metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro*

W szeregu pracach zaobserwowano, że zmiana ciśnienia osmotycznego pożywki generująca warunki stresu wpływa na podwyższenie syntezy niektórych metabolitów wtórnych. W tym celu stosuje się przeważnie cukry lub alkohole polihydroksylowe. Najczęściej stosowanym cukrem w kulturach organów roślin leczniczych jest sacharoza w stężeniu wyższym od standardowego, czyli od 40 do 90 mg g⁻¹.

Najwyższą produkcję kwasu rozmarynowego w kulturach korzeni *Salvia fruticosa* Mill., uzyskano gdy stężenie sacharozy w pożywce zostało podniesione do 40 mg g⁻¹ [Karam i wsp. 2003]. W kulturach korzeniowych *Periploca sepium* Bunge otrzymano najwyższą akumulację peryplocyny (101,56 µg g⁻¹) w obecności 50 mg g⁻¹ sacharozy [Zhang i wsp. 2012]. Najwyższa zawartość glicyryzyny (76,07 µg g⁻¹) w kulturach korzeni transformowanych *G. inflata*, 2,19-krotnie wyższa niż w kulturach kontrolnych, uzyskana została poprzez suplementowanie pożywki 60 mg g⁻¹ sacharozy [Wongwicha i wsp. 2011]. Innym przykładem zwiększania akumulacji metabolitu wtórnego są w kultury pędowe *C. asiatica*, gdzie wzrost stężenia sacharozy do 50 i 70 mg g⁻¹ skutkowało 1,64 i 1,18-krotnie podwyższoną akumulacją azjatykozydu (odpowiednio 7,2 mg g⁻¹ i 5,2 mg g⁻¹) [Prasad i wsp. 2011]. W kulturze pędowej *Narcissus confusus* Pugsley sacharoza w stężeniu 90 mg g⁻¹ powodowała wydzielanie do pożywki podwyższonych ilości galantaminy [Sellés i wsp. 1997].

Wpływ ekstraktu drożdżowego (YE) na podwyższenie akumulacji metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro*

Elicytory grzybowe to homogenaty lub filtry z kultur różnych gatunków grzybów, będących patogenami roślin. Ich wpływ na komórki roślinne może być różny, w większości przypadków stymulują uwalnianie metabolitów do pożywki. Aktywność elicytorowa ekstraktu drożdżowego z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* została wykazana dla wielu kultur roślinnych. Stwierdzono, że substancją odpowiedzialną za tę aktywność jest obecny w ścianie komórek drożdży beta-(1->3,1->6)glukan. Sugerowany jest także udział frakcji oligoglukanowej ściany drożdży oraz mieszaniny glikoprotein z komórek drożdży. Przypuszcza się też, że obecne w ich komórkach jony cynku, wapnia i kobaltu działają jako elicytory abiotyczne.

Sześciodniowa elicytacja kultur korzeniowych *D. burmanii* ekstraktem drożdżowym w stężeniu $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ wpłynęła na 3,5-krotne podwyższenie stężenie plumbaginy w korzeniach rosiczki [Putalun i wsp. 2010]. Ekstrakt drożdżowy w stężeniach $0,5 \text{ g l}^{-1}$ i $1,0 \text{ g l}^{-1}$ wpływał na podwyższenie stężenia hioscyjminy 1,28 i 1,05-krotnie oraz 1,6 i 1,28-krotnie skopolaminy w kulturach korzeniowych *Hyoscyamus niger* L. [Hong i wsp. 2012]. W kulturach korzeniowych *Scutellaria lateriflora* L. YE o stężeniu $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ podwyższył zawartość akteozydu 1,4-krotnie (7dni) i produkcję flawonów 1,7-krotnie (14 dni) [Wilczyńska-Barska i wsp. 2012]. Natomiast w kulturach *in vitro* całych roślin *Centella asiatica* (L.) Urban YE 1,41-krotnie podwyższał akumulację azjakozydu [Kim i wsp. 2004]. Zawartość glicyryzyny w kulturach korzeni transformowanych *Glycyrrhiza inflata* wzrosła 1,4-krotnie pod wpływem 7-dniowej elicytacji YE ($1,0 \text{ mg ml}^{-1}$) [Wongwicha i wsp. 2011].

Na skuteczność procesu elicytacji, oprócz rodzaju elicytora, wpływ mają także inne czynniki, jak gatunek rośliny, wybrana linia komórkowa, rodzaj kultury, stężenie elicytora i czas elicytacji.

W zależności od poziomu organizacji komórkowej (zawiesina komórek, kalus, kultura organów lub całych roślin) kultury różnią się odpowiedzią na czynniki stresowe, zawartość hormonów wzrostu i produkcją metabolitów wtórnych. Ponadto stan fizjologiczny komórek podlega zmianom na różnych etapach hodowli i z tego względu kultury wykazują odmienną aktywność obronną w różnych fazach wzrostu. Z reguły im wyższe stężenie elicytora, tym silniejsza odpowiedź komórkowa. Jednak produkowane metabolity po przekroczeniu pewnych stężeń mogą być toksyczne dla komórek, które je wytwarzają. Na odpowiedź komórkową w wyniku elicytacji ma wpływ stres biotyczny, o którego poziomie decyduje czas działania elicytora na komórki. Jeśli okres elicytacji będzie zbyt długi może nastąpić śmierć komórek [Szpitter, Królicka 2005; Goyal i wsp. 2012; Sharma, Shahzad 2013].

SKRÓTY STOSOWANE W PRACY

$\frac{1}{2}$ **MS** - Pożywka Murashige i Skooga (1962) ze zredukowanymi o połowę stężeniami soli mineralnych

$\frac{1}{2}$ **wit.** – Zredukowane o połowę stężenia witamin w pożywce MS

2,4-D – Kwas dwuchlorofenoksyoctowy

A – roztwór ACE

BAP – 6-benzyloaminopuryna

BAW – Faza ruchoma: butanol: kwas octowy: woda

BAX – Gen (*BCL2-Associated X*)

BCL2L10 – Gen (*BCL2-Like 10*)

BID – Gen (*BH₃ Interacting Domain Death Agonist*)

B₅ - Pożywka Gamborga (1968)

C – Roztwór Clorox

CASP 3 – Gen (Kaspaza 3)

CASP 9 – Gen (Kaspaza 9)

CGA – Kwas chlorogenowy

D - Roztwór Domestos

DPPH – 1,1-difenylo-2-pikrylhydrazyl

M1 - 3-*O*-β-D-glukopiranozylo-(1→2)-β-D-glukouronopiranozylo-22-*O*-angeloilo-R1-barygenol

M2A - 3-*O*-β-D-glukopiranozylo-(1→2)-β-D-glukouronopiranozylo-21-*O*-acetylo-22-*O*-angeloilo-R1-barygenol

M2B - 3-*O*-β-D-glukopiranozylo-(1→2)-β-D-glukouronopiranozylo-22-*O*-angeloilo-A1-barygenol

ES4, ES5, ES6 - saponiny triterpenowe pochodne barygenolu z korzenia *E. planum*

GA₃ – Kwas gibberelowy

HPLC - Wysokosprawna chromatografia cieczowa (*High performance liquid chromatography*)

HRK – Gen (*Harakiri*)

IAA – Kwas indolo-3-octowy

IBA – Kwas indolo-3-masłowy

Kin – Kinetyna

LDH – Dehydrogenaza mleczanowa

MeJa – Jasmonian metylu

MBC – Najmniejsze stężenie działające bakteriobójczo

MFC – Najmniejsze stężenie działające grzybobójcze

MIC – Najmniejsze stężenie hamujące

MS – Pożywka Murashige i Skoog (1962)

NAA – Kwas naftylo-1-octowy

OAW – Faza ruchoma: octan etylu: kwas octowy: woda

OFAW – Faza ruchoma: octan etylu: kwas mrówkowy: kwas octowy: woda

PMAIP1 – Gen (*Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein; NOXA*)

RA – Kwas rozmarynowy

RWRR – Regulatory wzrostu i rozwoju roślin

S – Sacharoza

SA – Siarczan adeniny

SKOV-3 – Komórki ludzkiego raka jajnika

SD – Odchylenie standardowe

SE – Błąd standardowy

SRB – Sulfurodamina B

STR - Stratyfikacja

TDZ – Tidiazuron

TLC - Chromatografia cienkowarstwowa (*Thin layer chromatography*)

TNF2 – Gen (*Tumor Necrosis Factor*)

TP 53 – Gen (*Tumor Protein 53*)

TNFRSF10A- Gen (*Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10A*)

TNFRSF10B - Gen (*Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B*)

TRAF7 – Gen (*TNF Receptor-Associated Factor 7*)

UPLC - Ultrasprawa chromatografia cieczowa (*Ultra performance liquid chromatography*)

YE – Ekstrakt drożdżowy

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Materiał i metody badawcze stosowane w kulturach *in vitro*

1.1. Materiał badawczy

Kultury *in vitro* *E. planum* i *E. campestre* będące przedmiotem niniejszej pracy zapoczątkowane zostały na nowo w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin w 2009 r., z nasion wyizolowanych z owoców zebranych w Ogrodzie Botanicznym Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. W pracy korzystano ze wstępnych wyników badań realizowanych w katedrze (2006-2008 r.) w zakresie wprowadzania do kultur *in vitro* wyżej wymienionych gatunków.

E. maritimum, będący również przedmiotem rozprawy, został wprowadzony do kultur *in vitro* w 2009 r. z eksplantatu młodej rośliny gruntowej pochodzącej ze sztucznej wydmy Ogrodu Botanicznego UAM w Poznaniu.

Owoce, liście rozetkowe oraz korzenie *E. planum* zebrane zostały ze stanowiska naturalnego w miejscowości Łukaszewo, woj. Kujawsko-Pomorskie. Natomiast owocujące okazy *E. campestre* zebrano z murawowych zbiorowisk roślinności kserotermicznej Rezerwatu Pamięcin w Owczarach, woj. Lubuskie. Liście rozetkowe oraz korzenie *E. maritimum* pobrano z Ogrodu Botanicznego UAM za zgodą Regionalnego Dyrektora Ochrony Środowiska w Poznaniu. Decyzja ta zezwala także na zbiór i przechowywanie owoców mikołajka nadmorskiego oraz bezterminowe utrzymywanie zregenerowanych *in vitro* roślin oraz kultur *in vitro* w celu prowadzenia badań naukowych.

Przynależność systematyczna gatunków potwierdzona została przez prof. dr hab. Janinę Borysiak.

1.2. Pożywki i roztwory

W prowadzonych doświadczeniach stosowano dwie podstawowe pożywki: Murashige-Skooga (MS) [1962] oraz Gamborga (B₅) [1968] [Tab. 4, Tab. 5].

Tab. 4 Podstawowy skład pożywki Murashige-Skooga [1962]

Makroskładniki [mg l ⁻¹]		Mikroskładniki [mg l ⁻¹]		Inne składniki [mg l ⁻¹]	
KNO ₃	1900	H ₃ BO ₃	6,2	mezoinozytol	100
KH ₂ PO ₄	170	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	glicyna	2
NH ₄ NO ₃	1650	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	chlorowodorek tiaminy	0,1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,3	chlorowodorek pirydoksyny	0,5
CaCl ₂ ·H ₂ O	440	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	kwasy nikotynowy	0,5
		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,25	sacharoza	30 000
		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6		
		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25		
		KJ	0,83		

Tab. 5 Podstawowy skład pożywki Gamborga [1968]

Makroskładniki [mg l ⁻¹]		Mikroskładniki [mg l ⁻¹]		Inne składniki [mg l ⁻¹]	
KNO ₃	2500	H ₃ BO ₃	3	mezoinozytol	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	MnSO ₄ ·H ₂ O	10	chlorowodorek tiaminy	10
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	150	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	chlorowodorek pirydoksyny	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	250	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,3	kwasy nikotynowy	1
CaCl ₂ ·H ₂ O	150	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	sacharoza	20000
		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,25		
		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2		
		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25		
		KJ	0,75		

Rodzaj i stężenia fitohormonów w poszczególnych doświadczeniach dobierano analizując dane literaturowe oraz wcześniejsze wyniki badań prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin.

W zależności od rodzaju kultury stosowano pożywki płynne lub zestalone agarem, suplementowane regulatorami wzrostu i rozwoju roślin (Sigma-Aldrich) [Tab.7-12].

Odczyn pH doprowadzano do wartości 5,8 za pomocą 0,1 mol l⁻¹ roztworów HCl i NaOH. W pożywkach stałych używano agaru (Merck) uzyskując stężenie 7,2 g l⁻¹.

Podłoża rozlewano do naczyń szklanych (kolby Erlenmayera o pojemności 200cm³, 250cm³, probówki) i wyjaławiano w autoklawie z zachowaniem odpowiednich parametrów procesu autoklawowania (temperatura 121 ± 1°C, ciśnienie 0,2 MPa i czas 20 minut).

W celu przełamania fazy spoczynku nasion stosowano pożywkę MS z dodatkiem kwasu giberelowego (GA₃) zestaloną agarem [Tab. 6].

Tab. 6 Wariant pożywki stosowanej do indukcji sterylnych siewek

Gatunek	Pożywka	RWRR	Stężenie [mg l ⁻¹]
<i>E. planum</i>			
<i>E. maritimum</i>	MS	GA ₃	1,0
<i>E. campestre</i>			

RWRR – Regulatory wzrostu i rozwoju roślin; MS – pożywka Murashige-Skooga; GA₃ – kwas giberelowy

Wierzchołki pędów 30-dniowych siewek wykładano na pożywkę aby zaindukować proces rozwoju pąków bocznych i ich proliferację. W celu namnożenia pędów stosowano agarową pożywkę MS, ½ MS (stężenia soli mineralnych zredukowane o połowę) i ½ MS + ½ wit. (stężenia soli mineralnych i witamin zredukowane o połowę) suplementowaną BAP oraz IAA w różnych stężeniach, w zależności od biologii badanego gatunku [Tab. 7].

Tab. 7 Warianty pożywek stosowanych do namnażania pędów

Gatunek	Pożywka	RWRR	Stężenie [mg l ⁻¹]
<i>E. planum</i>	MS	BAP	0,0; 1,0; 1,5; 2,0
		IAA	0,0; 0,1; 1,0
<i>E. maritimum</i>	½ MS + ½ wit.	BAP	0,0; 1,0
		IAA	0,0; 0,1; 1,0
	½ MS	BAP	0,0; 1,0
		IAA	0,0; 0,1; 1,0
<i>E. campestre</i>	½ MS + ½ wit.	BAP	0,0; 1,0
		IAA	0,0; 0,1
	½ MS	BAP	0,0; 1,0
		IAA	0,0; 0,1
MS	BAP	0,0; 1,0	
	IAA	0,0; 0,1; 1,0	

RWRR – Regulatory wzrostu i rozwoju roślin; MS – pożywka Murashige-Skooga; BAP – 6-benzyloaminopuryna; IAA – kwas indolo-3-octowy

Do ukorzenia pędów stosowano agarową pożywkę MS i ½ MS (ze zredukowanymi o połowę stężeniami soli mineralnych), zawierające 15, 30 (wartość standardowa) lub 50 g l⁻¹ sacharozy, suplementowane auksynami w różnych stężeniach [Tab. 8].

Tab. 8 Warianty pożywek stosowanych do ukorzenia pędów

Gatunek	Pożywka	RWRR	Stężenie [mg l ⁻¹]
<i>E. planum</i>	½ MS	-	-
		-	-
	MS	IAA	0,1; 0,5
		IBA, NAA	0,1
<i>E. maritimum</i>	½ MS z 15 g l ⁻¹ S	-	-
		IAA, IBA, NAA	0,1
	½ MS	-	0,1
		IAA, IBA, NAA	0,1
	MS	-	-
		IAA, IBA, NAA	0,1
MS z 50 g l ⁻¹ S	-	-	
	IAA, IBA, NAA	0,1	
<i>E. campestre</i>	MS	-	-
		IAA, IBA, NAA	1,0

RWRR – Regulatory wzrostu i rozwoju roślin; MS – pożywka Murashige-Skooga; IAA – kwas indolo-3-octowy; IBA – kwas indolo-3-masłowy; NAA – kwas naftylo-1-octowy; S – sacharoza; - brak suplementacji RWRR

W celu inicjacji ryzogenezы przybyszowej pośredniej z ogonków liściowych stosowano pożywkę stałą MS z 2,4-D, BAP, TDZ, NAA w różnych stężeniach [Tab. 9].

Tab. 9 Warianty pożywek stosowanych do indukcji ryzogenezы pośredniej z ogonków liściowych

Gatunek	Pożywka	RWRR	Stężenie [mg l ⁻¹]
<i>E. planum</i>	MS	2,4-D	3,0
		BAP	1,0
		NAA	1,0
	MS	TDZ	2,0
		NAA	0,2

RWRR – Regulatory wzrostu i rozwoju roślin; MS – pożywka Murashige-Skooga; 2,4-D - kwas dwuchlorofenoksyoctowy; BAP – 6-benzylaminopuryna; NAA – kwas naftylo-1-octowy; TDZ - tidiazuron

Kultury *in vitro* korzeni prowadzono w pożywkach płynnych MS, ½ MS (ze zredukowanymi o połowę stężeniami soli mineralnych) oraz B₅ suplementowanych 30 mg l⁻¹ (wartość standardowa) lub 60 mg l⁻¹ sacharozy oraz różnymi stężeniami auksyn i bez fitohormonów (kontrola) oraz [Tab. 10].

Tab. 10 Warianty pożywek stosowanych do pobudzenia wzrostu i rozwoju korzeni w kulturze *in vitro*

Gatunek	Pożywka	RWRR	Stężenie [mg l ⁻¹]
<i>E. planum</i>	MS	-	
		IAA, IBA, NAA	0,1; 1,0; 2,0
	MS z 60 g l ⁻¹ S	-	
		IAA, IBA, NAA	0,1; 1,0; 2,0
	B ₅	-	
		IAA, IBA, NAA	0,1; 1,0
<i>E. maritimum</i>	MS	-	
		IAA, IBA, NAA	0,1; 1,0; 2,0
	MS z 60 g l ⁻¹ S	-	
		IAA, IBA, NAA	2,0
	½ MS z 60 g l ⁻¹ S	-	
		IAA, IBA, NAA	2,0
B ₅	-		
B ₅	-		
	IAA, IBA, NAA	1,0	
<i>E. campestre</i>	MS	-	
		IAA, IBA, NAA	1,0; 2,0
	MS z 60 g l ⁻¹ S	-	
		IAA, IBA, NAA	2,0
	½ MS z 60 g l ⁻¹ S	-	
		IAA, IBA, NAA	2,0

RWRR – Regulatory wzrostu i rozwoju roślin; MS – pożywka Murashige-Skooga; B₅ – pożywka Gamborga; IAA – kwas indolo-3-octowy; IBA – kwas indolo-3-masłowy; NAA – kwas naftylo-1-octowy; S – sacharoza; - brak suplementacji PGR (kontrola)

Kultury *in vitro* pędów prowadzono w płynnej pożywce MS [Tab. 11].

Tab. 11 Wariant pożywki stosowanej dla kultur pędowych

Gatunek	Pożywka	RWRR	Stężenie [mg l ⁻¹]
<i>E. planum</i>			
<i>E. maritimum</i>	MS	BAP	1,0
<i>E. campestre</i>		IAA	0,1

RWRR – Regulatory wzrostu i rozwoju roślin; MS – pożywka Murashige-Skooga; BAP – 6-benzylaminopuryna; IAA – kwas indolo-3-octowy

W celu indukcji kalusa z eksplantatów 30-dniowych siewek i namnożenia biomasy kalusowej do analiz fitochemicznych i mikrobiologicznych oraz założenia kultury komórkowej z ustabilizowanej kultury kalusa (22 pasaż), stosowano pożywkę stałą MS suplementowaną w 2,4-D i BAP [Tab. 12].

Tab.12 Wariant pożywki stosowanej do indukcji i proliferacji kalusa z eksplantatów siewek

Gatunek	Pożywka	RWRR	Stężenie [mg l ⁻¹]
<i>E. planum</i>	MS	2,4-D	1,0
		BAP	1,0

RWRR – Regulatory wzrostu i rozwoju roślin; MS – pożywka Murashige-Skooga; 2,4-D - kwas dwuchlorofenoksyoctowy ; BAP – 6-benzylaminopuryna;

Do założenia i ustabilizowania kultury komórkowej, z wcześniej namnożonego kalusa, przeznaczonej do analiz fitochemicznych i mikrobiologicznych zastosowano pożywkę płynną MS dodatkiem 2,4-D [Tab. 13].

Tab. 13 Wariant pożywki stosowany dla kultury komórkowej

Gatunek	Pożywka	RWRR	Stężenie [mg l ⁻¹]
<i>E. planum</i>	MS	2,4-D	0,5

RWRR – Regulatory wzrostu i rozwoju roślin; MS – pożywka Murashige-Skooga; 2,4-D - kwas dwuchlorofenoksyoctowy

1.3. Zabiegi biotechnologiczne stosowane w kulturach *in vitro*

W roślinnych kulturach *in vitro* możliwe jest podwyższanie zawartości wybranych metabolitów wtórnych. W tym celu wybrane kultury badanych gatunków poddano zabiegom elicytacji jasmonianem metylu, ekstraktem drożdżowym oraz zastosowano zwiększone stężenie sacharozy [Tab. 14].

Tab. 14 Zabiegi biotechnologiczne stosowane w kulturach *in vitro* badanych gatunków *Eryngium*

Gatunek	Rodzaj kultury	Zabieg biotechnologiczny	Stężenie elicytora	Czas ekspozycji
<i>E. planum</i>	Komórkowa	MeJa	100µM	24, 48 godz.
		Pędowa	MeJa	100µM
	Korzeniowa	YE	1 g l ⁻¹	24, 48, 72, 96 godz.
		S	50 g l ⁻¹	10, 20, 30 dni
<i>E. campestre</i>	Pędowa	MeJa	100µM	24, 48 godz.
		YE	1 g l ⁻¹	24, 48, 72, 96 godz.
		S	50 g l ⁻¹	10, 20 dni
<i>E. maritimum</i>	Pędowa	MeJa	100µM	12, 24, 48 godz.
		YE	1 g l ⁻¹	24, 48, 72, 96 godz.
		S	50 g l ⁻¹	10, 20 dni

MeJa – jasmonian metylu; YE – ekstrakt drożdżowy; S – sacharoza

Sporządzenie roztworu jasmonianu metylu

Jasmonian metylu (C₁₃H₂₀O₃, 95%, Aldrich, m.cz.: 224,3 g/M) posłużył do przygotowania roztworu podstawowego. Do kolby miarowej o pojemności 100 ml odważono 2,243 g MeJA (224,3g/M·0,01M = 2,243g; 0,01M to zawartość MeJA w 100 ml roztworu) i uzupełniono do 100 ml alkoholem etylowym. Następnie tak przygotowany roztwór przesączono, przy użyciu sterylnych sączków membranowych (0,2 µm; Sartorius) w celu uwolnienia od mikroorganizmów. Do pożywki dodawano odpowiednią ilość roztworu, uzyskując końcowe stężenie 100 µM.

Sporządzanie ekstraktu drożdżowego

W celu uzyskania w pożywce stężenia ekstraktu drożdżowego 1,0 g l⁻¹ do kolby miarowej 50 ml dodano 1 g sproszkowanego ekstraktu drożdżowego (Becton, Dickinson and Company) i uzupełniono wodą do 50ml. Uzyskany roztwór przesączono w warunkach pełnej aseptyki przez sączek membranowy o średnicy porów 0,2 mm

w celu wyjałowienia. Do 20 ml pożywki dodawano za pomocą pipety automatycznej 1 ml roztworu YE.

1.4. Warunki sterylizacji i pracy w warunkach aseptycznych

Szkło laboratoryjne i narzędzia poddawano procesowi sterylizacji w autoklawie o temperaturze $121 \pm 1^\circ\text{C}$ i ciśnieniu 0,2 MPa przez 20 minut. Szklane szalki Petriego wyjaławiano suchym, gorącym powietrzem przez 180 minut w temperaturze 160°C . Wszystkie czynności wymagające jałowych warunków otoczenia wykonywano w kabinie z laminarnym przepływem powietrza, wyposażonej w lampy UV ($\lambda = 254$ nm) i dwa filtry HEPA. Przed rozpoczęciem pracy, kabinę przygotowywano poprzez włączenie nawiewu, przetrarcie powierzchni stołu 80° etanolem, ułożenie potrzebnego sprzętu oraz włączenie lamp UV. Po upływie 15 minut wstawiano do kabiny naczynia z materiałem roślinnym i ponownie włączano lampy UV na 2-5 min.

1.5. Warunki prowadzenia kultur *in vitro*

Kultury *in vitro* prowadzono w pokoju hodowlanym, w ściśle określonych, kontrolowanych warunkach: temperatura $22 \pm 1^\circ\text{C}$, wilgotność względna 60 – 70%, oświetlenie lampami jarzeniowymi typu Flora o natężeniu $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, 16-godzinny fotoperiod lub ciemność. Kultury w płynnych pożywkach umieszczano na platformach wytrząsarki rotacyjnej o obrotach 110 na minutę.

1.6. Metody badawcze

1.6.1. Indukcja sterylnych siewek

Hodowlę sterylnych siewek podjęto w celu uzyskania materiału niezbędnego do zapoczątkowania kultur *in vitro*.

W pierwszym etapie doświadczenia owoce mikołajków przemywano pod bieżącą wodą z detergentem a następnie trzykrotnie płukano autoklawowaną wodą destylowaną. Następnie zanurzano je na 30 sekund w 70% (v/v) EtOH i w roztworze jednego z komercyjnych środków wybielających Ace/Clorox/Domestos (<5% podchloryn sodu) w różnych stężeniach (5-30%) na określony czas (10-30 min) z dodatkiem dwóch kropel Tween 80 obniżającego napięcie powierzchniowe. Zdezynfekowane w ten sposób owoce przenoszono w roztworze podchlorynu sodu do warunków jałowych, w których przeprowadzano dalsze czynności. Owoce przepłukane kilkakrotnie wodą destylowaną autoklawowaną umieszczano w pożywkach stałych wzbogaconych w $1,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ GA}_3$. Kwas giberelowy dodano w celu przerwania spoczynku nasion. Probówki z nasionami umieszczano w pokoju hodowlanym w warunkach ciemności i pozostawiano do momentu kiełkowania, a następnie przenoszono do warunków fotoperiodu.

Ze względu na bardzo duży procent zakażeń owoców, przy niewielkiej efektywności kiełkowania, w drugim etapie doświadczenia, zmieniono sposób dezynfekcji – podwyższano stężenia Ace/Clorox/Domestos i wydłużano czas ekspozycji na ich działanie. Kolejnymi zabiegami mającymi na celu podwyższenie wydajności procesu kiełkowania była stratyfikacja owoców oraz ponowna dezynfekcja powierzchniowa wyizolowanych nasion. Owoce umieszczano w mieszaninie piasku, ziemi i perlitu w stosunku 1:1:1 i przechowywano w temperaturze 15°C przez trzy tygodnie, a następne dwa tygodnie w temperaturze 4°C . Po miesiącu owoce wyjmowano z podłoża, przemywano pod bieżącą wodą z detergentem i oczyszczano poprzez trzykrotne płukanie autoklawowaną wodą destylowaną. Następnie zanurzano na 30 sekund w 70% (v/v) EtOH i w roztworze komercyjnego środka Ace/ Clorox/ Domestos (<5% podchloryn sodu) w różnych stężeniach (%) na określony czas (min) [Tab. 18] z dodatkiem niewielkiej ilości Tween. Zdezynfekowane owoce przenoszono w roztworze podchlorynu sodu do warunków jałowych. Owoce przemyte wodą

destylowaną autoklawowaną pozbawiano owocni. Czynności wykonywano pod binokulem przy pomocy igielki preparacyjnej i skalpela. Wyizolowane nasiona dezynfekowano w taki sam sposób jak owoce stosując zmienne stężenia środka dezynfekującego [Tab. 18], po czym przepłukiwano kilkakrotnie wodą destylowaną autoklawowaną i umieszczano w pożywkach stałych wzbogaconych w $1,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ GA}_3$. Probówki z nasionami umieszczano w pokoju hodowlanym i pozostawiano do momentu kiełkowania w warunkach ciemności.

Niewielkie fragmenty pędów z pąkami wierzchołkowymi i bocznymi *E. maritimum* pobierano z 2-3 miesięcznych roślin z kolekcji Ogrodu Botanicznego UAM. Eksplantaty inicjalne przemywano pod bieżącą wodą z detergentem i oczyszczano poprzez trzykrotne płukanie autoklawowaną wodą destylowaną. Następnie zanurzano na 30 sekund w 70% (v/v) EtOH i w roztworze Clorox w stężeniu 30% (v/v) z dodatkiem niewielkiej ilości Tween na czas 8 min. Zdezynfekowane fragmenty roślin przenoszono w roztworze podchlorynu sodu do warunków jałowych. Następnie eksplantaty przepłukiwano kilkakrotnie wodą destylowaną autoklawowaną i umieszczano na pożywkach stałych MS w pokoju hodowlanym w warunkach fotoperiodu.

1.6.2. Namnażanie pędów i optymalizacja warunków kultur pędowych

Wierzchołki wzrostu pędów (0,8-1 cm) pochodzące z 30 dniowych siewek wykorzystywano do indukcji kultur pędowych *E. planum* i *E. campestre*. Eksplantaty umieszczano w 250 cm^3 kolbach Erlenmayera, zawierających 50 cm^3 pożywki MS suplementowanej BAP i IAA. Po namnożeniu pędów wielopędy dzielono na pojedyncze pędy lub w przypadku małych kultur na niewielkie rozetki pędowe i przenoszono na świeże pożywki co 5-6 tygodni. W celu poprawienia kondycji fizjologicznej pędów *E. campestre* do pożywki dodawano siarczan adeniny (100 mg l^{-1}).

Po 8 pasażach obliczano procent eksplantatów generujących odpowiedź, określano liczbę pędów powstających z pojedynczego eksplantatu oraz liczbę liści przypadających na pęd. Uzyskane wyniki ujednolicono względem zastosowanej opcji pożywki i przedstawiono w formie wartości uśrednionych, dla których wyznaczono błąd standardowy (SE). Część pędów mnożono poprzez pobudzanie do rozwoju pąków bocznych w szeregu cyklach, aż do momentu uzyskania wystarczającej ilości materiału

do analiz fitochemicznych. Z kolei część pędów przeznaczono do doświadczeń mających na celu ukorzenie *in vitro* i przeniesienie do warunków *ex vitro* całych roślin.

1.6.3. Ocena cytogenetyczna¹

W celu przeprowadzenia oceny wierności genetycznej zregenerowanych w kulturach *in vitro* pędów mikołajków wykonano analizy cytogenetyczne metodą cytometrii przepływowej według Galbraith'a i wsp. [1983]. Zbadano zawartość 2C DNA w komórkach liści pędów z kultur *in vitro* (z ostatniego pasażu 12 miesięcznej kultury) i porównano z zawartością 2C DNA liści siewek pochodzących nasion. Do badania wybrano liście z młodych, świeżych siewek i 10 klonów z każdego gatunku. Do oznaczenia zawartości jądrowego DNA, jako wewnętrzny standard użyto komórki z liści *Petunia hybryda* i *Solanum lycopersicum*. Materiał roślinny do analiz przygotowano rozdrabniając tkanki z 1ml buforu wzbogaconego 1% PVP-10, z dodatkiem jodku propidyny ($50\mu\text{l ml}^{-1}$) i rybonukleazy ($50\mu\text{l ml}^{-1}$). Każdorazowo analizowano około 10 000 jąder przy użyciu cytometru przepływowego Partec CCA, wyposażonego w lampę HBO i argonowy laser. Analizy wykonano w 10 powtórzeniach. Uzyskane wyniki przedstawiono w formie wartości uśrednionych, dla których wyznaczono błąd standardowy (SE). Uzyskane histogramy analizowano przy zastosowaniu programu DPAC v. 2.2.

1.6.4. Ukorzianie pędów

Otrzymane w procesie namnażania wielopędy *E. planum*, *E. campestre* i *E. maritimum* po uzyskaniu właściwego stopnia rozwoju i osiągające długość 1,5-3 cm rozdzielano na pojedyncze pędy i przenoszono na pożywki MS, $\frac{1}{2}$ MS lub $\frac{1}{2}$ MS + $\frac{1}{2}$ wit. z auksyną IAA, IBA lub NAA i różnym stężeniem sacharozy. Pędy hodowano w 250 cm³ kolbkach Erlenmeyera zawierających 50 cm³ pożywki lub probówkach zawierających 10 cm³. Po 6 tygodniach kultury (3 powtórzenia po 10 analiz na każdą opcję pożywki) szacowano procent ukorzenionych pędów, liczbę i długość korzeni oraz oceniano ich cechy morfologiczne. Uzyskane wyniki ujednolicono względem zastosowanej opcji

¹ Ocenę cytogenetyczną wykonano w Zakładzie Biologii Molekularnej i Cytometrii Katedry Genetyki, Fizjologii i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy pod kierunkiem prof. dr hab. Elwiry Śliwińskiej

pożywki i przedstawiono w formie wartości uśrednionych, dla których wyznaczono błąd standardowy (SE).

1.6.5. **Hartowanie roślin**

Rośliny po wyjęciu z probówek i dokładnym oczyszczeniu z pozostałości pożywki agarowej przenoszono do doniczki wypełnionej sterylną mieszanką ziemi ogrodowej, piasku i perlitu w proporcji 1:1:1 dla *E. planum*, 1:2:1 dla *E. campestre* i 1:3:1 dla *E. maritimum*. Przesadzone rośliny przykrywano szklanymi naczyniami dla utrzymania wysokiej wilgotności. Po około 2 tygodniach odkrywano rośliny, zaczynając od kilku minut i stopniowo ten okres wydłużano. Docelowo zahartowane rośliny trafiały do uprawy gruntowej na polatka doświadczalne Katedry i Zakładu Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin oraz Katedry i Zakładu Naturalnych Surowców Leczniczych i Kosmetycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

1.6.6. **Zapoczątkowanie i optymalizacja warunków kultur korzeniowych**

Do założenia kultur korzeni w płynnych pożywkach wykorzystano fragmenty korzeni siewek, namnożonych pędów lub uzyskanych w procesie ryzogenezy pośredniej, z kalusa pochodzącego z ogonków liściowych. Pobierano odcinki korzeni głównych (2 cm) zawierające stożek wzrostu i hodowano w płynnych pożywkach suplementowanych auksynami i sacharozą w różnym stężeniu.

Kultury korzeniowe umieszczono w pokoju hodowlanym na wytrząsarce rotacyjnej (110 rpm) w warunkach fotoperiodu. Dokonywano obserwacji morfologicznej i pomiaru masy, a w równym odstępstwie czasowym pasażowano do świeżej pożywki o identycznym składzie.

Celem doświadczenia było zbadanie, który z wariantów zastosowanych pożywek (MS, B₅ z dodatkiem auksyn: IAA, IBA, NAA i różnych stężeń sacharozy 15, 30, 60 g l⁻¹) wpływa na największy przyrost biomasy korzeni i sprzyja wytwarzaniu korzonków bocznych, istotnych dla biosyntezy metabolitów wtórnych.

Krzywą wzrostu korzeni wykreślono w celu zilustrowania tendencji wzrostu biomasy korzeniowej w czasie trwania kultur w zależności od zastosowanego wariantu pożywki. W dniu założenia kultury, a następnie w regularnych odstępach czasu, dokonywano

dokładnego pomiaru świeżej masy korzeni. Uzyskane wyniki (10 analiz na każdą opcję pożywki) ujednolicono względem zastosowanej opcji pożywki i przedstawiono w formie wartości uśrednionych, dla których wyznaczono błąd standardowy (SE).

Zabiegi biotechnologiczne w kulturach korzeniowych

W kulturach korzeniowych przeprowadzono zabiegi biotechnologiczne w celu podwyższenia zawartości metabolitów wtórnych. Zastosowano jasmonian metylu (MeJa), który dodany do pożywki MS z $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ IBA osiągał ostateczne stężenie $100 \text{ }\mu\text{M}$. Próbę kontrolną stanowiła kultura korzeniowa prowadzona w pożywce MS z dodatkiem $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ IBA bez elicytora. Czas elicytacji był zróżnicowany (24 i 48 godz.). Kolby z kontrolnymi i elicytowanymi korzeniami umieszczono w pokoju hodowlanym na wytrząsarce rotacyjnej (110 rpm), w warunkach fotoperiodu.

1.6.7. Kultury pędowe w płynnych pożywkach

Kultury pędowe w płynnej pożywce zakładano pobierając z namnożonych wcześniej roślin po dwa pojedyncze pędy i umieszczając je w 20 ml świeżej płynnej pożywki MS z dodatkiem $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ BAP i $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ IAA. Kultury prowadzono przez okres 30 dni prowadząc obserwacje morfologiczne.

Krzywą przyrostu biomasy pędowej, która jest wykresem zależności przyrostu masy pędów w czasie trwania hodowli, wykreślono w celu wyznaczenia dnia przeprowadzenia elicytacji pędów. W dniu założenia kultury, a następnie w regularnych odstępach czasu (co 5 dni) dokonywano pomiaru świeżej masy pędów w kolejnych kulturach. Wyniki uzyskane po każdej kolejnej likwidacji uśredniono, wyznaczono błąd standardowy i wykreślono krzywą.

Zabiegi biotechnologiczne w kulturach pędowych

Kultury pędowe poddano zabiegom biotechnologicznym w celu zwiększenia akumulacji metabolitów wtórnych, z których kontrolowano zawartość fenolokwasów. Zastosowano elicytory: jasmonian metylu (MeJa) $100 \text{ }\mu\text{M}$, ekstrakt drożdżowy (YE) $1,0 \text{ g l}^{-1}$ oraz sacharozę w stężeniu 50 g l^{-1} . Próbę kontrolną stanowiła kultura pędowa prowadzona w pożywce MS z dodatkiem BAP i IAA ze stężeniem sacharozy 30 g l^{-1} , bez elicytorów. Elicytację YE oraz MeJa przeprowadzono w dniu wyznaczonym z krzywej przyrostu biomasy pędowej. Pędy traktowane zwiększonym stężeniem

sacharozy generującym podwyższone ciśnienie osmotyczne, umieszczono w pożywce na cały okres prowadzenia hodowli (10, 20, 30 dni). Kolby z kontrolnymi i elicytowanymi pędami umieszczono w pokoju hodowlanym na wytrząsarce rotacyjnej (110 rpm), w warunkach fotoperiodu.

1.6.8. Indukcja i stabilizacja kultur komórkowych

Pierwotna kultura kalusa założona została z korzonków pochodzących z 30-dniowych sterylnych siewek *Eryngium planum* L. Kalus pasażowano systematycznie co 30 dni na pożywkę MS suplementowaną 2,4-D i BAP. Kultury kalusowe umieszczono w pokoju hodowlanym, w warunkach ciemności. Po szeregu pasażach otrzymano ustabilizowaną biomasa jasnego i sypkiego kalusa, odpowiedniego do założenia kultury komórkowej (zawiesinowej). Homogeny kalus rozdrobniono i przeniesiono do płynnej pożywki MS suplementowanej w 2,4-D. Zawiesinę pasażowano co 30 dni do świeżej pożywki o tym samym składzie. Kultury komórkowe umieszczono w pokoju hodowlanym, na wytrząsarce rotacyjnej (110 obr./min.) w warunkach ciemności.

Z ustabilizowanego kalusa (pasaże 20-32) i kultury komórkowej (pasaż 9) biomasa komórkowa przeznaczona została do analiz fitochemicznych i badań właściwości przeciwdrobnoustrojowych niezróżnicowanych kultur *in vitro* mikołajka płaskolistnego.

2. Materiał i metody stosowane w analizach fitochemicznych

2.1. Chromatografia cienkowarstwowa (1D TLC i 2D TLC)

Materiał roślinny otrzymany w kulturach *in vitro* poddany był ocenie fitochemicznej na obecność trzech głównych grup metabolitów wtórnych: saponin triterpenowych, kwasów fenolowych i flawonoidów. Przeprowadzono wstępne analizy fitochemiczne ekstraktów metodą chromatografii cienkowarstwowej.

2.1.1. Ekstrakcja materiału roślinnego do wstępnych analiz fitochemicznych

W celu przygotowania próbki do analiz TLC, surowce uprzednio wysuszone w temperaturze 40° C rozdrabniano, ważono i poddawano ekstrakcji. Ekstrakcję prowadzono 4-krotnie, po 1h, za pomocą 70% EtOH (v/v) na łąźni wodnej pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 95°C. Otrzymane wyciągi etanolowe łączono a następnie zagęszczano do suchej masy pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 40°C. Część ekstraktów przygotowano na łąźni ultradźwiękowej. W ten sposób otrzymano ekstrakty z organów roślin gruntowych (liście rozetkowe i korzenie) oraz kultur *in vitro* (liście rozetkowe i korzenie zregenerowanych w warunkach *in vitro* roślin, biomasa pędowa i korzeniowa z płynnych pożywek, kalus, zawiesina komórkowa).

2.1.2. Wstępne analizy chromatograficzne

Dla analiz **1D TLC** stosowano gotowe płytki firmy Merck: Darmstadt, Germany

- HPTLC z żelem krzemionkowym (HPTLC Precoated Fertigplatten Kieselgel 60)
- TLC z żelem krzemionkowym (DC Plastikfolien Kieselgel 60)
- TLC DC z celulozą (DC Precoated Fertigplatten Cellulose)
- oraz ręcznie przygotowane płytki z poliamidem 6, przez pokrywanie płytki szklanej zawiesiną poliamidu DC-6 (firmy Macherey-Nagel, Düren, Niemcy) z dodatkiem celulozy DC MN 300 (Macherey-Nagel) (10+1, w/v) w etanolu

Dla analiz **2D TLC** stosowano płytki firmy Merck: Darmstadt, Germany

- TLC DC z celulozą (DC Precoated Fertigplatten Cellulose)

1D TLC. Odważone próbki (0,1g) uzyskanych ekstraktów rozpuszczano w 1 ml 70% (v/v) etanolu. Analizowane roztwory wraz z substancją wzorcową (10 μ l) nanoszono pasmowo na szerokość 1 cm na odpowiednie płytki chromatograficzne. Na płytce pokryte poliamidem próbki nanoszono ręcznie, a na płytce gotowe HPTLC pokryte żelem krzemionkowym (Merck) próbki nanoszono za pomocą półautomatycznego urządzenia CAMAG LINOMAT 5. Chromatogramy rozwijano w komorze pionowej wysyczonej parami fazy ruchomej [Tab. 15]. Po rozwinięciu chromatogramy analizowano w świetle UV₂₅₄, UV₃₆₆ oraz widzialnym, przed i po wywołaniu odczynnikami charakterystycznymi dla wykrywania saponin, kwasów fenolowych i flawonoidów:

- wanilina w etanolu/ 5% H₂SO₄

(1g waniliny rozpuszczano w 100 ml EtOH)

- odczynnik Liebermanna-Burcharda

(1 ml H₂SO₄ + 20 ml bezwodnik octowy + 50 ml chloroform)

- 0,1% etanolewy roztwór kompleksu kwasu difenyloborowego i etanoloaminy

(0,1 g NA w 250 ml EtOH)

a w przypadku płytek pokrytych żelem krzemionkowym, spryskiwano 5,0% etanolewym roztworem polietylenoglikolu (PEG)

- 1,0 % etanolewym roztworem AlCl₃ po ogrzaniu w temp. 105° C przez 3 minut

2D TLC. Odważone próbki (0,1g) uzyskanych ekstraktów rozpuszczano w 1 ml 70% (v/v) etanolu. Analizowane roztwory wraz z substancją wzorcową nanoszono ręcznie na płytki celulozowe kalibrowanymi kapilarami, plamowo po 10 μ l. Chromatogramy rozwijano dwukierunkowo w komorze pionowej wysyczonej parami fazy ruchomej BAW (1 kierunek) a następnie 15% kwasem octowym (2 kierunek).

1 kierunek: n-BuOH-AcOH-H₂O 4:1:5

2 kierunek: AcOH-H₂O 3:17

Po rozwinięciu chromatogramy analizowano w świetle UV₃₆₆ oraz widzialnym, przed i po wywołaniu odczynnikami charakterystycznymi dla wykrywania kwasów fenolowych i flawonoidów:

- 0,1% etanolemowym roztworem kompleksu kwasu difenyloborowego i etanoloaminy (0,1 % NA)

- 1,0 % etanolemowym roztworem AlCl₃ po ogrzaniu w temp. 105° C przez 3 minut

Substancje wzorcowe

Do analiz porównawczych, do kochromatografii stosowano następujące substancje wzorcowe: kwas rozmarynowy, kwas chlorogenowy, kwas kawowy, escyna, kemferol, kwercetyna, izoramnetyna, rutozyd, naryngenina. Wzorce rozpuszczano w metanolu (w stężeniu 1mg ml⁻¹) i наносzono na płytki 5 lub 10 ul roztworu.

Tab. 15 Warunki wstępnej analizy TLC badanych ekstraktów i frakcji z roślin gruntowych i kultur *in vitro* *Eryngium* L.

Analizowane związki	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Wzorce	R _f	Barwa przed i po wywołaniu	
					przed	po
Saponiny triterpenowe	Żel krzemionkowy (DC-Plastikfolien Kieselgel 60; HPTLC Alufolien Kieselgel 60)	BAW 4:1:5 ↑ (faza górna) (butanol: kw.octowy: woda)	Escyna kompleks	0,32 0,47	Wanilina/5% H₂SO₄/VIS	
					_____	fioletowa/VIS/
Kwasy fenolowe	Żel krzemionkowy (DC-Plastikfolien Kieselgel 60)	OAW 8:1:1 (octan etylu: kwas octowy: woda)	CGA	0,16	Niebieskie	niebieskie
			RA	0,64	Niebieskie	niebieskie
			CA	0,82	Niebieskie	niebieskie
	Żel krzemionkowy (HPTLC Alufolien Kieselgel 60)	OFAW 100:11:11:27 (octan etylu: kw. mrówkowy: kw. octowy: woda)	CGA		NA /UV₃₆₆	
			RA		Niebieskie	niebieskie
			CA		Niebieskie	niebieskie
	Żel krzemionkowy (HPTLC Alufolien Kieselgel 60)	BAW 4:1:5 ↑ (butanol: kw.octowy: woda)	CGA	0,44	NA/ UV₃₆₆	
			RA	0,34	Niebieskie	niebieskie
			CA	0,30	Niebieskie	niebieskie
flawonoidy	Celuloza (DC-Cellulose)	BAW 4:1:5 ↑(faza górna) (butanol: kw.octowy: woda)	Kemferol	0,90	Żółta	fluorescencja
			Izoramnetyna	0,89	Żółta	fluorescencja
	Żel krzemionkowy (HPTLC Alufolien Kieselgel 60)	OFAW 100:11:11:27 (octan etylu: kwas mrówkowy: kwas octowy: woda)	Kwercetyna	0,84	Żółta	fluorescencja
			Naryngenina	0,61	Słabo brunatna	żółta
			Rutozyd	0,52	Brunatna	pomarańczowa

2.1.3. Frakcjonowanie ekstraktów do analiz TLC

Do rozdzielania ekstraktów na frakcje zastosowano mikrokolumny Sep-Pak Plus Long (Waters) z sorbentem C18 (WAT023635), które przed użyciem poddano kondycjonowaniu polegającym na przepuszczaniu przez kolumnkę około 5 ml MeOH i około 5 ml wody destylowanej. Suchy ekstrakt rozpuszczano w małej objętości wody destylowanej i наносono na mikrokolumnki Sep-Pak. Frakcję zawierającą kwasy fenolowe wymywano za pomocą 5 ml 40% (v/v) MeOH. Następnie wymywano frakcję zawierającą saponiny triterpenowe przy pomocy 5 ml 80% (v/v) MeOH. Otrzymane frakcje zagęszczano na wyparce próżniowej i rozpuszczano w 1 ml etanolu.

2.1.4. Frakcjonowanie ekstraktów do badań biologicznych

W Katedrze przeprowadzono frakcjonowanie dwóch ekstraktów z surowców z *E. planum* przeznaczonych do badań biologicznych stosując chromatografię kolumnową [Derda i wsp. 2013].

Liście odziomkowe suche, sproszkowane (82,8 g) poddano ekstrakcji 70% EtOH (v/v) (4 x 600 ml = 2,4 l); w temperaturze 95°C. Otrzymano 32,4 g surowego ekstraktu (39%). W celu uzyskania frakcji zastosowano chromatografię kolumnową. Na kolumnę o wymiarach 9.2 x 32 cm, wypełnioną poliamidem MN-6 wprowadzono 27g surowego ekstraktu rozpuszczonego uprzednio w 70% EtOH (v/v). W celu rozdzielania mieszaniny związków, kolumnę przemywano następującymi rozpuszczalnikami: H₂O (3,5l), 20% MeOH (1l), 40% MeOH (5l), 60% MeOH (2l), 80% MeOH (4l), MeOH z 0.1% NH₄OH. Zebrano 36 frakcji, które po uprzedniej analizie metodą chromatografii cienkowsarstwowej połączono w następujące frakcje: frakcja 1-6 cukry/sole; frakcja 7-8 kumarynowa; frakcja 9-19 flawonoidowa; frakcja 20-22 flawonoidowo-saponinowa; frakcja 23-29 saponinowa; frakcja 30-33 fenolokwasowa. Występowanie grup związków analizowano metodą chromatografii cienkowsarstwowej, stosując fazy stacjonarne i ruchome:

- żel krzemionkowy BAW 4:1:5, C₆H₅CH₃-MeOEt 9:1, OAW 8:1:1, 7:2:2, C₆H₅CH₃-MeCOEt 9:1;
 - celuloza - BAW 4:1:5; 2D TLC ↑BAW 4:1:5(I) → 15% AcOH(II);
 - poliamid - H₂O-nBuOH-Me₂CO 16:3:3
- z zastosowaniem odczynników wywołujących: NA, AlCl₃, wanilina – kwas siarkowy.

Korzenie. Suchy, sproszkowany surowiec (351,0g) ekstrahowano 70% EtOH (4x 3,05l) w temperaturze 95°C; - otrzymano 145,45g surowego ekstraktu (41 %). Na kolumnę z wypełnieniem Poliamid MN-6 o wymiarach 9.2 x 32 cm wprowadzono 138g surowego ekstraktu rozpuszczonego w 70% EtOH. Kolumnę przemywano następującymi rozpuszczalnikami: H₂O (3l), MeOH (5l), 0.1% NH₄OH-MeOH (4l). Zebrano 17 frakcji, które po uprzedniej analizie chromatografii cienkowarstwowej połączono w następujące frakcje: frakcje 1-3 cukry/sole (126,9 g); frakcje 4-5 polisacharydy (0,20 g), frakcje 6-14 zawierające saponiny (6,40 g); frakcje 15-16 zawierające kwasy fenolowe (0,80 g). Obecność grup związków analizowano metodą chromatografii cienkowarstwowej:

- żel krzemionkowy - BAW 4:1:5, C₆H₅CH₃-MeOEt 9:1, OAW 8:1:1, 7:2:2;
- celuloza - BAW 4:1:5; 2D TLC ↑BAW 4:1:5(I) → 15% AcOH(II);
- poliamid - 16:3:3 H₂O-nBuOH-Me₂CO

W wyniku rozdziału ekstraktów metodą chromatografii kolumnowej otrzymano szereg frakcji, z których do badań aktywności cytotoksycznej wybrano 5 frakcji: z liści – frakcję flawonoidową, frakcję flawonoidowo-saponinową oraz frakcję kwasów fenolowych, a z korzeni – frakcję saponinową i frakcję kwasów fenolowych.

2.1.5. Wstępne analizy densytometryczne

Dokumentację chromatogramów TLC i wstępną analizę densytometryczną przeprowadzono przy pomocy systemu Digi Store 2 firmy CAMAG Reprostar 3 z kamerą cyfrową, oprogramowaniem WinCATS i Video Scan. Otrzymane chromatogramy oceniano w sposób półilościowy, porównując intensywność plam, spektrum kwasów fenolowych i saponin. Wykreślone densytogramy z ekstraktów pozwoliły tylko na szacunkowe porównanie zawartości związków w badanym surowcu, a przede wszystkim w biomacie po zabiegach elicytacji. Analizowane związki posiadały maksima przy innej długości fali niż 366 nm i 254 nm, przy których dostępny densytmetr skanował chromatogramy, dlatego otrzymane wyniki mają charakter wyłącznie porównawczy.

2.2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)²

Metodą HPLC przeprowadzono identyfikację i analizy ilościowe kwasów fenolowych w wybranym materiale roślinnym z *E.planum*:

- Liście rozetkowe i korzenie roślin gruntowych
- Kultura pędów w płynnej pożywce po elicytacji
- Kultura kalusowa
- Kultura komórkowa elicytowana

2.2.1. Ekstrakcja materiału roślinnego

W celu przygotowania próbek do analiz, surowiec uprzednio wysuszony rozdrabniano, ważono i przenoszono do kolby okrągłodennej. Do 0,5 g suchej masy dodawano 50% MeOH (v/v) i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną na łaźni wodnej w temperaturze 95°C, każdorazowo przez 30 min. Ciepły ekstrakt przesączano. Ekstrakcję przeprowadzano 3-krotnie. Otrzymane wyciągi metanolowe łączono i uzupełniano 50% (v/v) MeOH do objętości 50 lub 100 ml.

2.2.2. Analizy chromatograficzne

Jakościowe i ilościowe analizy związków występujących w ekstraktach roślin gruntowych i biomasy z kultur *in vitro* przeprowadzono wykorzystując wysokosprawny chromatograf cieczowy RP HPLC (aparatur Merck-Hitachi D-7000 wyposażony w detektor diodowy (DAD)). Rozdział składników obecnych w ekstraktach prowadzono na kolumnie Li-Chrospher 100 250×4 mm (RP 18e, 5 μm, Merck).

Jako fazę rozwijającą zastosowano liniowy gradient rozpuszczalników MeCN/H₂O i H₃PO₄ (pH=2,2): acetonitryl od 15 do 60% (v/v) przez 40 min, 60% przez 15 min, od 60 do 15 % przez 9 min i 15% przez 9 min. Szybkość przepływu wynosiła 1 ml min⁻¹. Oznaczenia wykonano przy długości fali λ = 320 nm. Identyfikację wybranych kwasów fenolowych przeprowadzono poprzez porównanie czasów retencji i widm UV z czasami retencji i widmami UV substancji wzorcowych (RT RA 13,707 min), (RT CGA 4,600 min) i CA (RT CA 6,367 min). Analizowano 10 μl próbki.

² Analizy HPLC wykonano w Dziale Kontroli Jakości Phytopharm Klęka pod kierunkiem mgr inż. Aldony Krawczyk

Zawartość fenolokwasów w badanym materiale roślinnym obliczono porównując pola powierzchni pików tych substancji z polem powierzchni pików obliczonych z krzywych kalibracji. Zawartość związków podano w mg g⁻¹ suchej masy. Uzyskane wyniki są średnią z trzech serii pomiarów, każdy obejmował 3 oddzielne próby. Względne odchylenie standardowe dla pól powierzchni RA, CGA i CA wynoszą odpowiednio 1,5%, 1,3% i 1,1%.

2.3. Ultrasprawa chromatografia cieczowa (UPLC)³

Metodą UPLC przeprowadzono analizy ilościowe kwasów fenolowych i saponin triterpenowych w wybranym materiale roślinnym:

- Liście rozetkowe i korzenie roślin gruntowych trzech badanych gatunków
- Liście rozetkowe i korzenie roślin zregenerowanych *in vitro*
- Kultury korzeniowe *E. maritimum*

2.3.1. Ekstrakcja materiału roślinnego

Próbki wysuszonego i drobno zmielonego materiału roślinnego (ok. 100 mg) ekstrahowano 80% (v/v) metanolem używając układu przyspieszonej ekstrakcji rozpuszczalnikowej (ASE 200, Dionex, Sunnyvale). Ekstrakcje przeprowadzono przy następujących parametrach: ciśnienie robocze 10 MPa i temperatura 40°C. Otrzymane ekstrakty odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem i rozpuszczono w 2 ml metanolu zawierającego 0,05% (w/v) kwasu askorbinowego. Następnie próbki przechowywano w temperaturze -20°C, które bezpośrednio przed analizami rozcieńczano 20 razy wodą destylowaną i wirowano (23000 x g) przez 15 min.

2.3.2. Analizy chromatograficzne

Jakościowe i ilościowe analizy roślin gruntowych i biomasy z kultur *in vitro* przeprowadzono wykorzystując ultrasprawy chromatograf cieczowy firmy Waters typ ACQUITY (Waters, Milford) wyposażony w detektor mas TQD (Waters, Manchester). Analizy wykonano stosując kolumnę BEH C₁₈ (100 x 1 mm; 1,7 µm; Waters, Milford). Analizowano saponiny triterpenowe i kwasy fenolowe. Jako fazę rozwijającą zastosowano gradient rozpuszczalników: od 5 do 80% acetonitryl zawierający 0,1%

³ Analizy UPLC wykonano w Zakładzie Biochemii i Jakości Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Stochmal

(v/v) kwas mrówkowy (roztwór B) przez 6 min i 0,1% kwas mrówkowy (roztwór A) z szybkością przepływu $140 \mu\text{l min}^{-1}$. Analizy przeprowadzono w temperaturze 50°C . Każdorazowo przed nastrzykiem, kolumnę przemywano czystym roztworem B przez 2 min, a następnie 5% roztworem B w roztworze A przez 7 min. Pojedynczą analizę powtarzano trzykrotnie – każdorazowo pobierając próbkę o objętości $1 \mu\text{l}$. Parametry analizatora MS były następujące: napięcie na stożku 130 V, napięcie na kapilarze 3,1 kV, ekstraktor 3 V, RF lens 100 mV, temperatura źródła 120°C , temperatura desolwacji 350°C , przepływ gazu desolwacyjnego 500 l h^{-1} , przepływ gazu na stożku 50 l h^{-1} , and collision przepływ gazu $100 \mu\text{l min}^{-1}$. Kolizyjne wyjście komórek zostało nastawione na 0,5. Parametry kwadrupoli 1 i 3 zostały ustawione tak, aby uzyskać rozdzielczość rzędu jednostki masy. Rozdzielczości LM oraz HM zostały ustawione na 15, energię jonów ustawiono na 0,9. Metodę ilościową kalibrowano przy użyciu standardowych rozcieńczeń roztworu w zakresie od 100 pg do $16 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$. RA i CGA analizowano przy użyciu SRM trybu spektrometru masowego. Selekcjonowano jony macierzyste przy m/z 353 i 359, które poddawano fragmentacji przy 15eV. Monitorowano powstawanie jonów potomnych przy odpowiednio m/z 191 i m/z 161. Saponiny triterpenowe analizowano w trybie monitorowania pojedynczego jonu, w którym obserwowano deprotonowane jony pseudo-molekularne przy m/z 925 (M1), 967 (M2A), 909 (M2B), 1251 (M3), 907 (M4) i 895 (M5). Wszystkie dane uzyskano w oparciu o program Waters MassLynx wersja 4.1 SCN 714.

2.4. Metoda spektrofotometryczna⁴

Zawartość sumy polifenoli z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w przeliczeniu na kwas galusowy oznaczono wg zmodyfikowanej metody Meng i wsp. [2009].

2.4.1. Wykreślenie krzywej kalibracyjnej dla wzorcowego kwasu galusowego

Odważono $0,10000 \text{ g}$ kwasu galusowego (Sigma-Aldrich) do kolby miarowej o pojemności 100 ml , rozpuszczono w 10 ml MeOH i uzupełniono do współmierności wodą dejonizowaną, uzyskując roztwór podstawowy o stężeniu $1,0 \text{ mg ml}^{-1}$. Do kolbek miarowych o pojemności 5 ml dodawano kolejno: podstawowy roztwór kwasu galusowego (w ilościach $0,10$; $0,15$; $0,20$; $0,25$; $0,30$; $0,35$; $0,40 \text{ ml}$ co odpowiadało $0,02$; $0,03$; $0,04$; $0,05$; $0,06$; $0,07$; $0,08 \text{ mg}$ kwasu galusowego w 1 ml roztworu) i wodę

⁴ Analizy zawartości sumy polifenoli wykonano w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji UMP. Za pomoc w realizacji części badań dziękuję dr Justynie Chanaj – Kaczmarek.

dejonizowaną do objętości 5ml. Dla każdego rozcieńczenia przygotowano 6 prób. Do probówek typu Eppendorf o pojemności 2 ml dodawano: 0,1 ml rozcieńczeń podstawowego roztworu kwasu galusowego (0,002-0,008 mg wzorca w próbie), 0,1 ml odczynnika Folin-Ciocalteu (FC; Merck) i po upływie 3 min od dodania odczynnika FC – 1,0 ml wodny 7% wodny roztwór węgla sodu (POCH). Próbę odniesienia przygotowano zastępując roztwór kwasu galusowego wodą dejonizowaną. Po 60 min od dodania węgla sodu zmierzono absorbancję otrzymanych roztworów wobec próby odniesienia, w jednorazowych kuwetach plastikowych o grubości 1 cm. Otrzymane wartości absorbancji przy długości fali $\lambda = 760$ nm posłużyły do wykreślenia krzywej kalibracyjnej.

2.4.2. Ekstrakcja materiału roślinnego

Wysuszony, rozdrobniony i zważony materiał roślinny (organy z roślin gruntowych i z rozmnażanych w kulturach *in vitro*) poddano czterokrotnej ekstrakcji w 70% (v/v) MeOH na łaźni wodnej, pod chłodnicą zwrotną, w temperaturze 95°C, każdorazowo 1 godz. [Tab. 16]. Otrzymane ekstrakty połączono i zagęszczono do objętości 25 ml na wyparce próżniowej w temperaturze 40°C.

Tab. 16 Masy poszczególnych organów *Eryngium* wykorzystane do analiz sumy polifenoli

Materiał roślinny		Masa surowca [g]	
<i>E. planum</i>	Rośliny gruntowe	Liście rozetkowe	4,0000
		Korzenie	4,0002
	Kultury <i>in vitro</i>	Liście rozetkowe	4,0017
		Korzenie	2,2000
<i>E. campestre</i>	Rośliny gruntowe	Liście rozetkowe	4,0016
		Korzenie	4,0005
	Kultury <i>in vitro</i>	Liście rozetkowe	4,0700
		Korzenie	4,0000
<i>E. maritimum</i>	Rośliny gruntowe	Liście rozetkowe	4,0089
		Korzenie	4,0000
	Kultury <i>in vitro</i>	Liście rozetkowe	4,0096
		Korzenie	4,0000

2.4.3. Oznaczenie zawartości sumy polifenoli

Do probówek typu Eppendorf o pojemności 2 ml dodawano po 0,1 ml badanych wyciągów a następnie odczynniki jak w przypadku wyznaczania krzywej kalibracyjnej. Z każdego wyciągu przygotowano po 3 próby, z każdej dokonując 4 analizy. Pomiarów dokonywano przy długości fali $\lambda = 760$ nm, w aparacie UV/VIS Perkin Elmer Lambda 35 Wyniki oznaczeń ilościowych polifenoli w badanych wyciągach podano w mg g^{-1} surowca w przeliczeniu na kwas galusowy.

3. Materiał i metody stosowane w badaniach aktywności biologicznej

3.1. Aktywność cytotoksyczna i proapoptotyczna⁵

Fracje z liści i korzeni *Eryngium planum*

Do badań aktywności cytotoksycznej wybrano liście rozetkowe i korzenie roślin gruntowych *Eryngium planum* L.

Ekstrakty metanolowe z liści i korzeni rozdzielano na frakcje z zastosowaniem chromatografii kolumnowej, według procedury opisanej w rozdziale 2.1.4. *Fracjonowanie ekstraktów do badań biologicznych*

Do badań wybrano 6 frakcji flawonoidową, flawonoidowo-saponinową, saponinową i fenolokwasową z liści rozetkowych oraz frakcję saponinową i fenolokwasową z korzeni mikołajka płaskolistnego.

Hodowla komórek ludzkich

Ludzka linia komórkowa raka jajnika SKOV-3 pochodziła z tkanki nabłonkowej izolowanej z wodobrzusza. Komórki hodowane były w pożywce DMEM (Sigma-Aldrich) suplementowanej 10% FBS (płodowa surowica bydlęca) i 2,5 mM L-glutaminą.

W celu uniknięcia zakażenia hodowli, do medium dodawano mieszaninę antybiotyków i antymykotyku (ABAM, 100 U ml⁻¹ penicyliny, 1mg ml⁻¹ streptomycyny, 100 U ml⁻¹ nystatyny, Sigma-Aldrich). Optymalne warunki hodowlane, tj. temperatura 37°C, 95% wilgotność i 5% CO₂, utrzymywano przy pomocy inkubatora - model 490-1CE (LabLine Instruments Inc.). Po uzyskaniu pożądanej liczby komórek, przemywano je dwukrotnie buforem fosforanowym PBS, a następnie odtrawiano od podłoża za pomocą 10% trypsyny/EDTA. Komórki zliczano z użyciem komory Bürkera i mikroskopu świetlnego (TS 100, kamera Digital Sight Camera System; Nikon), a następnie rozcieńczano do odpowiedniego stężenia. Pasaże komórek przeprowadzano w warunkach jałowych, w kabinie z laminarnym przepływem powietrza.

⁵ Analizy aktywności cytotoksycznej i proapoptotycznej wykonano w Katedrze i Zakładzie Toksykologii UMP pod kierunkiem dr. hab. Marka Muriasa. Za pomoc w realizacji części badań dziękuję dr Hannie Piotrowskiej i mgr Małgorzacie Kucińskiej.

3.1.1. Test LDH

Komórki ludzkiego raka jajnika wysiano na 96-dołkowe płytki (Corning Inc.), w ilości 20 000 komórek na dołek. Po upływie 24 godz. ściągnięto pożywkę i do każdej studzienki dodano badane frakcje w stężeniach 100, 10, 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ oraz kontrolę w postaci DMEM + DMSO. Pozytywną kontrolę stanowił 1% Tryton X-100 (Sigma-Aldrich). Komórki traktowane frakcjami z mikołajka inkubowano przez 24 godz. Po upływie doby z każdej studzienki pobrano 50 μl pożywki znad komórek i przeniesiono na nową płytkę. Następnie dodano 150 μl odczynnika LDH (skład: NAD^+ , L-mleczan, bufor Tris, niereaktywne stabilizatory; Pointe Scientific) i płytkę umieszczono na wytrząsarce na 10 min. Absorbancję badanych próbek odczytano przy długości fali $\lambda=340\text{nm}$, z użyciem czytnika płytek Elx-800 (BioTek).

3.1.2. Test SRB

Wyhodowane komórki SKOV-3 wysiano na 96-dołkowe płytki (Corning Inc.), w ilości 20 000 komórek na dołek. Do każdej studzienki dodano frakcje saponinowe z liści rozetkowych i korzeni, w stężeniach 100, 75, 50, 25, 12,5, 6,25 i 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ oraz kontrolę w postaci DMEM + DMSO. Po upływie 24 godz. ściągnięto pożywkę i do każdej studzienki dodano 200 μl zimnego 10% kwasu trichlorooctowego (Sigma-Aldrich). Po 1-godz. inkubacji w temperaturze 4°C , studzienki przepłukano pięciokrotnie 100 μl wody dejonizowanej, a następnie do każdej dodano 200 μl roztworu SRB (roztwór 0,1% w 1% kwasie octowym; Sigma). Komórki z roztworem inkubowano 15 min. w temperaturze pokojowej. Po ściągnięciu SRB studzienki przepłukano czterokrotnie 100 μl 1% kwasu octowego (Sigma-Aldrich). Płytkę pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Następnie do każdej studzienki dodano 200 μl 10mM roztworu TRIS (roztwór wodny trihydroksy-metyloaminometanu). Absorbancję poszczególnych próbek odczytano przy długości fali $\lambda=540\text{nm}$, z użyciem czytnika płytek Elx-800 (BioTek).

3.1.3. Test z kaspazą 3

Oznaczenie aktywności kaspazy 3 wykonano z wykorzystaniem zestawu Caspase 3 Assay Kit firmy Aldrich.

Wyhodowane komórki SKOV-3 wysiano na 96-dołkowe płytki (Corning Inc.), w ilości 20 000 komórek na dołek. Po 24-godz inkubacji komórek z frakcjami saponinowymi z liści rozetkowych i korzeni, w stężeniach 25 i 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ściągnięto pożywkę hodowlaną i dodano odczynnik Caspase 3, a następnie inkubowano w temperaturze pokojowej przez 4 godz. Zmierzono luminescencję produktu 7-amino-4-metylokumaryny przy długości fali $\alpha=360$ i 460 nm, z użyciem czytnika płytek Tecan Infinity 200 (Männedorf). Wykonano trzy niezależne powtórzenia oznaczeń.

3.1.4. Aneksyna V i jodek propidyny

Analizę cytometryczną komórek apoptotycznych i nekrotycznych wykonano z wykorzystaniem Aneksyny V i jodku propidyny – zestawu Annexin-V FITC Apoptosis Detection Kit firmy Caymanchem.

Komórki SKOV-3 wysiano na 6-dołkowe płytki (Corning Inc.), w ilości 500 000 komórek na dołek. Po upływie 24 godz. ściągnięto pożywkę i do każdej studzienki dodano badane frakcje saponinowe z liści rozetkowych i korzeni w odpowiednich stężeniach (25 i 50 $\mu\text{l ml}^{-1}$). Kontrolę stanowił DMSO, a jego stężenie nie przekroczyło 0,1%. Po 4 godz. inkubacji studzienki przemyto trypsyną w celu odtrawienia komórek od płytek inkubacyjnych. Mieszaninę komórek i frakcji przeniesiono do probówek i odwirowano (400xg, 5min). Następnie komórki zwieszono w 2 ml buforu (Assay Binding Buffer Concentrate rozpuszczony w wodzie destylowanej w stosunku 1:10) i dobrze wymieszano w celu rozdzielenia komórek. Mieszaninę ponownie odwirowano i zebrano supernatant. Komórki rozpuszczono w 250 μl roztworu aneksyny/jodku propidyny (10 μl odczynnika Cell-Based Annexin V FITC i 10 μl odczynnika Cell-Based Propidium Iodide Solution w 5ml buforu), roztworu aneksyny (10 μl odczynnika Cell-Based Annexin V FITC w 5ml buforu) i roztworu jodku propidyny (10 μl odczynnika Cell-Based Propidium Iodide Solution w 5ml buforu). Komórki inkubowano przez 10 min bez dostępu światła. Odwirowane komórki zawieszono w 2 ml buforu i dobrze wymieszano w celu rozdzielenia komórek. Ponownie komórki

odwirowano i rozpuszczono w 0,5 ml buforu w celu dokonania analiz cytometrem przepływowym. Wykonano trzy niezależne powtórzenia.

3.1.5. Technika PCR-array

Izolacja RNA

Całkowity RNA izolowano według zmodyfikowanej metody Chomczyńskiego i Sacchi [1987]. Po inkubacji z frakcją saponinową z korzenia mikołajka płaskolistnego (w stężeniu $50 \mu\text{g ml}^{-1}$) komórki poddawano lizie mieszaniną fenolu i izotiocyanianu guanidyny (1 ml) (TRIitydG, Applichem). Do prób dodawano następnie chloroform w objętości równej 1/5 objętości odczynnika TRIitydG ($200 \mu\text{l}$). Próby intensywnie mieszano i inkubowano 5 minut na lodzie, po czym wirowano przez 15 minut, w temperaturze 4°C , $15000\times g$. W wyniku wirowania próby rozdzielały się na trzy warstwy; (1) fazę wodną (zawierającą RNA), (2) fazę pośrednią (interfazę, zawierającą DNA) oraz (3) fazę fenolowo-chloroformową (zawierającą białka i struktury subkomórkowe). Do dalszej izolacji pobierano $500 \mu\text{l}$ fazy wodnej i przenoszono do nowych próbek. RNA wytrącano przez dodanie izopropanolu (POCh) w stosunku objętościowym 1:1. Próby mieszano i umieszczano w temperaturze -80°C . Po upływie 24 godz. wytrącony RNA wirowano 15 minut, 4°C , $15000\times g$. Usuwano supernatant, a powstały osad RNA przemywano dwukrotnie schłodzonym 75% etanolem (POCh), po czym wirowano 15 minut, 4°C , $15000\times g$, a następnie suszono. RNA rozpuszczano w $20 \mu\text{l}$ wody dejonizowanej, wolnej od RNaz. Przygotowany w ten sposób RNA wykorzystywano jako matrycę do syntezy cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji, do której użyto $1 \mu\text{g}$ całkowitego RNA. Stężenie RNA oznaczano fluorymetrycznie z wykorzystaniem zestawu Quant-iT™ RNA Assay Kits (Invitrogen).

Odwrotna transkrypcja

Całą procedurę wykonywano na lodzie w kabinie z laminarnym przepływem powietrza. Objętość RNA jaką pobrano do przepisania na cDNA poszczególnych prób przeliczono na $1 \mu\text{g}$. Do $1 \mu\text{g}$ RNA dodawano $4 \mu\text{l}$ $2,5 \text{ mM}$ dNTP (Novazym), $0,5 \mu\text{l}$ oligo(dT) (Novazym) oraz $0,5 \mu\text{l}$ losowych heksamerów (Novazym). Próby mieszano, wirowano i umieszczano na 5 minut w 65°C w termobloku TS-100C (Biosan) w celu denaturacji RNA. Próby wirowano, umieszczano na lodzie i dodawano następujące składniki: $4 \mu\text{l}$ pięciokrotnie stężonego buforu First Strand Buffer (Invitrogen, USA), $2 \mu\text{l}$ DTT $0,1 \text{ M}$

(Invitrogen), 0,5 µl odwrotnej transkryptazy SuperScript™ II Reverse Transcriptase 200 U/µl (Invitrogen) oraz 0,25 µl inhibitora rybonukleaz Rnase OUT 40 U/µl (Invitrogen). Próby wytrząsano, a następnie krótko wirowano i umieszczano w termobloku. Syntezę cDNA przeprowadzano przez 50 minut w temp. 37°C. W celu zatrzymania reakcji próby inkubowano przez 15 min. w temp. 65°C.

Amplifikacja cDNA za pomocą metody PCR-array

Poziom ekspresji panelu genów pro- i antyapoptotycznych został oznaczony techniką PCR-array za pomocą aparatu LightCycler 480 Instrument (Roche Diagnostics) oraz oprogramowania LightCycler Software 1.5. Reakcję PCR-array przeprowadzano na płytkach 96-dołkowych RealTime ready Human Apoptosis Panel 96 (Roche Diagnostics), służącej do analizy 84 wybranych genów pro- i antyapoptotycznych. Standardy wewnętrzne stanowiły cDNA 7 genów konstytutywnych. W każdym dołku płytki znajdowała się odpowiednio dobrana sonda, komplementarna do sekwencji danego genu oraz startery w kierunku 5' _3' oraz 3' _5'. Do każdego dołka naniesiono 10 µl mieszaniny reakcyjnej, której skład był zawsze taki sam dla analizy ekspresji genów danej próby: 20 µl cDNA (0,2 µl na 1 reakcję), 480 µl LightCycler 480 Probes Master (4,8 µl na 1 reakcję) i 500 µl wody (5 µl na 1 reakcję).

Reakcję przeprowadzono według protokołu zalecanego przez producenta (Roche Diagnostics):

denaturacja wstępna – 95°C, 10 min. (aktywacja polimerazy); oznaczenie ilościowe – 60 cykli; denaturacja – 95°C, 10s (rozdzielenie nici DNA); przyłączanie starterów – 60°C, 30s; wydłużanie starterów (synteza nici komplementarnej) – 72°C, 2s; chłodzenie aparatu 40°C, 30s.

W ocenie ekspresji wykorzystywano względną metodę ilościową. Wyniki ilościowych oznaczeń badanych cDNA normalizowano względem 7 standardów wewnętrznych:

ACTB, GAPDH, beta-2-mikroglobulina B2M (ang. *beta-2-microglobulin*), fosforybozylotransferazy hipoksantyno-guaninowej HPRT1 (ang. *hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase*), RPL13A (ang. *60S ribosomal protein L13A*), 18S (ang. *18S ribosomal RNA*), YWHAZ (ang. *14-3-3 protein zeta/delta*).

1.1. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa – metoda seryjnych rozcieńczeń⁶

1.1.1. Metoda seryjnych rozcieńczeń

Material

Drobnoustroje

Do badań wykorzystano dwa szczepy bakteryjne *Staphylococcus aureus* ATCC 4163 (Gram-dodatnia bakteria gronkowca złocistego) i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6749 (Gram-ujemna pałeczka ropy błękitnej), grzyby drożdżoidalne *Candida albicans* ATCC 10231, grzyb pleśniowy *Aspergillus niger* ATCC 16404 (kropidlak czarny) oraz dermatofity: *Microsporum canis* ATCC 36299, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

Szczepy bakteryjne i drożdże przechowywano we fiolkach Microbank (ProLabDiagnostic) w temperaturze $-70^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$. Grzyby pleśniowe utrzymywano na pożywce agarowej Sabouraud (SDA, Merck) w temperaturze 10°C . Przed użyciem bakterie i drożdże namnażano w pożywce Brain Heart Infusion (BHI, BioMerieux) w temperaturze 34°C przez 18 godzin a pleśnie na pożywce Sabouraud w 34°C przez 18 godzin. Po inkubacji hodowle bakteryjne i drożdżowe rozcieńczano w odpowiedniej pożywce otrzymując ostateczne stężenie zawiesiny zawierające około 10⁶ CFU/ml.

Dermatofity umieszczano na pożywce agarowej Sabouraud i inkubowano w temperaturze 34°C przez 5 do 8 dni by otrzymać odpowiednią sporulację. Po inkubacji, kultury pokrywano 0,9% roztworem NaCl z dodatkiem 0,1% Tween 80, materiał dokładnie zbierano sterylnym wacikiem i przenoszono do jałowej kolby. Zawiesiny homogenizowano i filtrowano. Liczba spor określana była metodą seryjnych rozcieńczeń. Przed użyciem zawiesina rozpuszczana była w pożywce Sabouraud otrzymując ostateczne stężenie zawiesiny zawierające około $2-5 \cdot 10^5$ spor/ml.

Ekstrakty i frakcje

W celu przygotowania próbek do analiz, surowiec (liście rozetkowe i korzenie roślin gruntowych oraz korzenie zregenerowanych w warunkach *in vitro* roślin *E. planum*,

⁶ Analizy wykonano w Katedrze i Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej UMP pod kierunkiem dr Jolanty Długaszewskiej.

E. maritimum, *E. campestre* oraz biomasę korzeniową) uprzednio wysuszony rozdrabniano, ważono i poddawano ekstrakcji.

Do badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej użyto:

- surowych ekstraktów metanolowych z liści rozetkowych i korzeni roślin gruntowych oraz korzenie zregenerowanych w warunkach *in vitro* roślin *E. planum*, *E. maritimum*, *E. campestre*,
- frakcji wodno – metanolowych z korzeni gruntowych *E. planum*, *E. maritimum*, *E. campestre* po rozdiale na mikrokolumnie Sep-Pak (2.1.3. *Fracjonowanie ekstraktów do analiz TLC*)
- frakcji saponinowej z korzeni gruntowych *E. planum*, otrzymanych w wyniku chromatografii kolumnowej (2.1.4. *Fracjonowanie ekstraktów do badań biologicznych*)

Metoda seryjnych rozcieńczeń w podłożu płynnym

Aktywność przeciwdrobnoustrojową badanych wyciągów i frakcji określano metodą mikrorozcieńczeń według wytycznych EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Ekstrakty i frakcje rozpuszczono w metanolu, a następnie dwukrotnie rozcieńczono w pożywce hodowlanej. 100 µl każdego roztworu rozprowadzono na płytkach 96-dołkowych (Kartell). Wykonano kontrolę sterylności oraz kontrolę wzrostu (zawierającą pożywkę hodowlaną i rozpuszczalnik). Do każdej studzienki z roztworem oraz kontrolą wzrostu dodawano 100 µl zawiesiny drobnoustrojów. Płytki hodowlane inkubowano w temperaturze 34°C przez 18 godz. dla bakterii i drożdży, 48 godz. dla grzybów pleśniowych. Następnie określano MIC – najniższe stężenie wyciągu/frakcji przy którym zaobserwowano zahamowanie wzrostu mikroorganizmów. Po wykonaniu testu MIC i wyznaczeniu końcowej wartości MIC – dla każdej studzienki gdzie nie zaobserwowano wzrostu (stężenie równe lub większe MIC) zawartość przenoszono na pożywkę agarową: Typcase Soy Agar (TSA, BioMerieux) dla bakterii, Sabouraud Dextrose Agar (SDA, Merck) dla grzybów. Płytki inkubowano w temperaturze 34°C przez 18 godz. dla bakterii i drożdży, 48-72 godz. dla grzybów pleśniowych. Następnie określono MBC - najniższe stężenie wyciągu/frakcji, przy którym nie zaobserwowano wzrostu mikroorganizmów. Kontrolę pozytywną stanowiła gentamycyna dla bakterii i nystatyna dla grzybów.

1.2. Aktywność antyoksydacyjna⁷

Potencjał antyoksydacyjny ekstraktów metanолоwych badanych surowców z roślin gruntowych i kultur *in vitro* *E. planum*, *E. maritimum* i *E. campestre* mierzono trzema testami opartymi na różnych mechanizmach antyoksydacyjnych.

Ekstrakty metanолоwe

W celu przygotowania próbek do analiz, surowiec uprzednio wysuszony rozdrabniano, ważono i ekstrahowano. Do 1,0 g surowca dodawano 50 ml 80% (v/v) MeOH i umieszczano w łaźni ultradźwiękowej o częst. 15/50s w temp. 20°C na 5 godz.

3.3.1. Test DPPH

Metodę obrazującą zdolność badanych ekstraktów do zmiatania wolnych rodników DPPH[•] (1,1-difenylo-2-pikrylhydrazyl) zaproponowali Bondet i Brand-Williams [1997].

Tab. 17 Ilość surowca w próbce i mieszaninie reakcyjnej dla testu DPPH w zależności od zastosowanego rozcieńczenia ekstraktów

Rozcieńczenie	Ilość surowca w próbce [mg]	Ilość surowca w mieszaninie reakcyjnej [mg]
1:2	5	2,5
1:3	3,33	1,665
1:4	2,5	1,25
1:5	2	1
1:6	1,665	0,8325
1:7	1,43	0,715
1:8	1,25	0,625
1:9	1,11	0,555
1:10	1	0,5
1:12	0,83	0,415
1:14	0,715	0,3575
1:16	0,625	0,3125
1:18	0,555	0,2775
1:20	0,5	0,25
1:30	0,33	0,1665
1:40	0,25	0,125
1:50	0,2	0,1
1:60	0,165	0,0825

⁷ Analizy aktywności antyoksydacyjnej wykonano w Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu pod kierunkiem dr. hab. Adama Matkowskiego. Za pomoc w realizacji części badań dziękuję dr. Sylwestorowi Ślusarczykowi.

Metoda polega na użyciu stabilnego rodnika DPPH, który będąc w roztworze z badanymi ekstraktami ulega redukcji. Rodnik jest czynnikiem utleniającym, a jego redukcję mierzy się spektrofotometrycznie. W celu wykonania testu przygotowano odpowiednie rozcieńczenia ekstraktów metanolowych [Tab. 17].

Do kuwet pomiarowych pobierano 0,5 ml badanego ekstraktu i 0,5 ml 400 μ M roztworu metanolowego DPPH (Sigma-Aldrich). Absorbancję badanych próbek mierzono za pomocą spektrofotometrycznego czytnika płytek μ Quant 2005 firmy BioTek, przy długości fali 517 nm, kontrolnie zaraz po zmieszaniu badanej próbki z DPPH, oraz co minutę przez 29 min. Kontrolną próbę stanowiła mieszanina DPPH i czystego metanolu w równych proporcjach. Ślepą próbę stanowił ekstrakt rozpuszczony w metanolu. Doświadczenie wykonano dwukrotnie w czterech powtórzeniach.

Dla każdego rozcieńczenia obliczono procent redukcji DPPH według wzoru:

$$\% = 100 (A_{\text{DPPH}} - A_{\text{F}} - A_{\text{E}}) / A_{\text{DPPH}}$$

gdzie:

A_{DPPH} – absorbancja odczynnika DPPH (próba kontrolna)

A_{F} – absorbancja ekstraktu z mieszaniną reakcyjną (próba finalna)

A_{E} – absorbancja ekstraktu z MeOH (próba ślepa)

3.3.2 Test PMo

Antyoksydacyjną aktywność badanych ekstraktów sprawdzano metodą Prieto i wsp. [1999] określającą zdolność ekstraktów do redukcji stopnia utleniania Mo(VI) do Mo(V).

W celu wykonania testu przygotowano ekstrakty metanolowe w rozcieńczeniu 1:10.

Do 1,2 ml 84 mM roztworu dwunastowodnego fosforanu (V) sodu dodawano 1,2 ml 18 mM kwasu siarkowego (VI), następnie 1,2 ml roztworu molibdenianu (VI) amonowego i 0,4 ml ekstraktu. Mieszaninę reakcyjną w szklanych probówkach zamkniętych metalowymi kapslami umieszczano w łaźni wodnej i inkubowano w temperaturze 90°C przez 90 min. Ślepą próbę stanowił ekstrakt rozpuszczony w metanolu. Absorbancję badanych próbek mierzono za pomocą spektrofotometrycznego czytnika płytek μ Quant 2005 firmy BioTek, przy długości fali 695 nm, po uprzednim ochłodzeniu próbek do temperatury pokojowej. Doświadczenie wykonano w 6 powtórzeniach.

Siłę redukcyjną poszczególnych ekstraktów w tym teście obliczono korzystając ze wzoru:

$$A = A_F - A_{MR} - A_E$$

gdzie:

A_F – absorbancja ekstraktu z mieszaniną reakcyjną (próba finalna)

A_{MR} – absorbancja mieszaniny reakcyjnej (próba kontrolna)

A_E – absorbancja próbki w której fosfomolibdenian zastąpiono wodą (próba ślepa)

Rezultaty zdolności redukcyjnej ekstraktów przedstawiano w przeliczeniu na ekwiwalenty kwasu askorbinowego.

3.3.3. Test z deoksyrybozą

Podstawą tego testu jest badanie zahamowania degradacji deoksyrybozy na skutek generowania rodnika hydroksylowego w układzie H_2O_2 – EDTA/AA. Zaprojektowana przez Gutteridge metoda [Gutteridge, Halliwell 1988] pozwala wyznaczyć szybkość reakcji danego substratu z rodnikiem hydroksylowym, oszacować zdolność antyoksydacyjną badanego materiału, jak również oszacować stopień chelatowania metali. Teoretyczną podstawę stanowi reakcja Fentona.

Do wykonania testu wyselekcjonowano ekstrakty w rozcieńczeniu 1:6, co oznacza, że ilość surowca w badanych próbach wynosiła 3,3 mg a 2 μ g w mieszaninie reakcyjnej. Ze względu na silne właściwości ekstraktów z korzeni z roślin gruntowych *E. planum* i *E. maritimum* sporządzono bardziej rozcieńczone ekstrakty – dla mikołajka płaskolistnego 1: 16 (ilość surowca w badanej próbce wynosiła 1,25 mg i 0,75 μ g w mieszaninie reakcyjnej) a dla mikołajka nadmorskiego 1:12 (ilość surowca w badanej próbce wynosiła 1,66 mg i 1 μ g w mieszaninie reakcyjnej).

Do przeprowadzenia testu sporządzono 28 mM roztwór deoksyrybozy (Fluka); 0,5 M bufor fosforanowy (POCH); 176 mM roztwór kwasu askorbinowego, 1mM kompleks Fe(III)EDTA, 100 mM roztwór nadtlenu wodoru, 1% roztwór kwasu tiobarbiturowego. Roztwór deoksyrybozy (28 mM) (Fluka) sporządzono rozpuszczając 0,375 g 2-deoksy-D-rybozy w wodzie i uzupełniając wodą dejonizowaną do 100 ml. Bufor fosforanowy (0,5 M) (POCH) sporządzono odważając/odmierając i łącząc następujące składniki: 0,8g NaCl, 0,02g KCl, 0,144g Na_2HPO_4 , 0,024 KH_2PO_4 i 80 ml

wody dejonizowanej. Po ustabilizowaniu pH na 7,4 roztwór uzupełniono wodą do objętości 100 ml i zagotowano. Roztwór kwasu askorbinowego (176 mM) sporządzono rozpuszczając 0,0176 g kwasu askorbinowego w wodzie i uzupełniając wodą dejonizowaną do 100 ml. Roztwór żelaza z EDTA (1 mM) (POCH) sporządzono łącząc ze sobą roztwór siarczanu żelaza i wersenianu II sodowego. 0,0278 g FeSO_4 rozpuszczono w wodzie i uzupełniono wodą dejonizowaną do 100 ml. 0,0372 g EDTA rozpuszczono w niewielkiej ilości wody, podgrzewano i uzupełniono wodą dejonizowaną do 100 ml. Roztwory zmieszano otrzymując 1mM roztwór kompleksu Fe^{3+} EDTA. Roztwór nadtlenu wodoru (100mM) sporządzono odważając 1,132 g H_2O_2 i uzupełniając wodą dejonizowaną do 200 ml. Roztwór kwasu tiobarbiturowego sporządzono odważając 1,2 g TBA i wsypując do wcześniej odmierzonych 10 ml 1M NaOH, ogrzewając aż do rozpuszczenia kwasu a następnie mieszając kroplami dodawano wodę i uzupełniano do 118 ml, po czym dodawano 2 ml 1M HCl.

W celu wykonania testu do szklanych probówek dodawano w następującej kolejności roztwory: 150 μl deoksyrybozy, 300 μl buforu fosforanowego, 570 μl wody dejonizowanej, 30 μl badanego ekstraktu, 150 μl kwasu askorbinowego, 150 μl kompleksu Fe (III) EDTA, 150 μl nadtlenu wodoru a następnie umieszczano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C na 1 godz. Do ogrzanej mieszaniny dodawano 1,5 ml zimnego kwasu trichlorowego (10%) i 2 ml kwasu tiobarbiturowego (1%) po czym umieszczano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C na 30 min. Do osobnych probówek odmierzone 2 ml ochłodzonych mieszanin i 2,5 ml n-butanolu. Po wymieszaniu składników, absorbancję badanych próbek mierzono przy długości fali 532 nm.

Procent zahamowania degradacji deoksyrybozy wyznaczono według wzoru:

$$\% = 100 (A_{\text{MR}} - A_{\text{E}}) (A_{\text{F}} - A_{\text{E}}) / (A_{\text{MR}} - A_{\text{E}})$$

gdzie:

A_{MR} – absorbancja mieszaniny reakcyjnej z metanolem (próba kontrolna)

A_{E} – absorbancja roztworu deoksyrybozy, buforu fosforanowego i wody dejonizowanej

A_{F} – absorbancja ekstraktu z mieszaniną reakcyjną

2. Obliczenia statystyczne

Analizie statystycznej poddano wszystkie wyniki doświadczeń prezentowanych w niniejszej rozprawie, z wykorzystaniem programów Microsoft Exel 2007, Statistica 10 i GraphPad Prism 6. Dla każdej serii danych obliczono średnią, odchylenie standardowe / błąd standardowy. W celu porównania średnich zastosowano t-test oraz jednoczynnikową analizę wariancji (One-way ANOVA). Do oceny istotności różnic pomiędzy średnimi zastosowano test Duncan'a oraz test Dunnett'a, przyjmując 5% przedział ufności.

Parametry krzywej kalibracyjnej dla kwasu galusowego obliczono metodą najmniejszych kwadratów, określono liniowość wyznaczając współczynnik R^2 (przedział ufności 5% w oszacowaniu statystycznym).

WYNIKI

1. Wybrane kultury *in vitro* krajowych gatunków *Eryngium* L.

1.1. Mikrorozmnażanie

1.1.1. Indukcja sterylnych siewek

Owoce (dwurozłupnie) charakterystyczne dla rodziny *Apiaceae* posiadają owocnię wewnętrzną zrosniętą z łupiną nasienną. Powierzchnia rozłupek pokryta jest równowąsko-szydlastymi łuskami, które często stanowią miejsce występowania licznych koloni grzybów, bakterii i fitoplazm. Taka budowa owoców utrudnia odkażanie eksplantatów inicjalnych. W celu założenia aksenicznych kultur *in vitro* konieczne było opracowanie skutecznej metody wyjaławiania powierzchni owoców i pobudzenie nasion do kiełkowania, do przerwania ich głębokiego spoczynku.

Ze względu na wysoki procent zakażeń owoców przy niewielkiej liczbie kiełkujących roślin w przypadku zastosowania standardowych stężeń środka dezynfekującego, zmieniono warunki sterylizacji – podwyższono stężenia komercyjnych preparatów zawierających aktywny chlor – Ace, Clorox lub Domestos oraz wydłużono czas ekspozycji owoców na ich działanie. Gdy zmienione warunki dezynfekcji powierzchniowej nie przynosiły oczekiwanego rezultatu, dodatkowo nasiona izolowano z łupiny nasiennej zrosniętej z owocnią i przed umieszczeniem w pożywce indukcyjnej, płukano je jałową wodą destylowaną. Kolejnymi zabiegami mającymi na celu skuteczną sterylizację propagul i podwyższenie wydajności procesu kiełkowania były: trzytygodniowa stratyfikacja owoców w temp. 4°C oraz ponowna dezynfekcja powierzchniowa nasion. W celu przerwania spoczynku nasion, pożywki MS wzbogacano kwasem giberelowym (GA₃).

Zbadano wpływ różnych stężeń podchlorynu sodu oraz czasu wyjaławiania owoców lub/i nasion oraz stratyfikacji na siłę kiełkowania [Tab. 16]. Wyniki doświadczeń wskazują, że najlepszą strategią pobudzania nasion do kiełkowania było połączenie wszystkich zabiegów – stratyfikację owoców, izolowanie nasion z owocni i łupiny nasiennej, dezynfekcję powierzchniową owoców i nasion. Zastosowanie niższego stężenia środka dezynfekującego lub dezynfekcja jedynie owoców, bez izolacji nasion, skutkowało wyższą liczbą zakażonych owoców/nasion (do 50%).

Odpowiedź nasion na warunki fizykochemiczne przeprowadzanej dezynfekcji powierzchniowej owoców/nasion różniła się znacząco w zależności od gatunku mikołajka. Najwyższy procent kiełkowania nasion *E. planum* wynosił 62%. Owoce tego gatunku poddano procesowi stratyfikacji, następnie zdezynfekowano 50% środkiem komercyjnym (Domestos) przez 15 min. W kolejnym etapie wyizolowane nasiona umieszczono w 30% Domestosie na 10 min. Ponad 4% siewek *E. maritimum* otrzymano z nasion zdezynfekowanych w 20% środka Ace przez 10 min i wyizolowanych ze stratyfikowanych owoców wytrząsanych w 20% Ace przez 30 min. Zarówno owoce poddane stratyfikacji, jak i wyizolowane z owocni i łupiny nasiennej nasiona *E. campestre*, wyjałowiono w 10% Cloroxie przez 10 min, otrzymując prawie 29% wykiełkowanych siewek dla tego gatunku [Tab. 18].

Tab. 18 Wpływ stratyfikacji i wyjaławiania owoców/nasion na wydajność kiełkowania nasion *Eryngium* L. w warunkach *in vitro*

Gatunek	STR	Owoce		Izolowane nasiona		Liczba wyłożonych owoców	Zakażone nasiona [%]	Otrzymane siewki [%]
		Stężenie preparatu [%]	Czas dezynfekcji [min]	Stężenie preparatu [%]	Czas dezynfekcji [min]			
<i>E. planum</i>		5,0 A	15	-	-	32	50,00	6,25
		5,0 C	20	-	-	36	50,00	25,00
		10,0 C	10	-	-	60	0,00	30,67
	+	50,0 D	15	30	10	166	5,00	62,00
	+	70,0 D	15	50	10	131	7,00	57,00
	+	30,0 D	20	10	20	180	13,00	50,00
<i>E. maritimum</i>		5,0 A	10	-	-	35	0,00	0,00
		20,0 A	30	-	-	28	0,00	0,00
		20,0 A	50	-	-	54	0,00	0,00
	+	5,0 A	10	10	10	34	41,18	2,94
	+	20,0 A	30	20	10	24	4,17	4,17
	+	20,0 A	50	20	20	28	0,00	0,00
<i>E. campestre</i>		25,0 C	25	-	-	50	36,00	8,00
		30,0 C	30	-	-	50	0,00	0,00
		25,0 C	30	-	-	100	21,00	5,00
	+	25,0 C	30	-	-	24	25,00	12,50
	+	10,0 C	10	10	10	104	7,69	20,2
	+	10,0 C	20	10	20	38	15,79	28,95

STR – stratyfikacja; A – Ace; C – Clorox; D – Domestos

Otrzymane siewki *E. planum* i *E. campestre* cechowały się prawidłową morfologią, dobrą kondycją fizjologiczną i poprawnie wytworzonym systemem korzeniowym. Fragmenty siewek *E. planum* i *E. campestre* wykorzystano do założenia kultur *in vitro*.

Siewki *E. maritimum*, otrzymane w kulturach *in vitro* w niewielkiej liczbie, odznaczały się zmienioną morfologią i barwą oraz nieprawidłowym rozwojem. Z tego względu do otrzymania materiału inicjalnego do założenia kultur *in vitro* mikołajka nadmorskiego zastosowano metodę wyjaławiania powierzchniowego fragmentów pędów roślin gruntowych z pąkami wierzchołkowymi i bocznymi. Skuteczność zastosowanego 30% Cloroxu w czasie 8 min wynosiła 100%

1.1.2. Namnażanie pędów poprzez rozwój pąków szczytowych i bocznych oraz optymalizacja warunków hodowli kultur pędowych

ERYNGIUM PLANUM L.

Do założenia kultury pędowej *E. planum* i namnożenia pędów w szeregu cyklach, wykorzystano wierzchołki pędów (długości ok. 5 mm), pochodzące z 30-dniowych aksenicznych siewek a następnie następnie z pąków rosnących w kulturze *in vitro*.

Mikołajek hodowany w warunkach *in vitro* charakteryzował się rozetkowym typem wzrostu. Początkowo ze stożka wzrostu pędu powstawało kilka nowych pąków, a następnie roślina rozrastała się tworząc skupiska pędowe. Ze względu na trudności związane z izolowaniem poszczególnych pędów, częstą praktyką w niniejszym doświadczeniu stało się dzielenie masy pędowej na mniejsze skupiska pędowe (2-3).

Wpływ suplementacji pożywki MS hormonami generował różną odpowiedź eksplantatów wierzchołkowych mikołajka płaskolistnego w zależności od stężeń [Tab. 19]. W przypadku wszystkich wariantów hormonalnych pożywki namnażającej, zaobserwowano tworzenie nowych pąków i namnażanie pędów. Po 6 tygodniach hodowli, 98 – 100% eksplantatów eksponowanych na działanie regulatorów wzrostu i rozwoju, tworzyło skupiska 8 – 17 pędowe. Podczas gdy brak fitohormonów w pożywce wpływał na niższą indukcję pędów jak i średnią liczbę pędów i liści. W tych warunkach tworzyło się od 2 do 5 pędów o większych rozmiarach.

Najwyższy procent odpowiedzi eksplantatów (100%) i największą liczbę zregenerowanych pędów (17 pędów/eksplantat) *E. planum* zanotowano dla okazów rosnących na pożywce MS uzupełnionej w 1,0 mg l⁻¹ BAP i 0,1 mg l⁻¹ IAA. Wysoki procent odpowiedzi eksplantatów (99,79 %) oraz dużą liczbę pędów (prawie 16 pędów/eksplantat) warunkował pasaż eksplantatów na pożywkę MS suplementowaną w 1,0 mg l⁻¹ BAP i 1,0 mg l⁻¹ IAA. Na obu wariantach pożywki

namnażającej, po 6 tygodniach kultury, uzyskane skupiska pędów osiągające długość 1,33 – 1,50 cm charakteryzowały się łatwością rozdzielania na pojedyncze pędy. Proliferacja pędów była większa w przypadkach, gdy malał stosunek stężeń cytokininy do auksyny. Natomiast zastosowanie wyższych stężeń BAP wpływało korzystnie na wydłużanie pędów, także gdy stężenie IAA nie ulegało zmianie. Największą liczbę liści obserwowano na pędach rosnących na pożywce MS wzbogaconej jedynie w BAP.

Kalus pojawiał się u podstawy pędów sporadycznie i w bardzo małej ilości, jedynie podczas rozpoczynania hodowli *in vitro*.

Tab. 19 Wpływ regulatorów wzrostu i rozwoju roślin [RWRR] na namnażanie pędów *E. planum* na pożywce MS po 6 tygodniach kultury

RWRR [mg l ⁻¹]		Odpowiedź eksplantatu [%] (± SE)	Liczba pędów na eksplantat (± SE)	Długość pędów [cm] (± SE)	Liczba liści na pęd (± SE)
BAP	IAA				
0,0	0,0	93,19 ± 1,0 ^d	4,57 ± 0,60 ^c	4,65 ± 0,04 ^a	2,80 ± 0,07 ^f
1,0	0,0	98,36 ± 0,55 ^{abc}	8,03 ± 0,60 ^b	1,25 ± 0,03 ^e	5,6 ± 0,06 ^a
1,0	1,0	99,79 ± 0,15 ^{ab}	15,58 ± 0,59 ^a	1,33 ± 0,02 ^e	3,12 ± 0,04 ^c
1,0	0,1	100 ± 0,00 ^a	17,10 ± 0,60 ^a	1,50 ± 0,02 ^d	3,99 ± 0,04 ^c
1,5	0,1	98,19 ± 0,6 ^{bc}	8,37 ± 0,60 ^b	3,40 ± 0,03 ^c	3,80 ± 0,05 ^d
2,0	0,1	97,85 ± 0,67 ^c	7,63 ± 0,60 ^b	3,80 ± 0,03 ^b	4,53 ± 0,06 ^b

Średnie wartości w kolumnach z tą samą literą nie różnią się istotnie dla P = 0,05 stosując test wielokrotnych porównań Duncana



Fot. 7 *E. planum* w kulturze *in vitro*

A pędy namnożone na pożywce MS +1,0 mg l⁻¹ BAP i 0,1 mg l⁻¹ IAA (skala 30 mm)

B pojedynczy pęd przeznaczony do ukorzeniania po 8 tygodniach kultury (skala 1cm)

***ERYNGIUM MARITIMUM* L.**

Do założenia kultury pędowej *E. maritimum*, ze względu na trudności w otrzymaniu prawidłowych siewek w warunkach *in vitro*, wykorzystano niewielkie fragmenty pędów (długości ok. 5 mm) zawierające pąki wierzchołkowe i boczne pochodzące z roślin gruntowych. Do namnożenia pędów w szeregu kolejnych cykli wykorzystano fragmenty szczytów pędów roślin z kultur *in vitro*.

Mikołajek nadmorski rosnący w warunkach *in vitro* charakteryzował się wytwarzaniem rozetki liści o długich ogonkach liściowych.

Stężenie soli mineralnych oraz witamin, podobnie jak suplementacja pożywki MS egzogennymi hormonami (BAP, IAA) w różnych stężeniach wpływały na różną odpowiedź eksplantatów mikołajka nadmorskiego [Tab. 20]. W przypadku wszystkich wariantów pożywki, zaobserwowano tworzenie pąków i namnażanie pędów.

W doświadczeniach zastosowano pożywki MS o pełnym składzie, ale uwzględniono także warianty ze zredukowanymi o połowę stężeniami soli mineralnych i witamin. Dane z piśmiennictwa wskazują, że warunki środowiskowe preferowane przez *E. maritimum* to wydmy i gleby ubogie w składniki odżywcze.

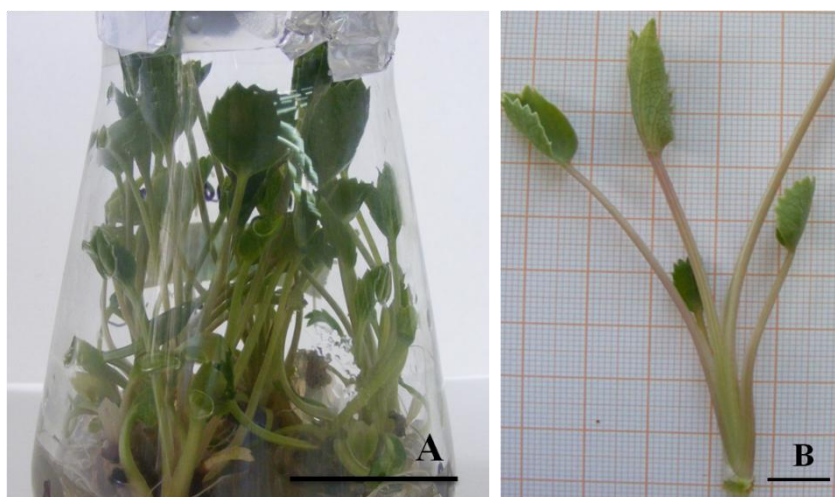
Najefektywniejsze mnożenie mikołajka nadmorskiego obserwowano jednak na pożywkach MS z pełną zawartością soli mineralnych i witamin [Tab. 18]. Najwyższy procent odpowiedzi eksplantatów (ponad 93%) charakteryzował kultury pędowe utrzymywane na pożywce MS uzupełnionej w 1,0 mg l⁻¹ BAP i 1,0 mg l⁻¹ IAA, a także na MS z 1,0 mg l⁻¹ BAP i 0,1 mg l⁻¹ IAA. Taki skład hormonalny pożywek indukował również najwyższą liczbę pędów na eksplantat (powyżej 4 pędy na eksplantat), lecz dużo niższą niż *E. planum*.

Kalus sporadycznie pojawiał się u podstawy pędów rosnących na pożywkach ze zredukowanymi stężeniami składników mineralnych i witamin. Pod koniec cyklu hodowlanego, z kalusa regenerowały nieliczne pędy przybyszowe. Obniżenie zawartości wspomnianych składników skutkowało spadkiem tempa namnażania pędów i obniżeniem żywotności eksplantatów, łącznie z pojawianiem się zmian morfologicznych. Okazy z liśćmi, bez wyraźnie zaznaczonych ogonków liściowych i szklistej, często odbarwionej blaszce liściowej, eliminowano z kultur ze względu na niebezpieczeństwo pojawienia się zmienności somaklonalnej.

Tab. 20 Wpływ wariantu pożywki i regulatorów wzrostu i rozwoju roślin [RWRR] na namnażanie pędów *E. maritimum* na pożywce MS po 6 tygodniach kultury

Pożywka	RWRR		Odpowiedź eksplantatu [%]	Liczba pędów na eksplantat (\pm SE)	Długość pędów [cm] (\pm SE)	Liczba liści na pęd (\pm SE)
	BAP	IAA				
$\frac{1}{2}$ MS + $\frac{1}{2}$ wit.	0,0	0,0	53,6	$2,4 \pm 0,08^f$	$4,0 \pm 0,04^b$	$3,1 \pm 0,08^g$
	1,0	0,0	56,6	$2,0 \pm 0,1^g$	$3,0 \pm 0,1^g$	$3,6 \pm 0,2^f$
	1,0	1,0	72,4	$2,9 \pm 0,03^d$	$2,3 \pm 0,06^h$	$3,5 \pm 0,1^f$
$\frac{1}{2}$ MS	1,0	0,1	56,9	$2,5 \pm 0,06^f$	$3,2 \pm 0,03^f$	$5,7 \pm 0,08^a$
	0,0	0,0	45,6	$1,6 \pm 0,07^h$	$3,5 \pm 0,03^e$	$4,0 \pm 0,09^{de}$
	1,0	0,0	63,3	$3,4 \pm 0,05^c$	$3,1 \pm 0,03^g$	$4,2 \pm 0,06^d$
	1,0	1,0	56,6	$2,8 \pm 0,05^{de}$	$3,2 \pm 0,04^f$	$4,2 \pm 0,07^d$
MS	1,0	0,1	54,9	$2,6 \pm 0,06^{ef}$	$3,0 \pm 0,04^g$	$5,8 \pm 0,09^a$
	0,0	0,0	70,1	$1,5 \pm 0,07^h$	$3,8 \pm 0,04^c$	$4,6 \pm 0,09^c$
	1,0	0,0	71,5	$2,6 \pm 0,06^{ef}$	$3,6 \pm 0,04^{de}$	$5,9 \pm 0,09^a$
	1,0	1,0	93,9	$4,1 \pm 0,03^b$	$3,1 \pm 0,03^g$	$3,9 \pm 0,07^e$
	1,0	0,1	96,3	$4,4 \pm 0,04^a$	$3,7 \pm 0,03^{cd}$	$5,2 \pm 0,05^b$
	1,5	0,1	90,0	$2,6 \pm 0,04^{ef}$	$3,7 \pm 0,03^{cd}$	$5,3 \pm 0,06^b$
	2,0	0,1	77,0	$1,2 \pm 0,07^i$	$4,2 \pm 0,05^a$	$4,5 \pm 0,12^c$

Średnie wartości w kolumnach z tą samą literą nie różnią się istotnie dla $P=0,05$ stosując test wielokrotnych porównań Duncana



Fot. 8 *E. maritimum* w kulturze *in vitro*

A pędy namnożone na pożywce MS +1,0 mg l⁻¹ BAP i 0,1 mg l⁻¹ IAA (skala 30 mm)

B pojedynczy pęd przeznaczony do ukorzeniania (skala 1 cm)

***ERYNGIUM CAMPESTRE* L.**

Do założenia kultury pędowej *E. campestre* i namnożenia pędów w szeregu cyklach, wykorzystano wierzchołki pędów (długości ok. 5 mm), pochodzące z 30 dniowych siewek wprowadzonych wcześniej do warunków *in vitro* a następnie pędów rozmnażanych *in vitro*.

Z uwagi na warunki siedliskowe preferowane przez *E. campestre* (murawy kserotermiczne), w doświadczeniach uwzględniono także warianty pożywki podstawowej MS ze zredukowanymi o połowę stężeniami soli mineralnych i witamin.

Stężenie soli mineralnych oraz witamin, podobnie jak suplementacja pożywki MS egzogennymi hormonami (BAP, IAA) w różnych stężeniach wpływały na różną odpowiedź eksplantatów mikołajka polnego [Tab. 21]. W przypadku wszystkich wariantów pożywki, zaobserwowano tworzenie nowych pąków i namnażanie pędów. Po 6 tygodniach hodowli, procent odpowiedzi eksplantatów mieścił się w przedziale od 50 do 100%. Najniższe parametry oceny wydajności procesu mnożenia klonalnego (procent odpowiedzi eksplantatów i średnia liczba pędów na eksplantat) otrzymano dla roślin hodowanych na najuboższych pożywkach (ze zredukowanymi o połowę stężeniami soli mineralnych, witamin oraz bez dodatku egzogennych fitohormonów) – jedynie połowa eksplantatów rozwinęła nowe pędy (nieco ponad 3cm). Najwyższy procent odpowiedzi eksplantatów (ponad 90%) odnotowano dla roślin wzrastających w obecności BAP i IAA w pożywce, bez względu ich proporcje. Suplementacji pożywki w BAP, również BAP i IAA towarzyszył wzrost indukcji pędów oraz liczby pędów przypadających na eksplantat. Najlepszą pożywką do wydajnego mnożenia klonalnego mikołajka polnego (13 pędów/eksplantat), podobnie jak dla pozostałych badanych gatunków, było podłoże MS uzupełnione w 1,0 mg l⁻¹ BAP i 0,1 mg l⁻¹ IAA.

Kalus nie pojawiał się u podstawy pędów, nawet podczas rozpoczynania hodowli *in vitro*. Nie zaobserwowano zjawiska szklistości pędów.

Mikołajek polny w kulturze *in vitro* także wytwarzał rozetki liści i charakteryzował się dobrym przyrostem liczby nowych pędów, jednakże podczas dłuższego utrzymywania materiału w hodowlach, rośliny traciły turgor a liście przybierały lekko zielono-żółte zabarwienie. Z tego względu pożywkę MS wzbogacono w siarczan adeniny, który z jednej strony wpływał na poprawę kondycji fizjologicznej i morfologii roślin, z drugiej obniżał parametry mnożenia pędów.

Tab. 21 Wpływ wariantu pożywki i regulatorów wzrostu i rozwoju roślin [RWRR] na namnażanie pędów *E. campestre* na pożywce MS po 6 tygodniach kultury

Pożywka	RWRR		Odpowiedź eksplantatu [%]	Liczba pędów na eksplantat (\pm SE)	Długość pędów [cm] (\pm SE)	Liczba liści na pęd (\pm SE)
	[mg l ⁻¹]					
	BAP	IAA				
½ MS + ½ wit.	0,0	0,0	50	3,90 \pm 0,2 ^h	3,16 \pm 0,2 ^b	3,15 \pm 0,2 ^d
	1,0	0,0	78	5,80 \pm 0,5 ^{fg}	3,02 \pm 0,2 ^{bc}	4,00 \pm 0,2 ^c
	1,0	0,1	100	9,10 \pm 0,6 ^{bc}	1,75 \pm 0,2 ^{fg}	5,10 \pm 0,2 ^b
½ MS	0,0	0,0	70	4,10 \pm 0,4 ^h	2,66 \pm 0,2 ^d	2,95 \pm 0,2 ^d
	1,0	0,0	78	6,20 \pm 0,5 ^{efg}	2,37 \pm 0,2 ^e	4,10 \pm 0,2 ^c
	1,0	0,1	100	10,15 \pm 0,7 ^b	1,56 \pm 0,2 ^g	5,30 \pm 0,2 ^b
MS	0,0	0,0	64	5,15 \pm 0,3 ^{gh}	3,84 \pm 0,2 ^a	4,40 \pm 0,2 ^c
	1,0	0,0	83	7,50 \pm 0,3 ^{de}	3,82 \pm 0,2 ^a	3,90 \pm 0,1 ^c
	1,0	0,1	100	13,30 \pm 0,8 ^a	1,80 \pm 0,2 ^f	6,85 \pm 0,3 ^a
	1,0	1,0	100	8,30 \pm 0,4 ^{cd}	2,45 \pm 0,1 ^{de}	5,15 \pm 0,2 ^b
MS + SA	1,0	0,1	100	6,50 \pm 0,4 ^{efg}	2,86 \pm 0,1 ^c	4,05 \pm 0,2 ^c
	1,0	1,0	100	6,7 \pm 0,3 ^{ef}	2,50 \pm 0,1 ^{de}	3,90 \pm 0,2 ^c

Średnie wartości w kolumnach z tą samą literą nie różnią się istotnie dla P=0,05 stosując test wielokrotnych porównań Duncan



Fot. 9 *E. campestre* w kulturze *in vitro*

A pędy namnożone na pożywce MS +1,0 mg l⁻¹ BAP i 0,1 mg l⁻¹ IAA (skala 30 mm)

B pojedynczy pęd przygotowany do ukorzenienia po 8 tygodniach kultury (skala 1 cm)

1.1.3. Analizy cytogenetyczne

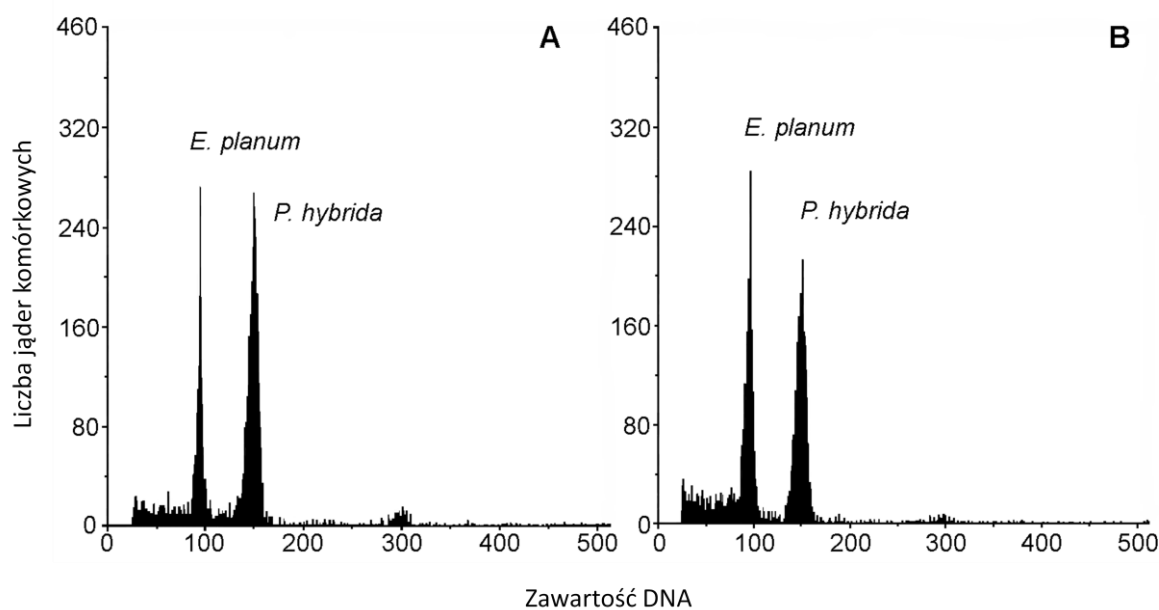
W wyniku mikrorozmnażania pędy potomne mikołajków powstawały głównie poprzez rozwój pąków bocznych z istniejących w eksplantacie merystemów, ale także sporadycznie z pąków przybyszowych regenerujących z niewielkiej ilości kalusa rozwijającego się u podstawy pędów. Zjawisko to obserwowano głównie dla *E. maritimum*. Dlatego wskazane było przeprowadzenie kontroli cytogenetycznej.

Ryzyko pojawienia się zmienności somaklonalnej, zwłaszcza podczas długiego okresu trwania kultur, wymusiło konieczność przeprowadzenia kontroli ploidalności zregenerowanych w kulturach *in vitro* roślin. Metodą cytometrii przepływowej określono zawartość 2C DNA w komórkach z liści siewek stanowiących kontrolę i pędów *Eryngium* zregenerowanych w kulturach *in vitro*. Histogramy wskazują, iż ploidalność zregenerowanych pędów nie zmieniła się, natomiast zawartość jądrowego DNA była zbliżona i nie różniła się statystycznie od kontroli [Tab. 22; Ryc. 18-20].

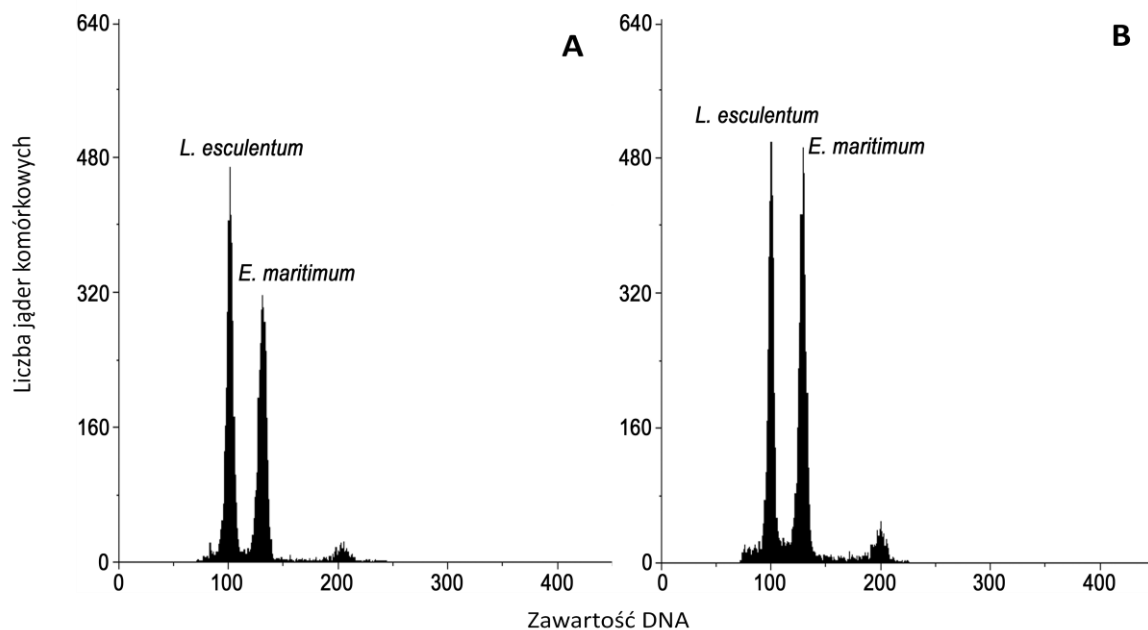
Tab. 22 Zawartość 2C DNA w liściach *Eryngium* L. – pobranych z siewek/ roślin gruntowych i pędów z kultur *in vitro*

Materiał roślinny	Zawartość DNA (pg/2C ± SE/SD)		
	<i>E. planum</i>	<i>E. campestre</i>	<i>E. maritimum</i>
Siewka / młoda roślina gruntowa	1,805 ± 0,0035	3,29 ± 0,028	2,489 ± 0,05
Kultura pędowa <i>in vitro</i> *	1,815 ± 0,0045	3,34 ± 0,102	2,490 ± 0,02

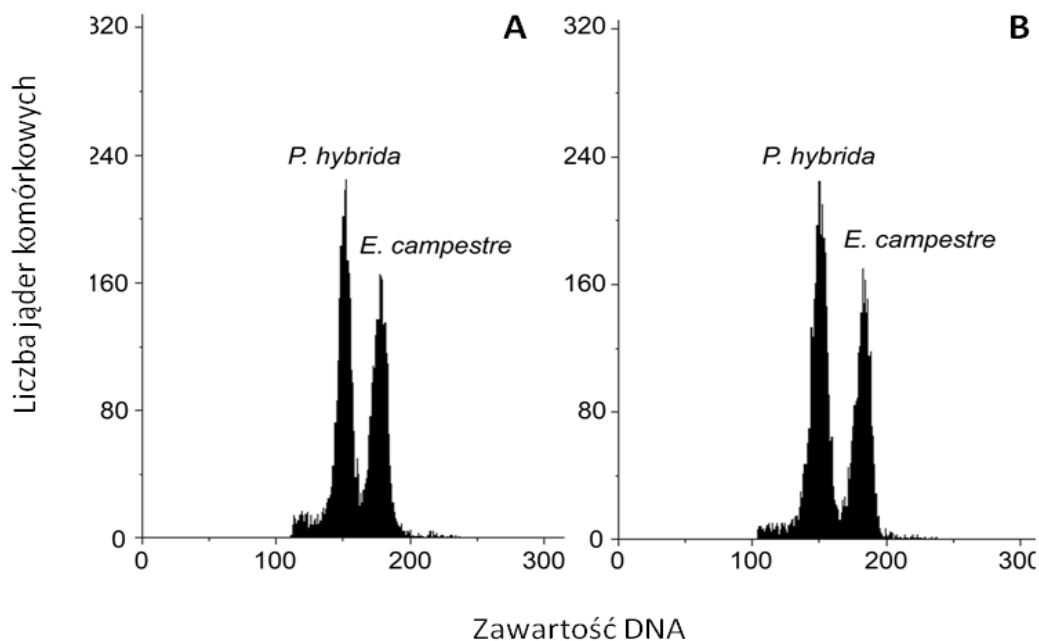
*Do analiz cytogenetycznych metodą cytometrii przepływowej pobrano pędy utrzymywane w warunkach *in vitro* przez 12 pasaży



Ryc.18 Histogramy obrazujące zawartość DNA jądrowego w analizie cytometrycznej liści - kontrola wewnętrzna – *Petunia hybrida* i badany gatunek *Eryngium planum* L. **A** liście siewki **B** zregenerowane w kulturach *in vitro* pędy



Ryc.19 Histogramy obrazujące zawartość DNA jądrowego w analizie cytometrycznej liści - kontrola wewnętrzna – *Solanum lycopersicum* (*Lycopersicum esculentum*) i badany gatunek *Eryngium maritimum* L. **A** liście młodej rośliny **B** zregenerowane w kulturach *in vitro* pędy



Ryc. 20 Histogramy obrazujące zawartość DNA jądrowego w analizie cytometrycznej liści - kontrola wewnętrzna – *Petunia hybrida* i badany gatunek *Eryngium campestre* L. **A** liście siewki **B** zregenerowane w kulturach *in vitro* pędy

Po namnożeniu licznych pędów, charakteryzujących się zdrowym wyglądem i dobrą kondycją fizjologiczną, rozpoczynano etap ich ukorzenia na różnych wariantach pożywek podstawowych MS oraz suplementowanych auksynami.

1.1.4. Ukorzenianie pędów

ERYNGIUM PLANUM L.

Zdrowe, zregenerowane w kulturach *in vitro* pędy o długości 2-3 cm *E. planum* spontanicznie tworzyły korzenie na wszystkich wariantach pożywek. Częstotliwość ryzogenezy na pożywkach ukorzeniających wynosiła od 86,09 do 92,06 % [Tab. 23]. Pierwsze korzenie pojawiały się po dwóch tygodniach w pożywkach wzbogaconych w auksyny IAA i IBA i po trzech tygodniach w pożywkach kontrolnych, bez auksyn. Najpóźniej indukcję korzeni powodowała suplementacja NAA, dlatego też w momencie dokonywania pomiarów korzenie z tej pożywki były najslabiej wykształcone. Egzogenny dodatek auksyn nie był warunkiem koniecznym do indukcji korzeni, jednakże wpływał na średnią liczbę korzeni przypadających na eksplantat. Wraz ze wzrostem liczby korzeni malała ich długość. Największą liczbę korzeni przybyszowych przypadającą na pęd zanotowano dla roślin hodowanych na pożywkach MS (ponad 4 korzenie), jednakże inne auksyny także dobrze indukowały ryzogenezę i wpływały na liczbę korzeni (3 korzenie). Obserwacja morfologiczne wykazały, że najwięcej korzeni bocznych pojawiało się pod wpływem IAA i IBA [Fot. 10].

Tab. 23 Wpływ wariantu pożywki i auksyn na ukorzenianie pędów *E. planum* po 6 tygodniach kultury

Pożywka [auksyny w mg l ⁻¹]	Indukcja korzeni [%] (± SE)	Liczba korzeni na 1pęd (± SE)	Długość korzeni [cm] (± SE)
½ MS	92,06 ± 1,60 ^a	1,97 ± 0,51 ^b	4,47 ± 0,11 ^a
MS	90,83 ± 1,72 ^{ab}	2,78 ± 0,47 ^{ab}	4,23 ± 0,09 ^{ab}
MS + IAA 0,1	88,24 ± 1,69 ^{ab}	3,03 ± 0,48 ^{ab}	3,86 ± 0,09 ^c
MS + IAA 0,5	90,62 ± 1,11 ^{ab}	3,10 ± 0,53 ^{ab}	4,05 ± 0,09 ^{bc}
MS + IBA 0,1	86,09 ± 1,39 ^b	3,33 ± 0,52 ^{ab}	1,38 ± 0,09 ^d
MS + NAA 0,1	90,58 ± 1,69 ^{ab}	4,34 ± 0,53 ^a	0,70 ± 0,08 ^e

Średnie wartości w kolumnach z tą samą literą nie różnią się istotnie dla P=0,05 stosując test wielokrotnych porównań Duncana

Początkowo korzenie mikołajka płaskolistnego charakteryzowały się białym zabarwieniem, jednakże w czasie trwania kultury zmieniały kolor na brązowy.



Fot. 10 Wpływ wariantu pożywki i auksyn (w stężeniu $0,1 \text{ mg l}^{-1}$) na ukorzenianie pędów *E. planum* po 6 tygodniach kultury

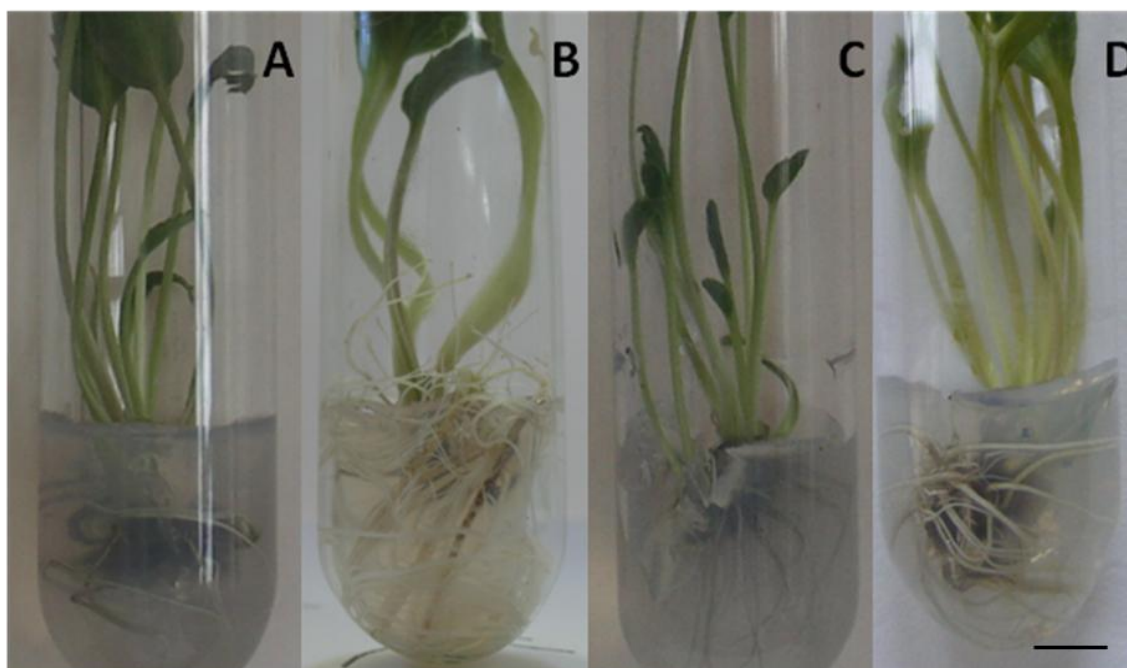
ERYNGIUM MARITIMUM L.

W czasie trwania fazy namnażania pędów *E. maritimum*, niektóre z nich spontanicznie tworzyły korzenie. W odrębnym doświadczeniu nad indukcją korzeni, zregenerowane w kulturach *in vitro* pędy tworzyły korzenie z dużą wydajnością, zależną od zastosowanego wariantu pożywki (83-100%) [Tab. 24]. Pierwsze korzenie pojawiały się już po 7 dniach kultury. Na wszystkich stosowanych pożywkach, mikropędy wytwarzały korzenie w procesie ryzogenezy bezpośredniej. Suplementacja pożywek auksynami nie była niezbędna do indukcji korzeni. Niemniej jednak dodatek fitohormonów wpływał na lepszy rozwój systemu korzeniowego. Największą liczbę korzeni przybyszowych otrzymano na pożywce $\frac{1}{2}$ MS w obecności IAA i 15 g l^{-1} sacharozy [Fot. 11]. Wzrost liczby korzeni bocznych następował w trakcie wydłużania korzeni głównych hodowanych w pożywkach suplementowanych IAA i IBA, przy czym duże zagęszczenie korzeni głównych wpływało negatywnie na pojawienie się korzonków kolejnego rzędu. Zarówno zbyt niskie stężenie sacharozy (15 g l^{-1} S), jak i zbyt wysokie (50 g l^{-1} S) w pożywce o pełnym składzie powodowało spadek liczby korzeni głównych w stosunku do pożywki kontrolnej MS (30 g l^{-1} S). Pędy *E. maritimum* hodowane w kulturach *in vitro* wytwarzały korzenie o znacznej długości, co ma związek z naturalną tendencją gatunku do wytwarzania długiego systemu korzeniowego w warunkach naturalnych (do 4 m). Jednakże długie korzenie były cienkie i brązowe, nieodpowiednie do wysadzenia roślin do doniczek.

Tab.24 Wpływ wariantu pożywek, auksyn i sacharozy na ukorzenie pędów *E. maritimum* po 6 tygodniach kultury

Pożywka [sacharoza w g l ⁻¹ auksyny w mg l ⁻¹]	Indukcja korzeni [%]	Liczba korzeni na 1 pęd (± SE)	Długość korzeni [cm] (± SE)
1/2 MS z 15 S	100,0	8,0 ± 0,3 ^{def}	5,1 ± 0,2 ^d
1/2 MS z 15 S + IAA 0,1	100,0	22,2 ± 0,7 ^a	4,6 ± 0,2 ^e
1/2 MS z 15 S + IBA 0,1	100,0	12,7 ± 0,5 ^c	3,4 ± 0,1 ^{gh}
1/2 MS z 15 S + NAA 0,1	100,0	18,4 ± 0,7 ^b	2,0 ± 0,2 ^j
1/2 MS z 30 S	83,3	6,8 ± 0,3 ^{ef}	6,0 ± 0,2 ^{bc}
1/2 MS z 30 S + IAA 0,1	91,0	7,8 ± 0,1 ^{def}	4,5 ± 0,08 ^e
1/2 MS z 30 S + IBA 0,1	91,0	7,6 ± 0,1 ^{ef}	3,9 ± 0,1 ^f
1/2 MS z 30 S + NAA 0,1	100,0	8,3 ± 0,1 ^{def}	3,2 ± 0,07 ^h
MS z 15 S	83,3	5,5 ± 0,1 ^f	5,8 ± 0,1 ^c
MS z 15 S + IAA 0,1	83,3	5,8 ± 0,1 ^f	3,2 ± 0,06 ^h
MS z 15 S + IBA 0,1	100,0	9,9 ± 0,4 ^{cde}	5,8 ± 0,1 ^c
MS z 15 S + NAA 0,1	83,3	6,0 ± 0,3 ^f	3,8 ± 0,1 ^{fg}
MS z 30 S	83,3	5,2 ± 0,4 ^f	7,1 ± 0,2 ^a
MS z 30 S + IAA 0,1	100,0	12,3 ± 0,5 ^c	3,7 ± 0,1 ^{fg}
MS z 30 S + IBA 0,1	100,0	11,0 ± 0,4 ^{cd}	6,1 ± 0,2 ^{bc}
MS z 30 S + NAA 0,1	100,0	6,0 ± 0,3 ^f	4,9 ± 0,1 ^{de}
MS z 50 S	83,3	5,8 ± 0,3 ^f	7,2 ± 0,2 ^a
MS z 50 S + IAA 1,0	100,0	6,5 ± 0,3 ^f	6,5 ± 0,1 ^b
MS z 50 S + IBA 1,0	100,0	5,6 ± 0,3 ^f	6,5 ± 0,2 ^b
MS z 50 S + NAA 1,0	100,0	2,0 ± 0,3 ^g	2,5 ± 0,3 ⁱ

Średnie wartości w kolumnach z tą samą literą nie różnią się istotnie dla P=0,05 stosując test wielokrotnych porównań Duncana



Fot. 11 Pędy *E. maritimum* ukorzone na podłożach **A** ½ MS z 15 g l⁻¹ S **B** ½ MS z 15 g l⁻¹ S + 0,1 mg l⁻¹ IAA
C ½ MS z 15 g l⁻¹ S + 0,1 mg l⁻¹ IBA **D** ½ MS z 15 g l⁻¹ S + 0,1 mg l⁻¹ NAA (skala 1 cm)

***ERYNGIUM CAMPESTRE* L.**

Zdrowe, zregenerowane w kulturach *in vitro* pędy *E.campestre* tworzyły korzenie na wszystkich wariantach pożywek ukorzeniających a częstotliwość ryzogenezy wynosiła od 50 do 85 % [Tab. 25]. W czasie trwania fazy namnażania pędów nie zaobserwowano tworzenia korzeni, do ich indukcji niezbędny był dodatek auksyny w stężeniu 1,0 mg l⁻¹. Niższe stężenia auksyn (takie jak w pożywkach namnażających) nie wpływały na powstawanie korzeni przybyszowych. Najliczniej korzenie tworzyły się na pędach hodowanych na pożywkach suplementowanych IAA, chociaż największą liczbę korzeni bocznych odnotowano w doświadczeniu wykorzystującym IBA jako dodatek do pożywek ukorzeniających. Podwyższone stężenie sacharozy (50 g l⁻¹ S) wpływało korzystnie, zarówno na współczynnik indukcji korzeni, jak i na średnią liczbę i długość korzeni przypadających na pęd. Najkorzystniejszymi pożywkami do ukorzenia pędów *E. campestre* były: MS z 50 g l⁻¹ S i 1,0 mg l⁻¹ IAA (80% zaindukowanych korzeni, średnia liczba korzeni – ponad 8) oraz MS z 50 g l⁻¹ S i 1,0 mg l⁻¹ IBA (95% zaindukowanych korzeni, średnia liczba korzeni – ponad 6) [Fot. 12].

Tab. 25 Wpływ auksyn i sacharozy na ukorzenianie pędów *E. campestre* po 6 tygodniach kultury

Pożywka [sacharoza w g l ⁻¹ auksyny w mg l ⁻¹]	Indukcja korzeni [%]	Liczba korzeni na 1 pęd (± SE)	Długość korzeni [cm] (± SE)
MS z 30 S	45	2,0 ± 0,2 ^d	5,4 ± 0,3 ^b
MS z 30 S+ IAA 1,0	76	5,3 ± 0,4 ^c	2,4 ± 0,2 ^f
MS z 30 S+ IBA 1,0	85	5,0 ± 0,3 ^c	3,5 ± 0,2 ^d
MS z 30 S+ NAA 1,0	70	4,5 ± 0,2 ^c	3,8 ± 0,2 ^c
MS z 50 S	50	2,4 ± 0,2 ^d	6,1 ± 0,2 ^a
MS z 50 S+ IAA 1,0	80	8,2 ± 0,4 ^a	2,8 ± 0,2 ^e
MS z 50 S+ IBA 1,0	95	6,7 ± 0,4 ^b	3,6 ± 0,2 ^{cd}
MS z 50 S+ NAA 1,0	85	5,0 ± 0,3 ^c	3,0 ± 0,2 ^e

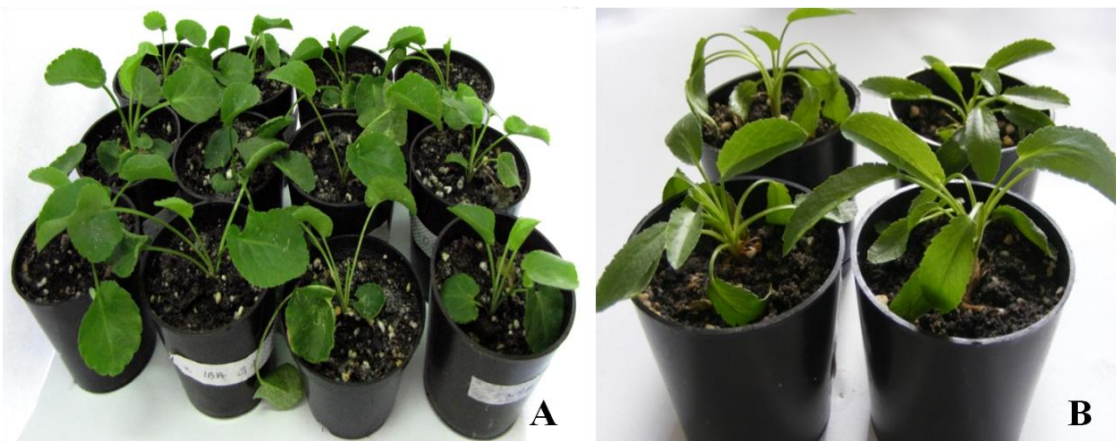
Średnie wartości w kolumnach z tą samą literą nie różnią się istotnie dla P=0,05 stosując test wielokrotnych porównań Duncana



Fot. 12 Pędy *E. campestre* ukorzenione na podłożach
A MS z 50 g l⁻¹ **B** MS z 50 g l⁻¹ + 1,0 g l⁻¹ IBA
C MS z 50 g l⁻¹ + 1,0 g l⁻¹ NAA (skala 1 cm)

1.1.5. Hartowanie roślin

Kolejnym etapem mikrorozmnażania była adaptacja zregenerowanych w kulturach *in vitro* młodych roślin do warunków środowiskowych. Rośliny przenoszono do doniczek ze specjalnie dobranym podłożem [Fot. 13,14]. Przenoszenie ukorzenionych roślin do warunków *ex vitro* było procesem trudnym, a przeżywalność roślin z zależności od gatunku wynosiła dla: *E. planum* 98%, *E. maritimum* 90%, *E. campestre* 67%.



Fot. 13 Rośliny otrzymane w wyniku mikrorozmnażania przed przesadzeniem na poletko doświadczalne
A *E. planum* **B** *E. campestre*



Fot. 14 *E. maritimum* – rośliny otrzymane w wyniku mikrorozmnażania, hartowane przed przesadzeniem na poletko Doświadczalne (skala 3 cm)

Rośliny otrzymane w wyniku mikrorozmnażania wysadzone na poletko doświadczalne, niezależnie od gatunku, były zdrowe, żywotne, jednakowe morfologicznie w obrębie gatunku. W drugim roku wegetacji wytwarzały pędy kwiatowe, a następnie owoce. Nie zauważono różnic fenotypowych roślin rozmnożonych w kulturach *in vitro* i roślin ze stanowiska naturalnego [Fot. 15-17].



Fot. 15 *E. planum* – rozmnożone w kulturach *in vitro* rośliny na poletku doświadczalnym
A pierwszy i B drugi rok wegetacji



Fot. 16. *E. maritimum* – rozmnożone w kulturach *in vitro* rośliny na poletku doświadczalnym
A pierwszy i B drugi rok wegetacji



Fot. 17 *E. campestre* – rozmnożone w kulturach *in vitro* rośliny na poletku doświadczalnym
A pierwszy i B drugi rok wegetacji

Podsumowanie wyników mikrorozmnażania gatunków z rodzaju *Eryngium* L.

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń opracowano metody mikrorozmnażania dla krajowych gatunków z rodzaju *Eryngium* L. Wykazano, iż mikrorozmnażanie ze szczytów pędów poprzez rozwój pąków bocznych trzech gatunków mikołajków, jest szybką i efektywną strategią otrzymywania stosunkowo dużej liczby nowych pędów, różnej dla poszczególnych gatunków. Stwierdzono, że eksplantaty pędowe wszystkich badanych gatunków reagowały podobnie na zmianę składu podłoża eksperymentalnych, zwłaszcza w zakresie regulatorów wzrostu i rozwoju roślin. Zjawisko to obserwowano na poziomie namnażania pędów. Dla inicjacji a następnie wzrostu kultur pędowych

i regeneracji największej liczby pędów najlepszą pożywką była MS z 1,0 mg l⁻¹ BAP i 0,1 mg l⁻¹ IAA. Taki wariant pożywki indukował 17 pędów z jednego eksplantatu *E. planum*, 13 pędów/eksplantat *E. campestre* i 4 pędów/eksplantat *E. maritimum*. Ważnym czynnikiem była obecność cytokininy w pożywce. Stosowanie wariantu pożywki bez BAP, zawierającej tylko IAA, dawało niską efektywność proliferacji pędów, co wskazuje, że proces ten był raczej spontaniczny i prawdopodobnie związany z obecnością endogennych cytokinin.

W wyniku mikrorozmnażania otrzymano pędy, które charakteryzowały się stabilnością genetyczną, co wykazała kontrola cytogenetyczna.

Pędy różnych gatunków reagowały odmiennie na warianty pożywek ukorzeniających, zarówno w zakresie stężeń soli mineralnych, sacharozy jak i typu auksyny.

Największą liczbę korzeni dla pędów indukowały warianty pożywek:

- ½ MS w 15 g l⁻¹ S i 0,1 mg l⁻¹ IAA dla *E. maritimum* (średnio 22 korzenie)
- MS w 50 g l⁻¹ S i 1,0 mg l⁻¹ IAA dla *E. campestre* (średnio 8 korzeni)
- MS w 50 g l⁻¹ S i 0,1 mg l⁻¹ NAA dla *E. planum* (średnio 4 korzenie)

Przeżywalność roślin w procesie przenoszenia do warunków *ex vitro* w zależności od gatunku wynosiła dla: *E. planum* 98%, *E. maritimum* 90%, *E. campestre* 67%.

1.2. Kultury korzeniowe

Kultury korzeni w płynnych korzeniach trzech gatunków *Eryngium* założono z uwagi na produkowane w korzeniach saponiny triterpenowe i kwasy fenolowe. Kultury korzeni, jako rodzaj kultury organów, poddane były ocenie fitochemicznej.

Eksplantatami do założenia kultur korzeniowych w płynnych pożywkach były fragmenty korzeni siewek i zregenerowanych w kulturach *in vitro* roślin oraz korzonki powstałe w wyniku ryzogenezy pośredniej z kalusa z ogonków liściowych.

Dla różnych typów kultur korzeniowych przyjęto oznaczenia:

KPs - kultury korzeniowe *E. planum* indukowane z fragmentów korzonków siewek;
KPr - kultury korzeniowe *E. planum* z fragmentów korzeni roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro*;

KPk - kultury korzeniowe *E. planum* z korzonków zregenerowanych na drodze ryzogenezy pośredniej;

KMr - kultury korzeniowe *E. maritimum* indukowane z fragmentów korzeni roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro*;

KCr - kultury korzeniowe *E. campestre* z fragmentów korzeni roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro*

Kultury korzeniowe *Eryngium planum* L. indukowane z fragmentów korzonków siewek (KPs)

Do założenia kultur korzeniowych mikołajka płaskolistnego w pożywkach płynnych wykorzystano fragmenty korzonków 30-dniowych siewek. Pobrano dwucentymetrowe odcinki korzonków głównych zawierające stożek wzrostu i hodowano w płynnych pożywkach suplementowanych auksynami.

Korzenie *E. planum* wzrastające w płynnych pożywkach podstawowych MS i B₅ wzbogaconych w IAA/IBA/NAA w stężeniu 1,0 mg l⁻¹ lub bez regulatorów wzrostu i rozwoju roślin (stanowiących kontrolę) kontynuowały wzrost i rozwój w czasie trwania kultury (18 tygodni). W dniu zakładania kultur korzenie siewek mikołajka płaskolistnego były cienkie i delikatne, barwy białej. Z czasem zwiększały biomasę przyrastając na długość i grubość, wytwarzając korzenie boczne kolejnych rzędów oraz zmieniały barwę na brunatną.

Przyrost biomasy korzeni w pożywkach B₅ na początku hodowli był niewielki, jednak zwiększał się z czasem prowadzenia kultury. Zaobserwowano znacznie słabszy rozwój korzeni w pożywce B₅ w porównaniu do pożywki MS. Korzenie w pożywce kontrolnej B₅ ulegały nieznacznemu wzrostowi wydłużeniowemu, sporadycznie następował rozwój pędów. W pożywce B₅ suplementowanej IBA nastąpił nieznaczny przyrost korzeni na długość i rozwinęły się korzenie boczne. W wariantach pożywek B₅ z IAA i NAA tworzył się kalus. W pożywce B₅ z NAA wzrost biomasy był minimalny, następował rozwój kalusa, a korzenie zamierały, dlatego kultura została zlikwidowana. Najlepszym wzrostem w pożywce B₅ charakteryzowały się korzenie rosnące z IBA [Fot. 18].

W pożywce MS, korzenie charakteryzowały się wolnym tempem przyrostu biomasy na początku trwania kultur, zwiększającym się w miarę upływu czasu. Po 18 tygodniach zaobserwowano, iż w pożywkach kontrolnych MS korzenie wykazywały większy

przyrost na długość niż w pożywkach suplementowanych auksynami, natomiast korzenie boczne rozwijały się najslabiej, stąd też najniższa wartość biomasy korzeniowej w pożywce MS (3,81 g). W kontroli sporadycznie następowała kaulogeneza, której nie obserwowano na korzeniach hodowanych w pożywkach z dodatkiem auksyn. Większą masę niż korzenie kontrolne osiągnęły korzenie w pożywkach MS suplementowanych NAA (4,44 g).

Ma to związek z tendencją korzeni do produkcji niewielkiej liczby korzeni bocznych pod wpływem NAA. Auksyna ta wpływała na kalusowanie eksplantatów. Maksymalny wzrost biomasy korzeniowej nastąpił w pożywce MS z dodatkiem IAA, po 18 tygodniach prowadzenia kultur korzenie zwiększyły biomasę ponad 1200-krotnie w stosunku do masy początkowej (12,56 g). Intensywny rozwój biomasy nastąpił również w pożywce z IBA. Kultura ta zwiększyła biomasę ponad 600-krotnie w odniesieniu do masy początkowej (6,13 g). Wiąże się to z obserwacją, iż korzenie hodowane w pożywkach z dodatkiem IAA i IBA charakteryzowały się wysokim stopniem indukcji i rozwojem licznych korzeni bocznych [Fot. 19].

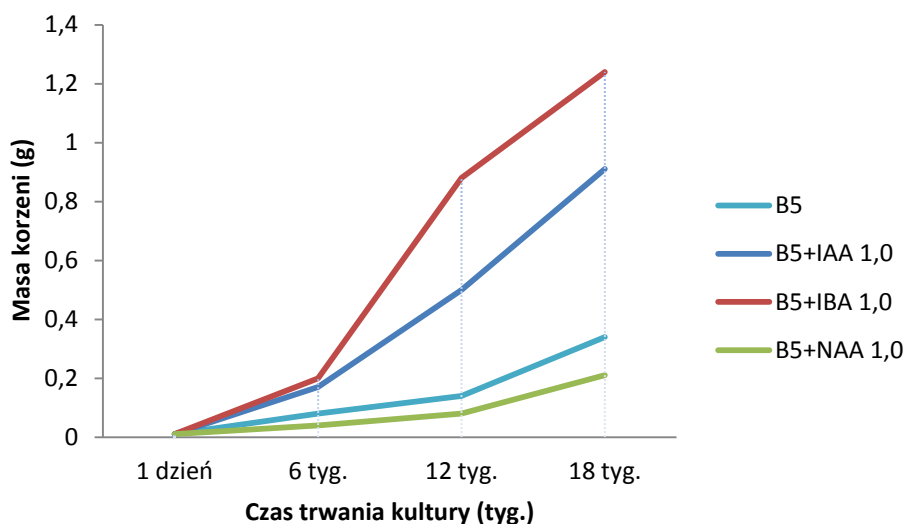
Wpływ pożywek B₅ i MS oraz auksyn na wzrost biomasy korzeni obrazuje tabela 26.

Tab. 26 Wpływ składu mineralnego pożywek i typu auksyny na przyrost biomasy korzeni *E. planum* indukowanych z wierzchołków korzeni siewek w czasie trwania 18 tygodniowej kultury

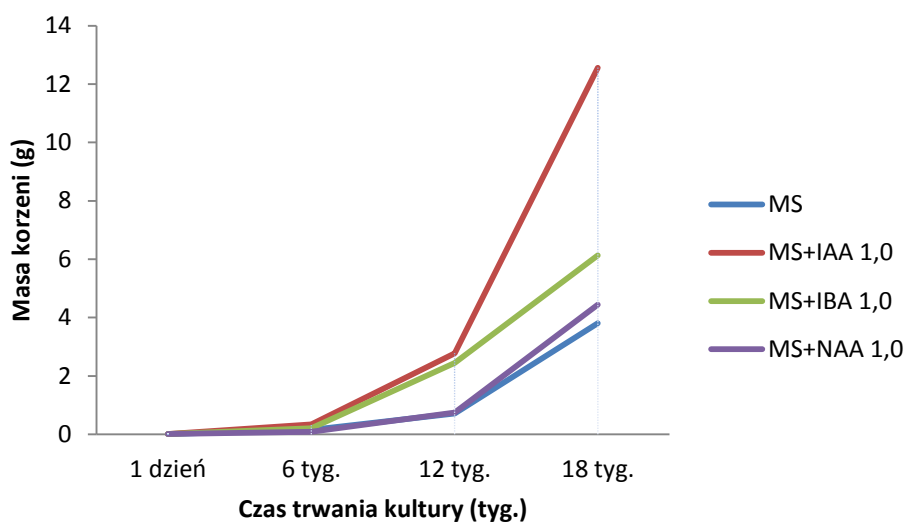
Symbol linii korzeni	Wariant pożywki [auksyny w mg l ⁻¹]	Masa korzeni [g] (±SE)			
		1 dzień	6 tyg.	12 tyg.	18 tyg.
KPs 1B-10B	B ₅	0,01 ± 0,0	0,08 ± 0,1	0,14 ± 0,0	0,34 ± 0,1 ^c
KPs 11B-20B	B ₅ +IAA 1,0	0,01 ± 0,0	0,17 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,91 ± 0,2 ^b
KPs 21B-30B	B ₅ +IBA 1,0	0,01 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,88 ± 0,3	1,24 ± 0,4 ^a
KPs 31B-40B	B ₅ +NAA 1,0	0,01 ± 0,0	0,04 ± 0,0	0,08 ± 0,0	0,21 ± 0,0 ^d
KPs 1M-10M	MS	0,01 ± 0,0	0,16 ± 0,1	0,71 ± 0,3	3,81 ± 2,0 ^c
KPs 11M-20M	MS+IAA 1,0	0,01 ± 0,0	0,34 ± 0,1	2,78 ± 1,0	12,56 ± 3,0 ^a
KPs 21M-30M	MS+IBA 1,0	0,01 ± 0,0	0,21 ± 0,1	2,45 ± 1,0	6,13 ± 2,0 ^b
KPs 31M-40M	MS+NAA 1,0	0,01 ± 0,0	0,09 ± 0,0	0,75 ± 0,1	4,44 ± 1,0 ^c

Średnie wartości w kolumnach z tą samą literą nie różnią się istotnie dla P=0,05 stosując test wielokrotnych porównań Duncana

Dla lepszego zobrazowania tempa wzrostu badanych kultur korzeniowych wykreślono krzywe przyrostu biomasy [Ryc. 21, 22].

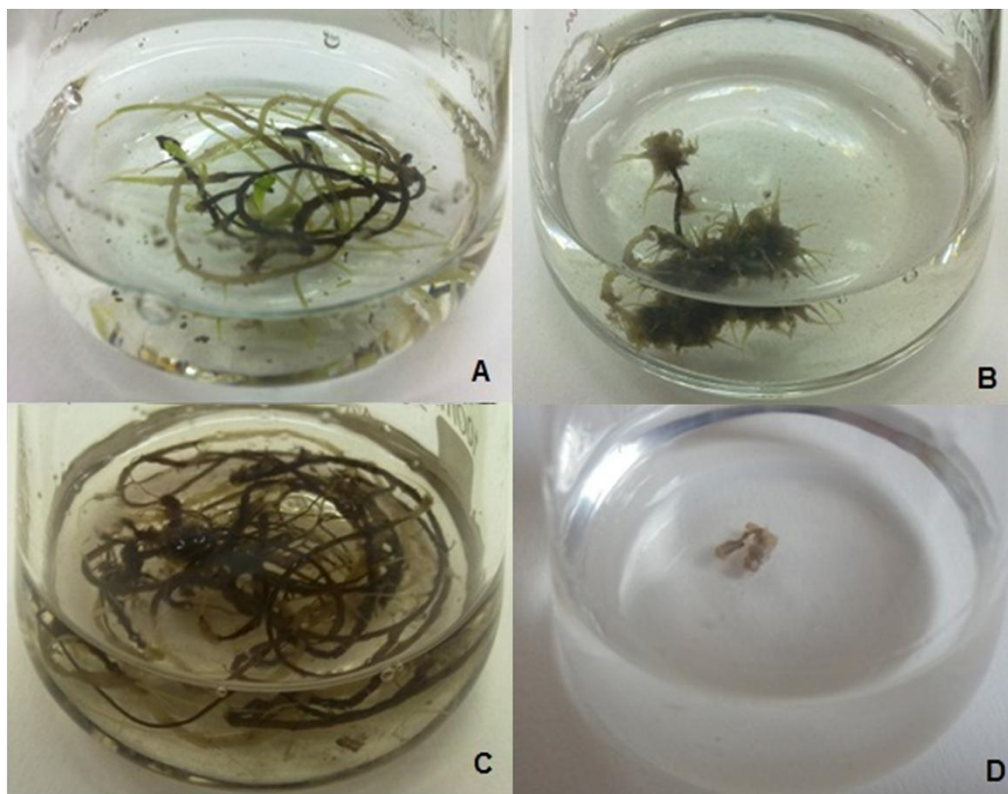


Ryc. 21 Przyrost biomasy w kulturze korzeniowej *E. planum* (KPs) w czterech wariantach pożywki B₅ w czasie 18 tygodni (auksyny w stężeniu 1,0 mg l⁻¹)

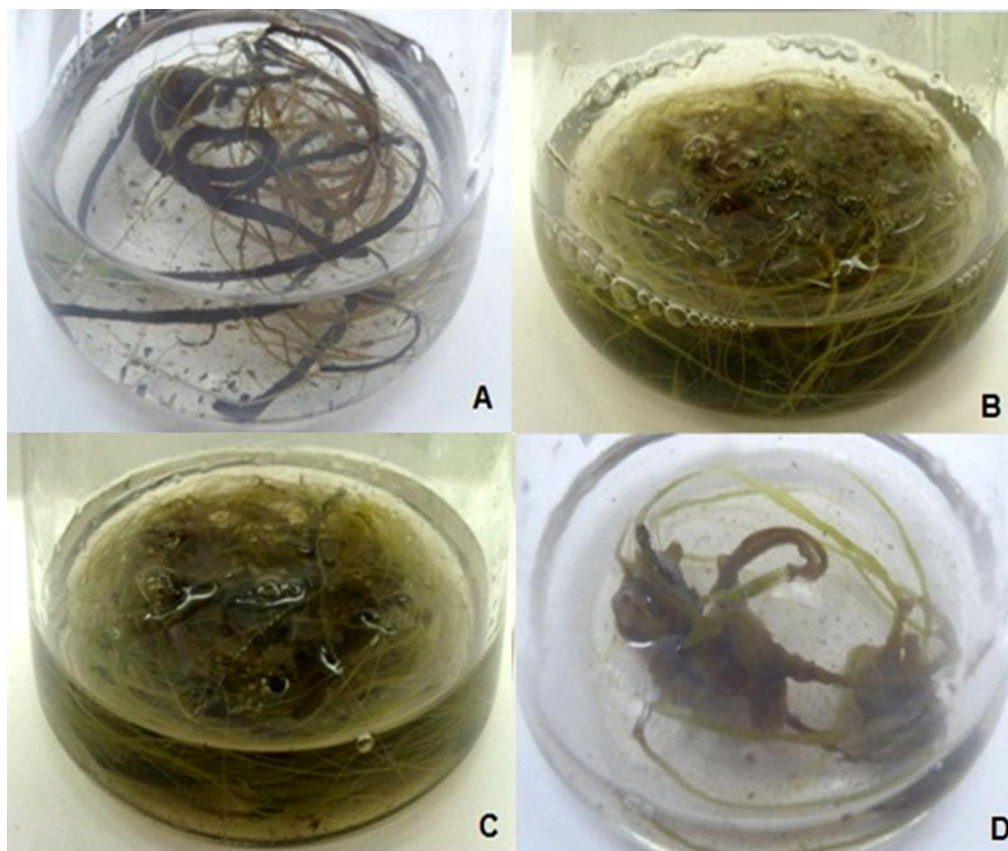


Ryc. 22 Przyrost biomasy w kulturze korzeniowej *E. planum* (KPs) w czterech wariantach pożywki MS w czasie 18 tygodni (auksyny w stężeniu 1,0 mg l⁻¹)

Analiza krzywych wzrostu biomasy korzeni [Ryc. 21, 22] hodowanych na 8 różnych wariantach pożywek potwierdza obserwacje morfologiczne, że rozwojowi korzeni *E. planum* najlepiej sprzyjała pożywka MS z IAA. Wysoki przyrost biomasy w tej pożywce jest związany z tworzeniem nowych korzeni bocznych. Znaczący przyrost biomasy korzeni następował dopiero w 12 tygodniu kultury. Z uwagi na dane literaturowe, wskazujące, że największą zawartość tych związków obserwuje się w młodych korzeniach, po 18 tygodniach kultury korzeniowe likwidowano i poddano analizie fitochemicznej na zawartość wybranych metabolitów.



Fot. 18 Kultury korzeniowe *E. planum* (KPs) w płynnych pożywkach B₅ po 18 tygodniach hodowli
 A B₅ B B₅ + 1,0 mg l⁻¹ IAA C B₅ + 1,0 mg l⁻¹ IBA D B₅ + 1,0 mg l⁻¹ NAA



Fot. 19 Kultury korzeniowe *E. planum* (KPs) w płynnych pożywkach MS po 18 tygodniach hodowli
 A MS B MS + 1,0 mg l⁻¹ IAA C MS + 1,0 mg l⁻¹ IBA D MS + 1,0 mg l⁻¹ NAA

Kultury korzeniowe *Eryngium planum* L. indukowane z fragmentów korzeni roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro* (KPr)

W drugim doświadczeniu do założenia płynnych kultur korzeniowych mikołajka płaskolistnego wykorzystano fragmenty korzeni roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro* roślin. Pobrano dwucentymetrowe odcinki korzeni głównych zawierające stożek wzrostu i hodowano w płynnych pożywkach suplementowanych auksynami i sacharozą w różnych stężeniach.

Wpływ składu mineralnego pożywek i typu auksyny na przyrost biomasy korzeni obrazuje tabela 27 oraz wykreślone krzywe przyrostu biomasy [Ryc. 23-17].

Korzenie *E. planum* wzrastające w płynnych pożywkach podstawowych MS i B₅ suplementowanych IAA/IBA/NAA (0,1; 1,0; 2,0 mg l⁻¹) lub bez regulatorów wzrostu i rozwoju roślin (stanowiących kontrolę) kontynuowały wzrost i rozwój w czasie trwania kultury (24 tygodnie). W dniu zakładania kultur korzenie pędów mikołajka płaskolistnego były cienkie i delikatne, barwy białej. Z czasem zwiększały biomasę przyrastając na długość i grubość, wytwarzając korzenie boczne kolejnych rzędów oraz zmieniały barwę na brunatną.

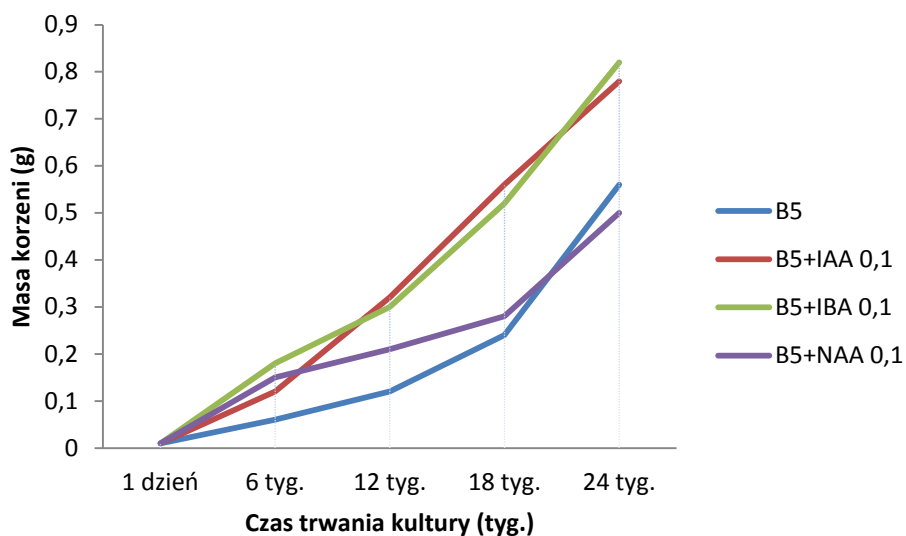
Najlepszym wzrostem i rozwojem charakteryzowały się korzenie *E. planum*, których kultury prowadzono w pożywkach MS o podwyższonych stężeniach sacharozy (60 g l⁻¹) i auksyny (2,0 mg l⁻¹) [Fot. 20]. W ciągu 24 tygodni biomasa korzeniowa wyraźnie wzrastała w pożywkach MS z wyższymi stężeniami auksyn (0,1 < 1,0 < 2,0 mg l⁻¹). Korzenie hodowane w obecności IAA i IBA charakteryzowały się dużym przyrostem biomasy oraz licznymi korzeniami bocznymi. Zwłaszcza w pożywce MS wzbogaconej w IBA korzenie wytwarzały gęstą sieć odgałęzień bocznych, tworząc trudną do rozdzielenia biomasę. W początkowym okresie hodowli korzenie rozwijające się w pożywkach kontrolnych wykazywały większą masę (poprzez wzrost wydłużeniowy korzeni głównych) niż w pożywkach z NAA. Pod koniec trwania kultur, korzenie hodowane w pożywce MS suplementowanej tą auksyną, wykazywały większy przyrost biomasy niż korzenie rosnące w kontrolnej pożywce MS. Powodem tego przyrostu była otoczka kalusowa pokrywająca korzenie w czasie trwania kultury. Na korzeniach, szczególnie u ich podstawy, obserwowano grubą otoczkę kalusową, we wszystkich opcjach pożywki wzbogaconej w sacharozę o podwyższonym stężeniu.

Podobnie jak w przypadku kultur korzeniowych wyprowadzonych z korzeni siewek (KPr), kultury KPr prowadzone w pożywkach B₅ charakteryzowały się znacznie gorszymi parametrami wzrostu. Przyrost biomasy korzeni w pożywkach B₅ na początku hodowli był niewielki, jednak zwiększał się w kolejnych tygodniach prowadzenia kultury.

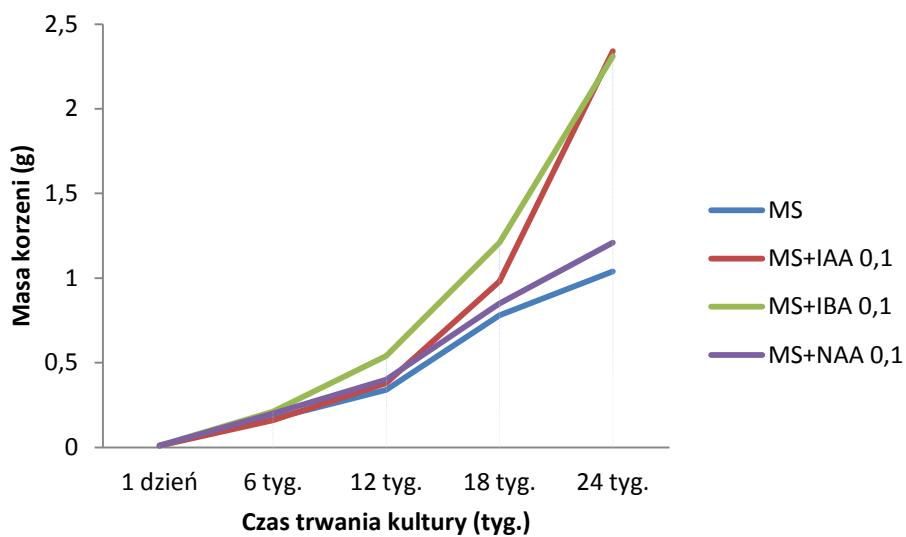
Tab. 27 Wpływ składu mineralnego pożywek i typu auksyny na przyrost biomasy korzeni *E. planum* indukowanych z wierzchołków korzeni pędów w czasie 24 tygodni kultury

Symbol linii korzeni	Wariant pożywki [auksyny w mg l ⁻¹ , sacharoza w g l ⁻¹]	Masa korzeni [g] (± SE)				
		1 dzień	6 tyg.	12 tyg.	18 tyg.	24 tyg.
KPr 1B-10B	B ₅	0,01± 0,0	0,06± 0,0	0,12± 0,0	0,24± 0,0	0,56± 0,1 ^b
KPr 11B-20B	B ₅ +IAA 0,1	0,01± 0,0	0,12± 0,0	0,32± 0,0	0,56± 0,1	0,78± 0,1 ^a
KPr 21B-30B	B ₅ +IBA 0,1	0,01± 0,0	0,18± 0,0	0,30± 0,0	0,52± 0,1	0,82± 0,2 ^a
KPr 31B-40B	B ₅ +NAA 0,1	0,01± 0,0	0,15± 0,0	0,21± 0,0	0,28± 0,0	0,50± 0,0 ^b
KPr 1M-10M	MS	0,01± 0,0	0,17± 0,0	0,34± 0,0	0,78± 0,2	1,04± 0,2 ^b
KPr 11M-20M	MS + IAA 0,1	0,01± 0,0	0,16± 0,0	0,38± 0,0	0,98± 0,2	2,34± 0,2 ^a
KPr 21M-30M	MS + IBA 0,1	0,01± 0,0	0,21± 0,0	0,54± 0,1	1,21± 0,5	2,31± 0,5 ^a
KPr 31M-40M	MS + NAA 0,1	0,01± 0,0	0,20± 0,0	0,40± 0,1	0,85± 0,2	1,21± 0,2 ^b
KPr 41M-50M	MS	0,01± 0,0	0,10± 0,0	0,42± 0,0	1,14± 0,4	1,78± 0,4 ^b
KPr 51M-60M	MS + IAA 1,0	0,01± 0,0	0,10± 0,0	0,51± 0,1	1,56± 0,2	2,80± 0,3 ^a
KPr 61M-70M	MS + IBA 1,0	0,01± 0,0	0,15± 0,0	0,48± 0,0	1,60± 0,1	2,65± 0,2 ^a
KPr 71M-80M	MS + NAA 1,0	0,01± 0,0	0,09± 0,0	0,23± 0,0	0,89± 0,1	1,56± 0,1 ^b
KPr 81M-90M	MS	0,01± 0,0	0,24± 0,0	0,78± 0,2	2,06± 0,5	3,21± 0,6 ^c
KPr 91M-100M	MS + IAA 2,0	0,01± 0,0	0,25± 0,0	0,82± 0,2	2,42± 0,3	4,45± 0,4 ^b
KPr 101M-110M	MS + IBA 2,0	0,01± 0,0	0,40± 0,0	1,98± 0,6	4,06± 0,8	6,16± 1,0 ^a
KPr 111M-120M	MS + NAA 2,0	0,01± 0,0	0,18± 0,0	0,58± 0,1	1,86± 0,2	3,98 ± 0,4 ^{bc}
KPr 121M-130M	MS	0,01± 0,0	0,41± 0,0	0,71± 0,2	2,76± 0,2	3,98± 0,3 ^c
KPr 131M-140M	MS z 60 S+ IAA 2,0	0,01± 0,0	0,52± 0,0	1,87± 0,6	4,67± 0,6	5,78± 0,9 ^b
KPr 141M-150M	MS z 60 S + IBA 2,0	0,01± 0,0	0,51± 0,0	1,56± 0,5	4,18± 0,6	8,32± 1,2 ^a
KPr 151M-1600M	MS z 60 S+ NAA 2,0	0,01± 0,0	0,24± 0,0	0,65± 0,1	1,98± 0,2	3,91± 0,3 ^c

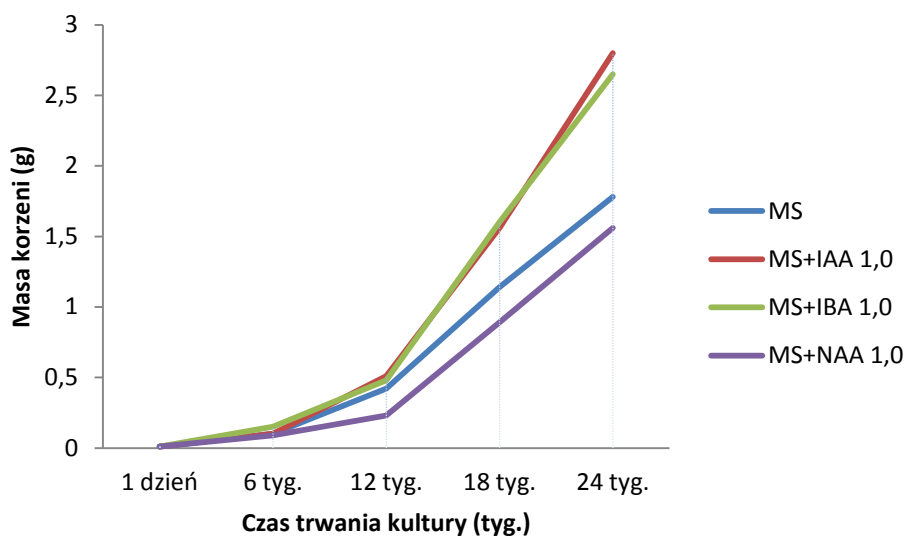
Średnie wartości w kolumnach z tą samą literą nie różnią się istotnie dla P=0,05 stosując test wielokrotnych porównań Duncana



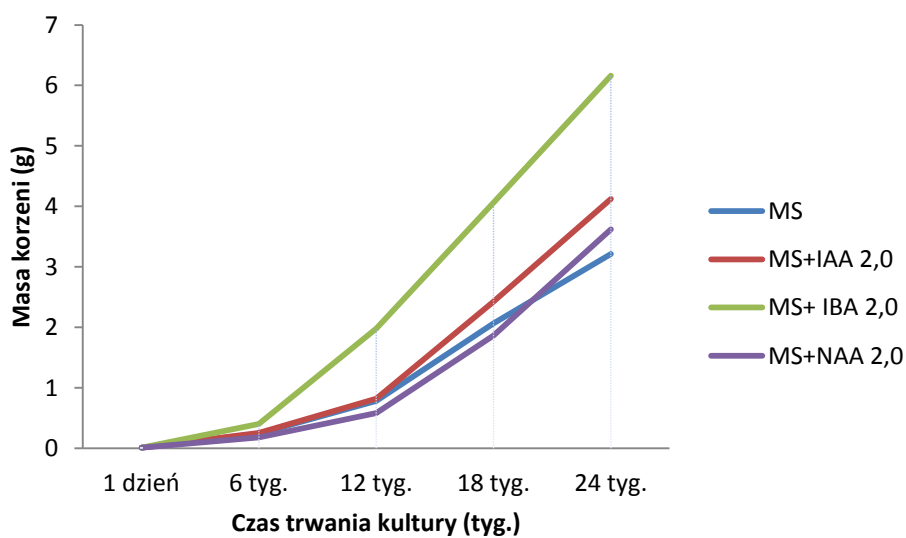
Ryc. 23 Przyrost biomasy z kultury korzeniowej *E. planum* (KPr) w czterech wariantach pożywki B₅ w czasie 24 tygodni (auksyny w stężeniu 0,1 mg l⁻¹)



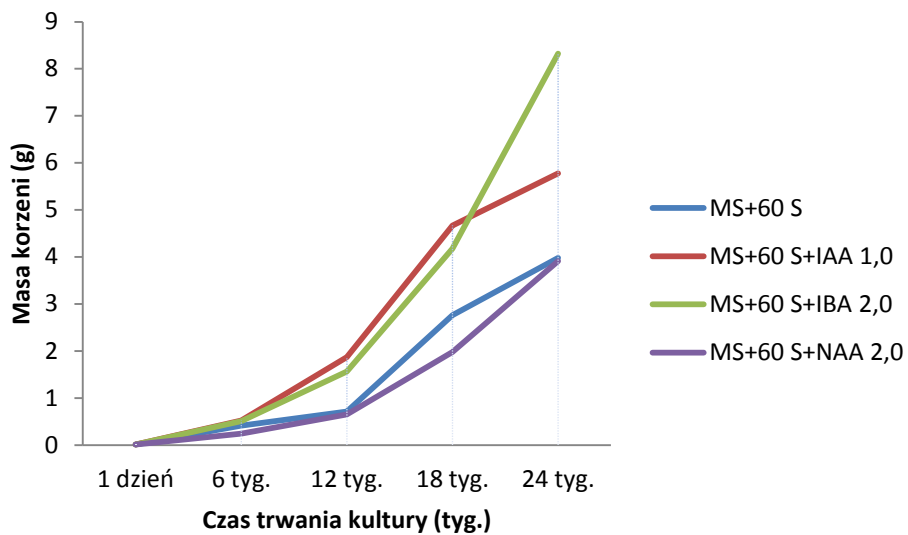
Ryc. 24 Przyrost biomasy z kultury korzeniowej *E. planum* (KPr) w czterech wariantach pożywki MS w czasie 24 tygodni (auksyny w stężeniu 0,1 mg l⁻¹)



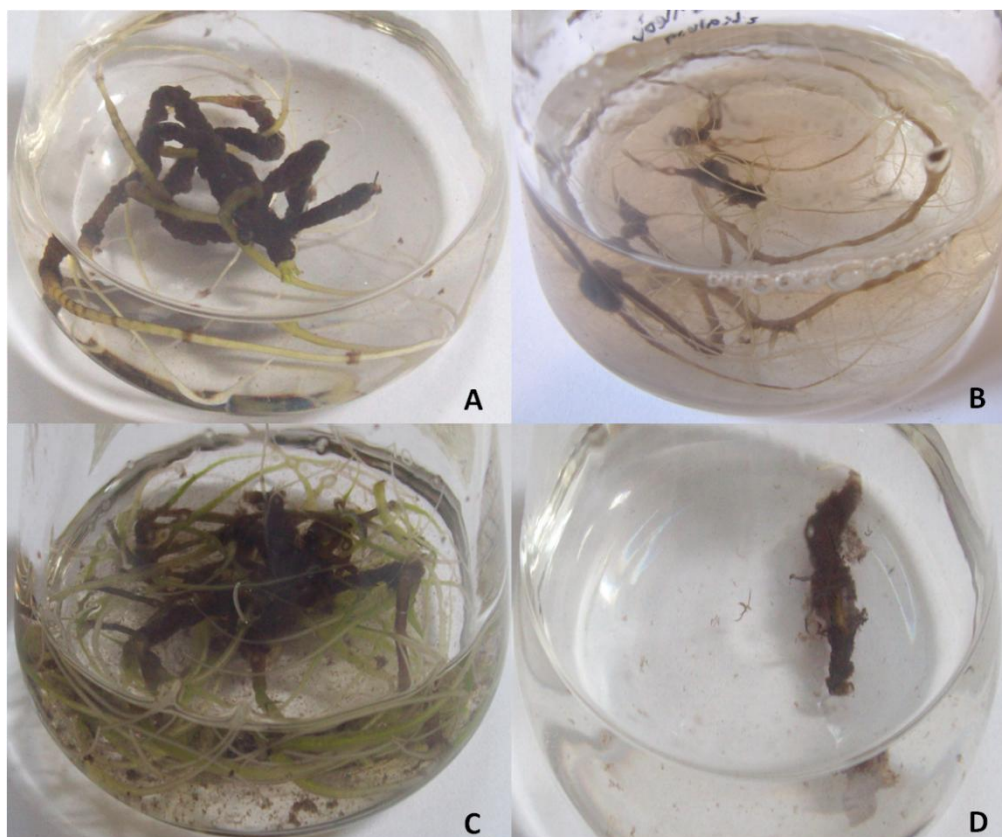
Ryc. 25 Przyrost biomasy z kultury korzeniowej *E. planum* (KPr) w czterech wariantach pożywki MS w czasie 24 tygodni (auksyny w stężeniu 1,0 mg l⁻¹)



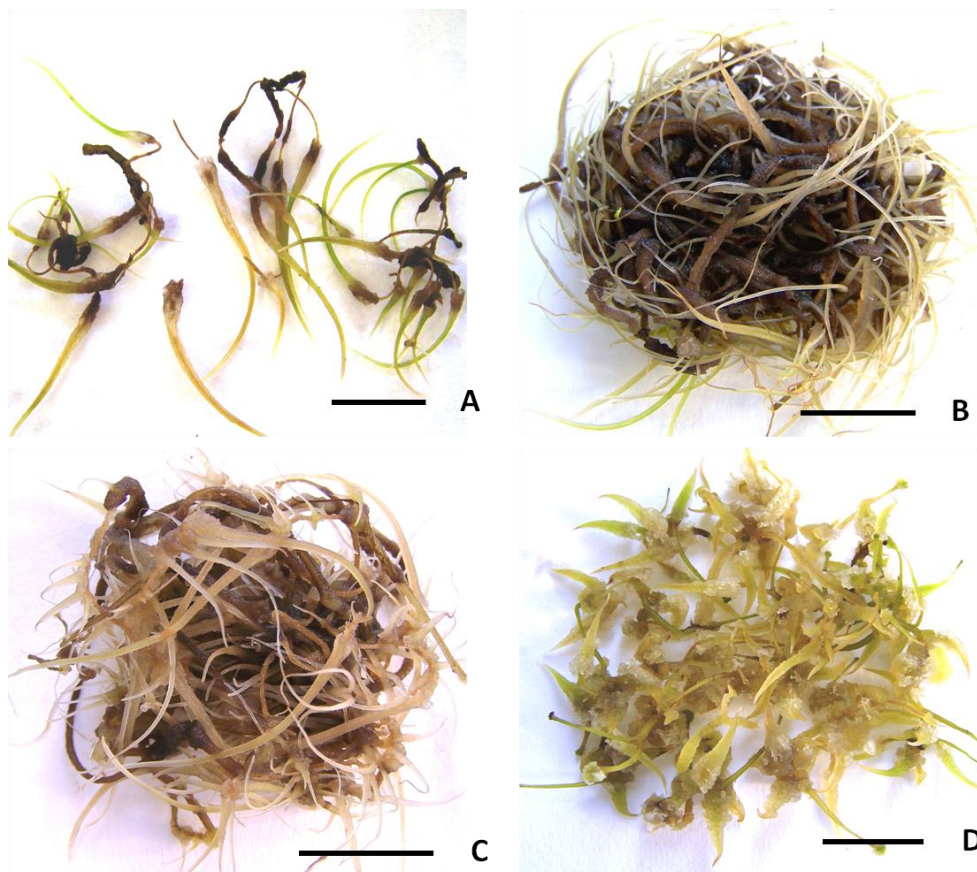
Ryc. 26 Przyrost biomasy z kultury korzeniowej *E. planum* (KPr) w czterech wariantach pożywki MS w czasie 24 tygodni (auksyny w stężeniu 2,0 mg l⁻¹)



Ryc. 27 Przyrost biomasy z kultury korzeniowej *E. planum* (KPr) w czterech wariantach pożywki MS w czasie 24 tygodni (sacharoza w stężeniu 60 g l^{-1} ; auksyny w stężeniu $2,0 \text{ mg l}^{-1}$)



Fot. 20 Kultury korzeniowe *E. planum* (KPr) w płynnej pożywce MS po 24 tygodniach hodowli
A MS z $60 \text{ g l}^{-1} \text{ S}$ **B** MS z $60 \text{ mg l}^{-1} \text{ S}$ + $2,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ IAA}$ **C** MS z $60 \text{ g l}^{-1} \text{ S}$ + $2,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ IBA}$
D MS z $60 \text{ g l}^{-1} \text{ S}$ + $2,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ NAA}$



Fot. 21 Korzenie z kultury *E. planum* (KPr) w płynnej pożywce MS po 24 tygodniach hodowli
A MS **B** MS + 1,0 mg l⁻¹ IAA **C** MS + 1,0 mg l⁻¹ IBA **D** MS + 1,0 mg l⁻¹ NAA

Dla tego typu kultur najlepszymi parametrami wzrostu i rozwoju cechowały się korzenie hodowane w pożywkach MS wzbogaconych fitohormonami i cukrem w podwyższonych stężeniach. Jednakże ze względu na wysoki stopień kalusowania eksplantatów nie wyselekcjonowano tego wariantu pożywki jako korzystnej do namnażania biomasy korzeniowej. Korzenie hodowane w pożywkach suplementowanych w auksyny o stężeniu 2,0 mg l⁻¹ uległy kontaminacji. Po 24 tygodniach kultury korzeniowe zlikwidowano i poddano analizie fitochemicznej na zawartość wybranych metabolitów. Z pożywki MS + IBA 1,0 mg l⁻¹, w której obserwowano najlepszy wzrost korzeni [Fot. 21, 22], przed likwidacją kultur, pobrano fragmenty korzeni i namnożono biomasę w tych samych warunkach.



Fot. 22 *E. planum* - namnożona biomasa korzeniowa (linia KPs15)
w pożywce MS + 1,0 mg l⁻¹ IAA (skala 1 cm)

Kultury korzeniowe *Eryngium planum* L. indukowane z korzonków zregenerowanych na drodze ryzogenezy pośredniej z kalusa

W doświadczeniu tym podjęto próbę indukcji korzeni poprzez organogenezę pośrednią, czyli na drodze regeneracji z kalusa. Jako eksplantaty wykorzystano ogonki liściowe pobrane z liści pędów mikołajka nadmorskiego zregenerowanych w kulturach *in vitro*. Ogonki liściowe o długości ok. 1cm izolowane z młodych, zdrowych i jędrnych liści umieszczano na pożywce MS + 1,0 mg l⁻¹ BAP + 3,0 mg l⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg l⁻¹ NAA. Rodzaj eksplantatu i suplementacja pożywki wybrana została na podstawie wcześniejszych badań dotyczących kultur komórkowych prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin. Na ogonkach liściowych kalus zaczął formować się już po dwóch tygodniach od założenia kultury. Wszystkie eksplantaty (50 sztuk) w całości pokrył kalus. W początkowym stadium rozwoju, kalus był zielono-żółty, z czasem stawał się coraz ciemniejszy, osiągając zabarwienie brunatne. Po 6 tygodniach kalus zaczął formować korzenie, których liczbę obliczono po upływie jednego miesiąca od indukcji pierwszych korzeni. Na jeden ogonek liściowy przypadało około 2-6 korzeni o długości około 1 cm. Korzenie te charakteryzowały się barwą białą i nie kontynuowały wzrostu w płynnych pożywkach, bez względu na wariant i suplementację (testowano pożywki MS i B₅ z auksynami – IAA, IBA i NAA w stężeniu 1,0 mg l⁻¹). Wierzchołki wzrostu przybierały brunatne zabarwienie, korzenie nie wydłużały się i nie wytwarzały korzeni bocznych.

Kultury korzeniowe *Eryngium maritimum* L. indukowane z fragmentów korzeni roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro* (KMr)

Do założenia płynnych kultur korzeniowych mikołajka nadmorskiego wykorzystano fragmenty korzeni roślin namnażanych w kulturach *in vitro*. Pobrano dwucentymetrowe odcinki korzeni głównych zawierające stożek wzrostu i hodowano w płynnych pożywkach suplementowanych auksynami w różnych stężeniach i sacharozą (60 g l⁻¹).

Korzenie *E.maritimum* wzrastające w płynnych pożywkach podstawowych ½ MS, MS i B₅ suplementowanych IAA/IBA/NAA (0,1; 1,0; 2,0 mg l⁻¹) lub bez regulatorów wzrostu i rozwoju roślin (stanowiących kontrolę) kontynuowały wzrost i rozwój w czasie trwania kultury (24 tygodnie). W dniu zakładania kultur korzenie pędów mikołajka płaskolistnego były cienkie i delikatne, barwy białej. Z upływem tygodni zwiększały biomasę przyrastając na długość i grubość, wytwarzając korzenie boczne kolejnych rzędów oraz zmieniały barwę na brunatną.

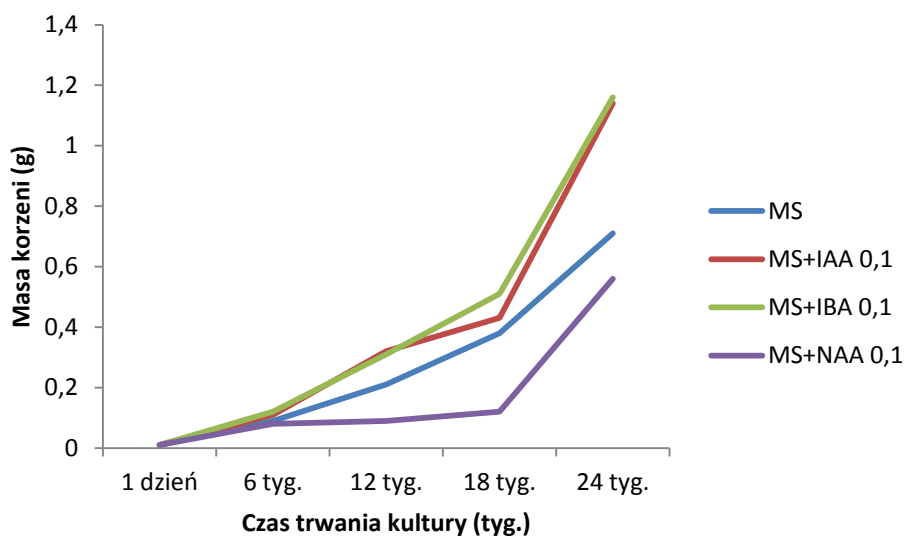
Najlepszym rozwojem charakteryzowały się korzenie rosnące w pożywkach suplementowanych IAA [Fot. 23] i nieco mniejszym IBA, bez względu na stężenie auksyny. Korzenie wykazywały przyrost na długość oraz wysoki potencjał indukcji i rozwoju korzeni bocznych, zarówno drugiego jak i trzeciego rzędu. Zdecydowanie najsłabszym rozwojem charakteryzowały się korzenie rosnące w pożywce z NAA – wykazywały znikomy przyrost na długość oraz wytwarzały najmniejszą liczbę korzonków bocznych. Ponadto korzenie pokrywała warstwa kalusa, narastającego w miarę upływu czasu trwania kultury. Najlepszymi parametrami wzrostu i rozwoju cechowały się korzenie rosnące w pożywkach ½ MS, co najprawdopodobniej związane jest z naturalnymi warunkami i ubogim podłożem, w jakim bytuje ten gatunek.

Wpływ pożywek i auksyn na przyrost biomasy korzeniowej *E. maritimum* obrazuje tabela 28 a dynamikę wzrostu korzeni przedstawiają ryciny 28-32.

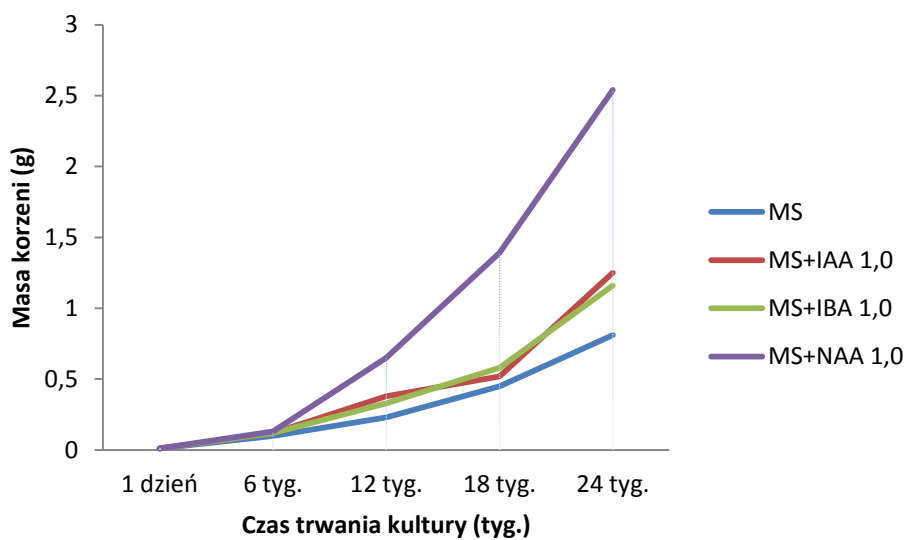
Tab. 28 Wpływ składu mineralnego pożywek i typu auksyny na przyrost biomasy w kulturze korzeni *E. maritimum* indukowanych z wierzchołków korzeni pędów w czasie 18 tygodni kultury

Symbol linii korzeni	Wariant pożywki [auksyny w mg l ⁻¹ , sacharoza w g l ⁻¹]	Masa korzeni [g] (± SE)				
		1 dzień	6 tyg.	12 tyg.	18 tyg.	24 tyg.
KMr 1M-10M	MS	0,01± 0,0	0,09± 0,0	0,21± 0,0	0,38± 0,1	0,71± 0,01 ^b
KMr 11M-20M	MS + IAA 0,1	0,01± 0,0	0,11± 0,0	0,32± 0,1	0,43± 0,1	1,14± 0,2 ^a
KMr 21M-30M	MS + IBA 0,1	0,01± 0,0	0,12± 0,0	0,31± 0,0	0,51± 0,1	1,16 ± 0,3 ^a
KMr 31M-40M	MS + NAA 0,1	0,01± 0,0	0,08± 0,0	0,09± 0,0	0,12± 0,0	0,56± 0,1 ^b
KMr 41M-50M	MS	0,01± 0,0	0,10± 0,0	0,23± 0,0	0,45± 0,0	0,81± 0,1 ^b
KMr 51M-60M	MS + IAA 1,0	0,01± 0,0	0,12± 0,0	0,38± 0,0	0,52± 0,1	1,25± 0,2 ^b
KMr 61M-70M	MS + IBA 1,0	0,01± 0,0	0,12± 0,0	0,33± 0,0	0,58± 0,1	1,16± 0,2 ^b
KMr 71M-80M	MS + NAA 1,0	0,01± 0,0	0,13± 0,0	0,65± 0,1	1,39± 0,2	2,54± 0,3 ^a
KMr 81M-90M	MS	0,01± 0,0	0,24± 0,0	0,29± 0,0	0,37± 0,0	0,51± 0,1 ^c
KMr 91M-100M	MS + IAA 2,0	0,01± 0,0	0,54± 0,1	1,35± 0,2	2,69± 0,3	4,82± 0,5 ^a
KMr 101M-110M	MS + IBA 2,0	0,01± 0,0	0,26± 0,0	0,51± 0,0	0,98± 0,1	2,08± 0,2 ^b
KMr 111M-120M	MS + NAA 2,0	0,01± 0,0	0,17± 0,0	0,28± 0,0	0,59± 0,1	0,98± 0,1 ^c
KMr 121M-130M	MS	0,01± 0,0	0,29± 0,0	0,46± 0,0	1,07± 0,2	2,87± 0,2 ^b
KMr 131M-140M	MS z 60 S+ IAA 2,0	0,01± 0,0	0,49± 0,0	1,22± 0,1	2,57± 0,2	5,17± 0,5 ^a
KMr 141M-150M	MS z 60 S+ IBA 2,0	0,01± 0,0	0,30± 0,0	0,62± 0,0	1,43± 0,2	3,23± 0,3 ^b
KMr 151M-160M	MS z 60 S+ NAA 2,0	0,01± 0,0	0,21± 0,0	0,46± 0,0	1,08± 0,1	2,98± 0,2 ^b
KMr 161M-170M	½ MS	0,01± 0,0	0,08± 0,0	0,54± 0,0	3,50± 0,3	4,25± 0,3 ^c
KMr 171M-180M	½ MS z 60S + IAA 2,0	0,01± 0,0	0,15± 0,0	1,60± 0,2	8,01± 0,5	12,03± 1,1 ^a
KMr 181M-190M	½ MS z 60 S+ IBA 2,0	0,01± 0,0	0,10± 0,0	0,82± 0,0	4,28± 0,3	6,92± 0,5 ^b
KMr 191M-200M	½ MS z 60 S+ NAA 2,0	0,01± 0,0	0,06± 0,0	0,22± 0,0	2,17± 0,2	4,58± 0,3 ^c

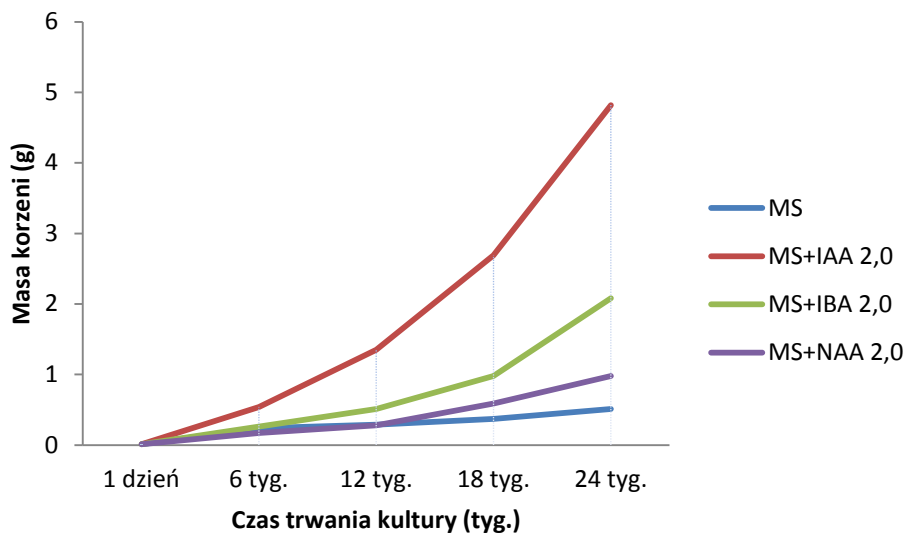
Średnie wartości w kolumnach z tą samą literą nie różnią się istotnie dla P=0,05 stosując test wielokrotnych porównań Duncana



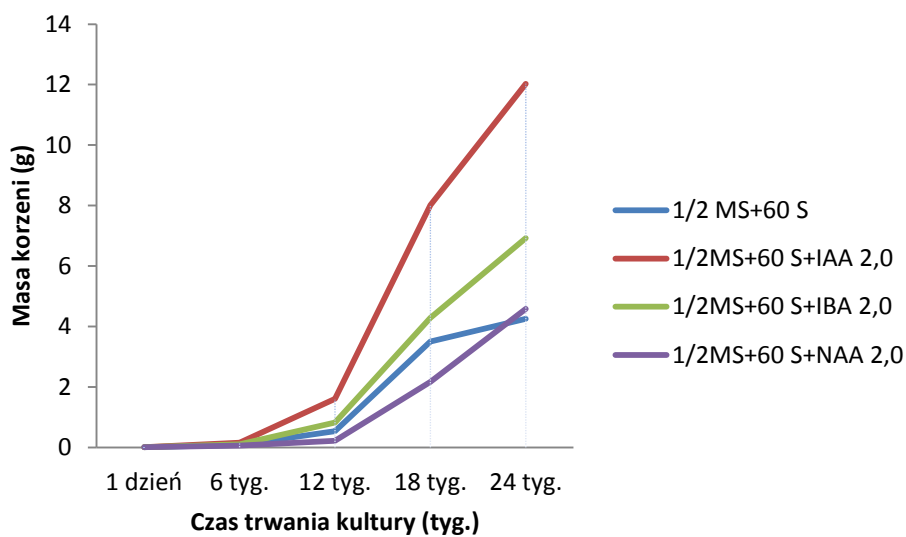
Ryc. 28 Przyrost biomasy w kulturze korzeniowej *E. maritimum* (KMr) w czterech wariantach pożywki MS w czasie 24 tygodni (auksyny w stężeniu 0,1 mg l⁻¹)



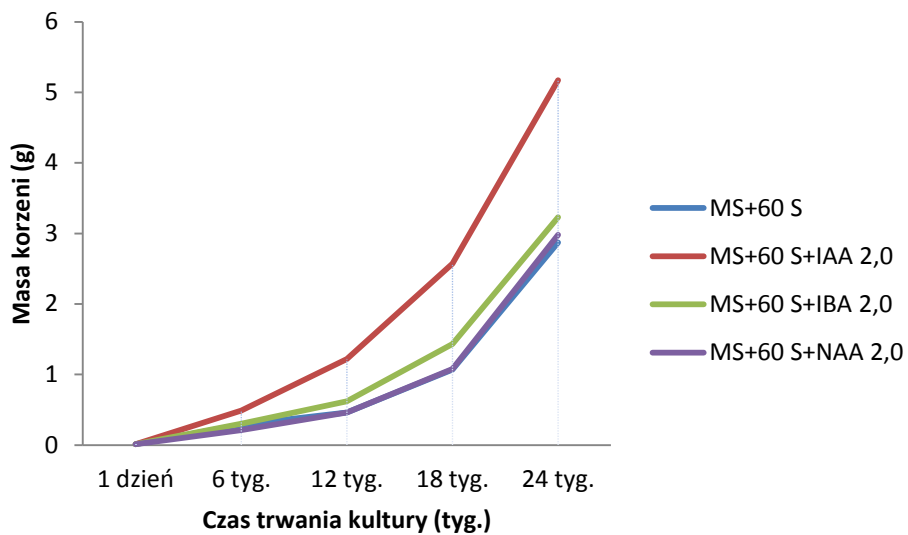
Ryc. 29 Przyrost biomasy w kulturze korzeniowej *E. maritimum* (KMr) w czterech wariantach pożywki MS w czasie 24 tygodni (auksyny w stężeniu 1,0 mg l⁻¹)



Ryc. 30 Przyrost biomasy w kulturze korzeniowej *E. maritimum* (KMr) w czterech wariantach pożywki MS w czasie 24 tygodni (auksyny w stężeniu 2,0 mg l⁻¹)



Ryc. 31 Przyrost biomasy w kulturze korzeniowej *E. maritimum* (KMr) w czterech wariantach pożywki 1/2 MS w czasie 24 tygodni (sacharoza w stężeniu 60 g l⁻¹, auksyny w stężeniu 0,1 mg l⁻¹)



Ryc. 32 Przyrost biomasy w kulturze korzeniowej *E. maritimum* (KMr) w czterech wariantach pożywki MS w czasie 24 tygodni (sacharoza w stężeniu 60 g l^{-1} , auksyny w stężeniu $0,1 \text{ mg l}^{-1}$)



Fot. 23 *E. maritimum* **A** korzenie (linia KMr 97M) namnożone w pożywce MS + $2,0 \text{ mg l}^{-1}$ IAA
B biomasa przeznaczona do analiz fitochemicznych (skala 1 cm)

Kultury korzeniowe *Eryngium campestre* L. indukowane z fragmentów korzeni roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro* (KCr)

Do założenia płynnych kultur korzeniowych mikołajka polnego wykorzystano fragmenty korzeni pędów namnażanych w kulturach *in vitro*. Pobrano dwucentymetrowe odcinki korzeni głównych zawierające stożek wzrostu i hodowano w płynnych pożywkach suplementowanych auksynami i sacharozą w różnych stężeniach.

Ze względu na nieduży współczynnik indukcji korzeni z pędów mikołajka polnego hodowanych na pożywkach MS suplementowanych niższymi stężeniami auksyn (w etapie mikrorozmnażania) oraz słabymi parametrami wzrostu korzeni mikołajka płaskolistnego rosnących w pożywkach B₅, w przypadku kultury korzeni *E. campestre* nie zastosowano pożywki MS + auksyny w stężeniu 0,1 mg l⁻¹ oraz pożywki Gamborga B₅.

Korzenie *E. campestre* wzrastające w płynnych pożywkach podstawowych MS suplementowanych IAA/IBA/NAA w stężeniach 1,0-2,0 mg l⁻¹ lub bez regulatorów wzrostu i rozwoju roślin (stanowiących kontrolę) kontynuowały wzrost i rozwój w czasie trwania kultury (24 tygodnie) [Tab. 29; Ryc. 33-36]. W dniu zakładania kultur korzenie pędów mikołajka polnego były cienkie i delikatne, barwy białej. W miarę upływu czasu zwiększały biomasę przyrastając na długość i grubość, wytwarzając korzenie boczne kolejnych rzędów oraz zmieniały barwę na brunatną.

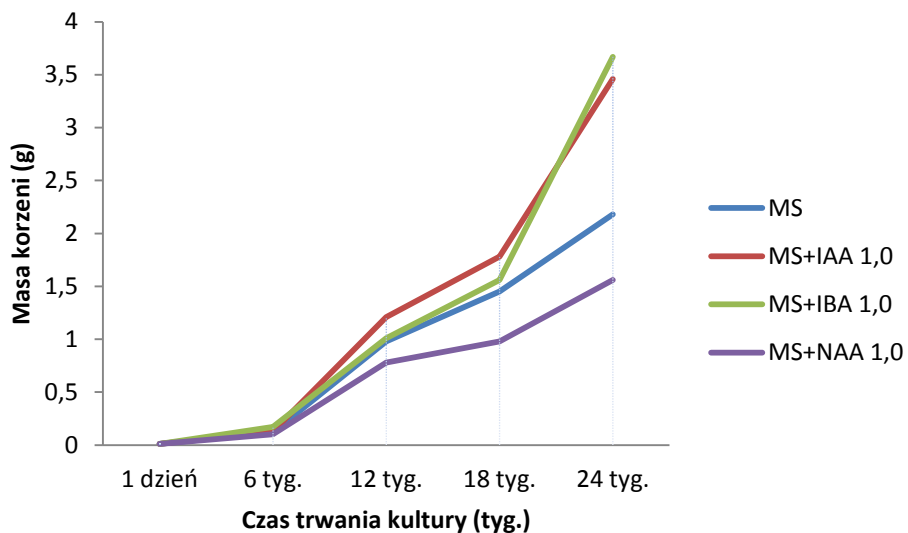
Najlepszym wzrostem i rozwojem charakteryzowały się korzenie *E. campestre*, których kultury prowadzono w pożywkach MS o podwyższonym stężeniu auksyny (2,0 mg l⁻¹). W ciągu 24 tygodni biomasa korzeniowa wyraźnie rosła w pożywkach MS suplementowanych wyższymi stężeniami auksyn (1,0 < 2,0 mg l⁻¹). Korzenie hodowane w obecności IAA i IBA charakteryzowały się dużym przyrostem biomasy oraz licznymi korzeniami bocznymi. W początkowym okresie hodowli korzenie rozwijające się w pożywkach bez auksyn, wykazywały większą masę, uzyskaną poprzez wzrost wydłużeniowy korzeni głównych, niż w pożywkach z NAA. Pod koniec trwania kultur, korzenie hodowane w pożywkę MS suplementowanej NAA, osiągały zbliżony lub większy przyrost biomasy niż korzenie rosnące w pożywkach MS. Korzenie te charakteryzowały się większą masą ze względu na pojawiającą się otoczkę kalusową pokrywającą korzenie główne i tworzącą się pod wpływem tego fitohormonu w czasie

trwania kultury, podobnie jak w kulturze korzeni pozostałych dwóch gatunków *Eryngium* [Fot. 24, 25].

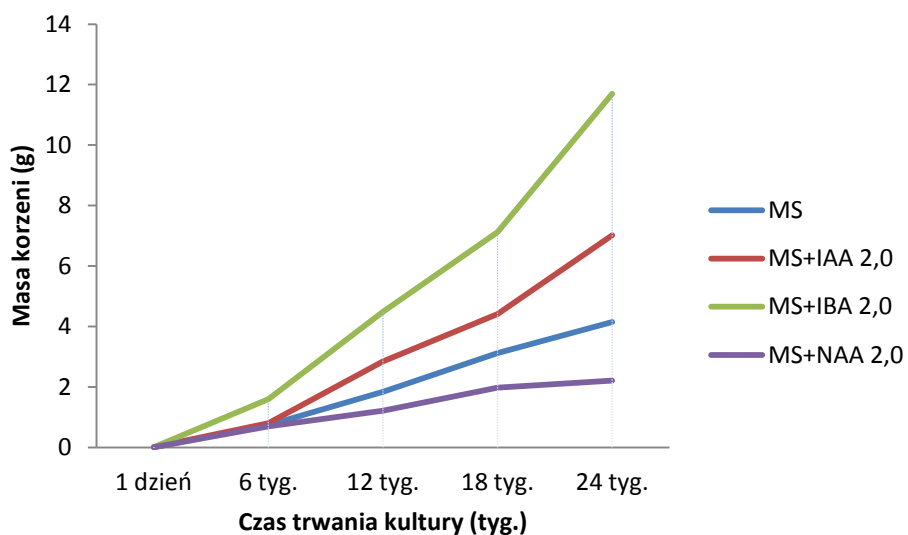
Tab. 29 Wpływ składu mineralnego pożywek i typu auksyny na przyrost biomasy korzeni *E. campestre* indukowanych z wierzchołków korzeni pędów w czasie 18 tygodni kultury

Symbol linii korzeniowej	Wariant pożywki [auksyny w mg l ⁻¹ , sacharoza w g l ⁻¹]	Masa korzeni [g] (±SE)				
		1 dzień	6 tyg.	12 tyg.	18 tyg.	24 tyg.
KCr 1M-10M	MS	0,01± 0,0	0,12± 0,0	0,98± 0,1	1,45± 0,2	2,18± 0,2 ^b
KCr 11M-20M	MS + IAA 1,0	0,01± 0,0	0,13± 0,0	1,21± 0,2	1,78± 0,2	3,46± 0,4 ^a
KCr 21M-30M	MS + IBA 1,0	0,01± 0,0	0,17± 0,0	1,01± 0,2	1,56± 0,2	3,67± 0,5 ^a
KCr 31M-40M	MS + NAA 1,0	0,01± 0,0	0,10± 0,0	0,78± 0,1	0,98± 0,2	1,56± 0,2 ^c
KCr 41M-50M	MS	0,01± 0,0	0,74± 0,1	1,84± 0,2	3,12± 0,3	4,15± 0,5 ^c
KCr 51M-60M	MS + IAA 2,0	0,01± 0,0	0,80± 0,0	2,84± 0,3	4,41± 0,4	7,02± 0,9 ^b
KCr 61M-70M	MS + IBA 2,0	0,01± 0,0	1,59± 0,2	4,48± 0,5	7,12± 0,5	11,7± 1,5 ^a
KCr 71M-80M	MS + NAA 2,0	0,01± 0,0	0,69± 0,1	1,21± 0,1	1,98± 0,2	2,21± 0,3 ^d
KCr 81M-90M	MS	0,01± 0,0	0,32± 0,0	1,04± 0,2	1,84± 0,3	2,98± 0,3 ^b
KCr 91M-100M	MS z 60 S+ IAA 2,0	0,01± 0,0	0,74± 0,1	2,84± 0,3	4,41± 0,5	7,14± 1,0 ^a
KCr 101M-110M	MS z 60 S + IBA 2,0	0,01± 0,0	0,44± 0,0	2,12± 0,2	4,52± 0,5	7,69± 1,2 ^a
KCr 111M-120M	MS z 60 S+ NAA 2,0	0,01± 0,0	0,16± 0,0	0,84± 0,1	1,82± 0,2	2,73± 0,3 ^b
KCr 121M-130M	½ MS	0,01± 0,0	0,09± 0,0	0,50± 0,0	2,57± 0,4	3,75± 0,5 ^b
KCr 131M-140M	½ MS z 60 S+ IAA 2,0	0,01± 0,0	0,22± 0,0	1,02± 0,2	4,08± 0,7	8,21± 1,3 ^a
KCr 141M-150M	½ MS z 60S + IBA 2,0	0,01± 0,0	0,12± 0,0	0,53± 0,1	3,25± 0,5	7,15± 1,4 ^a
KCr 151M-160M	½ MS z 60 S+ NAA 2,0	0,01± 0,0	0,09± 0,0	0,48± 0,0	2,89± 0,3	3,96± 0,6 ^b

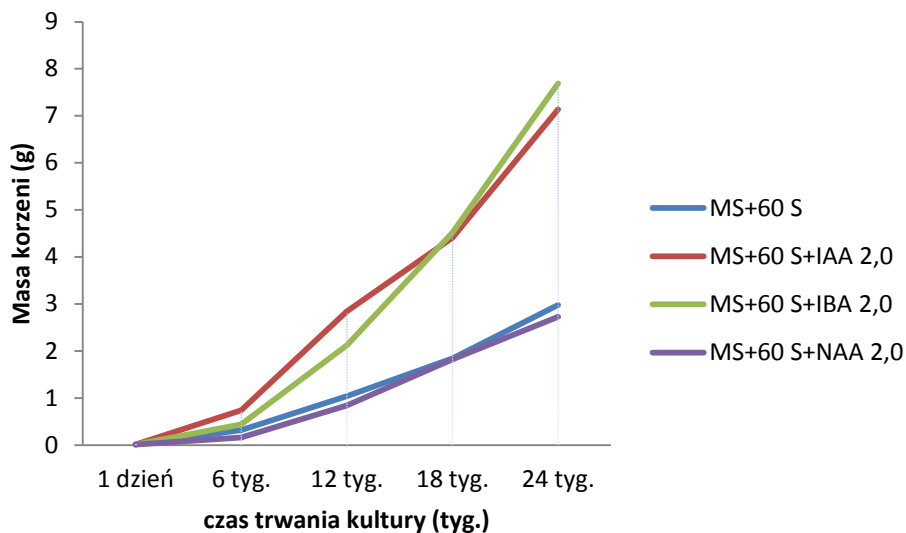
Średnie wartości w kolumnach z tą samą literą nie różnią się istotnie dla P=0,05 stosując test wielokrotnych porównań Duncana



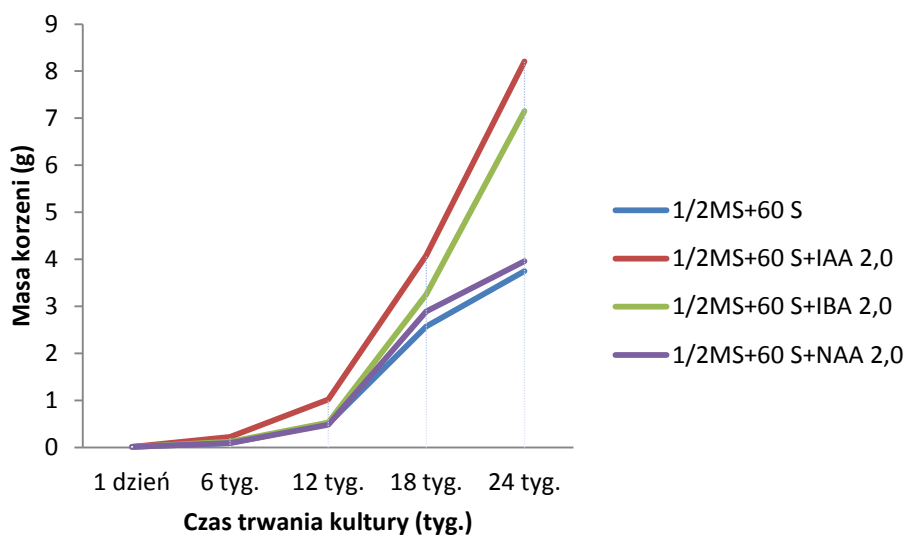
Ryc. 33 Przyrost biomasy w kulturze korzeniowej *E. campestre* (KCr) w czterech wariantach pożywki MS w czasie 24 tygodni (auksyny w stężeniu 1,0 mg l⁻¹)



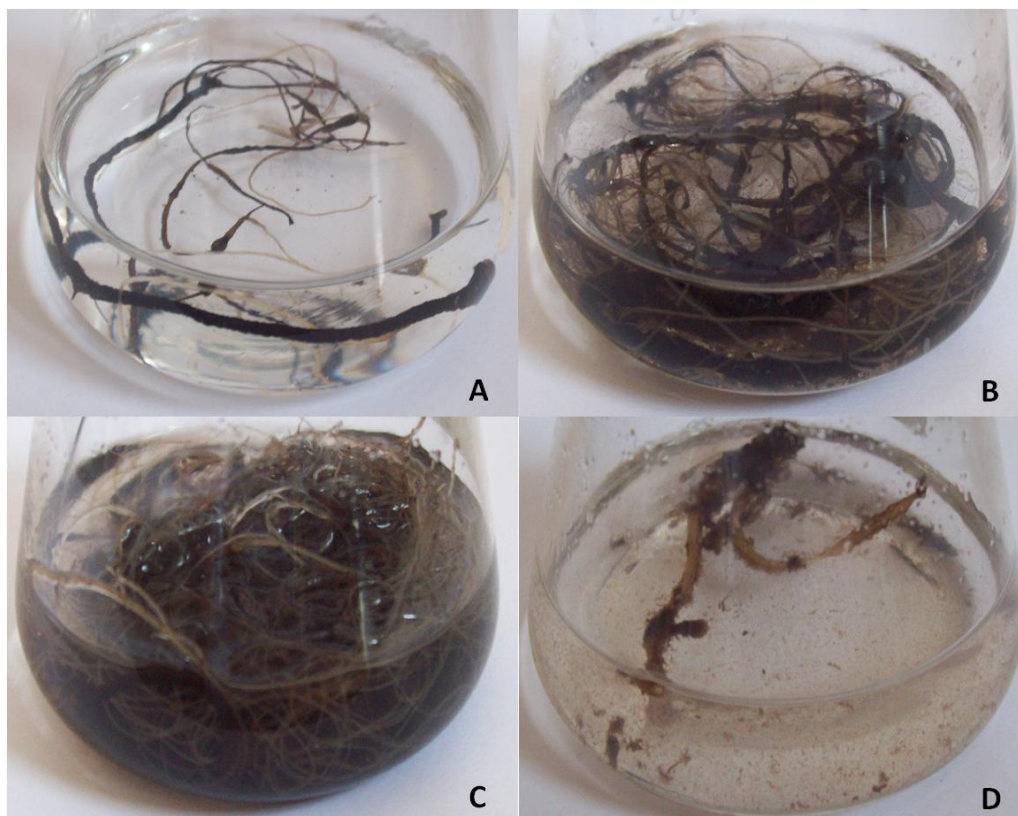
Ryc. 34 Przyrost biomasy w kulturze korzeniowej *E. campestre* (KCr) w czterech wariantach pożywki MS w czasie 24 tygodni (auksyny w stężeniu 2,0 mg l⁻¹)



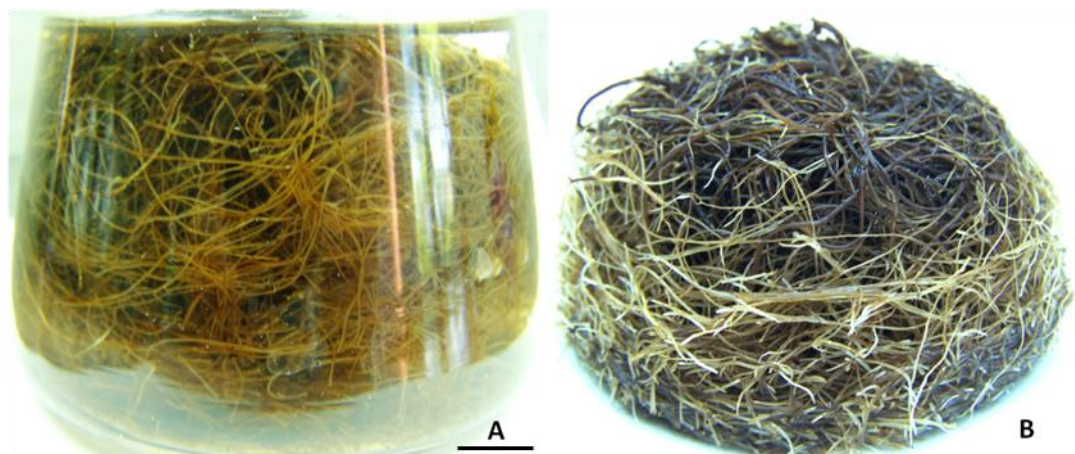
Ryc. 35 Przyrost biomasy w kulturze korzeniowej *E. campestre* (KCr) w czterech wariantach pożywki MS w czasie 24 tygodni (sacharoza w stężeniu 60 g l⁻¹, auksyny w stężeniu 2,0 mg l⁻¹)



Ryc. 36 Przyrost biomasy w kulturze korzeniowej *E. campestre* (KCr) w czterech wariantach pożywki 1/2 MS w czasie 24 tygodni (sacharoza w stężeniu 60 g l⁻¹, auksyny w stężeniu 2,0 mg l⁻¹)

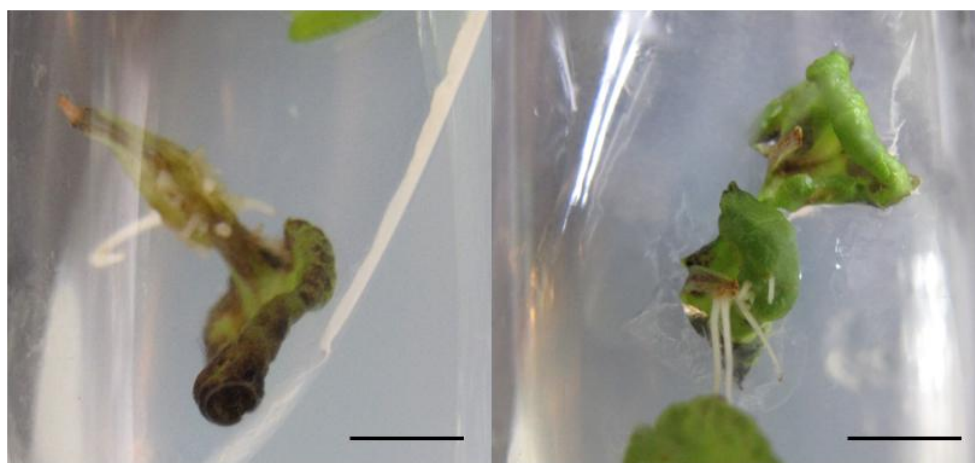


Fot. 24 Kultury korzeniowe *E. campestre* (KCr) w płynnej pożywce MS po 24 tygodniach hodowli
A MS **B** MS z 60 g l⁻¹ S + 2,0 mg l⁻¹ IAA **C** MS z 60 g l⁻¹ S + 2,0 mg l⁻¹ IBA
D MS z 60 g l⁻¹ S + 2,0 mg l⁻¹ NAA



Fot. 25 *E. campestre* **A** korzenie (linia KCr 61M) namnożone w pożywce MS + 2,0 mg l⁻¹ IBA
B biomasa przeznaczona do analiz fitochemicznych (skala 1 cm)

W pracy podjęto próby indukcji korzeni transformowanych dla wszystkich trzech gatunków *Eryngium*, z różnych eksplantatów: fragmentów siewek oraz blaszek i ogonków liściowych roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro*. Przeprowadzono liczne doświadczenia infekując eksplantaty trzema różnymi szczepami agropinowymi *Agrobacterium rhizogenes* (A4 z plazmidem pRi A4, LBA9402 z plazmidem pRi 1855, ATCC 15834 z plazmidem pRi 15834) otrzymanymi z dwóch różnych źródeł – Katedry Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz Zakładu Biologii Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin Leczniczych Uniwersytetu Medycznego w Warszawie. Zastosowano metodę zakażenia eksplantatów zawiesiną bakterii za pomocą sterylnej igły oraz metodą kokultywacji tzn. inkubacji eksplantatów z zawiesiną *Agrobacterium*. Wydajność procesu infekcji eksplantatów tą bakterią starano się zwiększyć poprzez dodanie do podłoża związku fenolowego – acetosyringonu. Dla gatunku *E. planum* otrzymano indukcję korzeni w miejscu infekcji szczepem agropinowym A4 dla 40% eksplantatów. Najlepszymi eksplantatami do indukcji korzeni były ogonki liściowe liści wykładanych na pożywki z acetosyringonem [Fot. 26]. Kultury korzeni utrzymywane w pożywce z antybiotykiem do 5 pasażu, jeszcze przed potwierdzeniem transformacji, uległy zniszczeniu wskutek awarii wszystkich wytrząsarek. Jednakże analizując cechy morfologiczne otrzymanych korzeni, można było wywnioskować, iż korzenie powstałe na eksplantatach z siewek i roślin mikołajka płaskolistnego były organami przybyszowymi powstałymi na drodze organogenezy bezpośredniej. Korzenie przeniesione do płynnej pożywki MS, także tej suplementowanej auksynami, nie podejmowały wzrostu, ciemniały i obumierały po kilkunastu dniach kultury.



Fot. 26 Korzenie *E. planum* wyrastające z miejsc infekcji ogonków liściowych szczepem A4 *A. rhizogenes* (skala 1 cm)

Po szeregu nieudanych próbach otrzymania kultury korzeni transformowanych można wnioskować, że gatunki rodzaju *Eryngium* nie należą do roślin łatwo poddających się tzw. agroinfekcji. Wstępne wyniki doświadczeń prób indukcji i hodowli korzeni transformowanych krajowych gatunków rodzaju *Eryngium* – *E. planum*, *E. alpinum* i *E. campestre* zostały opisane w krótkim doniesieniu konferencyjnym Thiem, Kikowska [2009].

Ze względu na fakt, iż podjęte próby otrzymania kultury korzeni transformowanych nie przyniosły oczekiwanych rezultatów, podjęto szereg badań korzeni nie-transformowanych, które opisano wcześniej.

Podsumowanie wyników z kultur korzeniowych gatunków z rodzaju *Eryngium* L.

Otrzymano szereg linii kultur korzeni normalnych (nie-transformowanych) *E. planum*, *E. maritimum* i *E. campestre*.

Korzenie w płynnych pożywkach wszystkich gatunków mikołajków charakteryzowały się wolnym tempem przyrostu biomasy na początku trwania kultur, zwiększającym się w miarę upływu czasu. W dniu zakładania kultur korzenie mikołajków były cienkie i delikatne, barwy białej. Z czasem zwiększały biomasę przyrastając na długość i grubość, wytwarzając korzenie boczne kolejnych rzędów oraz zmieniały barwę na brunatną. Korzenie rosnące w pożywce B₅ charakteryzowały się znacznie słabszym rozwojem, w porównaniu do pożywki MS. Dobrymi parametrami wzrostu i rozwoju cechowały się korzenie *E. maritimum* i *E. campestre* rosnące w pożywkach ½ MS, co jest najprawdopodobniej związane z naturalnymi warunkami w jakich bytują te gatunki. Biomasa korzeniowa wyraźnie rosła w pożywkach MS wraz ze wzrostem stężeń auksyn. Korzenie hodowane w obecności IAA i IBA charakteryzowały się dużym przyrostem biomasy oraz licznymi korzeniami bocznymi. Natomiast dodatek NAA lub wysokiego stężenia sacharozy skutkowało wytworzeniem się otoczki kalusowej na powierzchni korzeni głównych.

Spośród testowanych eksplantatów inicjalnych *E. planum*, najlepszym przyrostem biomasy charakteryzowały się kultury korzeniowe zapoczątkowane z fragmentów korzeni, zregenerowanych w kulturach *in vitro* pędów, w porównaniu z korzonkami siewek czy indukowanymi z kalusa. W przypadku korzeni zregenerowanych na drodze organogenezy pośredniej, wierzchołki wzrostu przybierały brunatne zabarwienie, korzenie nie wydłużały się i nie wytwarzały korzeni bocznych.

Dla każdego gatunku wyselekcjonowano linię kultury komórkowej charakteryzującą się wysokim przyrostem biomasy i namnożono do dalszych badań. Były to:

- **KPs 15M** – kultura korzeniowa *E. planum* założona z fragmentów korzeni siewek zregenerowanych w kulturach *in vitro*, rosnąca w pożywce MS z 1,0 mg⁻¹ IAA (otrzymana z 15 korzenia pobranego do doświadczenia); korzenie były grube i charakteryzowały się żółto-brunatną barwą

- **KMr 61M** – kultura korzeniowa *E. maritimum* założona z fragmentów korzeni roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro*, rosnąca w pożywce MS z 2,0 mg⁻¹ IBA (otrzymana z 61 korzenia pobranego do doświadczenia); cienkie korzenie o barwie brunatnej

- **KCr 97M** - – kultura korzeniowa *E. campestre* założona z fragmentów korzeni roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro*, rosnąca w pożywce MS z 2,0 mg⁻¹ IAA (otrzymana z 97 korzenia pobranego do doświadczenia); korzenie były cienkie o żółto-brunatnej barwie

1.3. Kultury pędowe

Z uwagi na fakt, iż w badanych gatunkach saponiny triterpenowe i kwasy fenolowe również są produkowane w częściach nadziemnych mikołajków założono kultury pędowe w płynnych pożywkach dla wszystkich trzech gatunków *Eryngium*.

Kultury pędowe założono umieszczając w płynnych pożywkach zdrowe, charakteryzujące się prawidłową morfologią i kondycją fizjologiczną pędy, pochodzące z kolekcji mikołajków zregenerowanych i namnożonych w warunkach *in vitro*. Wariant pożywki wyselekcjonowano na podstawie wyników mikrorozmnażania, najkorzystniejszą dla rozwoju pędów była pożywka MS z BAP 1,0 mg l⁻¹ i IAA 0,1 mg l⁻¹.

Kultury pędów mikołajków w płynnych pożywkach zainicjowano w celu otrzymania biomasy pędowej i wykreślenia krzywej wzrostu służącej wyznaczeniu dnia wykonania zabiegów biotechnologicznych, a następnie przeprowadzenia oceny fitochemicznej.

Kultury pędowe *Eryngium planum* L.

Ze skupiska namnożonych w kulturach *in vitro* pędów mikołajka płaskolistnego wybrano pojedyncze rozetki o długości liści 3 – 5 cm i przekładano do kolb z płynnymi pożywkami MS suplementowanymi BAP 1,0 mg l⁻¹ i IAA 0,1 mg l⁻¹. Kultury prowadzono na wytrząsarce rotacyjnej przez okres 30 dni [Fot. 27].



Fot. 27 *E. planum* w kulturze *in vitro* **A** kultury pędowe na wytrząsarce rotacyjnej **B** kultura pędowa w 30 dniu hodowli (skala 1 cm)

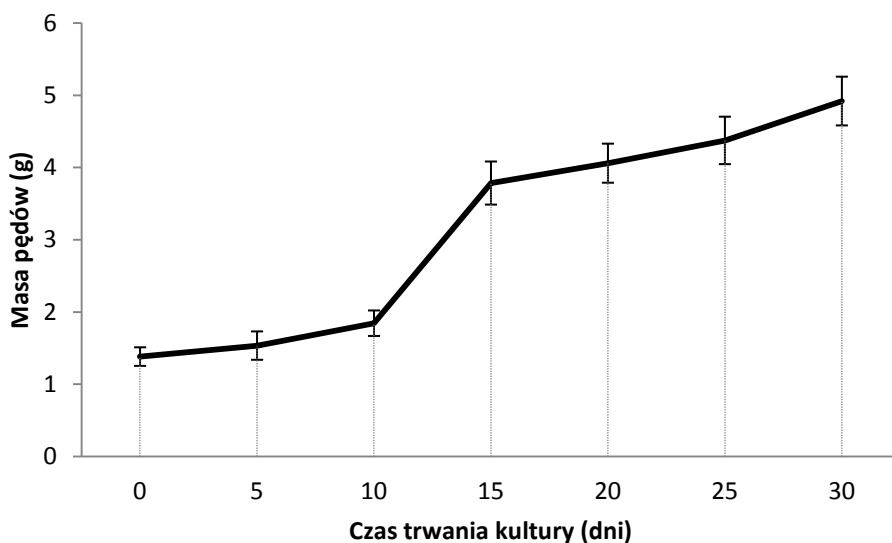
Pędy *E. planum* w nieelicytowanej kulturze płynnej (kontrolnej) charakteryzowały dobre parametry hodowli: szybki wzrost, poprawny turgor i żywo-zielone zabarwienie

przez cały okres kultury [Fot. 27]. Wzrost biomasy pędowej, określany na podstawie pomiaru świeżej masy pędów co 5 dni przez cały okres trwania hodowli (30 dni), następował w wyniku rozrostu blaszki liściowej, wzrostu wydłużeniowego ogonków liściowych oraz rozwoju nowych pędów z istniejących merystemów pąków bocznych. Poprawny turgor oraz zielone zabarwienie pędów świadczyły o dobrej kondycji fizjologicznej eksplantatów [Fot. 28].



Fot. 28 *E. planum* **A** pojedynczy pęd po 30 dniach hodowli **B** biomasa z kultur pędowych przeznaczona do oceny fitochemicznej (skala 1 cm)

Przyrost biomasy pędowej mikołajka płaskolistnego był niezauważalny od momentu przeniesienia pędów do pożywki płynnej do piątego dnia trwania hodowli, natomiast przez kolejne pięć dni masa pędów wzrastała nieznacznie. Zjawisko to prawdopodobnie ma związek z przystosowaniem pędów do nowych warunków fizykochemicznych hodowli. Największy przyrost biomasy pędowej odnotowano między 10 a 15 dniem kultury – świeża masa pędów wzrosła prawie 2-krotnie. W kolejnych dniach kultury tempo przyrostu pędów obniżyło się znacząco [Ryc. 37].



Ryc. 37 Krzywa przyrostu biomasy z kultury pędowej *E. planum* w czasie trwania 30 dniowej kultury

Zaobserwowano, że po 15 dniu trwania kultury masa pędów przyrastała wolno, dzień ten wyznaczono na przeprowadzenie elicytacji.

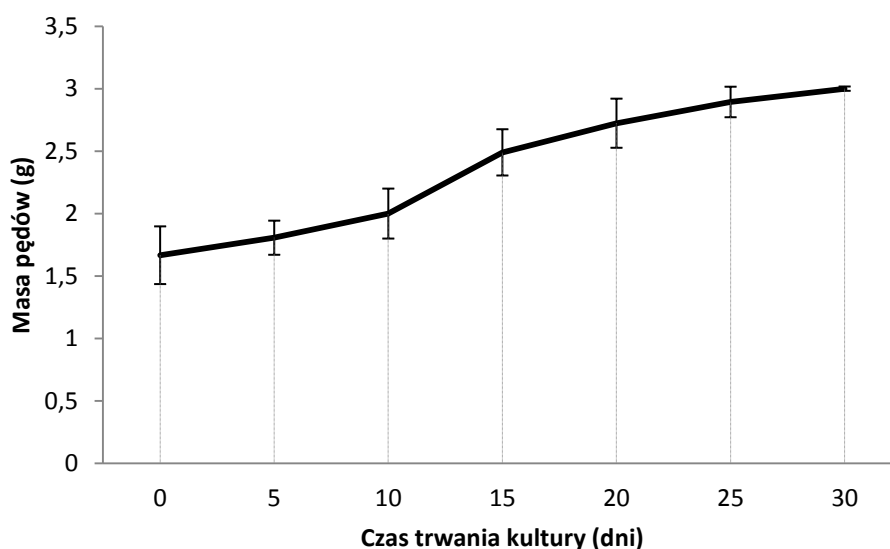
Pędy mikołajka płaskolistnego elicytowane jasmonianem metylu oraz ekstraktem drożdżowym nie przejawiały zmian morfologicznych. Krótki czas elicytacji (12-72 godz.) nie wpłynął niekorzystnie na kultury pędowe, natomiast pędy rozwijające się w pożywce z 50 g l⁻¹ stężeniem sacharozy wykazywały zmienioną morfologię w stosunku do pędów kontrolnych, nieelicytowanych. Podwyższone stężenie cukru powodowało duże deformacje blaszek liściowych, które charakteryzowały się sztywnością, łamliwością i wykazywały brunatno-czarne zabarwienie w około 50 % elicytowanych pędów. Część liści była intensywnie zielona i dobrze rozwinięta, lecz wątła, z niskim turgorem. Większość pędów hodowanych w pożywkach z podwyższonym stężeniem sacharozy wytwarzało korzenie.

Kultury pędowe *Eryngium maritimum* L.

Z wielopędów mikołajka nadmorskiego, namnożonych w kulturach *in vitro*, wybrano pojedyncze rozetki o długości liści 3 – 5 cm i przekładano do kolb z płynnymi pożywkami MS suplementowanymi BAP 1,0 mg l⁻¹ i IAA 0,1 mg l⁻¹. Kultury prowadzono na wytrząsarce rotacyjnej przez okres 30 dni.

Niewielki przyrost długości pędów następował aż do 30 dnia trwania hodowli, chociaż od 15 dnia uległ obniżeniu. Przyrost biomasy pędowej mikołajka nadmorskiego był

niezauważalny od momentu przeniesienia pędów do pożywki płynnej do piątego dnia trwania hodowli, co miało związek z przystosowaniem pędów do nowych warunków fizykochemicznych hodowli. Dzień załamania krzywej (15 dzień) był najlepszym momentem do przeprowadzenia zabiegów biotechnologicznych [Ryc. 38].



Ryc. 38 Krzywa przyrostu biomasy z kultury pędowej *E. maritimum* w czasie trwania 30 dniowej kultury

Pędy *E. maritimum* w kulturze płynnej charakteryzowały umiarkowanie dobre parametry wzrostu [Fot. 29]. Nieznaczny przyrost biomasy pędowej następował poprzez wydłużanie ogonków liściowych oraz kontynuację rozwoju nielicznych pąków kątowych.

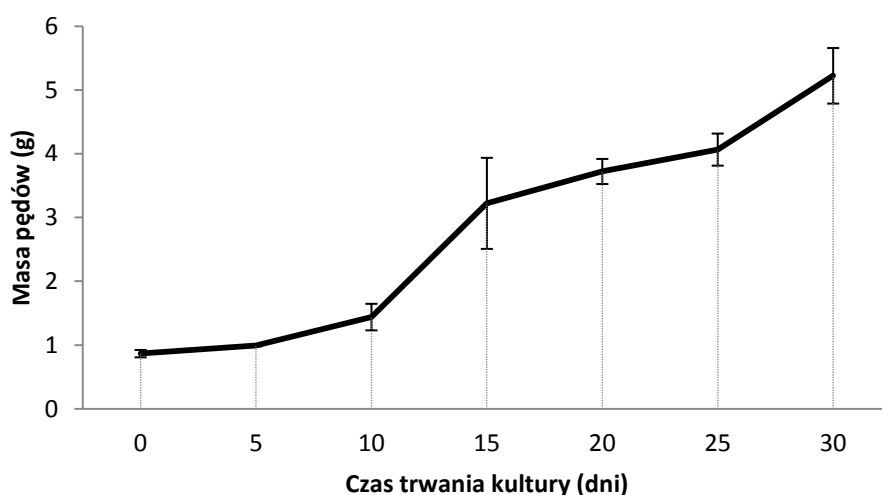


Fot. 29 *E. maritimum* A kultura pędowa w 30 dniu hodowli B biomasa z kultur pędowych (skala 1 cm)

Kultury pędowe *Eryngium campestre* L.

Podobnie, w celu założenia kultury pędowej w płynnej pożywce i wykreślenia krzywej wzrostu pędów *E. campestre*, z wielopędów namnożonych w kulturach *in vitro* wybrano pojedyncze rozetki o długości liści 2 – 3 cm i umieszczono w pożywkach MS z BA 1,0 mg l⁻¹ i IAA 0,1 mg l⁻¹. Kultury prowadzono na wytrząsarce rotacyjnej na okres 30 dni.

Pędy *E. campestre* w kulturze płynnej charakteryzowały dobre parametry hodowli do 15 dnia hodowli: poprawny turgor i intensywnie zielone zabarwienie [Fot. 30]. Po 15 dniu tempo przyrostu biomasy spadło a pędy zaczęły zmieniać się morfologicznie. Ostatni skok masy pędowej spowodowany był zmianami w wyglądzie organów – pędy zaczęły nabierać szklistości, zdeformowane blaszki liściowe chłonęły wodę [Ryc. 39].



Ryc. 39 Krzywa przyrostu biomasy z kultury pędowej *E. campestre* w czasie trwania 30 dniowej kultury



Fot. 30 *E. campestre* A kultura pędowa w 30 dniu hodowli B biomasa z kultur pędowych (skala 1 cm)

Podsumowanie wyników z kultur pędowych gatunków z rodzaju *Eryngium* L.

Pędy *E. planum* i *E. campestre* w nieelicytowanej kulturze płynnej charakteryzowały dobre parametry hodowli, szczególnie po kilkudniowym okresie adaptacji. Szybki wzrost biomasy pędowej następował w wyniku rozrostu blaszki liściowej, wzrostu wydłużeniowego ogonków liściowych oraz rozwoju nowych pędów z istniejących merystemów pąków bocznych. Poprawny turgor oraz zielone zabarwienie pędów mikołajka płaskolistnego świadczyły o dobrej kondycji fizjologicznej eksplantatów. Pod koniec kultury mikołajka polnego pędy zaczęły nabierać szklistości, zdeformowane blaszki liściowe chłonięły wodę. Natomiast pędy *E. maritimum* w kulturze płynnej charakteryzowały umiarkowanie dobre parametry wzrostu. Nieznaczny przyrost biomasy pędowej następował poprzez wydłużanie ogonków liściowych oraz kontynuację rozwoju nielicznych pąków kątowych.

Przyrost biomasy pędowej mikołajków był niezauważalny od momentu przeniesienia pędów do pożywki płynnej do piątego dnia trwania hodowli, natomiast przez kolejne pięć dni masa pędów wzrastała nieznacznie. Największy przyrost biomasy pędowej odnotowano między 10 a 15 dniem kultury. W kolejnych dniach kultury tempo przyrostu pędów obniżyło się znacząco. Zaobserwowano, że po 15 dniu trwania kultury masa pędów przyrastała wolno, dzień ten wyznaczono na przeprowadzenie elicytacji.

Pędy trzech gatunków mikołajków elicytowane jasmonianem metylu oraz ekstraktem drożdżowym nie przejawiały zmian morfologicznych. Krótki czas elicytacji (12-72 godz.) nie wpłynął niekorzystnie na morfologię kultur pędowych. Natomiast podwyższone stężenie cukru powodowało duże deformacje blaszek liściowych mikołajków, które charakteryzowały się sztywnością, łamliwością i wykazywały brunatno-czarne zabarwienie.

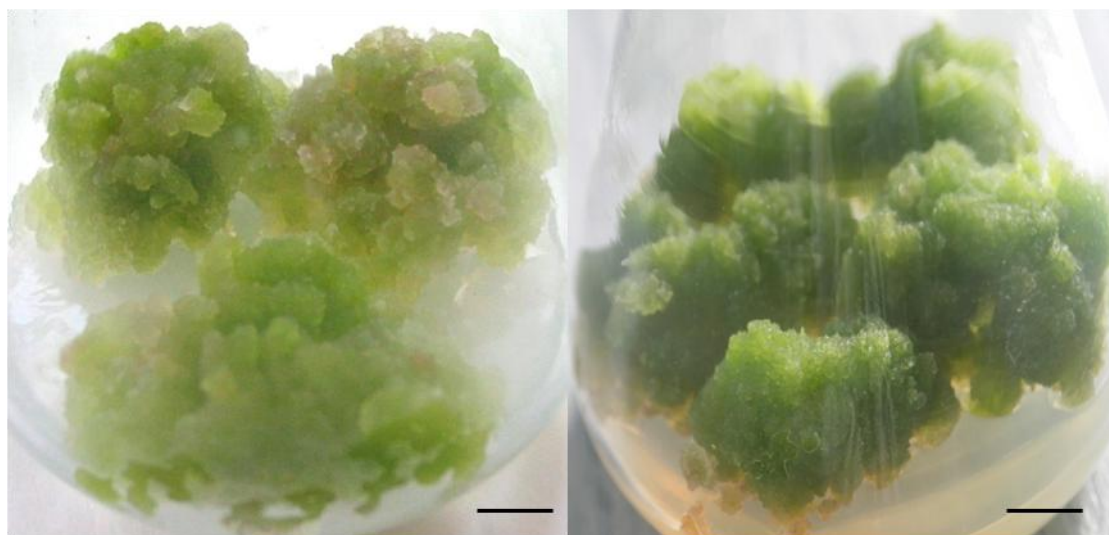
1.4. Kultury komórkowe

We wcześniejszych badaniach realizowanych w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin, w ramach projektu N N40506533, w którym zaplanowano fragment niniejszej rozprawy doktorskiej, opracowano optymalne warunki indukcji i wzrostu kultur komórkowych. Dokonano analiz kultur kalusowych i zawiesinowych w wybranych aspektach. Obserwowano przyrost biomasy kalusa w zależności od różnych parametrów: rodzaju eksplantatu, typu i stężeń regulatorów wzrostu i rozwoju roślin, warunków świetlnych. Efektywność przyrostu kalusa określano za pomocą współczynnika przyrostu biomasy kalusowej (WP). Ponadto analizowano zawartość głównych metabolitów wtórnych w kalusie hodowanym na różnych pożywkach oraz po wybranych zabiegach biotechnologicznych – elicytacji jasmonianem metylu i podwyższonym stężeniem sacharozy. Kalus morfogeny wykorzystywano do indukcji organogenezy w celu regeneracji roślin z pąków przybyszowych lub uzyskania korzeni służących do założenia kultur korzeniowych. Natomiast z ustabilizowanej kultury jasnego i sypkiego kalusa niemorfogenego (32 pasaż) założono zawiesinę komórkową. Dla ustabilizowanej kultury zawiesinowej (9 pasaż) wyznaczono kinetykę wzrostu. Na podstawie krzywych wzrostu zawiesiny wyznaczono szybkość wzrostu komórek oraz czas potrzebny do podwojenia świeżej i suchej masy. Analizowano zawartość kwasów fenolowych w zależności od fazy wzrostu zawiesiny. Wyniki badań własnych z tego zakresu opublikowano w pracy [Kikowska i wsp. 2012].

W dalszych doświadczeniach z zakresu niniejszej pracy namnożono biomasę kalusa oraz zawiesiny *E. planum* do analiz fitochemicznych oraz badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Wcześniejsze badania kalusa *E. planum* wykazały, że najlepszym podłożem do indukcji i proliferacji komórek kalusa była pożywka MS z dodatkiem $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ 2,4-D i $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ BAP. Ten zestaw fitohormonów zastosowany został do indukcji kalusa z eksplantatów siewki mikołajka płaskolistnego i namnożenia biomasy kalusowej w szeregu pasaży. Otrzymany kalus charakteryzował się jasnozieloną barwą, miękką, luźną i jednolitą strukturą i posłużył do założenia kultury zawiesinowej [Fot. 31].

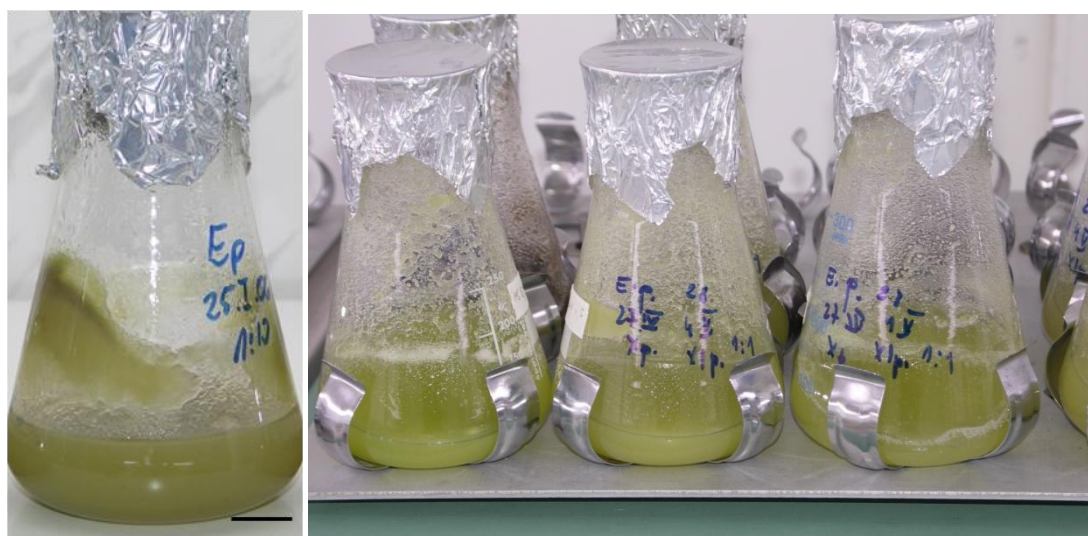
W ustabilizowanej zawieszynie komórkowej mikołajka płaskolistnego dokonano elicytacji hodowanych komórek jasmonianem metylu przez 24- i 48-godzin. Ocena

fitochemiczna kultury po elicytacji zamieszczona została w rozdziałach 2.1.3. *Wstępne analizy TLC metabolitów wtórnych w kulturach nieodróżnicowanych* oraz 2.2.4. *Ocena fitochemiczna biomasy z kultur komórkowych E. planum po zabiegach biotechnologicznych.*



Fot. 31 Kalus *E. planum* namnożony na pożywce MS z $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ 2,4-D i $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ BAP (skala 1 cm)

Do założenia kultury zawiesinowej *E. planum* wykorzystano wcześniej ustabilizowaną biomasę kalusa i wytrząsano w pożywce MS z dodatkiem $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ 2,4-D. Zawiesina charakteryzowała się zielono-żółtą barwą, jednolitą strukturą i była homogenna [Fot. 32]. Nie zaobserwowano tworzenia się agregatów komórkowych.



Fot. 32 Zawiesina komórkowa *E. planum* w pożywce MS z $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ 2,4-D (skala 1 cm)

2. Akumulacja metabolitów wtórnych w organach roślin gruntowych i wybranych kulturach *in vitro* *Eryngium planum* L. *E. maritimum* L. i *E. campestre* L.

Otrzymane *in vitro* różne typy kultur oceniano pod względem ich zdolności do biosyntezy pożądaných metabolitów. Przeprowadzono fitochemiczną analizę porównawczą z roślinami rosnącymi na naturalnych stanowiskach.

Ekstrakty alkoholowe organów roślin gruntowych i wybranych kultur *in vitro* poddano wstępnym jakościowym analizom metodą jedno- i dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej (1D, 2D TLC) oraz jakościowym i ilościowym analizom z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) i ultrasprawnej chromatografii cieczowej (UPLC).

2.1. Wstępne analizy TLC

We wstępnych analizach zastosowano metodę chromatografii cienkowarstwowej wykorzystując różne rodzaje adsorbentów i faz rozwijających. Wszystkie ekstrakty nakładano w jednakowych objętościach o stężeniu $0,1 \text{ g ml}^{-1}$ na płytki, przy pomocy aplikatora Linomat 5, co umożliwiło dokonanie szacunkowych analiz półilościowych.

Escyna, naturalna mieszanina saponin triterpenowych izolowanych z *Aesculus hippocastanum* L. umożliwiła wykrycie saponin w badanych gatunkach na podstawie podobnego fioletowo-różowego zabarwienia. Plamy związków o niebieskim zabarwieniu w świetle UV_{366} widoczne na chromatogramach wszystkich surowców sugerowały obecność kwasów fenolowych, natomiast plamy o zabarwieniu brązowym w UV_{366} , zmieniającym się na żółtą fluorescencję po wywołaniu chlorkiem glinu a na żółtą lub pomarańczową po reakcji z 0,1% NA były charakterystyczne dla flawonoidów. Plamy związków w świetle UV_{366} widoczne na chromatogramach po reakcji z NA charakteryzujące się barwą pomarańczową sugerują obecność flawonoidów z co najmniej dwoma grupami fenolowymi $-OH$ w pozycji orto, barwą brązową 5-hydroksy pochodne, natomiast barwą żółtą flawonoidy, z wolną grupą OH w pierścieniu B [Markham 1982].

Wstępne analizy kochromatograficzne wszystkich surowców ze wzorcami kwasów fenolowych (kwasu rozmarynowego, chlorogenowego i kawowego) na płytkach DC-Plastikfolien Kieselgel 60 pozwoliły wnioskować o ich obecności w badanych surowcach.

2.1.1. Wstępne analizy TLC obecności metabolitów wtórnych w organach roślin gruntowych i roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro*

Metodą TLC (chromatografii cienkowarstwowej) porównano organy – liście rozetkowe i korzenie, pochodzące z roślin gruntowych i zregenerowanych w kulturach *in vitro* trzech analizowanych gatunków z rodzaju *Eryngium*, pod kątem obecności głównych metabolitów wtórnych – saponin triterpenowych, kwasów fenolowych i flawonoidów. We wstępnych badaniach, w surowcach roślin gruntowych potwierdzono obecność głównych metabolitów wtórnych, które podaje piśmiennictwo [Hiller i wsp. 1969; Hiller i wsp. 1972; Hiller i wsp. 1974; Karting, Hiller i wsp. 1981; Wolf 1993; Ayoub, Kubeczka 2001; Liakoura i wsp. 2001; Głowniak i wsp. 2004; Le Claire i wsp. 2005; Kartal i wsp. 2005; Kartal i wsp. 2006; Suciú i wsp. 2006; El-Kassem i wsp. 2013; Kowalczyk i wsp. 2013].

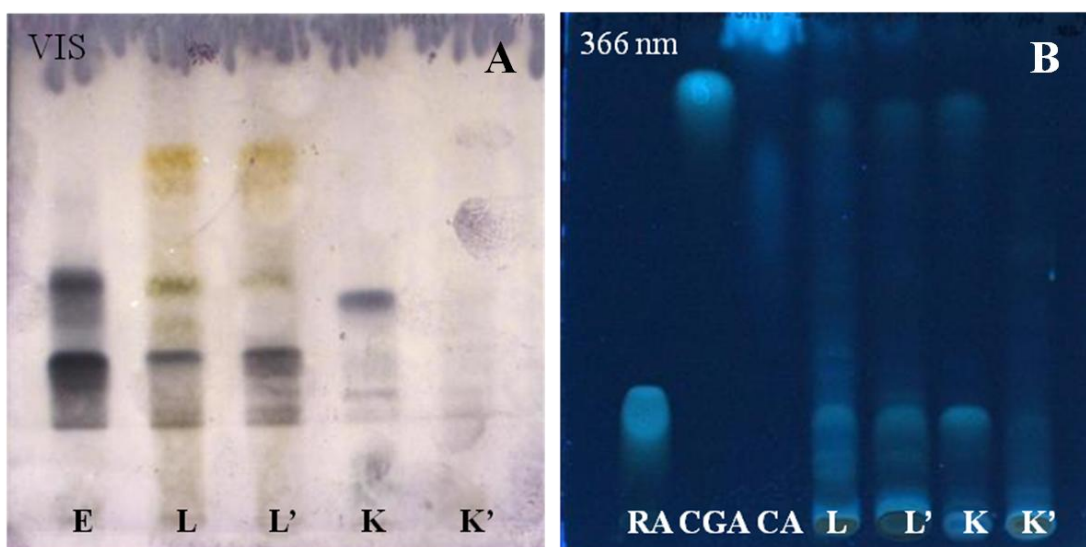
Wstępne analizy TLC ekstraktów alkoholowych z liści rozetkowych pochodzących z roślin gruntowych oraz zregenerowanych w kulturach *in vitro* mikołajków wykazały obecność saponin triterpenowych, kwasów fenolowych i flawonoidów w częściach nadziemnych roślin. W korzeniach roślin gruntowych, roślin hodowanych w warunkach *in vitro*, w kulturach korzeniowych obecne są saponiny i kwasy fenolowe. W przeciwieństwie do części nadziemnych, w organach podziemnych nie zaobserwowano flawonoidów.

Na chromatogramach TLC można zauważyć, że liście i korzenie, każdego z trzech gatunków mikołajków, produkują inny skład saponin, o kilku wspólnych indywidualnych związkach [Fot. 32A, 35, 39A]. Zarówno liście jak i organy podziemne zawierają kwas rozmarynowy, chlorogenowy i kawowy.

Półilościowe analizy TLC uwiaryściły na chromatografach różnice w wielkości i intensywności plam różnych związków. Na tej podstawie można wstępnie wnioskować o akumulacji badanych metabolitów wtórnych. Te obserwacje potwierdzono w kolejnych analizach w aspekcie badań ilościowych saponin triterpenowych i kwasów fenolowych.

ERYNGIUM PLANUM L.

Obecność saponin triterpenowych i kwasów fenolowych we wszystkich organach mikołajka płaskolistnego wykazano na chromatogramach TLC [Fot. 33A]. Organy roślin rosnących w warunkach *in vitro* akumulują wyższą zawartość saponin niż analogiczne organy pochodzące z roślin zebranych ze stanowisk naturalnych [Fot. 33A]. Podobnie liście rozetkowe i korzenie z kultur *in vitro* akumulują wyższą zawartość najważniejszego z badanych fenolokwasów – kwasu rozmarynowego, niż organy roślin ze stanowiska naturalnego. Można także zauważyć, że korzenie zawierają większą ilość tego kwasu niż liście rozetkowe [Fot. 33B].



Fot. 33 Chromatogramy TLC ekstraktów etanolowych z organów roślin gruntowych i z kultur *in vitro* *E. planum* analiza obecności **A** saponin triterpenowych i **B** fenolokwasów

(**A** analiza saponin: faza stacjonarna żel krzemionkowy (DC-Plastikfolien Kieselgel 60), faza ruchoma BAW 4:1:5, detekcja VIS, po wywołaniu wanilina + 5% H_2SO_4 ;

B analiza fenolokwasów: faza stacjonarna żel krzemionkowy (DC-Plastikfolien Kieselgel 60), faza ruchoma OAW 8:1:1, detekcja UV_{366} po wywołaniu NA)

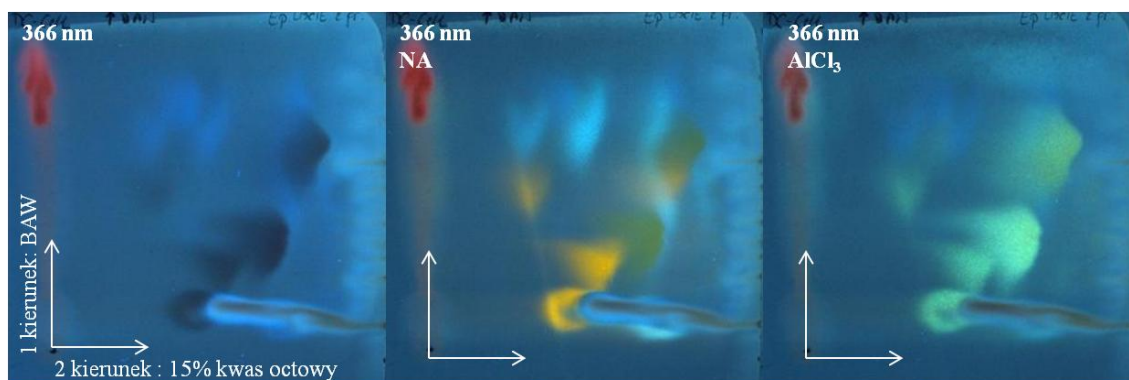
E Escyna **RA** – Kwas rozmarynowy **CGA** Kwas chlorogenowy **CA** Kwas kawowy

L Liście rozetkowe roślin z gruntu **L'** Liście rozetkowe roślin z kultur *in vitro*

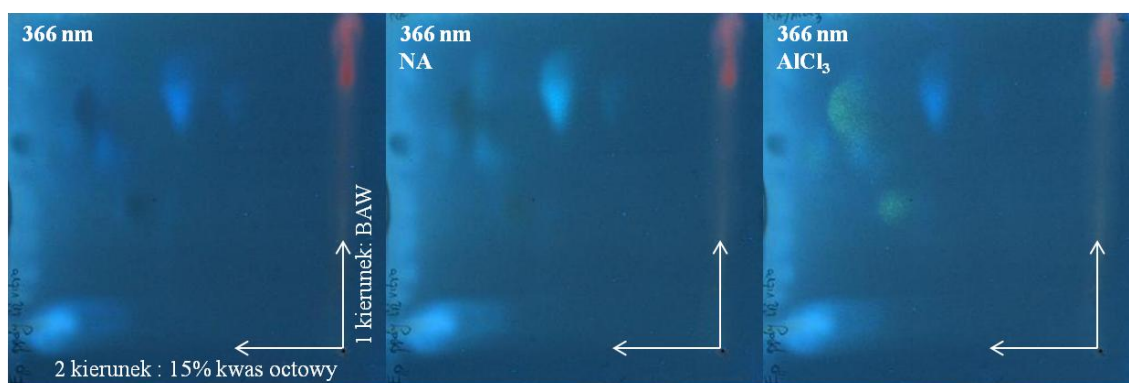
K Korzenie rośliny z gruntu **K'** Korzenie roślin z kultur *in vitro*

W ekstraktach etanolowych z liści rozetkowych *E. planum* z kultur i z gruntu, wykazano obecność flawonoidów, których nie zaobserwowano w korzeniach. Liście rozetkowe posiadają prawdopodobnie związki flawonoidowe – kemferol i kwercetynę oraz ich pochodne [Fot. 34,35]. Wstępne analizy metodą chromatografii dwukierunkowej na celulozie w fazach ruchomych BAW (1 kierunek) i 15% kwas

octowy (2 kierunek) wskazywały na obecność około 10 związków o charakterze fenolowym: 6 flawonoidów oraz 4-5 kwasów fenolowych [Fot. 34,35].



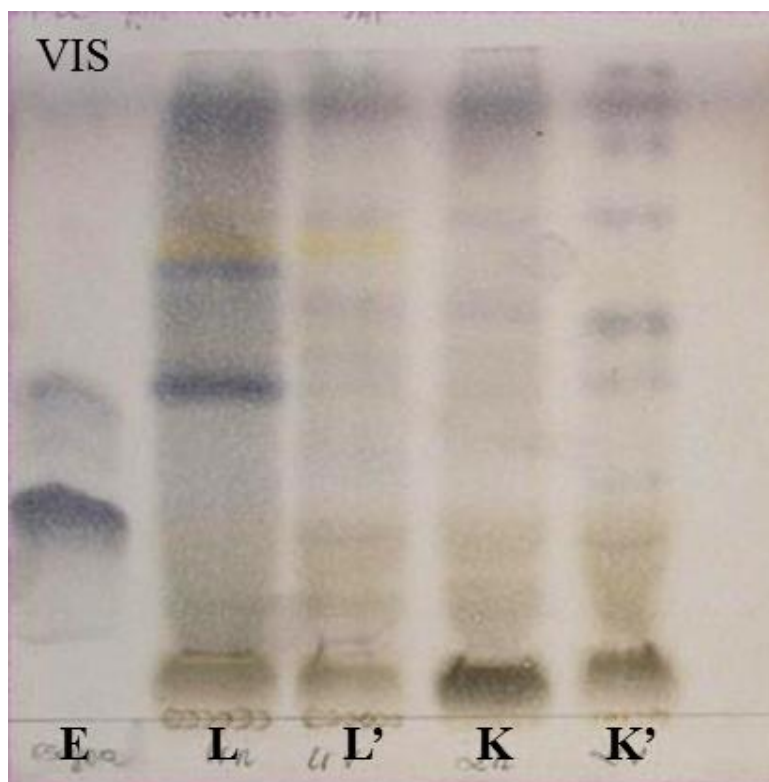
Fot. 34 Chromatogramy 2D TLC ekstraktów etanolowych z pędów roślin gruntowych *E. planum* - analiza obecności fenolokwasów i flawonoidów (faza stacjonarna celuloza (DC Precoated Fertigfolien Cellulose), faza ruchoma BAW 4:1:5 i 15% AcOH, detekcja UV₃₆₆, przed i po wywołaniu NA i AlCl₃)



Fot. 35 Chromatogramy 2D TLC ekstraktów etanolowych z pędów roślin *E. planum* z kultur *in vitro* - analiza Obecności fenolokwasów i flawonoidów (faza stacjonarna celuloza (DC Precoated Fertigfolien Cellulose), faza ruchoma BAW 4:1:5 i 15% AcOH, detekcja UV₃₆₆, przed i po wywołaniu NA i AlCl₃)

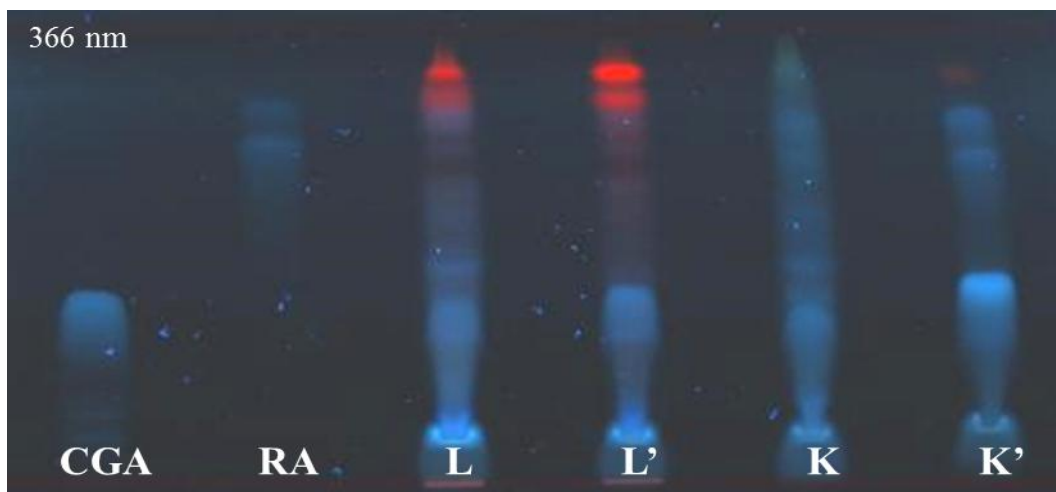
ERYNGIUM MARITIMUM L.

Chromatogram TLC [Fot. 36] wskazuje na obecność zespołu saponin w ekstraktach z liści i korzeni, zarówno roślin gruntowych jak i zregenerowanych *in vitro*. Rozmieszczenie plam związków sugeruje, że liście i korzenie posiadają nieco inny skład tych związków. Zespół saponin w korzeniach jest bogatszy od liści i składa się z około 8 związków.



Fot. 36 Chromatogram TLC ekstraktów etanolowych z organów roślin gruntowych i z kultur *in vitro* *E. maritimum*
 - **analiza obecności saponin** (faza stacjonarna żel krzemionkowy (HPTLC Alufolien Kiesel 60), faza ruchoma BAW 4:1:5, detekcja VIS, po wywołaniu odczynnikami wanilina + 5% H₂SO₄)
E Escyna **L** Liście rozetkowe roślin z gruntu **L'** Liście rozetkowe roślin z kultur *in vitro*
K Korzenie rośliny z gruntu **K'** Korzenie roślin z kultur *in vitro*

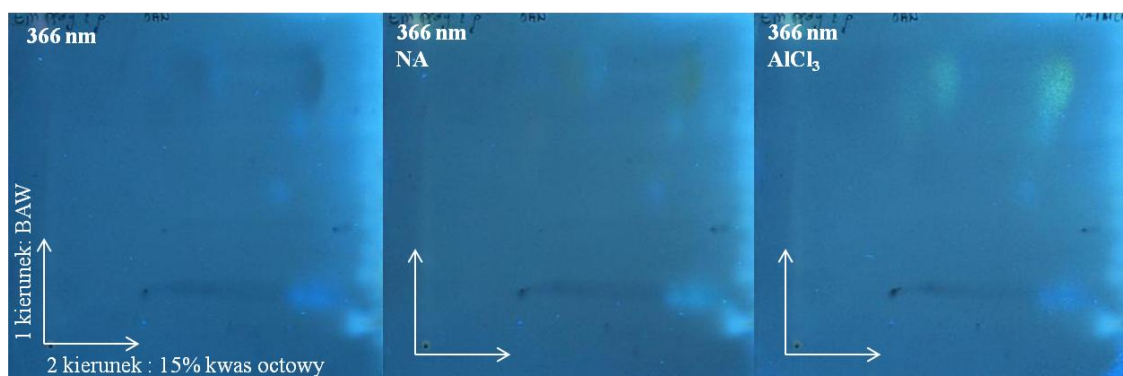
Wszystkie organy mikołajka nadmorskiego produkują badane kwasy fenolowe [Fot. 37]. Można zauważyć, że w tym gatunku produkcja kwasu chlorogenowego jest wyższa niż kwasu rozmarynowego. Ponadto zawartość tych fenolokwasów jest nieco wyższa w oorganach z roślin rosnących w kulturach *in vitro* niż w liściach i korzeniach okazów gruntowych [Fot. 37]. W ekstraktach etanolowych z liści rozetkowych *E. maritimum* pochodzących z kultur i roślin gruntowych, podobnie jak w *E. planum*, zaobserwowano obecność flawonoidów. Liście rozetkowe posiadają związki flawonoidowe – najprawdopodobniej pochodne kemferolu i kwercetyny [Fot. 38, 39]. Obecność nielicznych plam odpowiadającym flawonoidom i fenolokwasom na chromatogramach 2D TLC wskazuje, że ekstrakty etanolowe z liści rozetkowych *E. maritimum* są ubogie w te związki [Fot. 38, 39].



Fot. 37 Chromatogram TLC ekstraktów etanolowych z organów roślin gruntowych i z kultur *in vitro* *E. maritimum* – analiza obecności fenolokwasów (faza stacjonarna żel krzemionkowy (HPTLC Alufolien Kiesel 60), faza ruchoma BAW 4:1:5, detekcja UV₃₆₆ po wywołaniu NA)

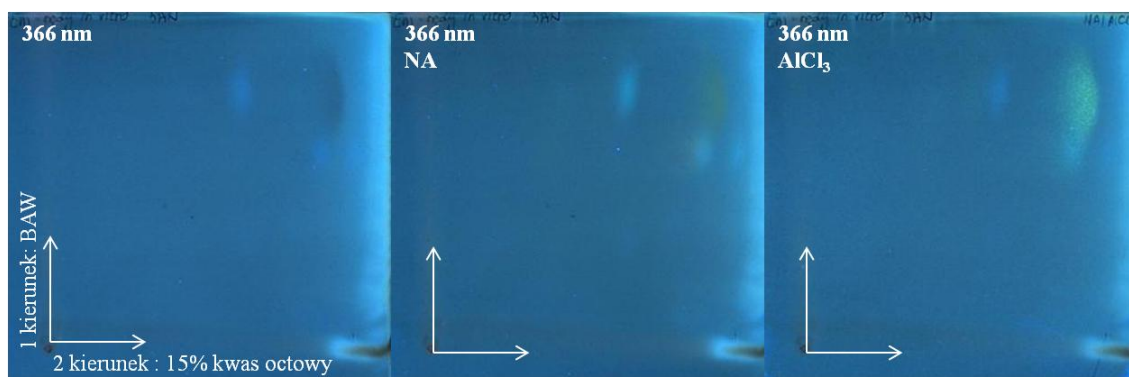
CGA Kwas chlorogenowy RA Kwas rozmarynowy L Liście rozetkowe roślin z gruntu

L' Liście rozetkowe roślin z kultur *in vitro* K Korzenie rośliny z gruntu K' – Korzenie roślin z kultur *in vitro*



Fot. 38 Chromatogramy 2D TLC ekstraktów etanolowych z pędów roślin gruntowych *E. maritimum* - analiza

Obecności fenolokwasów i flawonoidów (faza stacjonarna celuloza (DC Precoated Fertigfolien Cellulose), faza ruchoma BAW 4:1:5 i 15% AcOH, detekcja UV₃₆₆, przed i po wywołaniu NA i AlCl₃)

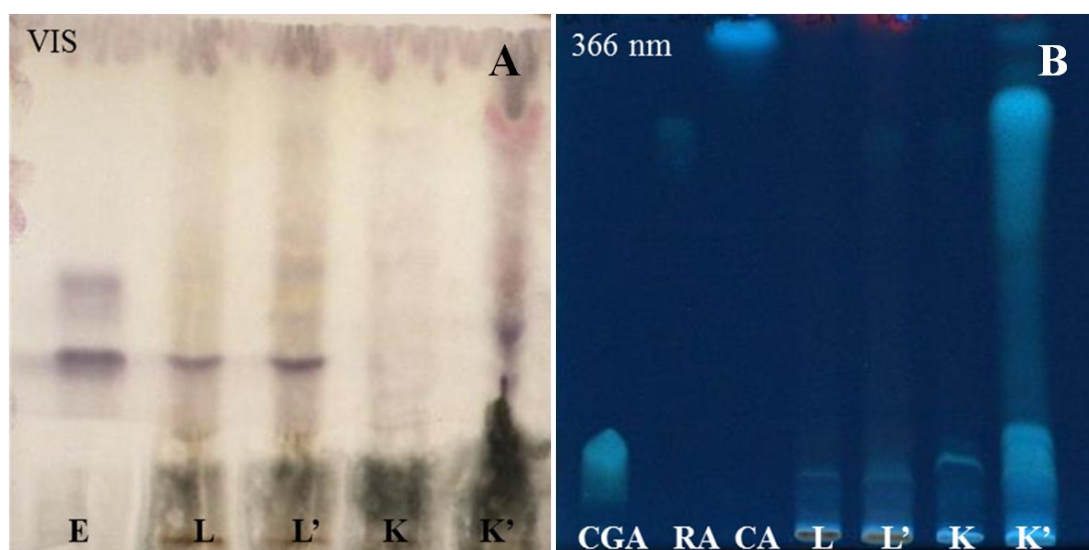


Fot. 39 Chromatogramy 2D TLC ekstraktów etanolowych z pędów roślin *E. maritimum* z kultur *in vitro* – analiza

obecności fenolokwasów i flawonoidów (faza stacjonarna celuloza (DC Precoated Fertigfolien Cellulose), faza ruchoma BAW 4:1:5 i 15% AcOH, detekcja UV₃₆₆, przed i po wywołaniu NA i AlCl₃)

ERYNGIUM CAMPESTRE L.

Obecność saponin w ekstraktach z liści i korzeni *E. campestre* - roślin gruntowych i zregenerowanych *in vitro* potwierdzono metodą TLC. Saponiny triterpenowe w liściach rozetkowych posiadają odmnienny profil niż te w korzeniach. Organy roślin rosnących w kulturach *in vitro* zawierają nieco wyższą zawartość saponin niż analogiczny materiał pochodzący z roślin gruntowych. Korzenie mikołajka polnego z gruntu posiadają uboższy zestaw saponin niż korzenie hodowane *in vitro* [Fot. 40 A]. Wykazano obecność wybranych kwasów fenolowych w materiale roślinnym z mikołajka, zarówno z kultur *in vitro* jak i roślin gruntowych. Najbogatszym w główne kwasy fenolowe surowcem z *E. campestre* są korzenie roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro* [Fot. 40B].



Fot. 40 Chromatogramy TLC ekstraktów etanolowych z organów roślin gruntowych i z kultur *in vitro* *E. campestre*

- analiza obecności **A saponin triterpenowych** i **B fenolokwasów**

(A analiza saponin: faza stacjonarna żel krzemionkowy (DC-Plastikfolien Kieselgel 60), faza ruchoma

BAW 4:1:5, detekcja VIS, UV₃₆₆ po wywołaniu odczynnikiem wanilina + 5% H₂SO₄;

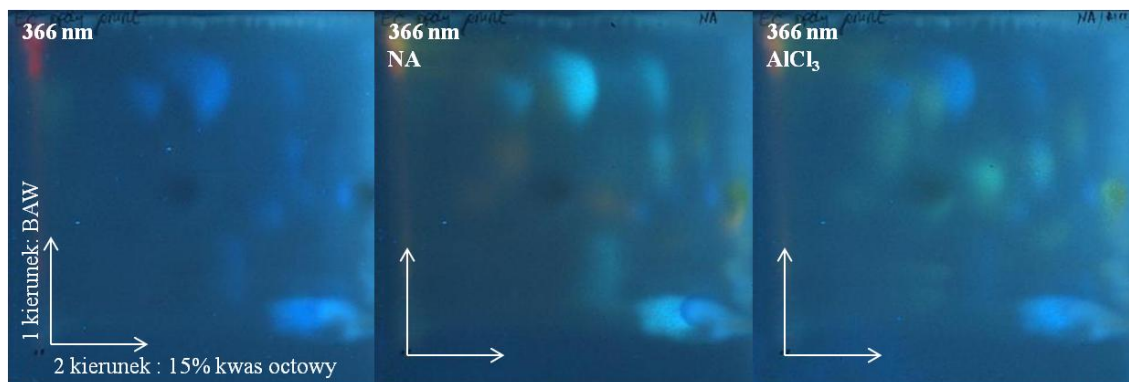
B analiza fenolokwasów: faza stacjonarna żel krzemionkowy (DC-Plastikfolien Kieselgel 60), faza ruchoma OAW 8:1:1; detekcja UV₃₆₆ po wywołaniu NA)

E Escyna **CGA** Kwas chlorogenowy **RA** Kwas rozmarynowy **CA** Kwas kawowy

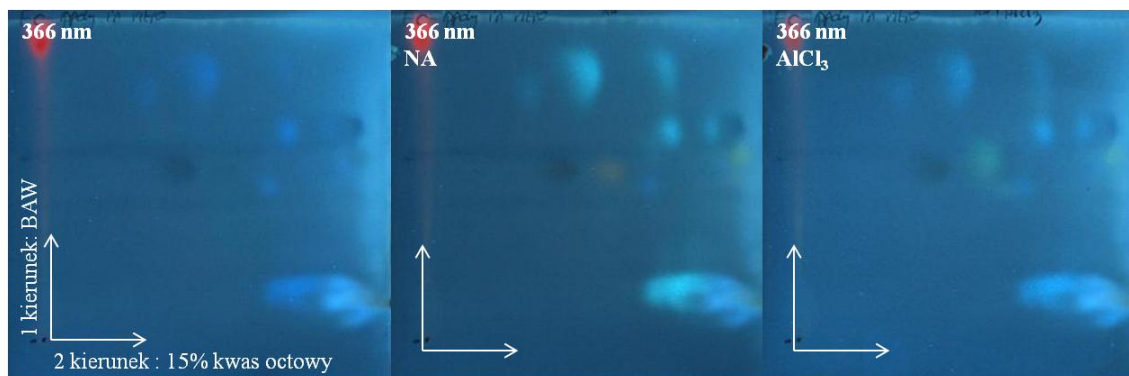
L Liście rozetkowe roślin z gruntu **L'** Liście rozetkowe roślin z kultur *in vitro*

K Korzenie rośliny z gruntu **K'** Korzenie roślin z kultur *in vitro*

Wstępne analizy metodą 2D TLC na celulozie w fazach ruchomych BAW (1 kierunek) i 15% kwas octowy (2 kierunek) wskazywały na obecność około 14 związków flawonoidowych co jest zgodne z doniesieniem z pracy Kartiga i Wolfa [1993]. Ponadto zaobserwowano około 9 niebieskich plam kwasów fenolowych [Fot.41, 42].



Fot. 41 Chromatogramy 2D TLC ekstraktów etanolowych z pędów roślin gruntowych *E. campestre* - **analiza Obecności fenolokwasów i flawonoidów** (faza stacjonarna celuloza (DC Precoated Fertigfolien Cellulose), faza ruchoma BAW 4:1:5 i 15% AcOH, detekcja UV₃₆₆, przed i po wywołaniu NA i AlCl₃)



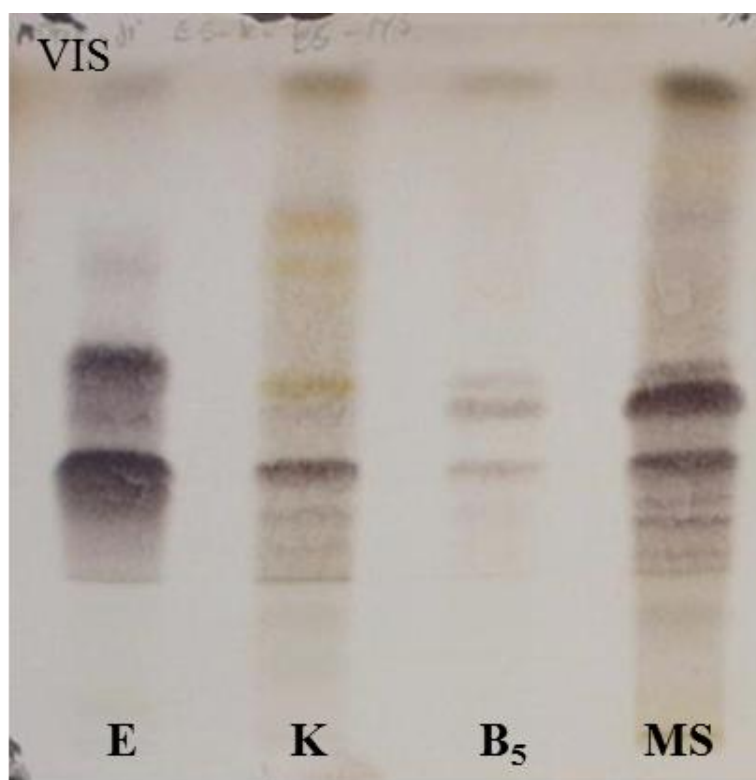
Fot. 42 Chromatogramy 2D TLC ekstraktów etanolowych z pędów roślin *E. campestre* z kultur - **analiza obecności fenolokwasów i flawonoidów** (faza stacjonarna celuloza (DC Precoated Fertigfolien Cellulose), faza ruchoma BAW 4:1:5 i 15% AcOH, detekcja UV₃₆₆, przed i po wywołaniu NA i AlCl₃)

2.1.2. Wstępne analizy TLC metabolitów wtórnych w kulturach korzeniowych

Badano wpływ typu pożywki (MS, B₅), stężeń soli mineralnych (1/2 MS, MS) i rodzaju auksyny (IAA, IBA, NAA) na produkcję saponin triterpenowych i kwasów fenolowych w ekstraktach z biomasy kultur korzeniowych mikołajków.

ERYNGIUM PLANUM L.

Kultury korzeniowe *E. planum* hodowane w pożywkach B₅ i MS charakteryzowały się odmiennym profilem zespołu saponin triterpenowych niż korzenie z roślin gruntowych. Zanalizowano wpływ składu mineralnego pożywek na akumulację tych związków w kulturach. Na chromatogramach TLC zaobserwowano około 10 pojedynczych saponin w ekstraktach z korzeni rosnących w pożywce MS i tylko 5 saponin w korzeniach hodowanych w B₅ [Fot. 43]. Kultury korzeniowe pozostałych gatunków w pożywce B₅ nie kontynuowały rozwoju, dlatego nie podjęto ich oceny fitochemicznej.

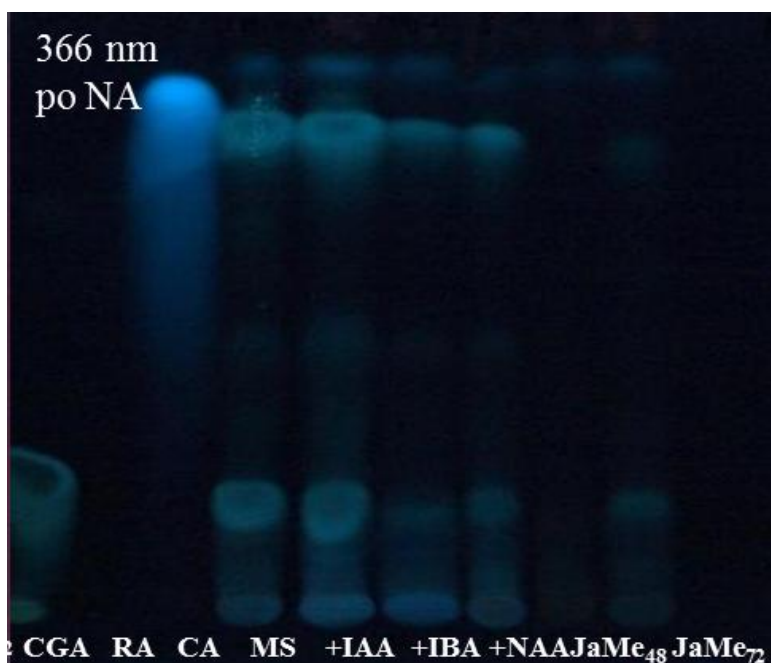


Fot. 43 Chromatogram TLC ekstraktów etanolowych z kultur korzeniowych *E. planum* – analiza saponin

(faza stacjonarna żel krzemionkowy DC-Plastikfolien Kieselgel 60, faza ruchoma BAW 4:1:5, detekcja VIS, UV₃₆₆ po wywołaniu wanilina + 5% H₂SO₄)

E Escyna **K** Korzenie z rośliny gruntowej **B₅** Korzenie z pożywki B₅ **MS** Korzenie z pożywki MS

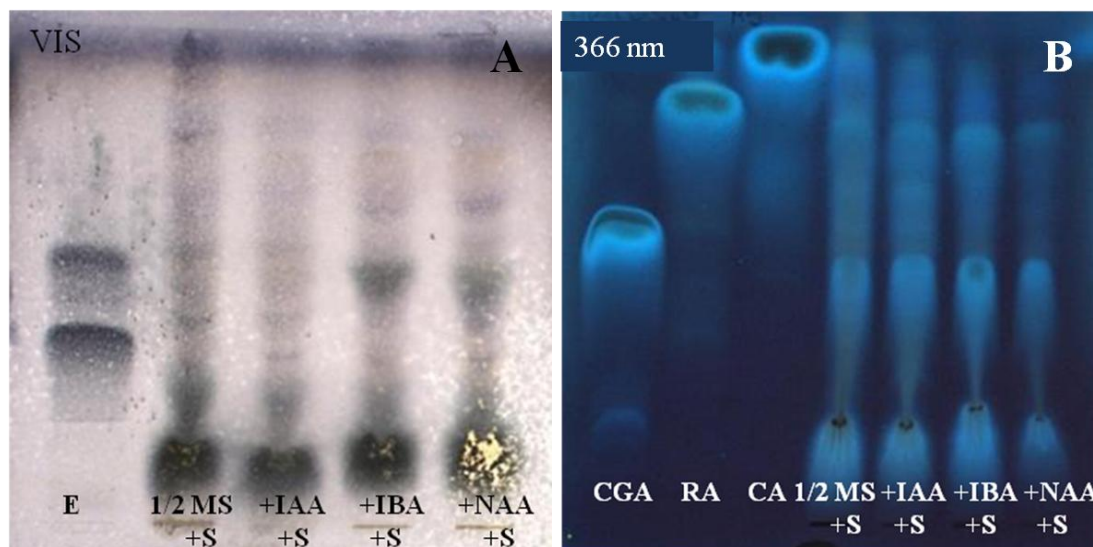
W kulturach korzeniowych *E. planum* zastosowano elicytację jasmonianem metylu. Zarówno 24-godz. jak i 48-godz. ekspozycja korzeni na elicytor nie wpłynęła na podwyższenie zawartości głównych kwasów fenolowych w materiale roślinnym. Porównanie wpływu auksyn w pożywce na produkcję kwasów widoczne jest na chromatografie TLC. Największą akumulację analizowanych fenolokwasów zaobserwowano w korzeniach hodowanych w płynnej pożywce MS i MS suplementowanej IAA, wyraźnie wyższą niż w korzeniach rosnących w pożywce MS z IBA lub NAA [Fot. 44].



Fot. 44 Chromatogram TLC ekstraktów etanolowych z kultur korzeniowych *E. planum* – analiza fenolokwasów (faza stacjonarna żel krzemionkowy HPTLC Alufolien Kiesel 60, faza ruchoma OAW 8:1:1, detekcja UV₃₆₆ po wywołaniu NA)
CGA Kwas chlorogenowy **RA** Kwas rozmarynowy **CA** –Kwas kawowy
 Korzenie hodowane w płynnej pożywce MS, MS + IAA 1,0; MS + IBA 1,0; MS + NAA 1,0 oraz korzenie poddane procesowi elicytacji jasmonianem metylu przez 48 i 72 godz.

Zaobserwowano wpływ różnych typów auksyn na akumulację saponin triterpenowych w kulturach korzeniowych *E. maritimum*. Najwyższą ich zawartość odnotowano dla korzeni rosnących w pożywkach MS suplementowanych IBA i NAA [Fot. 45A] Nie można jednoznacznie stwierdzić, która z auksyn wpłynęła na najwyższą produkcję fenolokwasów w kulturach korzeni mikołajka nadmorskiego, jednakże na chromatogramie widać, iż dodatek egzogennych auksyn wpływał na podwyższenie

wybranych kwasów fenolowych w biomasie korzeniowej, w porównaniu do korzeni hodowanych w pożywce bez regulatorów wzrostu i rozwoju roślin [Fot. 45B, Ryc. 40].



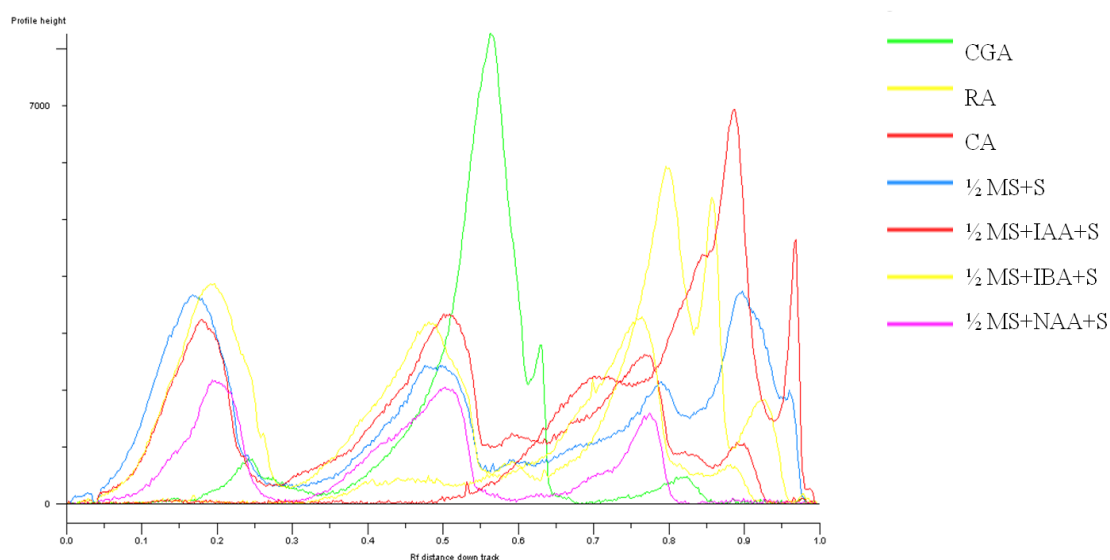
Fot. 45 Chromatogramy TLC ekstraktów etanolowych z kultur korzeniowych *E. maritimum* – **A** analiza saponin triterpenowych i **B** fenolokwasów

(dla saponin: faza stacjonarna żel krzemionkowy (HPTLC Alufolien Kiesel 60), faza ruchoma BAW 4:1:5, detekcja VIS, UV₃₆₆ po wywołaniu odczynnikiem wanilina + H₂SO₄;

dla fenolokwasów: faza stacjonarna żel krzemionkowy DC-Plastikfolien Kieselgel 60, faza ruchoma OAW 8:1:1, detekcja UV₂₅₄, po wywołaniu NA)

E Escyna **CGA** Kwas chlorogenowy **RA** Kwas rozmarynowy **CA** Kwas kawowy

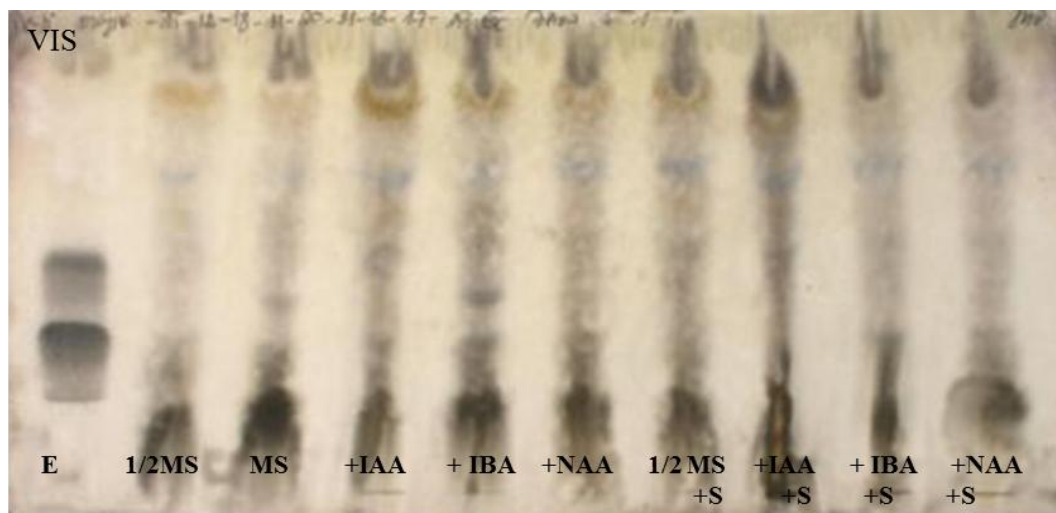
Korzenie hodowane w płynnej pożywce ½ MS z 60 S (sacharoza), ½ MS + IAA 2,0 +z 60 S; ½ MS + IBA 2,0 z 60 S; ½ MS + NAA z 60 S



Ryc. 40 TLC densytogram – chromatogram Video Scan TLC ekstraktów z kultur korzeniowych *E. maritimum* rosnących w pożywkach suplementowanych różnymi auksynami . Porównanie profili kwasów fenolowych ekstraktów z pikami wzorców kwasu rozmarynowego (RA), chlorogenowego (CGA) i kawowego (CA) w UV₃₆₆

ERYNGIUM CAMPESTRE L.

W kulturach korzeniowych *E. campestre* zaobserwowano wpływ stężeń soli mineralnych i auksyn na akumulację saponin i fenolokwasów. Najlepszymi, z punktu widzenia akumulacji metabolitów wtórnych w korzeniach, pożywkami były te zawierające pełne stężenia soli mineralnych. Najwyższą akumulację saponin triterpenowych i wybranych kwasów fenolowych zanotowano w korzeniach hodowanych w pożywkach suplementowanych w IAA i IBA [Fot. 46, 47].



Fot. 46 Chromatogram TLC ekstraktów etanolowych z kultur korzeniowych *E. campestre* – analiza saponin (faza stacjonarna żel krzemionkowy HPTLC Alufolien Kiesel 60, faza ruchoma BAW 4:1:5, detekcja VIS po wywołaniu odczynnikiem wanilina + H₂SO₄) E Escyna



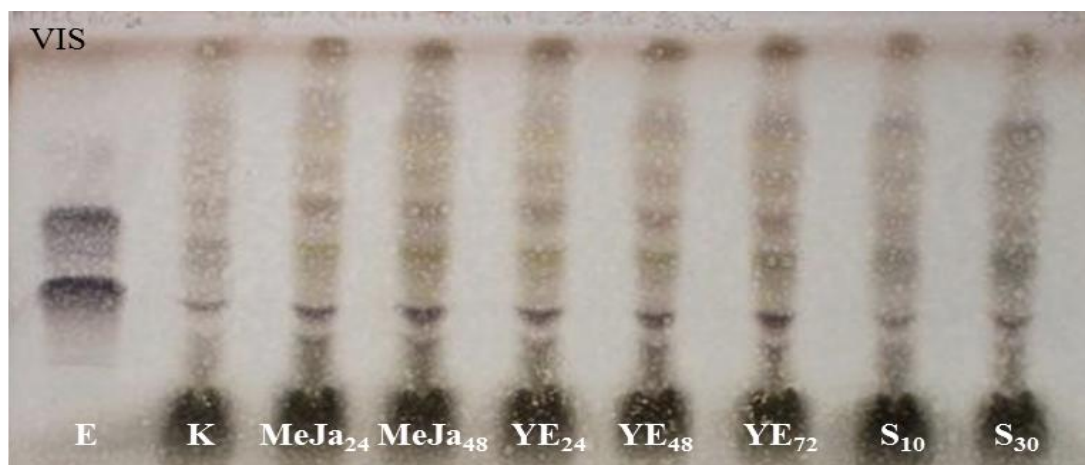
Fot. 47 Chromatogram TLC ekstraków etanolowych z kultur korzeniowych *E. campestre* – analiza fenolokwasów (faza stacjonarna żel krzemionkowy HPTLC Alufolien Kiesel 60, faza ruchoma OAW 8:1:1, detekcja UV₃₆₆ po wywołaniu NA) CGA Kwas chlorogenowy RA Kwas rozmarynowy CA Kwas kawowy

Fot. 46 i 47 Korzenie z płynnej pożywki 1/2 MS, MS, MS + IAA 2,0; MS + IBA 2,0; MS + NAA 2,0; 1/2 MS + 60 S (sacharoza), 1/2 MS + IAA 2,0 + 60 S; 1/2 MS + IBA 2,0 + 60 S; 1/2 MS + NAA + 60 S

2.1.3. Wstępne analizy TLC metabolitów wtórnych w elicytowanych kulturach pędowych

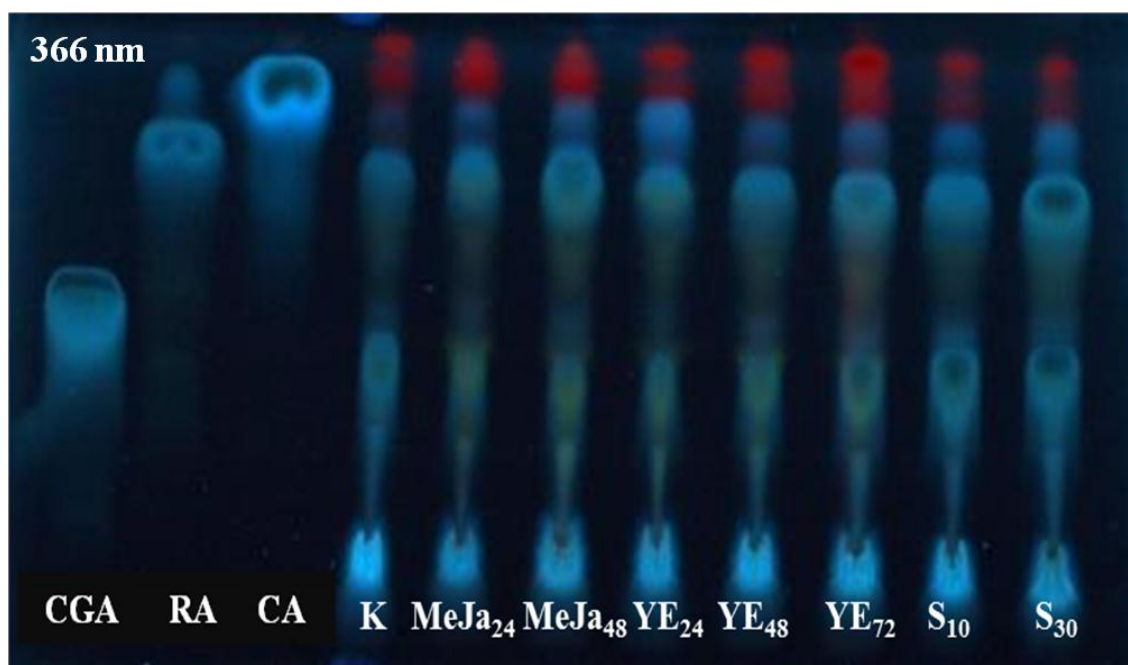
Wstępne badania fitochemiczne ekstraktów wykazały obecność saponin triterpenowych i związków fenolowych w kulturach. Po stwierdzeniu zdolności tych kultur do biosyntezy badanych związków przystąpiono do badań zwiększania akumulacji tych metabolitów wtórnych przy użyciu metod biotechnologicznych.

W kulturach pędowych *E. planum* i *E. maritimum* zastosowano wybrane zabiegi biotechnologiczne mające na celu podwyższenie zawartości metabolitów wtórnych – elicytację jasmonianem metylu, ekstraktem drożdżowym i podwyższonym stężeniem sacharozy. Rezultaty elicytacji obserwowano na chromatogramach TLC [Fot. 48, 49, 50] i na denzytogramach [Ryc. 41]. Na chromatogramach można wyraźnie zaobserwować, iż wszystkie zastosowane zabiegi wpłynęły na podwyższenie zawartości saponin triterpenowych. Akumulacja saponin zależała od zastosowanego elicytora oraz czasu ekspozycji pędów na ten czynnik. Najwyższą akumulację saponin triterpenowych w pędach mikołajka płaskolistnego i nadmorskiego odnotowano po elicytacji jasmonianem metylu, szczególnie po dłuższym traktowaniu (48 godz.). Zastosowanie wyższego stężenia sacharozy (60 g l^{-1}) wpłynęło na podwyższenie zawartości saponin, głównie innych niż te na które wpływał jasmonian metylu [Fot. 48].



Fot. 48 Chromatogram TLC ekstraktów etanolowych z elicytowanych kultur pędowych *E. planum* – analiza saponin (faza stacjonarna żel krzemionkowy (DC-Plastikfolien Kieselgel 60), faza ruchoma BAW 4:1:5, detekcja VIS po wywołaniu odczynnikami wanilina + 5% H_2SO_4) **E** Escyna **K** Pędy kontrolne **MeJa₂₄** Pędy elicytowane jasmonianem metylu przez 24 godz. **MeJa₄₈** Pędy elicytowane **MeJa** przez 48 godz. **YE₂₄** Pędy elicytowane ekstraktem drożdżowym przez 24 godz. **YE₄₈** przez 48 godz. **YE₇₂** przez 72 godz **S₁₀** Pędy elicytowane sacharozą przez 10 dni **S₃₀** Pędy elicytowane S przez 30 dni

Podobnie, wszystkie zastosowane zabiegi wpłynęły na podwyższenie zawartości kwasów fenolowych w kulturach pędowych *E. planum* i *E. maritimum*. Akumulacja fenolokwasów zależała od zastosowanego elicytora oraz czasu ekspozycji pędów na ten czynnik [Ryc.41]. Na podstawie wstępnej obserwacji chromatogramów można wnioskować, że elicytacja jasmonianem metylu i podwyższonym stężeniem sacharozy wpływa najkorzystniej na akumulację wybranych kwasów, zwłaszcza gdy kultury pędowe poddane zostały działaniu tych czynników przez dłuższy okres [Fot. 49,50]. Analizy ilościowe dla elicytowanych kultur pędowych *E. planum* podano w rozdziale 2.2.3. *Ocena fitochemiczna biomasy z kultur pędowych E. planum po zabiegach biotechnologicznych.*



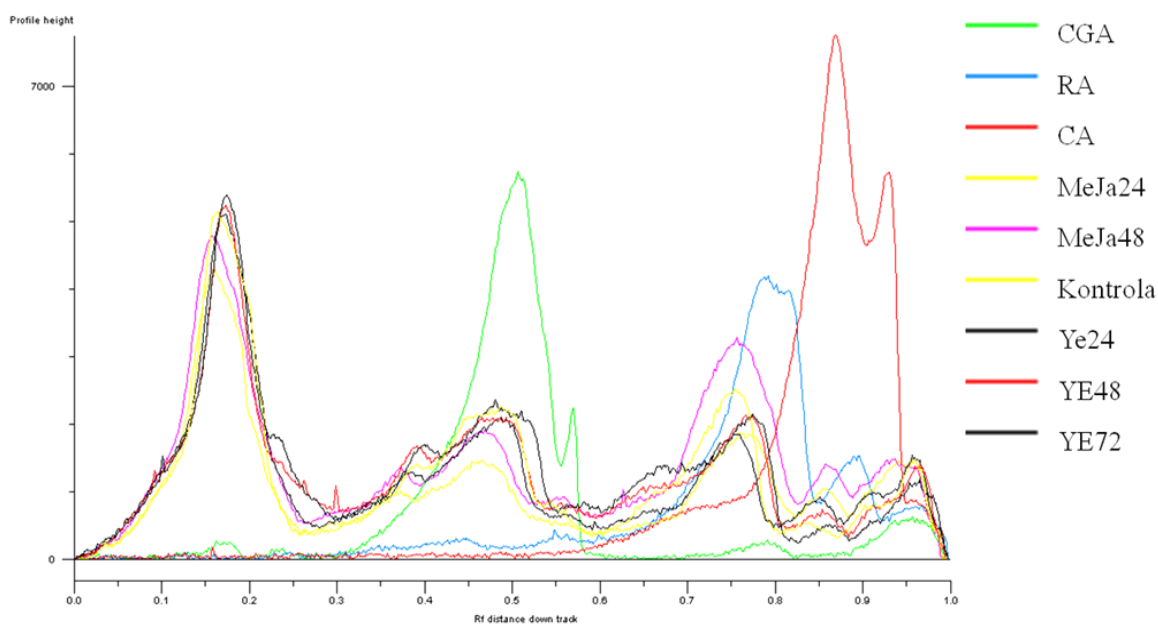
Fot. 49 Chromatogram TLC ekstraktów etanolowych z elicytowanych kultur pędowych *E. planum* - analiza fenolokwasów (faza stacjonarna żel krzemionkowy DC-Plastikfolien Kieselgel 60, faza ruchoma BAW 4:1:5, detekcja UV₃₆₆ po wywołaniu NA)

CGA Kwas chlorogenowy RA Kwas rozmarynowy CA Kwas kawowy K –Pędy kontrolne

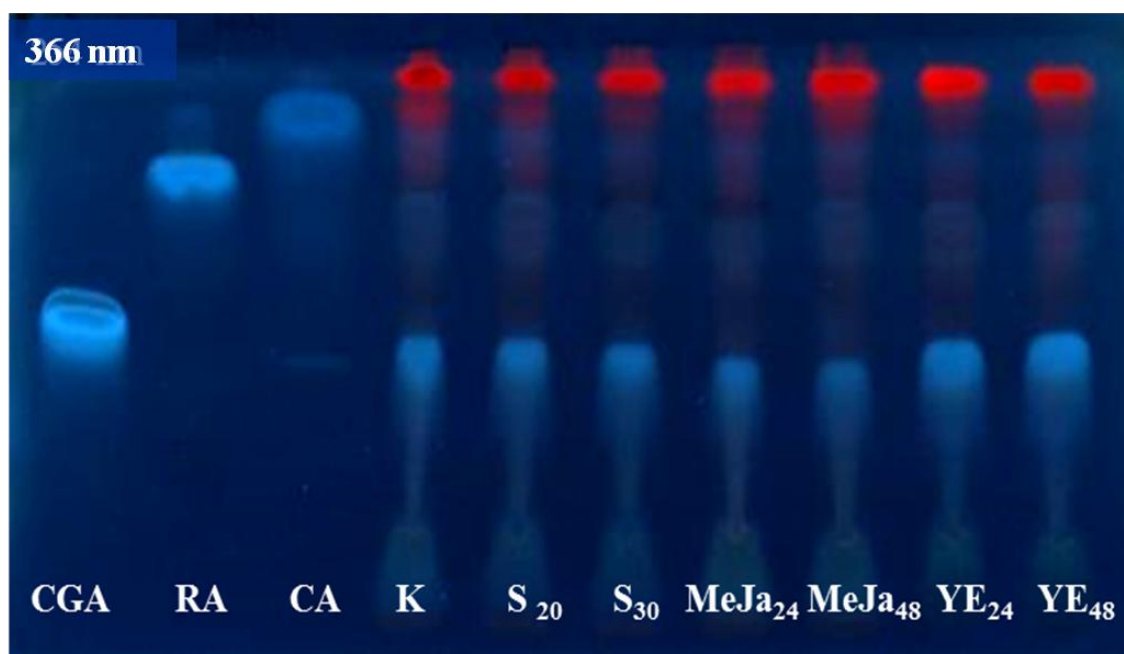
MeJa₂₄ Pędy elicytowane jasmonianem metylu przez 24 godz. MeJa₄₈ Pędy elicytowane MeJa przez 48 godz

YE₂₄ Pędy elicytowane ekstraktem drożdżowym przez 24 godz YE₄₈ przez 48 godz YE₇₂ przez 72 godz

S₁₀ Pędy elicytowane sacharozą przez 10 dni S₃₀ Pędy elicytowane S przez 30 dni



Ryc. 41 TLC densytogram – chromatogram Video Scan TLC ekstraktów z elicytowanych kultur pędowych *E. planum*. Porównanie profili kwasów fenolowych ekstraktów z pikami wzorców kwasu rozmarynowego (RA), chlorogenowego (CGA) i kawowego (CA) w UV₃₆₆

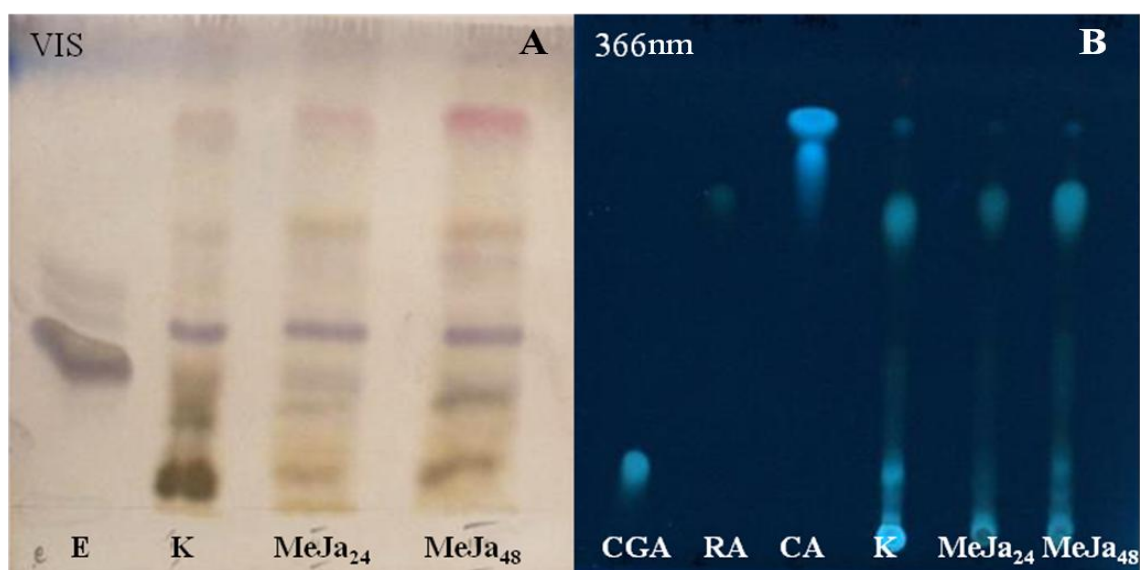


Fot. 50 Chromatogram TLC ekstraktów etanolowych z elicytowanych kultur pędowych *E. maritimum* – analiza fenolokwasów (faza stacjonarna żel krzemionkowy DC-Plastikfolien Kieselgel 60, faza ruchoma BAW 4:1:5, detekcja UV₃₆₆ po wywołaniu NA)

CGA Kwas chlorogenowy RA Kwas rozmarynowy CA Kwas kawowy K Pędy kontrolne
S₂₀ Pędy elicytowane sacharozą przez 20 dni S₃₀ Pędy elicytowane S przez 30 dni
MeJa₂₄ Pędy elicytowane jasmonianem metylu przez 24 godz. MeJa₄₈ Pędy elicytowane MeJa przez 48 godz.
YE₂₄ Pędy elicytowane ekstraktem drożdżowym przez 24 godz. YE₄₈ Pędy elicytowane YE przez 48 godz.

2.1.4. Wstępne analizy TLC metabolitów wtórnych w kulturach nieodróżnicowanych

Kultury kalusowe i zawiesinowe *E. planum* zdolne są także do produkcji saponin triterpenowych i polifenoli, co wykazano we wstępnej ocenie fitochemicznej metodą 1D TLC [Fot. 51, 52, 53]. Ponadto zauważono, że zawartość obu grup związków w analizowanej biomacie komórkowej zwiększała się pod wpływem jasmonianu metylu. Czas ekspozycji zawiesiny komórkowej na działanie elicytora miał wpływ na zawartość saponin i fenolokwasów w biomacie z tych kultur – dłuższy czas elicytacji warunkował wyższą akumulację badanych związków [Fot. 51]. Zaobserwowano, że kalus posiada większą zdolność do akumulacji metabolitów wtórnych niż zawiesina komórkowa [Fot. 52]. Badaniu poddano biomasę komórkową z kultury zawiesinowej z dwóch różnych faz – logarytmicznego wzrostu (komórki jasne) i fazy ustabilizowanej (komórki ciemniejące). Na chromatogramach TLC nie zaobserwowano różnic w składzie saponinowym i intensywności plam związków [Fot. 52]. Na chromatogramach TLC ekstraktów z pożywek po kulturze zawiesinowej nie zaobserwowano obecności badanych związków [Fot. 52].



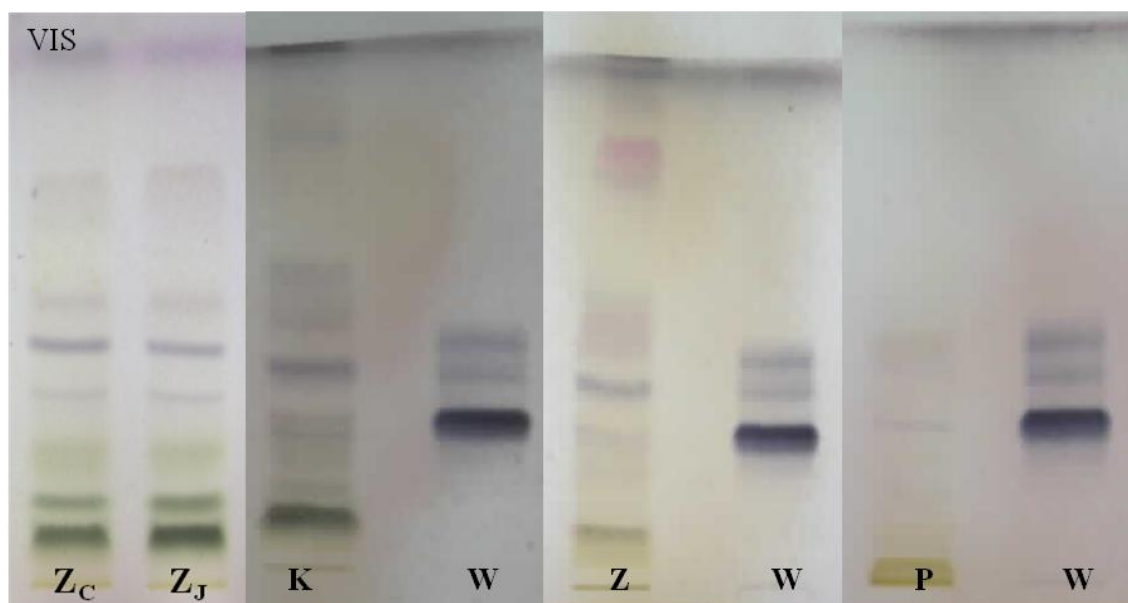
Fot. 51 Chromatogram TLC ekstraktów etanolowych z elicytowanych kultur zawiesinowych *E. planum* – analizy

A saponin triterpenowych i B fenolokwasów

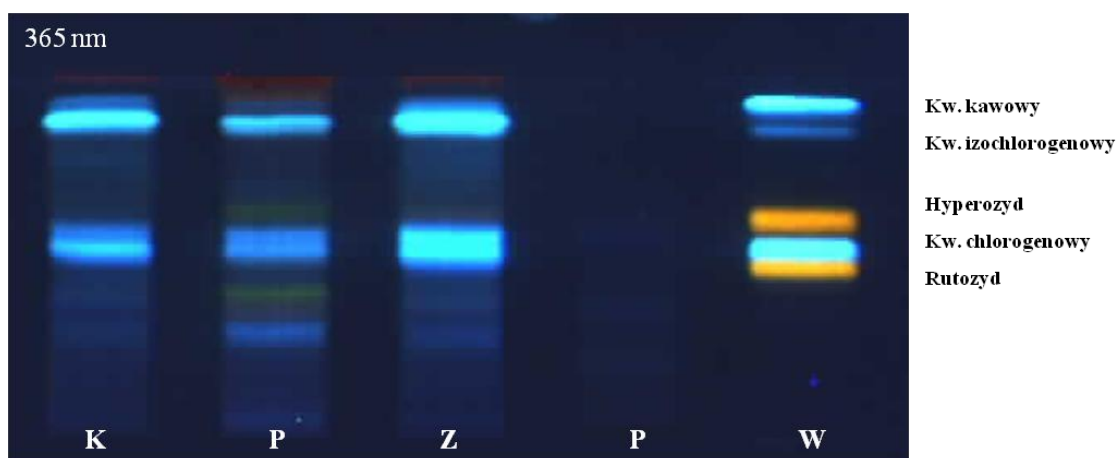
(dla saponin: faza stacjonarna żel krzemionkowy (HPTLC Alufolien Kiesel 60), faza ruchoma BAW 4:1:5, detekcja VIS, UV₃₆₆ po wywołaniu odczynnikami wanilina + H₂SO₄;

dla fenolokwasów: faza stacjonarna żel krzemionkowy DC-Plastikfolien Kieselgel 60, faza ruchoma OAW 8:1:1, detekcja UV₂₅₄, po wywołaniu NA)

E Escyna **CGA** Kwas chlorogenowy **RA** Kwas rozmarynowy **CA** Kwas kawowy **K** Kontrola – zawiesina **MeJa₂₄** Zawiesina komórkowa elicytowana jasmonianem metylu przez 24 godz. **MeJa₄₈** przez 48 godz.



Fot. 52 Chromatogram TLC ekstraktów metanolowych z kultur komórkowych (kalus i zawiesina) z *E. planum* – **analiza obecności saponin** (faza stacjonarna żel krzemionkowy (Alufolien Kiesel 60), faza ruchoma BAW 4:1:5, detekcja VIS po wywołaniu odczynnikiem wanilina + 5% H₂SO₄)
Z_C Biomasa zawiesinowa z ciemniejącymi komórkami **Z_J** Biomasa zawiesinowa z jasnymi komórkami
K Kalus **W** Wzorzec (escyna) **Z** Zawiesina komórkowa **P** Pożywka MS



Fot. 53 Chromatogram TLC ekstraktów metanolowych z kultur *in vitro* *E. planum* – **analiza obecności polifenoli** (faza stacjonarna żel krzemionkowy (Alufolien Kiesel 60), faza ruchoma OFAW 100:11:11:27; detekcja UV₃₆₅ po wywołaniu NA)
K Kalus **KP** Kultura pędów **Z** Zawiesina komórkowa **P** Pożywka MS **W** Wzorce

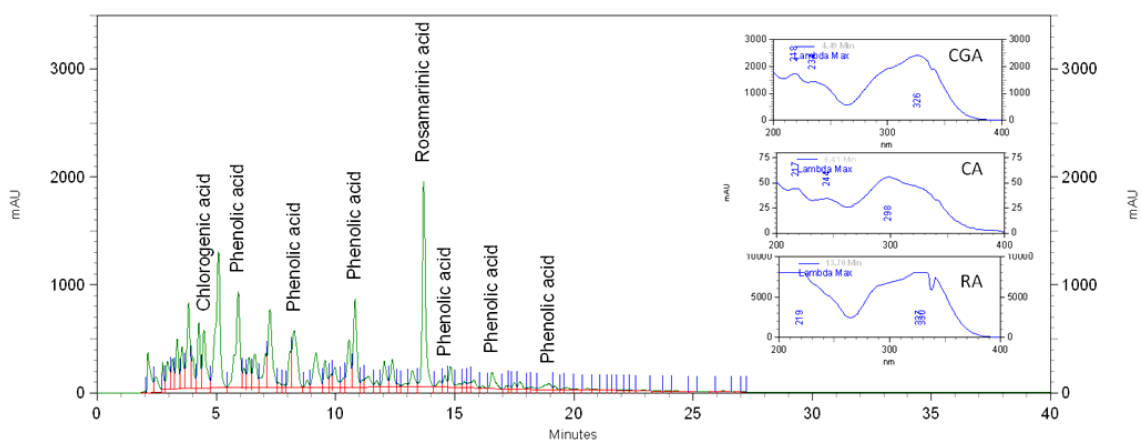
Wstępne analizy chromatografii cienkowarstwowej (TLC) wykazały obecność badanych metabolitów wtórnych i pozwoliły na szacunkową ocenę ich zawartości w materiale roślinnym trzech gatunków mikołajków, pochodzącym z kultur *in vitro*, w porównaniu do organów roślin gruntowych.

2.2. Analizy HPLC i UPLC

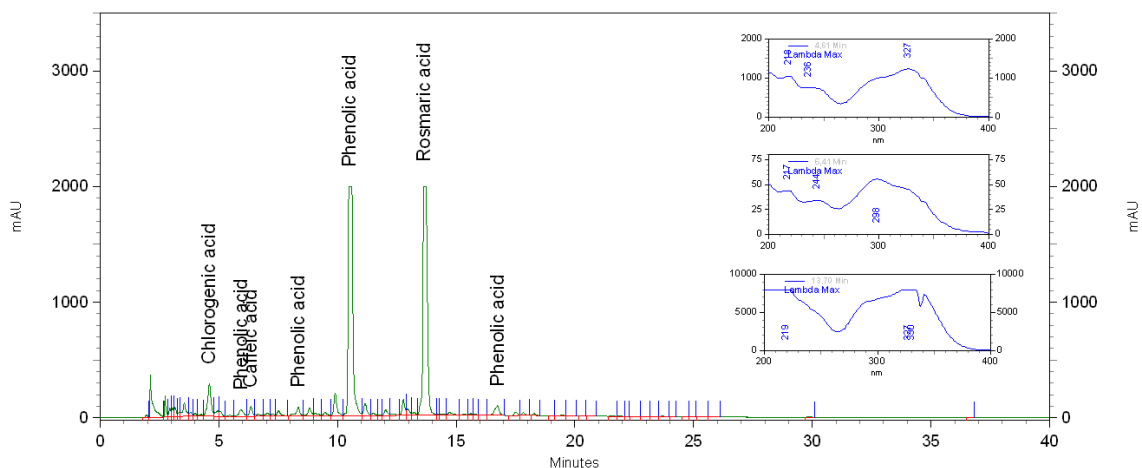
Analizy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) i ultrasprawnej chromatografii ciekowej (UPLC) wykazały różnice w profilach jakościowych i składzie ilościowym badanych metabolitów dla poszczególnych gatunków mikołajków i różnych organów, zarówno z kultur *in vitro* jak i roślin gruntowych [Tab. 30-33, Ryc. 42-48].

2.2.1. Ocena fitochemiczna organów roślin gruntowych i roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro*

Dla frakcji otrzymanych metodą chromatografii kolumnowej z liści rozetkowych i korzeni roślin gruntowych *E. planum* wykonano profile metodą HPLC [Ryc. 42, 43]. Czas retencji i widma UV badanych kwasów były porównywalne z substancjami wzorcowymi. Przykładowo przedstawiono frakcję kwasów fenolowych. Na chromatogramie widoczne są piki ośmiu kwasów fenolowych. Zidentyfikowano kwasy: rozmarynowy, chlorogenowy i kawowy; pozostałe związki nie zostały zidentyfikowane.

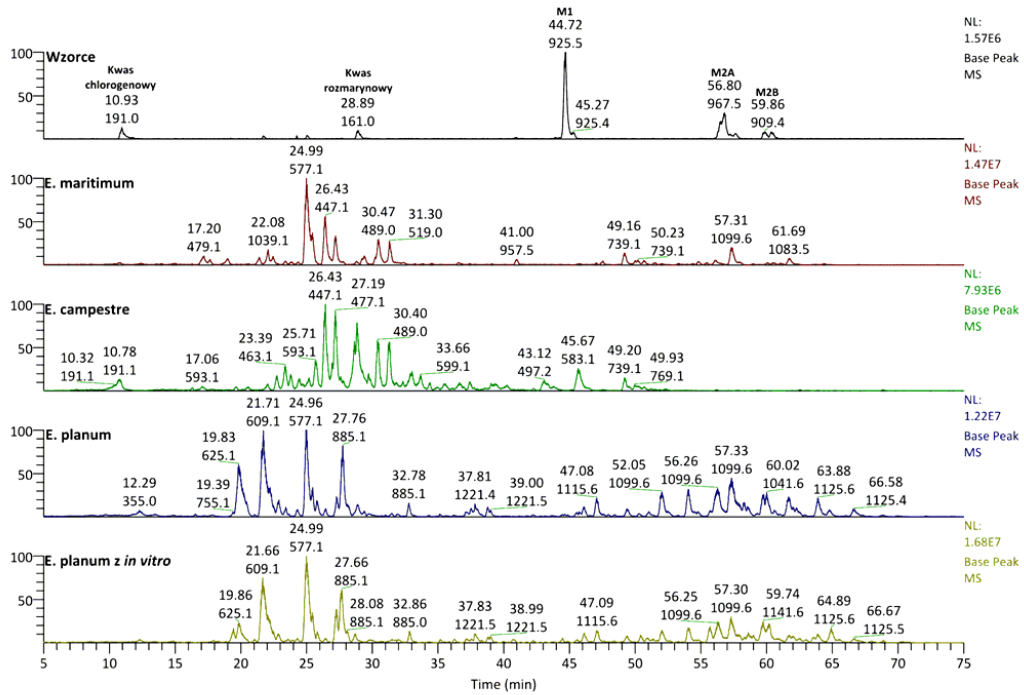


Ryc. 42 Chromatogram HPLC frakcji fenolokwasowej z liści rozetkowych roślin gruntowych *E. planum* długość fali detekcji $\lambda = 320$ nm, (w ramach widma UV pików kwasów CGA, CA i RA)

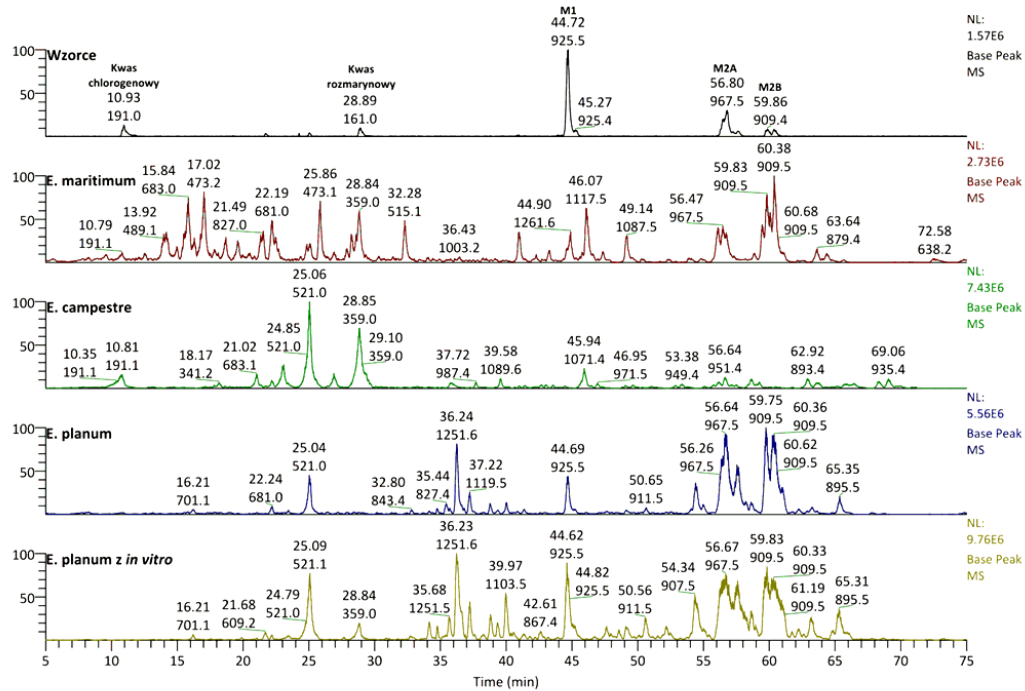


Ryc. 43 Chromatogram HPLC frakcji fenolokwasowej z korzeni z roślin gruntowych *E. planum*
długość fali detekcji $\lambda = 320$ nm, (w ramach widma UV pików kwasów CGA, CA i RA)

Porównano obecność głównych grup związków w ekstraktach metanolowych z liści i korzeni roślin gruntowych trzech badanych gatunków *Eryngium* i pędów *E. planum* zregenerowanych w kulturach *in vitro* metodą LC-MS [Ryc. 44, 45]. Na chromatografach uwzględniono kwas rozmarynowy, kwas chlorogenowy oraz saponiny triterpenowe M1, M2A, M2B. Na podstawie obserwacji profili można wnioskować, że liście *E. campestre* są najbogatsze w związki fenolowe, a liście *E. planum* w bogaty zestaw związków saponinowych. Ponadto zauważono, że profil liści gruntowych *E. planum* i pochodzących z kultur *in vitro* jest bardzo zbliżony [Ryc. 44, 45]. Profile z ekstraktów z korzeni *E. planum* i *E. maritimum* wskazują na podobieństwo składu zespołu saponin. Korzenie *E. campestre* charakteryzują się uboższym składem tych związków. Profile korzeni mikołajka płaskolistnego i pochodzących z kultur *in vitro* są bardzo zbliżone. Korzenie te są ubogie w związki fenolowe.

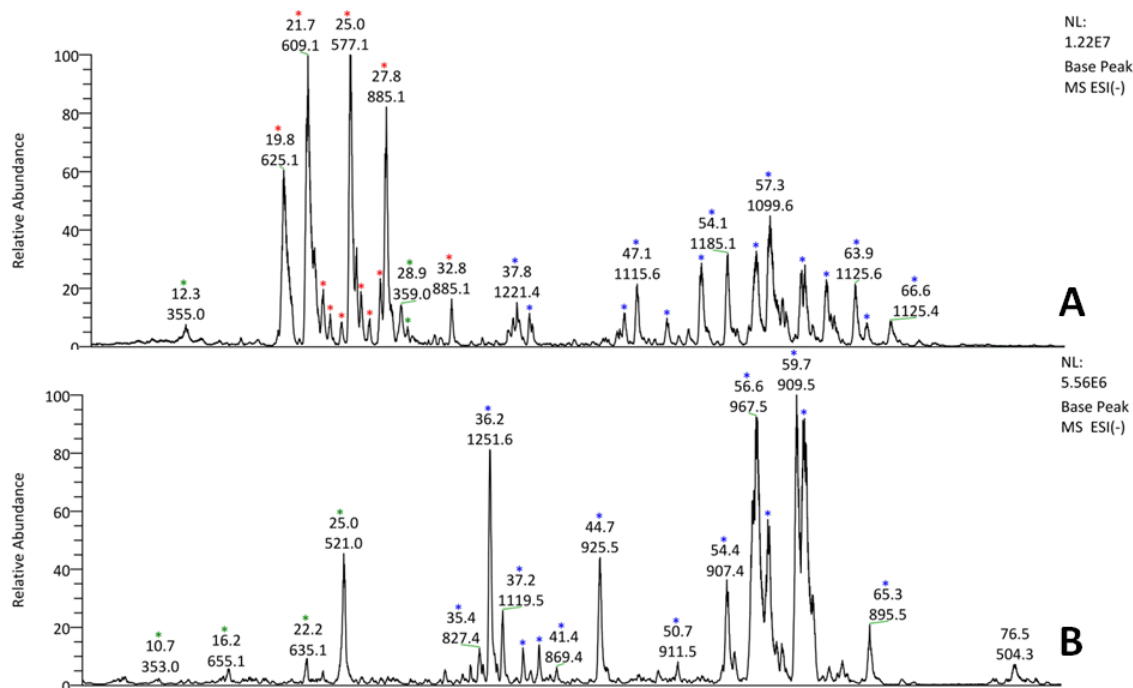


Ryc. 44 Chromatogramy LC-MS metanolowych ekstraktów z liści rozetkowych pochodzących z roślin gruntowych trzech gatunków *Eryngium* L. oraz z kultur *in vitro* *E. planum* (wartości liczbowe nad pikami: górna – czas retencji, dolna – masa jonu molekularnego)

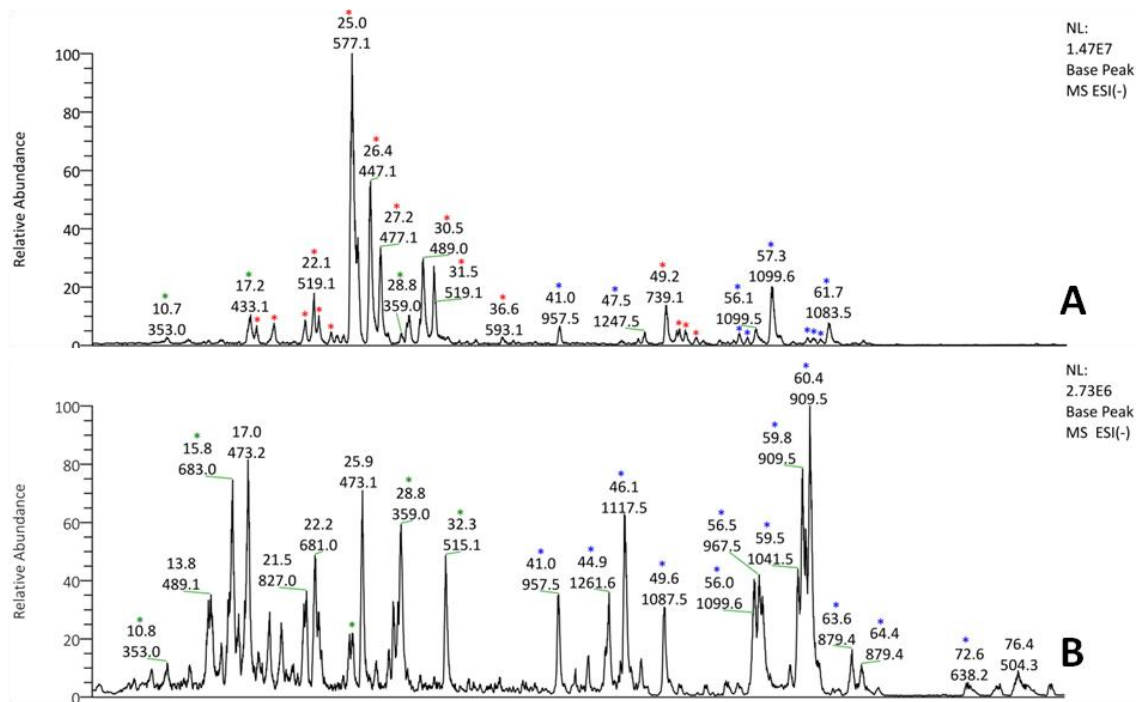


Ryc. 45 Chromatogramy LC-MS metanolowych ekstraktów z korzeni pochodzących z roślin gruntowych trzech gatunków *Eryngium* L. oraz z kultur *in vitro* *E. planum* (wartości liczbowe nad pikami: górna – czas retencji, dolna – masa jonu molekularnego)

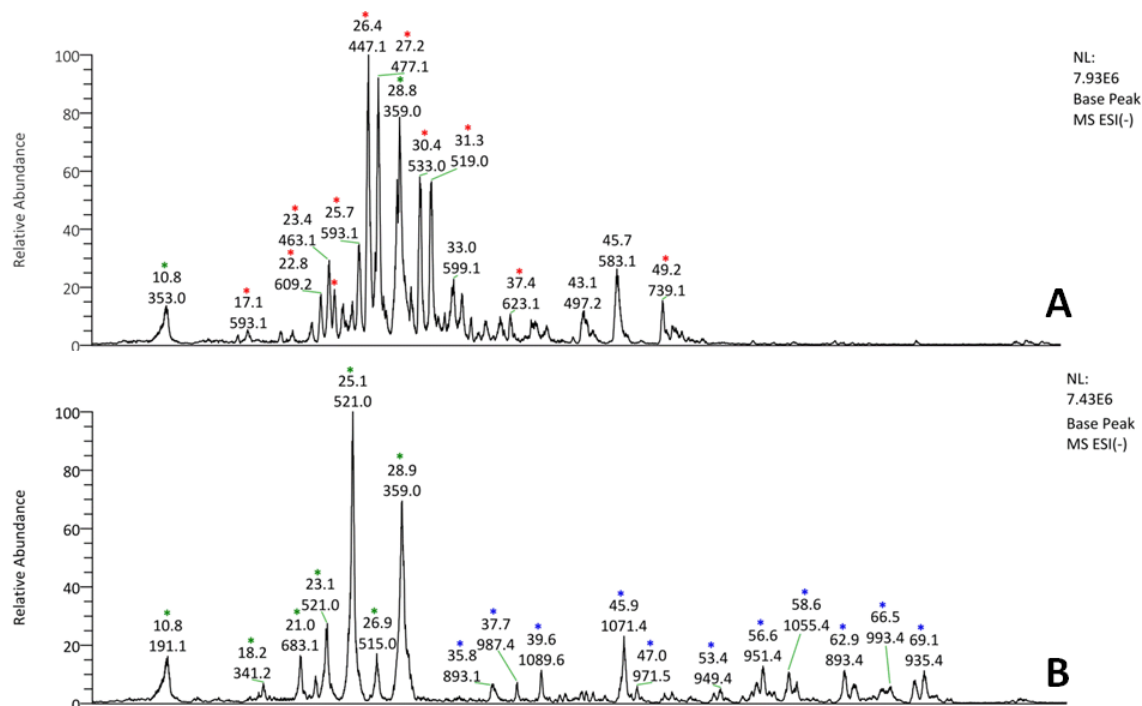
Porównano obecność kwasów fenolowych, flawonoidów i saponin triterpenowych w ekstraktach metanolowych z liści rozetkowych i korzeni roślin gruntowych trzech badanych gatunków mikołajków metodą LC-MS i wykreślono szczegółowe profile [Ryc. 46-48]. Na podstawie obserwacji profili dla *E. planum* zauważono, że zarówno liście jak i korzenie posiadają bogaty zestaw saponin triterpenowych (14 związków), których zawartość jest zdecydowanie wyższa w liściach. W liściach rozetkowych wykryto 3 kwasy fenolowe, natomiast w korzeniu 4 związki tego typu [Ryc. 46]. Korzenie *E. maritimum*, w porównaniu z liśćmi, charakteryzowały się większą liczbą i zawartością zarówno saponin triterpenowych jak i fenolokwasów. Liście tego gatunku zawierają 16 flawonoidów [Ryc. 47]. *E. campestre* akumuluje saponiny triterpenowe jedynie w korzeniach, jednakże w porównaniu z pozostałymi gatunkami w bardzo małych ilościach. Kwasy fenolowe obecne są w liczbie 7 w korzeniach i 2 w pędach roślin gruntowych tego gatunku [Ryc. 48]. Dla wszystkich trzech gatunków mikołajków potwierdzono brak obecności flawonoidów w korzeniach.



Ryc. 46 Chromatogramy LC-MS metanolowych ekstraktów z **A** liści rozetkowych i **B** korzeni z roślin gruntowych *E. planum* ● kwasy fenolowe ● flawonoidy ● saponiny triterpenowe
 (wartości liczbowe nad pikami: górna – czas retencji, dolna – masa jonu molekularnego)



Ryc. 47 Chromatogramy LC-MS metanolowych ekstraktów z **A** liści rozetkowych i **B** korzeni z roślin gruntowych *E. maritimum* ● kwasy fenolowe ● flawonoidy ● saponiny triterpenowe (wartości liczbowe nad pikami: górna – czas retencji, dolna – masa jonu molekularnego)



Ryc. 48 Chromatogramy LC-MS metanolowych ekstraktów z **A** liści rozetkowych i **B** korzeni z roślin gruntowych *E. campestre* L. ● kwasy fenolowe ● flawonoidy ● saponiny triterpenowe (wartości liczbowe nad pikami: górna – czas retencji, dolna – masa jonu molekularnego)

Na podstawie wykreslonych profili, porównanie trzech gatunków wskazuje, że:

E. planum – gatunek najbogatszy w saponiny triterpenowe, których duża zawartość charakteryzuje zarówno korzeń jak i liście rozetkowe

E. maritimum – gatunek, którego korzenie są stosunkowo bogate w kwasy fenolowe i saponiny, a liście we flawonoidy

E. campestre – atunek zawierający najwięcej flawonoidów w liściach

SAPONINY TRITERPENOWE

W oznaczeniach ilościowych saponin uwzględniono tylko saponiny triterpenowe wyizolowane z korzenia *E. planum*, o oznaczonych strukturach chemicznych [Kowalczyk i wsp. 2013]. Trzy główne saponiny występujące w krajowych gatunkach z rodzaju *Eryngium* to:

[M1] 3-*O*-β-D-glukopyranozylo-(1→2)-β-D-glukuronopyranozylo-21-*O*-acetylo,22-*O*-angeloilo-R1-barygenol

[M2A] 3-*O*-β-D-glukopyranozyol-(1→2)-β-D-glukuronopyranozylo-22-*O*-angeloilo-R1-barygenol

[M2B] 3-*O*-β-D-glukopyranozylo-(1→2)-β-D-glukuronopyranozylo-22-*O*-angeloilo-A1-barygenol

Ze względu na obserwację, iż te same saponiny charakterystyczne są dla korzeni *E. planum* i *E. maritimum*, jakościowych i ilościowych analiz składu saponin triterpenowych wykonano dla tych dwóch gatunków. Z danych literaturowych wynika, iż saponiny wyizolowane i oznaczone dla *E. campestre* różnią się zasadniczo od tych, które występują w pozostałych dwóch gatunkach krajowych mikołajków i nie są obecne w analizowanym materiale roślinnym z *E. planum* i *E. maritimum* [Kartal i wsp. 2005; Kartal i wsp. 2006; Kowalczyk i wsp. 2013]. Organy mikołajka polnego rosnącego w środowisku naturalnym nie zawierają saponin triterpenowych (M1-M5) charakterystycznych dla korzeni mikołajka płaskolistnego i mikołajka nadmorskiego. Natomiast w organach pochodzących z kultur *in vitro* wykazano obecność tych saponin – w liściach rozetkowych M2A i M2B oraz wszystkich sześciu (M1-M5) w korzeniach zregenerowanych roślin. Profil saponinowy różnicował się zależnie od gatunku *Eryngium* oraz jego organu [Tab. 30, 31, 32]. Dla dwóch analizowanych gatunków mikołajków, profil saponinowy korzeni był wyraźnie bogatszy, niż liści rozetkowych. Ponadto zarówno zawartość pojedynczych saponin, jak i zespołów saponin była wyższa w korzeniach niż liściach, bez względu na ich pochodzenie. Zawartość sumy wszystkich sześciu saponin w korzeniach *E. planum* hodowanego

w kulturach *in vitro* była 7,1-krotnie wyższa niż w korzeniach z gruntu. Tylko trzy (M1, M2A, M2B) z sześciu saponin tego zespołu wykryto w korzeniach *E. maritimum* – ich zawartość była 3,18- krotnie wyższa w surowcu z kultur *in vitro* niż w analogicznych organach roślin gruntowych. W liściach rozetkowych *E. planum* pochodzących z gruntu i kultur *in vitro* wykryto jedynie dwie saponiny charakterystyczne dla korzeni tego gatunku – M2A i M2B, natomiast w liściach *E. maritimum* – jedną saponinę M2B.

FENOLOKWASY

Metodą UPLC przeprowadzono analizę wybranych kwasów fenolowych – kwasu rozmarynowego i chlorogenowego, w surowcach trzech krajowych gatunków z rodzaju *Eryngium*. Najwyższą zawartość wybranych kwasów fenolowych odnotowano w organach *E. campestre*, następnie *E. maritimum* a najmniejszą w *E. planum*, z wyjątkiem liści rozetkowych roślin gruntowych, gdzie zawartość kwasu rozmarynowego w ekstrakcie mikołajka płaskolistnego była wyższa niż mikołajka nadmorskiego. Korzenie roślin rosnących w warunkach *in vitro* posiadały wyższą zawartość wybranych fenolokwasów niż korzenie roślin gruntowych – *E. planum* 4,4-krotnie, *E. campestre* 4,58-krotnie i *E. maritimum* 12-krotnie. Natomiast liście rozetkowe pędów namnażanych w kulturach *in vitro* posiadały zmienną zawartość kwasów fenolowych w zależności od mikrorozmnażanego gatunku. W przypadku *E. planum* i *E. campestre* zawartość sumy RA i CGA była odpowiednio 2,56- i 1,1-krotnie niższa niż w przypadku liści rozetkowych roślin gruntowych. W liściach pędów z kultur *in vitro* *E. maritimum* akumulacja kwasów fenolowych osiągnęła 6,75-krotność produkcji tych związków w pędach roślin gruntowych. Najbogatszym surowcem pod względem zawartości kw. rozmarynowego i chlorogenowego są korzenie *E. campestre* hodowanego w warunkach *in vitro*, w których akumulacja sumy RA + CGA wynosiła 16,883 mg g⁻¹ s.m. [Tab. 33].

Tab. 30 Zawartość (mg g⁻¹ s.m.) wybranych saponin triterpenowych (M1,M2A,M2B,M3,M4,M5) oraz ich sumy (M1-M5) w organach z roślin gruntowych i namnożonych w kulturach *in vitro* oraz kulturach niezróżnicowanych *E. planum* oznaczona metodą UPLC

SAPONINY TRITERPENOWE							
<i>Eryngium planum</i> L.							
Materiał roślinny	M1	M2A	M2B	M3	M4	M5	M1-M5
Rośliny gruntowe							
Liście rozetkowe	ND	0,053 ± 0,00 ^c	0,132 ± 0,00 ^c	ND	ND	ND	0,185
Korzenie	0,176 ± 0,01 ^c	2,347 ± 0,03 ^b	2,616 ± 0,03 ^b	0,036 ± 0,00 ^b	0,263 ± 0,02 ^b	0,188 ± 0,01 ^b	5,626
Rośliny z kultur <i>in vitro</i>							
Liście rozetkowe	ND	0,181 ± 0,01 ^c	0,281 ± 0,02 ^c	ND	ND	ND	0,462
Korzenie	1,228 ± 0,03 ^b	16,272 ± 0,07 ^a	16,233 ± 0,06 ^a	0,291 ± 0,01 ^a	2,702 ± 0,04 ^a	2,478 ± 0,02 ^a	22,971
Kalus	0,264 ± 0,06 ^a	0,659 ± 0,09 ^c	4,9 ± 0,05	ND	ND	ND	5,823
Zawiesina komórkowa	0,285 ± 0,04 ^a	0,486 ± 0,09 ^d	3,26 ± 0,04	ND	ND	ND	4,031

Średnie wartości w kolumnach z tą samą literą nie różnią się istotnie dla P=0,05 stosując test wielokrotnych porównań Duncana (ND – nie wykryto)

Tab. 31 Zawartość (mg g⁻¹ s.m.) wybranych saponin triterpenowych (M1,M2A,M2B,M3,M4,M5) oraz ich sumy (M1-M5) w organach z roślin gruntowych i namnożonych w kulturach *in vitro* *E. maritimum* oznaczona metodą UPLC

SAPONINY TRITERPENOWE							
<i>Eryngium maritimum</i> L.							
Materiał roślinny	M1	M2A	M2B	M3	M4	M5	M1-M5
Rośliny gruntowe							
Liście rozetkowe	ND	ND	0,049 ± 0,01 ^b	ND	ND	ND	0,049
Korzenie	0,024 ± 0,00 ^b	0,444 ± 0,05 ^{ns}	0,199 ± 0,02 ^b	ND	ND	ND	0,667
Rośliny z kultur <i>in vitro</i>							
Liście rozetkowe	ND	ND	0,216 ± 0,02 ^b	ND	ND	ND	0,216
Korzenie	0,132 ± 0,03 ^a	0,585 ± 0,1	1,407 ± 0,15 ^a	ND	ND	ND	2,124

Średnie wartości w kolumnach z tą samą literą nie różnią się istotnie dla P=0,05 stosując test wielokrotnych porównań Duncana (ND – nie wykryto)

Tab. 32 Zawartość (mg g⁻¹ s.m.) wybranych saponin triterpenowych (M1,M2A,M2B,M3,M4,M5) oraz ich sumy (M1-M5) w organach z roślin gruntowych i namnożonych w kulturach *in vitro* *E. campestre* oznaczona metodą UPLC

SAPONINY TRITERPENOWE							
Materiał roślinny	<i>Eryngium campestre</i> L.						
	M1	M2A	M2B	M3	M4	M5	M1-M5
Rośliny gruntowe							
Liście rozetkowe	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Korzenie	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Rośliny z kultur <i>in vitro</i>							
Liście rozetkowe	ND	0,095 ± 0,02 ^b	0,267 ± 0,04 ^{ns}	ND	ND	ND	0,362
Korzenie	0,493 ± 0,12	1,545 ± 0,38 ^a	0,282 ± 0,72	0,042 ± 0,00	0,036 ± 0,00	0,039 ± 0,00	2,437

Średnie wartości w kolumnach z tą samą literą nie różnią się istotnie dla P=0,05 stosując test wielokrotnych porównań Duncana (ND – nie wykryto)

Tab. 33 Zawartość (mg g⁻¹ s.m.) wybranych fenolokwasów: kw. rozmarynowego (RA) i chlorogenowego (CGA) oraz ich sumy (RA+CGA) w organach z roślin gruntowych i namnożonych w kulturach *in vitro* *Eryngium* oznaczona metodą UPLC

KWASY FENOLOWE									
Materiał roślinny	<i>Eryngium planum</i> L.			<i>Eryngium maritimum</i> L.			<i>Eryngium campestre</i> L.		
	RA	CGA	RA+CGA	RA	CGA	RA+CGA	RA	CGA	RA+CGA
Rośliny gruntowe									
Liście rozetkowe	0,717 ± 0,02 ^a	0,240 ± 0,01 ^a	0,957	0,188 ± 0,01 ^d	0,264 ± 0,02 ^c	0,452	4,229 ± 0,16 ^b	1,093 ± 0,09 ^b	5,322
Korzenie	0,112 ± 0,01 ^b	0,067 ± 0,00 ^b	0,179	0,495 ± 0,01 ^c	0,227 ± 0,01 ^c	0,722	2,644 ± 0,12 ^d	1,041 ± 0,06 ^b	3,685
Rośliny z kultur <i>in vitro</i>									
Liście rozetkowe	0,295 ± 0,01 ^b	0,079 ± 0,00 ^b	0,374	0,932 ± 0,02 ^b	2,117 ± 0,04 ^b	3,049	3,839 ± 0,14 ^c	0,989 ± 0,14 ^c	4,828
Korzenie	0,756 ± 0,02 ^a	0,032 ± 0,00 ^b	0,788	4,309 ± 0,09 ^a	4,359 ± 0,04 ^a	8,668	15,516 ± 0,37 ^a	1,367 ± 0,10 ^a	16,883

Średnie wartości w kolumnach z tą samą literą nie różnią się istotnie dla P=0,05 stosując test wielokrotnych porównań Duncana (ND – nie wykryto)

2.2.2. Ocena fitochemiczna biomasy z kultur korzeniowych *E. maritimum*

Ilościowej analizie fitochemicznej metodą UPLC poddano także kultury korzeniowe *E. maritimum* [Tab. 34]. Korzenie tego gatunku rosły w pożywkach płynnych MS wzbogaconych w auksyny w stężeniu 0,1 lub 1,0 mg l⁻¹. W doświadczeniu tym badano wpływ egzogennych regulatorów wzrostu i rozwoju roślin na akumulację metabolitów wtórnych w biomacie korzeniowej. Bez względu na rodzaj i stężenie auksyn korzenie utrzymywane w płynnych pożywkach wykazywały niższą akumulację kwasów fenolowych niż korzenie powstałe w wyniku ukorzeniania namnażanych w kulturach *in vitro* pędów oraz korzenie roślin gruntowych. Zawartość saponin triterpenowych w analizowanych korzeniach była niższa niż w korzeniach z roślin uzyskanych w *in vitro*, natomiast wyższa niż w korzeniach gruntowych, w których nie odnotowano saponin. W korzeniach rosnących w pożywce MS bez auksyn odnotowano znikomą zawartość metabolitów wtórnych – 0,006 mg g⁻¹ kwasów fenolowych i 0,023 mg g⁻¹ saponin. W pożywkach wzbogaconych niższymi stężeniami auksyn korzenie akumulowały wyższą zawartość fenolokwasów (1,227 – 1,362 mg g⁻¹) niż w pożywkach o wyższym ich stężeniu (0,504 – 0,953 mg g⁻¹). Z kolei zawartość saponin triterpenowych była zbliżona we wszystkich kulturach korzeniowych, z wyjątkiem korzeni utrzymywanych w pożywce MS + 1,0 mg g⁻¹ IAA w których akumulacja saponin wzrosła i wynosiła 0,525 mg g⁻¹ [Tab. 34].

Tab. 34 Zawartość (mg g⁻¹ s.m.) fenolokwasów: kw. rozmarynowego (RA), kw. chlorogenowego (CGA) i saponin (M1,M2A, M2B) w korzeniach *E. maritimum* rosnących w płynnych pożywkach MS wzbogaconych w auksyny mierzona metodą UPLC

Wariant MS (auksyny mg l ⁻¹)	FENOLOKWASY			SAPONINY TRITERPENOWE			
	RA	CGA	RA + CGA	M1	M2A	M2B	M1-M2B
0	0,002 ± 0,00 ^g	0,004 ± 0,00 ^f	0,006	0,004 ± 0,00 ^c	0,007 ± 0,00 ^d	0,012 ± 0,00 ^c	0,023
IAA 0,1	0,743 ± 0,00 ^a	0,620 ± 0,01 ^a	1,363	0,018 ± 0,00 ^b	0,087 ± 0,03 ^{bc}	0,245 ± 0,10 ^b	0,350
IBA 0,1	0,725 ± 0,01 ^b	0,576 ± 0,01 ^b	1,301	0,016 ± 0,00 ^b	0,064 ± 0,02 ^c	0,194 ± 0,07 ^b	0,274
NAA 0,1	0,676 ± 0,00 ^c	0,551 ± 0,01 ^c	1,227	0,020 ± 0,00 ^b	0,100 ± 0,01 ^{ab}	0,171 ± 0,02 ^b	0,291
IAA 1,0	0,439 ± 0,01 ^e	0,191 ± 0,01 ^e	0,630	0,042 ± 0,01 ^a	0,124 ± 0,03 ^a	0,359 ± 0,09 ^a	0,525
IBA 1,0	0,073 ± 0,01 ^f	0,431 ± 0,01 ^d	0,504	0,016 ± 0,00 ^b	0,107 ± 0,02 ^{ab}	0,147 ± 0,04 ^b	0,270
NAA 1,0	0,530 ± 0,01 ^d	0,423 ± 0,01 ^d	0,953	0,044 ± 0,00 ^a	0,101 ± 0,02 ^{ab}	0,254 ± 0,09 ^b	0,399

Średnie wartości w kolumnach z tą samą literą nie różnią się istotnie dla P=0,05 stosując test wielokrotnych porównań Duncana

2.2.3. Ocena fitochemiczna biomasy z kultur pędowych *E. planum* po zabiegach biotechnologicznych

Ilościowej analizie fitochemicznej metodą HPLC poddano kultury pędowe *E. planum*, w których zastosowano wybrane zabiegi biotechnologiczne [Tab. 35]. Pędy tego gatunku rosły w pożywkach płynnych MS z 1,0 mg l⁻¹ BAP i 0,1 mg l⁻¹ IAA. W doświadczeniu tym badano wpływ rodzaju elicytora i czasu elicytacji na akumulację wybranych fenolokwasów w biomacie pędowej mikołajka płaskolistnego. W wyniku zastawiania roztworu jasmonianu metylu, ekstraktu drożdżowego i podwyższonego stężenia sacharozy zwiększono akumulację sumy wybranych fenolokwasów jak i poszczególnych kwasów w kulturach pędowych, w porównaniu do kontroli, pędów nieelicytowanych. Elicytacja jasmonianem metylu zwiększała zawartość kwasu rozmarynowego w pędach *E. planum* nawet 5,5-krotnie, dodatek podwyższonego stężenia sacharozy do pożywki hodowlanej 4,7-krotnie, a elicytacja ekstraktem drożdżowym 2,3-krotnie, w porównaniu do pędów nieelicytowanych [Tab 35].

Tab. 35 Zawartość (mg g⁻¹ s.m.) fenolokwasów: kw. rozmarynowego (RA), kw. chlorogenowego (CGA) i kawowego (CA) w pędach *E. planum* rosnących w płynnych pożywkach MS po elicytacji jasmonianem metylu (MeJa), ekstraktem drożdżowym (YE) oraz sacharozą (S) o podwyższonym stężeniu mierzona metodą HPLC

Elicytacja	KWASY FENOLOWE			
	RA	CGA	CA	RA + CGA + CA
kontrola	3,25 ± 0,00 ^j	1,06 ± 0,0 ^f	0,08 ± 0,0 ^f	4,39
MeJa 12 godz.	7,78 ± 0,01 ^e	1,51 ± 0,0 ^c	0,1 ± 0,0 ^c	9,39
MeJa 24 godz.	11,01 ± 0,01 ^d	1,34 ± 0,0 ^e	0,11 ± 0,0 ^b	12,46
MeJa 48 godz.	17,73 ± 0,00 ^a	1,77 ± 0,0 ^b	0,3 ± 0,0 ^a	19,8
YE 24 godz.	3,95 ± 0,02 ⁱ	0,73 ± 0,0 ^g	0,08 ± 0,0 ^f	4,76
YE 48 godz.	7,39 ± 0,01 ^g	1,49 ± 0,0 ^d	0,08 ± 0,0 ^f	8,96
YE 72 godz.	5,91 ± 0,03 ^h	1,44 ± 0,0 ⁱ	0,06 ± 0,0 ^d e	7,41
YE 96 godz.	7,46 ± 0,0 ^f	1,15 ± 0,0 ^h	0,08 ± 0,0 ^f	8,69
S 10 dni	3,24 ± 0,0 ^j	1,45 ± 0,0 ⁱ	0,06 ± 0,0 ^e	4,75
S 20 dni	15,2 ± 0,0 ^b	3,32 ± 0,0 ^h	0,1 ± 0,0 ^c	18,62
S 30 dni	11,74 ± 0,02 ^c	3,07 ± 0,0 ^a	0,07 ^d	14,88

Średnie wartości w kolumnach z tą samą literą nie różnią się istotnie dla P=0,05 stosując test wielokrotnych porównań Duncana

2.2.4. Ocena fitochemiczna biomasy z kultur komórkowych *E. planum* po zabiegach biotechnologicznych

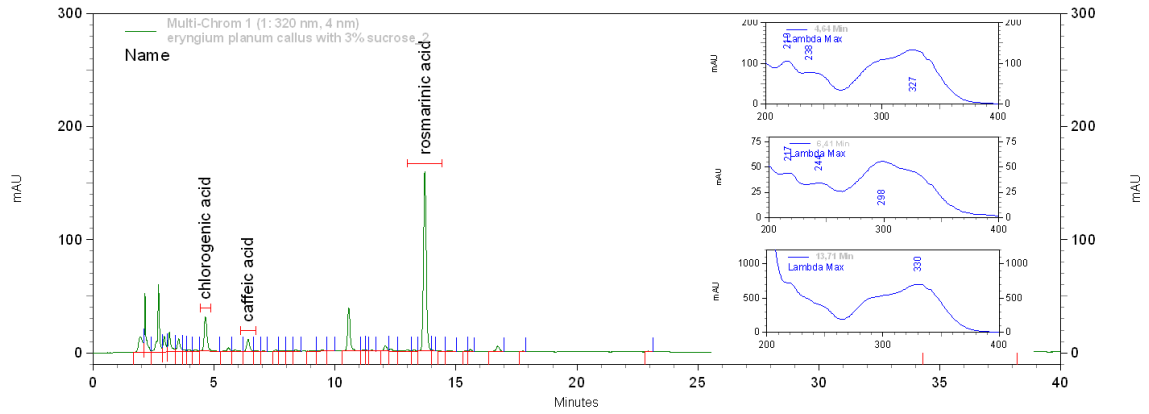
Ilościowej analizie fitochemicznej metodą HPLC poddano kultury komórkowe *E. planum* – ustabilizowany kalus pochodzący z eksplantatów 30-dniowej siewki i hodowany na pożywce MS suplementowanej w 1,0 mg l⁻¹ 2,4-D i 1,0 mg l⁻¹ IAA oraz wyprowadzoną z tego kalusa zawiesinę komórkową namnożoną w pożywce 1,0 mg l⁻¹ 2,4-D i poddaną elicytacji. Wyniki wskazują, że kalus mikołajka płaskolistnego zawierał wyższą zawartość zarówno sumy RA + CGA jak i pojedynczych kwasów fenolowych, niż zawiesina komórkowa, a także biomasa poddana procesowi elicytacji. Kulturę zawiesinową mikołajka płaskolistnego elicytowano jasmonianem metylu. Ekspozycja biomasy komórkowej na 24-godzinna elicytację 100 μM MeJa podwyższyła zawartość sumy fenolokwasów 1,65-krotnie, natomiast 48-godzinna elicytacja 2,08-krotnie, w porównaniu z kulturą komórkową nieelicytowaną [Tab. 36].

Tab. 36 Zawartość (mg g⁻¹ s.m.) fenolokwasów: kw. rozmarynowego (RA) i kw. chlorogenowego (CGA) w metanolowych ekstraktach z kalusa i zawiesiny komórkowej *E. planum* mierzona metodą HPLC

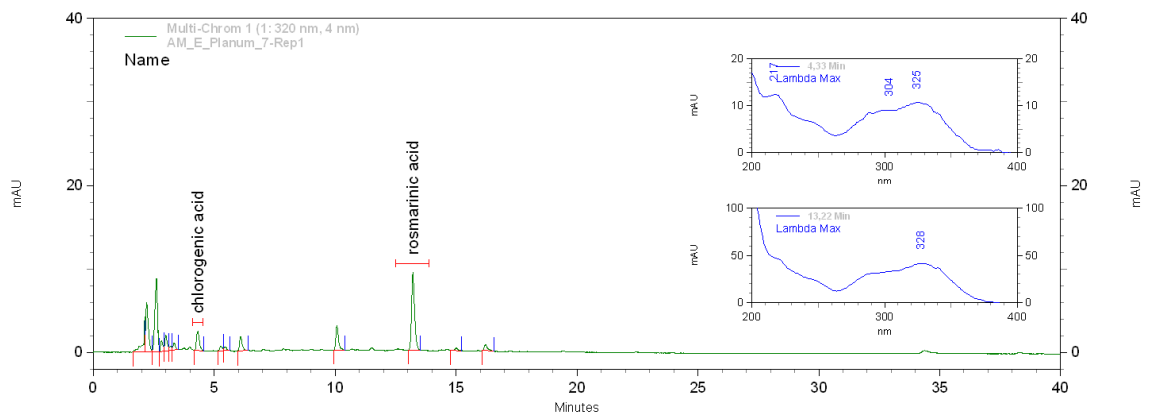
Typ kultury komórkowej / Elicytacja	KWASY FENOLOWE		
	RA	CGA	RA + CGA
Kalus	5,14 ± 0,03 ^a	0,94 ± 0,02 ^a	6,20
Zawiesina komórkowa	1,73 ± 0,03 ^d	0,31 ± 0,02 ^b	2,04
MeJa 12 godz.	3,12 ± 0,09 ^c	0,25 ± 0,03 ^c	3,37
MeJa 48 godz.	3,91 ± 0,05 ^b	0,33 ± 0,01 ^b	4,24

Średnie wartości w kolumnach z tą samą literą nie różnią się istotnie dla P=0,05 stosując test wielokrotnych porównań Duncana

Dla frakcji otrzymanych z kalusa i zawiesiny komórkowej *E. planum* wykonano chromatogramy HPLC [Ryc. 49, 50]. Czas retencji i widma UV badanych kwasów były porównywalne z substancjami wzorcowymi. Zidentyfikowano kwasy: rozmarynowy, chlorogenowy i kawowy, których wyższą wykazano zawartość dla kalusa, analizując chromatogramy HPLC frakcji fenolokwasowych. Pozostałe kwasy nie zostały zidentyfikowane.



Ryc. 49 Chromatogram HPLC frakcji fenolokwasowej z kalusa *E. planum*
długość fali detekcji $\lambda = 320$ nm (w ramach widma UV pików kwasów CGA, CA i RA)



Ryc. 50 Chromatogram HPLC frakcji fenolokwasowej z kultury zawiesinowej *E. planum*
długość fali detekcji $\lambda = 320$ nm (w ramach widma UV pików kwasów CGA, CA i RA)

2.2.5. Oznaczenie całkowitej sumy polifenoli

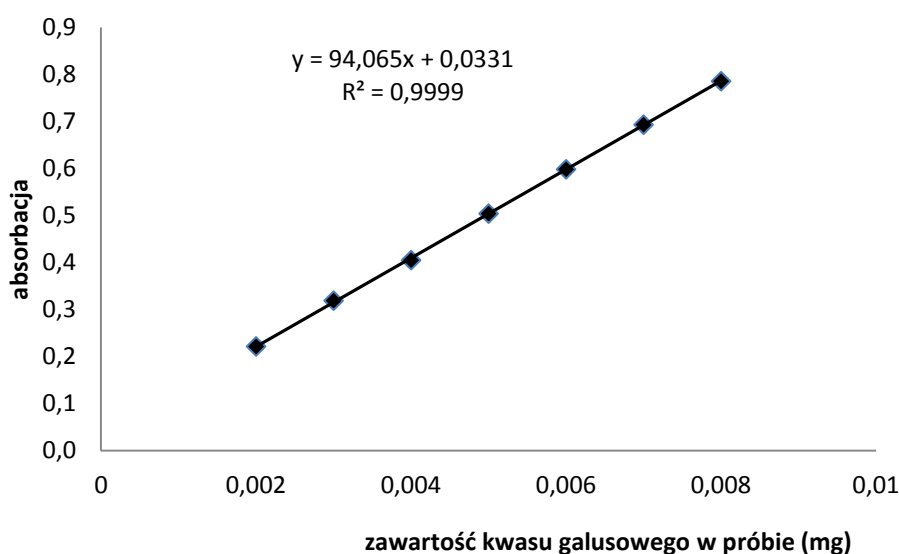
Badania ilościowe zawartości polifenoli z wykorzystaniem metod spektrofotometrycznych wg zmodyfikowanej metody Meng i wsp (2009) z wykorzystaniem odczynnika Folin-Ciocalteu przeprowadzono dla surowców roślin gruntowych oraz organów z kultur *in vitro* trzech gatunków mikołajków. Wyznaczono krzywą kalibracyjną dla kwasu galusowego [Tab. 37, Ryc. 51].

Obliczenie parametrów krzywej kalibracyjnej

Tab. 37 Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwasu galusowego

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	\bar{A}
0,002	0,2155	0,2199	0,2210	0,2217	0,2240	0,2250	0,2212
0,003	0,3151	0,3182	0,3186	0,3194	0,3197	0,3206	0,3186
0,004	0,4017	0,4022	0,4044	0,4048	0,4061	0,4091	0,4047
0,005	0,4954	0,5018	0,5039	0,5043	0,5070	0,5098	0,5037
0,006	0,5922	0,5947	0,5975	0,6001	0,6005	0,6027	0,5980
0,007	0,6876	0,6889	0,6923	0,6926	0,6975	0,6979	0,6928
0,008	0,7744	0,7763	0,7872	0,7885	0,7920	0,7931	0,7931

X – ilość kwasu galusowego w próbce (mg); A₁-A₆ – wartości absorbancji badanych próbek; \bar{A} – średnia arytmetyczna z wartości absorbancji



Ryc. 51 Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu galusowego

Wyniki oznaczeń ilościowych badanych wyciągów podano w mg g⁻¹ surowca, w przeliczeniu na kwas galusowy [Tab. 38].

Tab. 38 Zawartość sumy polifenoli w ekstraktach metanolowo-wodnych

Materiał roślinny		Ilość surowca w próbie [mg]	Zawartość sumy polifenoli w surowcu (mg GAE/g)	
<i>E.planum</i>	Rośliny gruntowe	Liście rozetkowe	0,384	12,21 ± 0,12
		Korzenie	2,080104	2,45 ± 0,01
	Kultury <i>in vitro</i>	Liście rozetkowe	0,2561088	15,84 ± 0,18
		Korzenie	0,2816	15,07 ± 0,11
<i>E.campestre</i>	Rośliny gruntowe	Liście rozetkowe	0,480192	9,45 ± 0,04
		Korzenie	0,416052	10,30 ± 0,20
	Kultury <i>in vitro</i>	Liście rozetkowe	0,29304	15,07 ± 0,08
		Korzenie	0,192	22,54 ± 0,10
<i>E.maritimum</i>	Rośliny gruntowe	Liście rozetkowe	0,4489968	11,20 ± 0,17
		Korzenie	2,88	1,5 ± 0,01
	Kultury <i>in vitro</i>	Liście rozetkowe	0,2887	15,51 ± 0,17
		Korzenie	0,352	11,79 ± 0,04

Zawartość sumy polifenoli w badanych surowcach była zawsze większa w biomase z kultur *in vitro* niż w analogicznych organach z roślin gruntowych dla wybranych gatunków. Zwłaszcza biomasa korzeni z kultur *in vitro* charakteryzowała się dużo wyższą zawartością polifenoli niż korzenie roślin gruntowych. Najwyższą zawartość sumy polifenoli (22,54 ± 0,10) wykazywały korzenie z kultur *in vitro* *E. campestre*, co jest zbieżne z obserwacją ich morfologii – były to korzenie najmłodsze, charakteryzujące się dużą liczbą korzonków bocznych.

3. Aktywność biologiczna ekstraktów i frakcji roślin gruntowych i kultur *in vitro*

Eryngium L.

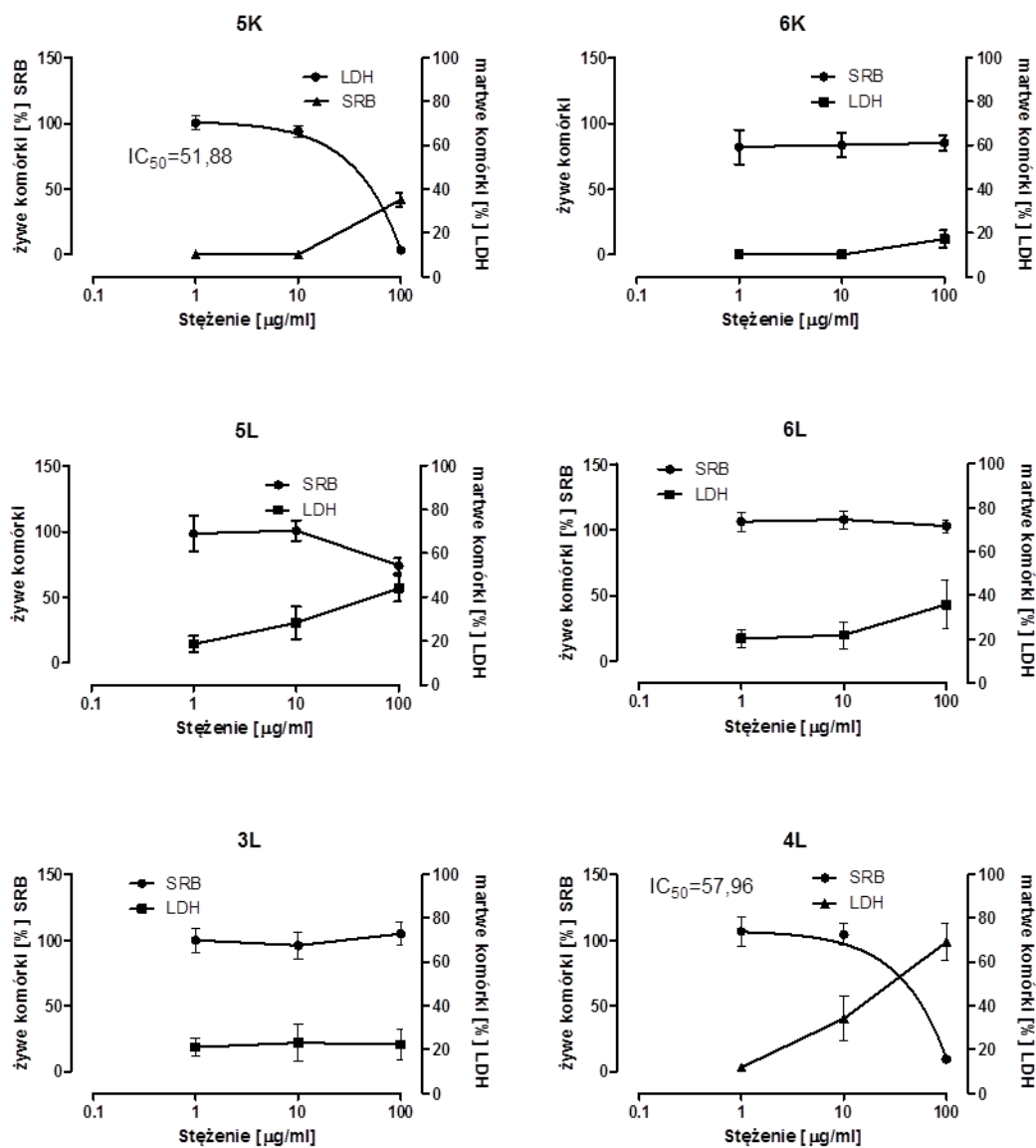
3.1. Aktywność cytotoksyczna i proapoptotyczna frakcji ekstraktu metanolowego

E. planum

3.1.1. Ocena stopnia cytotoksyczności badanych frakcji testami LDH i SRB

W pracy wykonano badania przesiewowe w kierunku oceny stopnia cytotoksyczności wybranych frakcji ekstraktów metanolowych z liści rozetkowych (frakcja flawonoidowa, flawonoidowo-saponinowa, saponinowa, fenolokwasowa) i korzeni (frakcja saponinowa, frakcja: kw.rozmarynowy + chlorogenowy + kawowy) roślin gruntowych *Eryngium planum L.* Ocenę działania cytotoksycznego badanych frakcji w stężeniu 100; 10; 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ wobec komórek ludzkiego raka jajnika SKOV-3 określono metodą pośrednią, poprzez monitoring aktywności enzymu komórkowego - dehydrogenazy mleczanowej - w teście LDH. Dehydrogenaza mleczanowa to enzym cytoplazmatyczny, który na skutek zmian integralności błony komórkowej przemieszcza się z komórki do pożywki hodowlanej. Obecny w pożywce enzym przekształca sól tetrazoliową w barwny formazan. Na podstawie intensywności zabarwienia mierzono spektrofotometrycznie do dalszych analiz wybrano frakcję saponinową z korzenia o określonym $\text{IC}_{50}=51,8$ i frakcję saponinową z liści rozetkowych) o $\text{IC}_{50}=57,9$ (IC_{50} jest miarą aktywności cytotoksycznej określanej jako stężenie badanej frakcji przy którym proliferacja komórek zostaje zahamowana w 50%).

W kolejnym etapie badań oszacowano liczbę żywych komórek SKOV-3 poddanych działaniu wyselekcjonowanych frakcji (w stężeniach 100; 75; 50; 25; 12,5; 6,25 $\mu\text{g ml}^{-1}$) przy użyciu testu z sulforodaminą (SRB). Podstawą tej metody jest elektrostatyczne wiązanie białka w środowisku o odpowiednim pH z anionowym barwnikiem sulforodaminą i spektrofotometryczny pomiar intensywności zabarwienia – ilość białka jest wprost proporcjonalna do liczby żywych komórek. Do dalszych badań wyselekcjonowano stężenia frakcji o najwyższej aktywności cytotoksycznej – frakcje saponinowe z korzenia i liści rozetkowych - 50 i 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ [Ryc. 52].



Ryc. 52 Przeżywalność komórek raka jajnika SKOV-3 traktowanych frakcjami saponinowymi z liści rozetkowych i korzeni *E. planum*

5K – frakcja saponinowa z korzenia *E. planum*

6K – frakcja fenolokwasowa z korzenia *E. planum*

5L – frakcja flawonoidowo-saponinowa z liści rozetkowych *E. planum*

6L – frakcja fenolokwasowa z liści rozetkowych *E. planum*

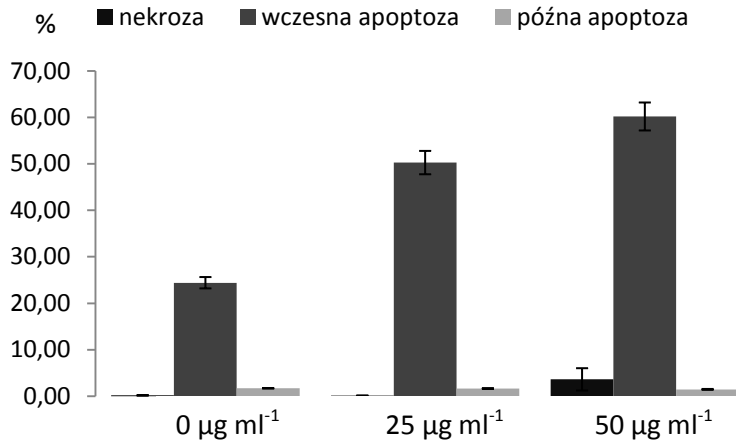
3L – frakcja flawonoidowa z liści rozetkowych *E. planum*

4L – frakcja saponinowa z liści rozetkowych *E. planum*

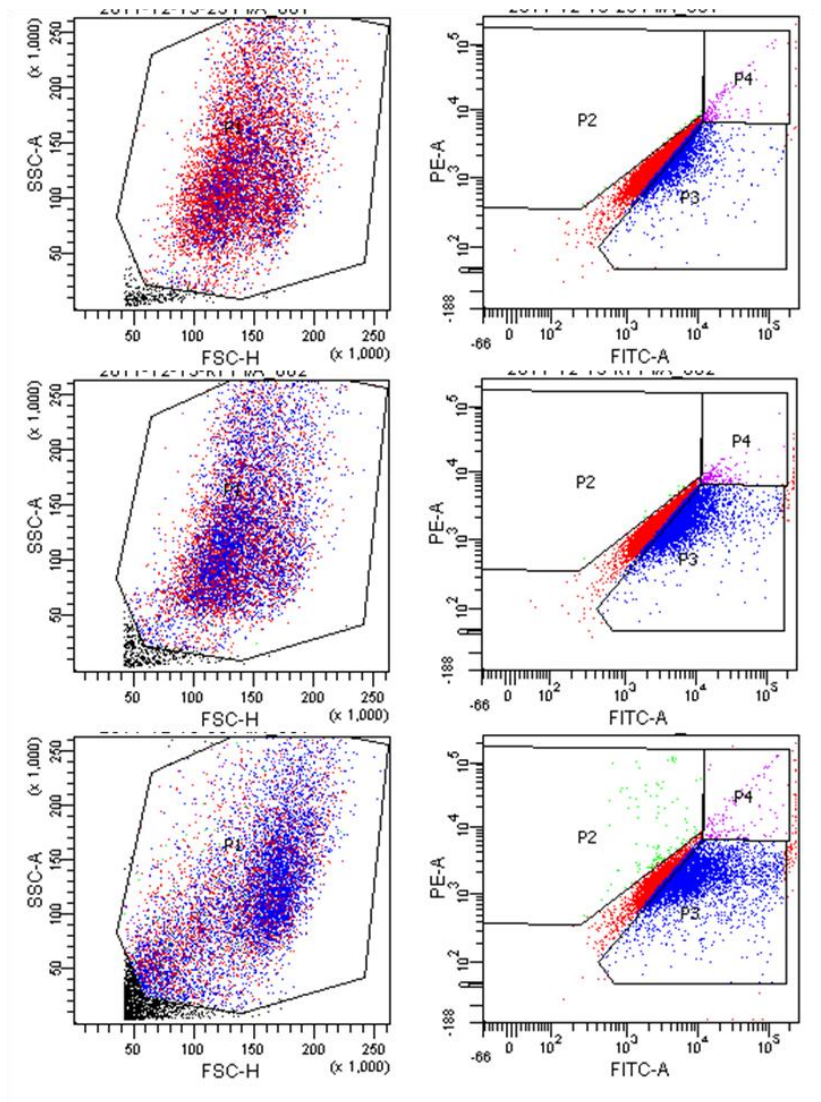
3.1.2. Ocena zdolności frakcji saponinowych do indukcji apoptozy

Odpowiedzią komórki na działanie czynników cytotoksycznych może być jej zatrzymanie w cyklu życiowym bądź indukcja śmierci na drodze apoptozy, a nawet nekrozy. Przeprowadzona ocena działania cytotoksycznego nie pozwala na rozróżnienie komórek apoptotycznych od nekrotycznych. Dlatego w celu wyjaśnienia mechanizmu cytotoksycznego działania frakcji saponinowych poprzez ocenę liczby komórek apoptotycznych i nekrotycznych wykonano test Annexin V. Komórki nienarażone na działanie czynników cytotoksycznych wykazują asymetrię błony komórkowej, polegającą na występowaniu cząsteczek fosfatydyloseryny wyłącznie na wewnętrznej powierzchni błony komórkowej. Jednym z pierwszych etapów apoptozy jest wydostawanie się tych cząsteczek na zewnątrz błony. Wykonane badania, czyli zastosowanie aneksyny V i jodku propidyny, pozwoliły na ocenę wielkości uszkodzeń komórek powodowanych przez badaną frakcję i zapoczątkowanie procesów fizjologicznej śmierci. We wczesnej apoptozie fosfatydyloseryna usytuowana po wewnętrznej stronie błony komórkowej przemieszcza się na zewnątrz i wiąże z aneksyną V. Jednocześnie jodek propidyny pozwala na obserwację integralności błony komórkowej związanej z procesem nekrozy. Ta procedura umożliwia rozróżnienie komórek: we wczesnej apoptozie, w późnej fazie apoptozy, żywych nieapoptotycznych i komórek nekrotycznych.

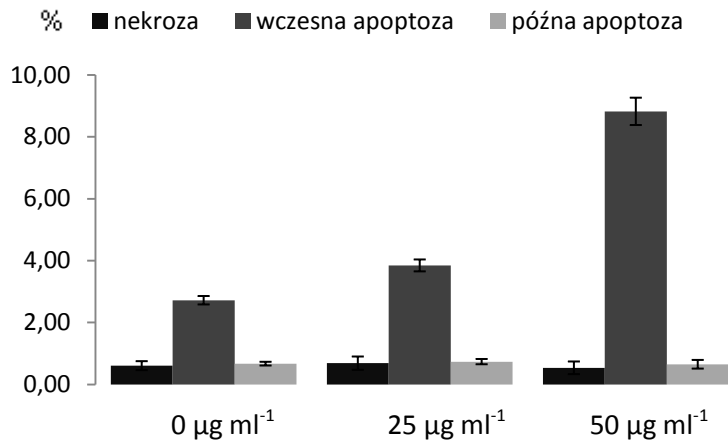
W pracy badano wpływ frakcji saponinowych z liści rozetkowych i korzeni mikołajka płaskolistnego na indukcję apoptozy i nekrozy w komórkach SKOV-3. Zdolność frakcji saponinowych do indukcji śmierci komórki oznaczono testem ANNEXIN V Assay w trzech niezależnych eksperymentach, a wyniki przedstawiono w formie wykresów kolumnowych [Ryc. 53, 54] i kropkowych [54,56]. Frakcje saponinowe z korzenia wykazywały silniejsze działanie proapoptotyczne niż frakcje z liści rozetkowych. Stopień aktywności proapoptotycznej wzrastał wraz ze wzrostem stężeń badanych frakcji.



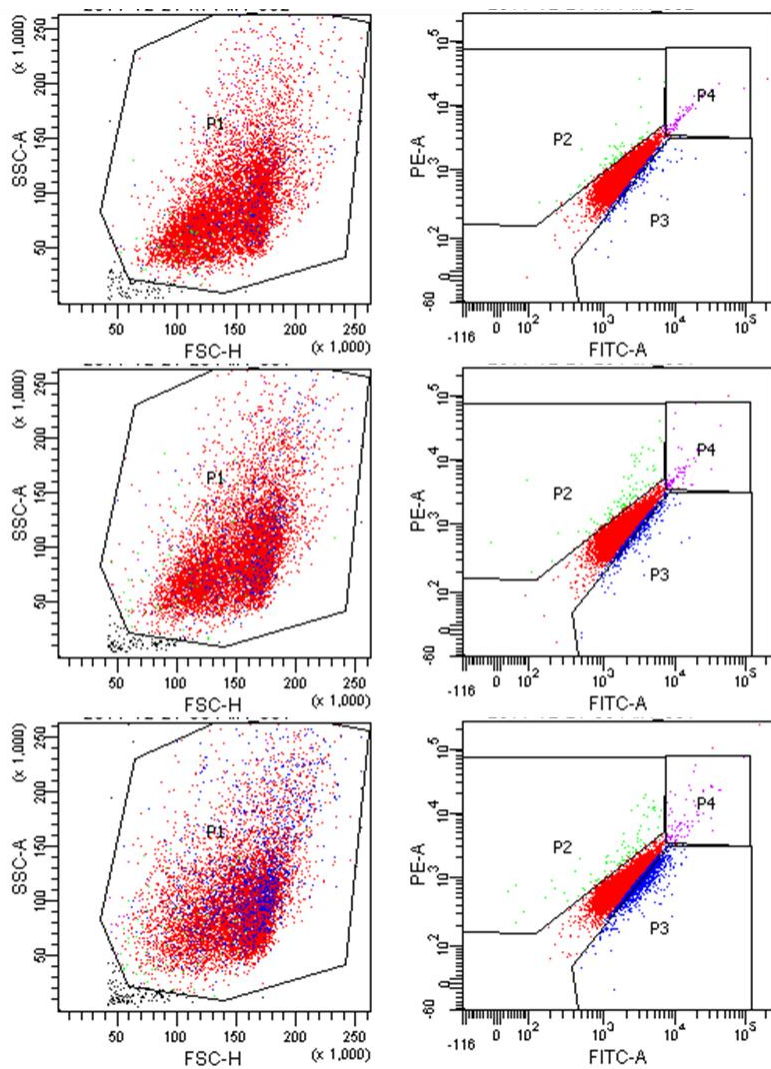
Ryc. 53 Indukcja apoptozy i nekrozy w komórkach nowotworowych SKOV-3 poddanych działaniu frakcji saponinowych z korzeni *E. planum*



Ryc. 54 Analiza cytometryczna komórek nowotworowych SKOV-3 poddanych działaniu frakcji saponinowych z korzeni *E. planum*



Ryc. 55 Indukcja apoptozy i nekrozy w komórkach nowotworowych SKOV-3 poddanych działaniu frakcji saponinowych z liści rozetkowych *E. planum*

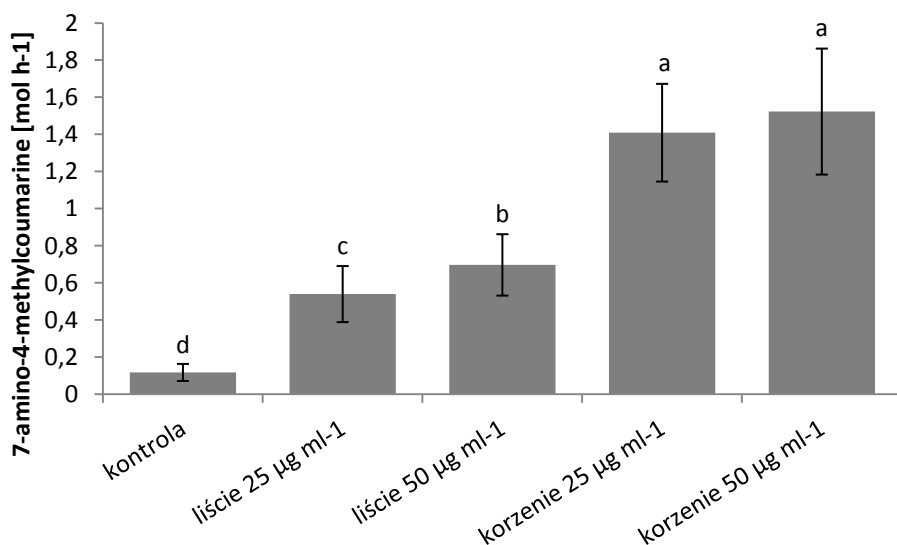


Ryc. 56 Analiza cytometryczna komórek nowotworowych SKOV-3 poddanych działaniu frakcji saponinowych z korzeni *E. planum*

3.1.3. Ocena wpływu frakcji saponinowych na aktywność kaspazy 3

W ostatnim etapie apoptozy następuje wzbudzenie kaskady kaspaz, z czego najważniejszą jest kaspaza 3, która uaktywnia bezpośrednio DFF (DNA Fragmentation Factor), doprowadzając do trawienia DNA. Kaspaza 3 jest końcowym etapem przemian kaspaz i w związku z tym stanowi właściwy punkt wykrywania apoptozy [Chmielewski i wsp. 2008].

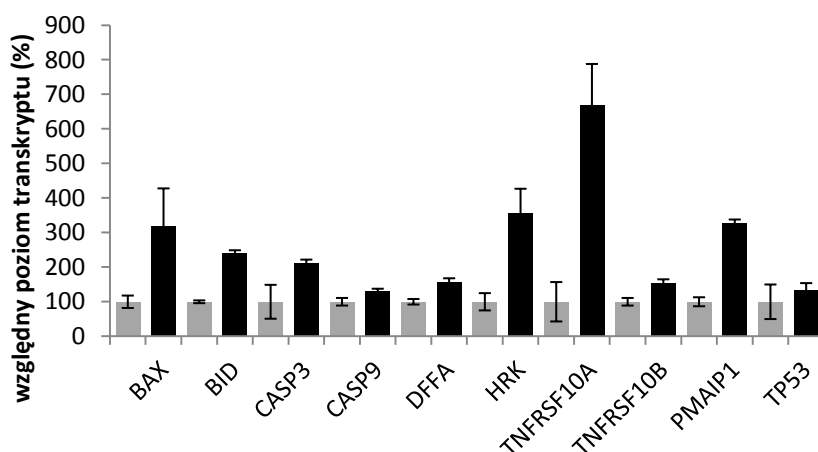
Zdolność frakcji saponinowych z liści i korzeni *E. planum* do aktywacji kaspazy 3 w komórkach raka jajnika SKOV-3 oznaczono testem Caspase 3 Assay w trzech niezależnych eksperymentach, a wyniki przedstawiono w formie wykresu kolumnowego [Ryc. 57]. W linii komórkowej SKOV-3 wykazano istotny statystycznie wzrost aktywności kaspazy 3 pod wpływem frakcji saponinowych z liści i korzenia, zarówno w stężeniu $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ jak i $25 \mu\text{g ml}^{-1}$. Aktywność ta skorelowana była z kompleksem saponin, odmiennym dla różnych organów. Najwyższą aktywność kaspazy 3 odnotowano w komórkach rakowych traktowanych frakcją saponinową z korzenia w stężeniu $50 \mu\text{g ml}^{-1}$.



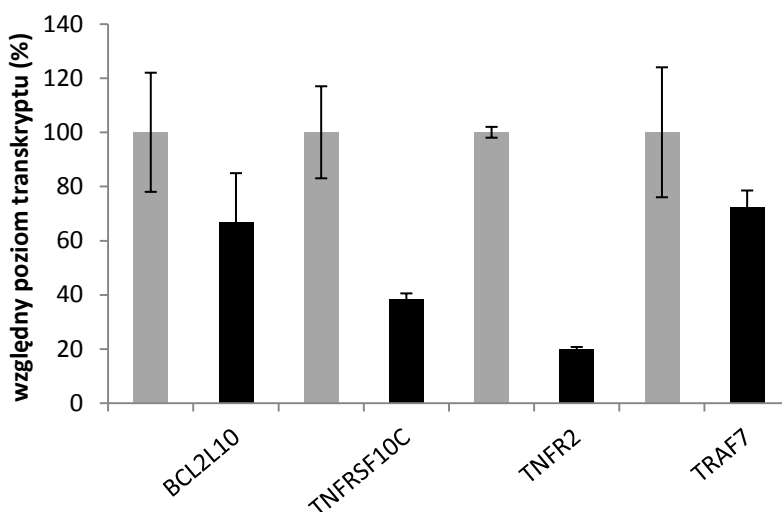
Ryc. 57 Wpływ frakcji saponinowych z liści rozetkowych i korzeni *E. planum* na aktywność kaspazy 3 w komórkach SKOV-3. Średnie wartości z tą samą literą nie różnią się istotnie dla $P=0,05$ stosując test wielokrotnych porównań Dunetta.

3.1.4. Ocena wpływu frakcji saponinowej z korzeni na ekspresję genów pro- i antyapoptotycznych

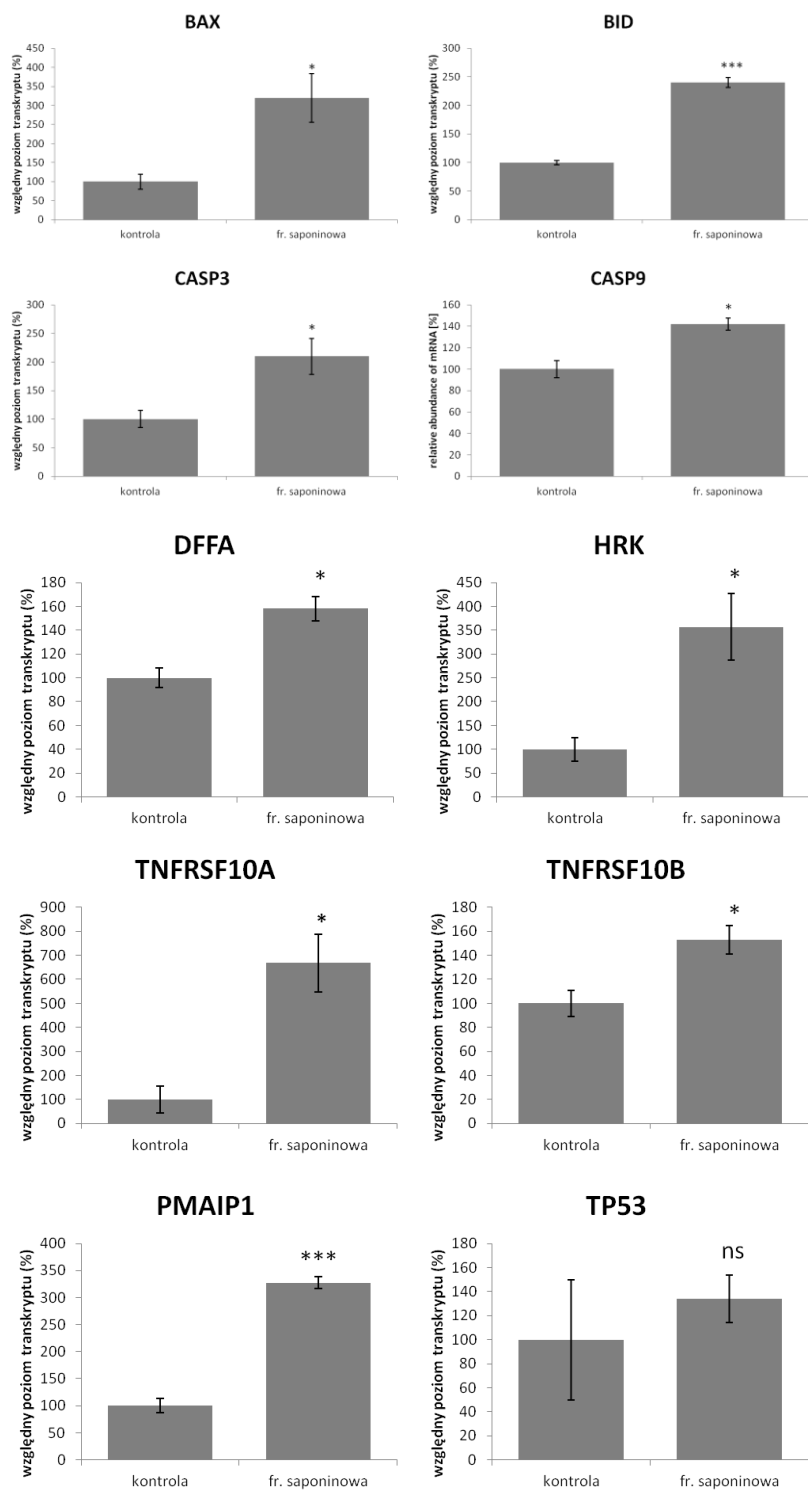
Wpływ frakcji saponinowej z korzeni *E. planum* w stężeniu 50 µg ml⁻¹ na ekspresję genów apoptotycznych w komórkach SKOV-3 oznaczono metodą PCRarray w trzech niezależnych eksperymentach, a wyniki przedstawiono w formie wykresów kolumnowych [58-61]. W wyniku 24 godz. inkubacji komórek raka jajnika z frakcją saponinową zaobserwowano zmianę profilu ekspresji 14 genów. Wykazano wzrost ekspresji genów proapoptotycznych: BAX, BID, CASP 3, CASP 9, DFFA, HRK, PMAIP1, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TP53 oraz spadek poziomu ekspresji genów antyapoptotycznych: BCL2L10, TNFRSF10C, TNF2, TRAF7 [Ryc. 58-61].



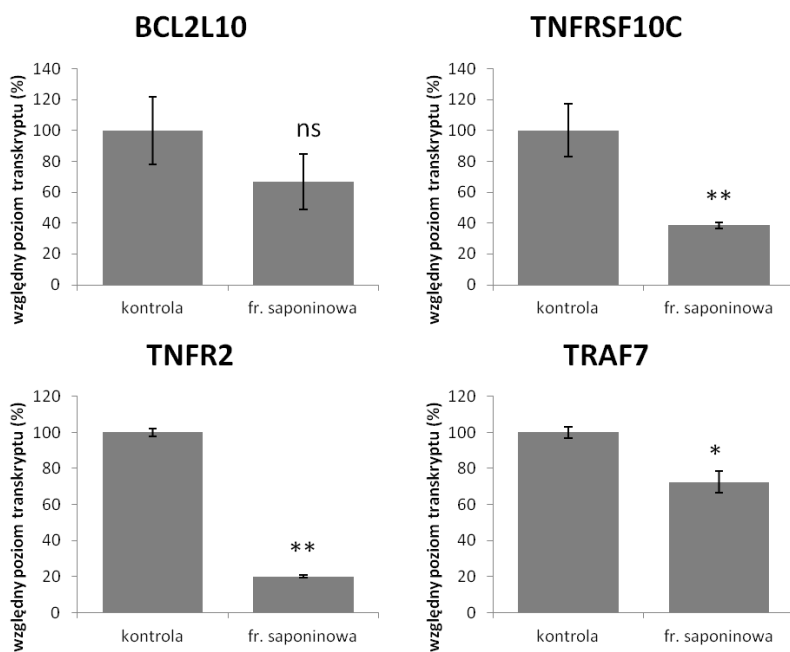
Ryc. 58 Wpływ frakcji saponinowej z korzenia *E. planum* w stężeniu 50 µg ml⁻¹ na ekspresję genów proapoptotycznych



Ryc. 59 Wpływ frakcji saponinowej z korzenia *E. planum* w stężeniu 50 µg ml⁻¹ na ekspresję genów antyapoptotycznych



Ryc. 60 Wpływ frakcji saponinowej z korzenia *E.planum* w stężeniu $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ na ekspresję genów proapoptotycznych. Wyniki, stanowiące średnią z trzech doświadczeń, porównywano do próby kontrolnej stosując t-test.
 *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$; ns – brak różnic statystycznych



Ryc. 61 Wpływ frakcji saponinowej z korzenia *E. planum* w stężeniu $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ na ekspresję genów antyapoptotycznych. Wyniki, stanowiące średnią z trzech doświadczeń, porównywano do próby kontrolnej stosując t-test.
 *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$; ns – brak różnic statystycznych

3.2. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa ekstraktów i ich frakcji *Eryngium L.*

3.2.1. Ocena aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej

Polskie gatunki mikołajków badano pod kątem aktywności przeciw wybranym szczepom bakterii i grzybów [Tab. 39,40]. Aktywność przeciwdrobnoustrojową wybranych ekstraktów i frakcji w porównaniu z substancjami referencyjnymi, oceniono metodą seryjnych rozcieńczeń i określono najmniejsze stężenie hamujące (MIC) i najmniejsze stężenie działające bakteriobójczo (MBC) i grzybobójczo (MFC) a wyniki przedstawiono w tabelach 39 i 40.

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa oceniana była dla metanolowych ekstraktów z surowców roślin gruntowych – liści i korzeni oraz ekstraktów z wybranych kultur *in vitro* – kalusa, kultury zawiesinowej i korzeni zregenerowanych *in vitro* roślin. Ponadto badano frakcje z korzeni uzyskane z użyciem kolumnienki Sep-pak oraz frakcję saponinową po rozdziale metodą chromatografii kolumnowej.

Wyniki badań wskazują, że działanie przeciwdrobnoustrojowe ekstraktów *Eryngium L.* bądź ich frakcji zależne jest od gatunku mikołajka, rodzaju surowca oraz szczepu drobnoustroju. Z trzech gatunków mikołajków najsilniejsze działanie przeciw Gram-dodatniej bakterii *S. aureus* posiadały frakcje saponinowo-fenolokwasowe z korzeni *E. maritimum* (MIC=1 mg ml⁻¹) i *E. planum* (MIC=2 mg ml⁻¹) oraz frakcja saponinowa z korzeni *E. planum* (MIC=2,5 mg ml⁻¹). Natomiast Gram-ujemna bakteria *P. aeruginosa* okazała się być bardziej oporna na działanie surowców z mikołajków – najniższą wartość MIC wykazywał metanolowy ekstrakt z liści rozetkowych *E. planum* (MIC=5,3 mg ml⁻¹). W stosunku do drożdżaka *C. albicans*, ekstrakty z korzeni trzech gatunków mikołajków oraz frakcja 40% z *E. maritimum* wykazywały silne działanie hamujące (MIC=1 mg ml⁻¹). Grzyby będące dermatofitami wykazywały większą wrażliwość na działanie ekstraktów i frakcji mikołajków. Frakcje saponinowo-fenolokwasowe z korzeni *E. planum* i *E. maritimum* najskuteczniej w hamowały wzrost *T. mentagrophytes* (MIC=1 mg ml⁻¹) i *T. rubrum* (MIC=2 mg ml⁻¹; 1 mg ml⁻¹). Z powodu zakażeń niektórych kultur, nie zbadano działania frakcji na inny szczep dermatofityczny – *M. canis* – z otrzymanych danych wynika, iż najefektywniej wzrost tego grzyba hamował metanolowy ekstrakt z korzenia *E. planum* (MIC=0,8 mg ml⁻¹). Najbardziej oportunistycznym szczepem w stosunku do zastosowanych ekstraktów

i frakcji mikołajków okazał się być pleśniak *A. niger* z wartością MIC osiagającą 25 mg ml⁻¹ dla metanolowego ekstraktu z korzenia *E. planum*.

Na podstawie wyników badań można wnioskować, że najwyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową wykazują gatunki *E. planum* i *E. maritimum*. Ze wszystkich badanych surowców roślinnych najefektywniej wzrost drobnoustrojów hamowały ekstrakty i frakcje z korzeni. Najbardziej wrażliwymi na badane ekstrakty szczepami były bakterie *S. aureus*, i dermatofity: *T. mentagrophytes* i *T. rubrum*, natomiast oportunistycznym *C. albicans*.

Ogólnie można stwierdzić, że ekstrakty z korzonków roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro* wykazywały działanie hamujące na bakterię *S. aureus* i gatunki dermatofitów. Ekstrakty z biomasy kalusa i zawiesiny komórkowej relatywnie słabo działały zarówno na badane bakterie jak i grzyby.

Tab. 39 Wartości MIC dla metanолоwych ekstraktów, wodno-metanолоwych frakcji i frakcji saponinowej roślin gruntowych i kultur *in vitro* *Eryngium* L. przeciw wybranym mikroorganizmom

Mikroorganizm	Najmniejsze stężenie hamujące (MIC mg ml ⁻¹)																	
	<i>E. planum</i>						<i>E. campestre</i>						<i>E. maritimum</i>					
	Metanолоwe ekstrakty			Fracje			Metanолоwe ekstrakty			Fracje			Metanолоwe ekstrakty			Fracje		
Ka	Z	L	K	K'	40%* K	80%* K	FS	L	K	K'	40%* K	80%* K	L	K	K'	40%* K	80%* K	
<i>S. aureus</i>	40	7,8	10,6	-	3,1	>25	2	2,5	12,5	12,5	1,6	>25	4	10,6	50	3,1	12,5	1
<i>P. aeruginosa</i>	-	15,6	5,3	-	50	>25	>8	20	25	25	25	>25	>4	21,3	50	50	12,5	>4
<i>C. albicans</i>	80	15,6	85	12,5	50	>25	>8	20	25	12,5	50	>25	>4	>170	12,5	50	12,5	>4
<i>A. niger</i>	160	>15,6	85	25	>100	>25	>8	>40	50	50	>50	-	-	21,3	50	>100	-	-
<i>M. canis</i>	-	-	10	0,8	-	-	-	-	6,3	3,1	-	-	-	2,7	6,3	-	-	-
<i>T. mentagrophytes</i>	20	31,3	42,5	3,1	3,1	>25	1	2,5	12,5	3,1	3,1	25	2	1,3	100	25	12,5	1
<i>T. rubrum</i>	20	15,6	42,5	3,1	6,3	>25	2	5	12,5	3,1	6,3	25	4	10,6	100	6,3	12,5	1

*frakcje rozdzielone na kolumnie Sep-Pak; **Ka** – kalus; **Z** – zawiesina komórkowa; **L** – liście rozetkowe rośliny gruntowej; **K** – korzeń rośliny gruntowej;

K' – korzeń rośliny zregenerowanej *in vitro*; **FS** frakcja saponinowa po rozdziale metodą chromatografii kolumnowej

Tab. 40 Wartość MBC/MFC dla metanолоwych ekstraktów, wodno-metanолоwych frakcji i frakcji saponinowej roślin gruntowych i kultur *in vitro* *Eryngium* L. przeciw wybranym mikroorganizmom

Mikroorganizm	Najmniejsze stężenie działające bakteriobójczo (MBC mg ml ⁻¹) i grzybobójczo (MFC mg ml ⁻¹)																	
	<i>E. planum</i>						<i>E. campestre</i>						<i>E. maritimum</i>					
	Metanолоwe ekstrakty			Frakcje			Metanолоwe ekstrakty			Frakcje			Metanолоwe ekstrakty			Frakcje		
	Ka	Z	L	K	K'	40%* K	80%* K	FS	L	K	K'	40%* K	80%* K	L	K	K'	40%* K	80%* K
<i>S. aureus</i>	80	31,3	>170	-	12,5	>25	8	10	25	>50	6,3	>25	>4	>170	>100	25	12,5	1
<i>P. aeruginosa</i>	-	31,3	85	-	100	>25	>8	20	>25	>50	50	>25	>4	>170	>100	100	12,5	>4
<i>C. albicans</i>	>160	>15,6	>170	12,5	>100	>25	>8	20	>50	>50	>50	>25	>4	>170	>100	>100	12,5	>4
<i>A. niger</i>	>160	>15,6	>170	>100	>100	>25	>8	>40	>50	>50	>50	-	-	>170	>100	>100	-	-
<i>M. canis</i>	-	-	10	0,8	-	-	-	-	12,5	25	-	-	-	2,7	6,3	-	-	-
<i>T. mentagrophytes</i>	40	31,3	42,5	25	25	>25	2	5	25,5	25	6,3	25	2	21,5	100	25	12,5	4
<i>T. rubrum</i>	40	15,6	42,5	25	25	>25	8	10	12,5	25	6,3	25	4	41,5	100	25	12,5	2

*frakcje rozdzielone na kolumiencie Sep-Pak; **Ka** – kalus; **Z** – zawiesina komórkowa; **L** – liście rozetkowe rośliny gruntowej; **K** – korzeń rośliny gruntowej;

K' – korzeń rośliny zregenerowanej *in vitro*; **FS** frakcja saponinowa po rozdziale metodą chromatografii kolumnowej

1.1. Aktywność antyoksydacyjna ekstraktów i ich frakcji *Eryngium L.*

Ocenę potencjału antyoksydacyjnego badanych surowców roślin gruntowych i kultur *in vitro* trzech gatunków *Eryngium L.* dokonano za pomocą dostępnych metod: zmiatania wolnego rodnika DPPH, w teście fosfomolibdenowym sprawdzającym potencjał redukcyjny analizowanych próbek wobec jonów metali przejściowych (na przykładzie Mo) oraz w teście sprawdzającym stopień hamowania oksydacyjnej degradacji deoksyrybozy.

Skróty stosowane w tej części pracy:

E.p. – L liście rozetkowe z roślin gruntowych *Eryngium planum L.*

E.p. – L in vitro liście rozetkowe z roślin *Eryngium planum L.* zregenerowanych w kulturach *in vitro*

E.p. – R korzenie z roślin gruntowych *Eryngium planum L.*

E.p. – R in vitro korzenie z roślin *Eryngium planum L.* zregenerowanych w kulturach *in vitro*

E.m. – L liście rozetkowe z roślin gruntowych *Eryngium maritimum L.*

E.m. – L in vitro liście rozetkowe z roślin *Eryngium maritimum L.* zregenerowanych w kulturach *in vitro*

E.m. – R korzenie z roślin gruntowych *Eryngium maritimum L.*

E.m. – R in vitro korzenie z roślin *Eryngium maritimum L.* zregenerowanych w kulturach *in vitro*

E.c. – L liście rozetkowe z roślin gruntowych *Eryngium campestre L.*

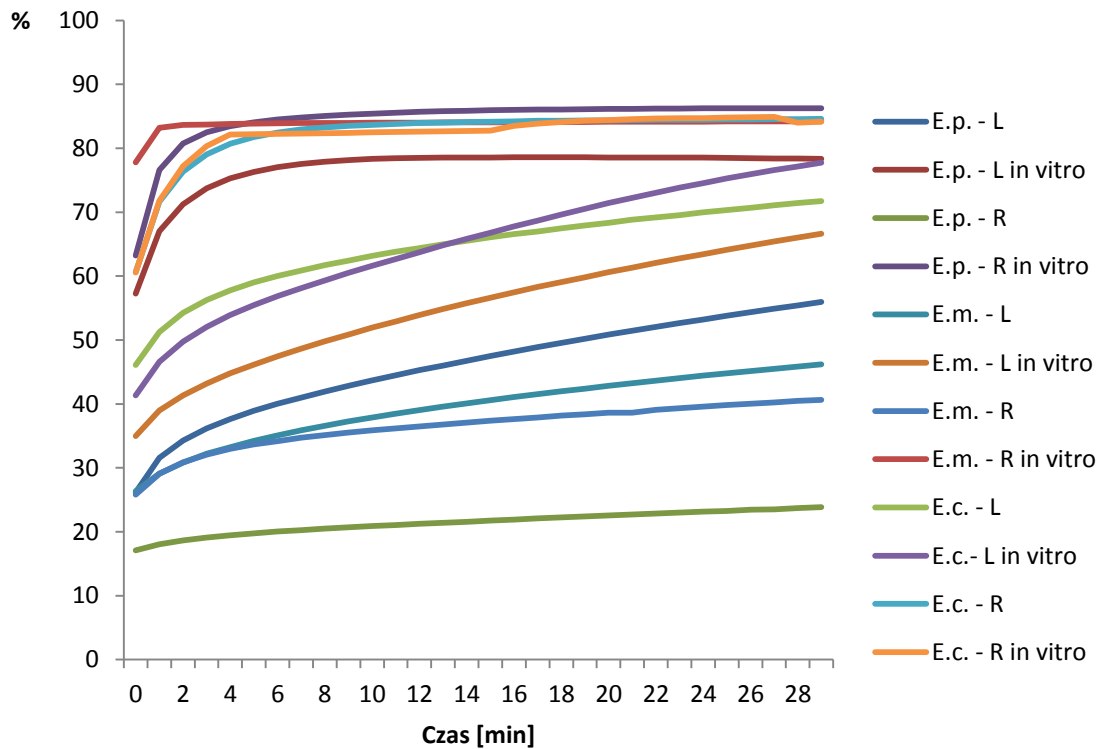
E.c. – L in vitro liście rozetkowe z roślin *Eryngium campestre L.* zregenerowanych w kulturach *in vitro*

E.c. – R korzenie z roślin gruntowych *Eryngium campestre L.*

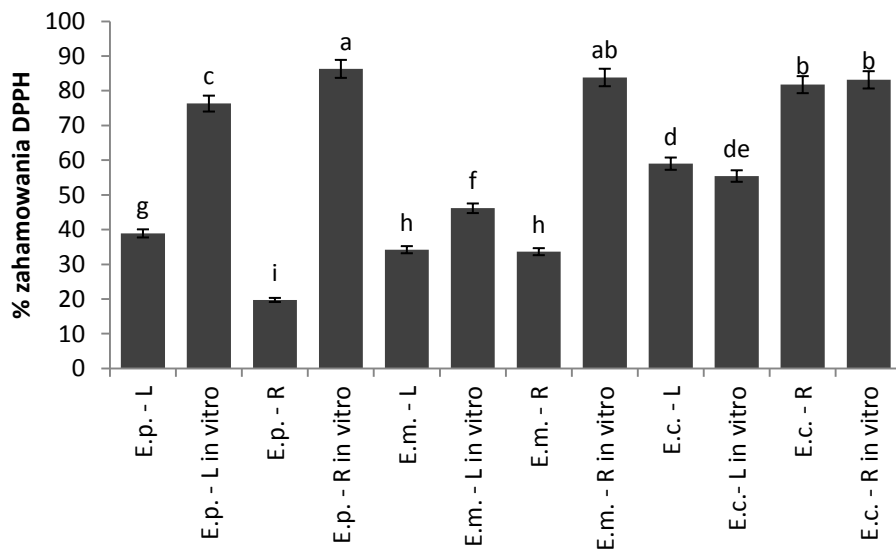
E.c. – R in vitro korzenie z roślin *Eryngium campestre L.* zregenerowanych w kulturach *in vitro*

3.3.1. Ocena zdolności zmiatania wolnego rodnika DPPH

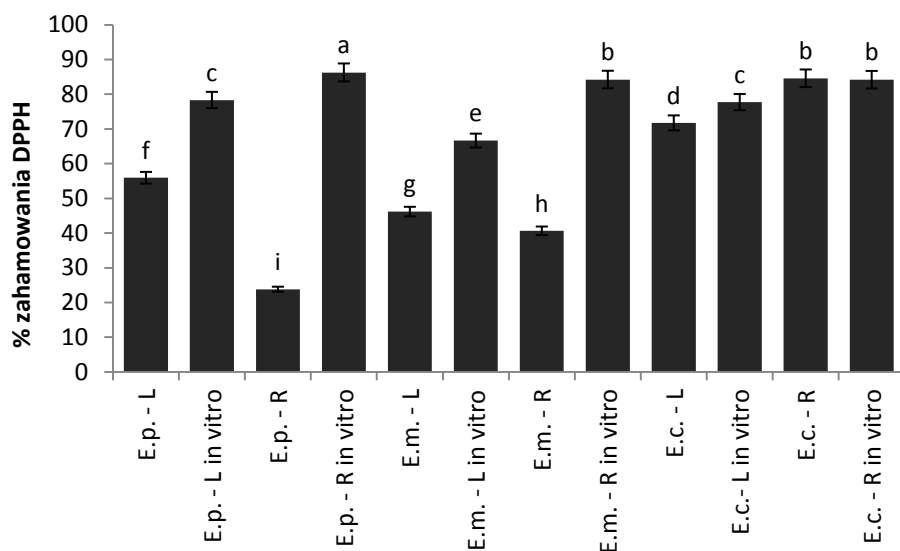
Wyniki testu zmiatania DPPH przedstawiono na Ryc. 62 -68



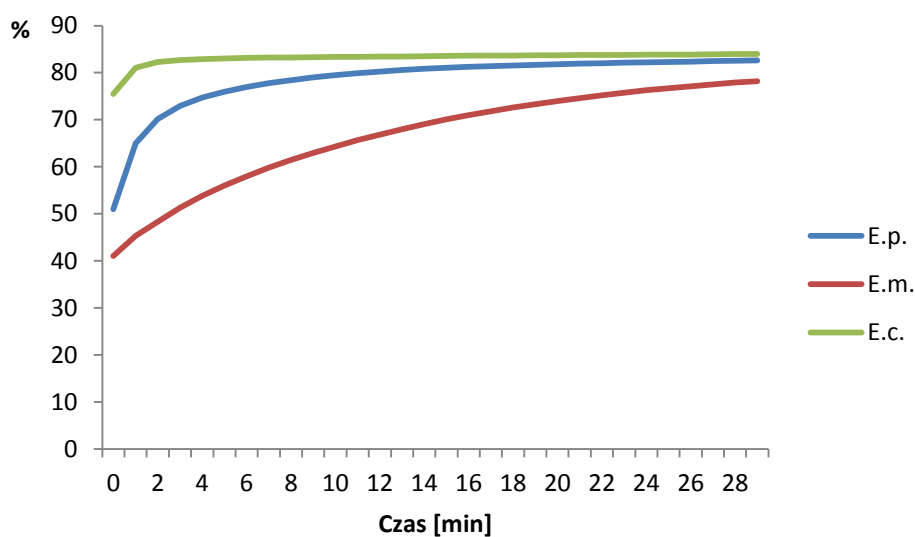
Ryc. 62 Krzywa zdolności zmiatania rodnika DPPH przez ekstrakty (rozcieńczenie 1:6) z organów roślin gruntowych i kultur *in vitro* *Eryngium* L.



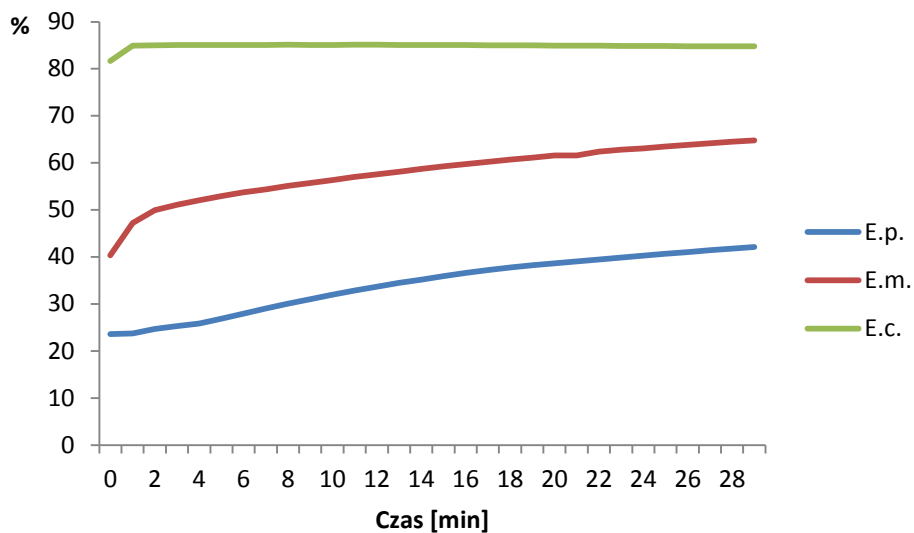
Ryc. 63 Wyniki badań zdolności zmiatania rodnika DPPH przez analizowane ekstrakty organów *Eryngium* L. w 5 minucie. Średnie wartości z tą samą literą nie różnią się dla $P=0,05$ stosując test wielokrotnych porównań Duncan.



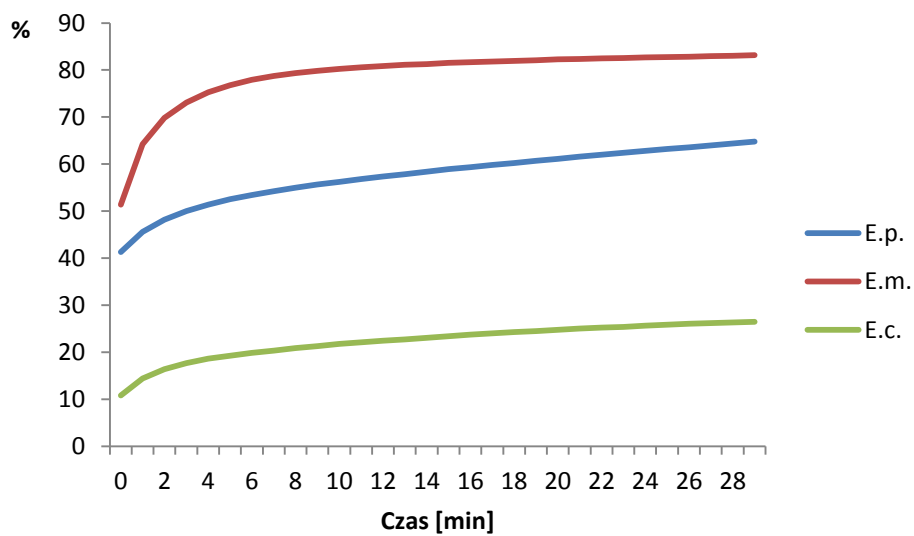
Ryc. 64 Wyniki badań zdolności zmiatania rodnika DPPH[•] przez analizowane ekstrakty organów *Eryngium L.* w 29 minucie. Średnie wartości z tą samą literą nie różnią się dla $P=0,05$ stosując test wielokrotnych porównań Duncana.



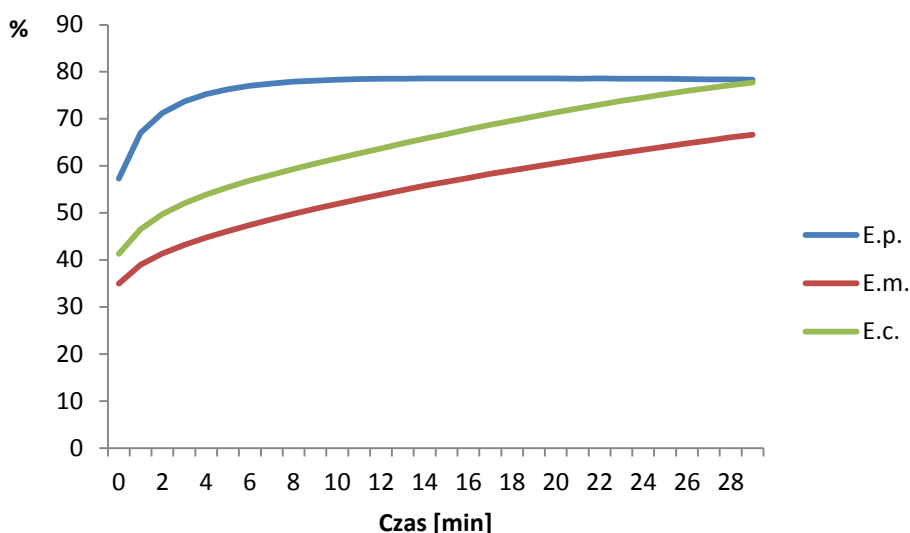
Ryc. 65 Krzywa zdolności zmiatania rodnika DPPH[•] przez ekstrakty z liści rozetkowych roślin gruntowych (rozcieńczenie 1:2)



Ryc. 66 Krzywa zdolności zmiatania rodnika DPPH przez ekstrakty z korzeni roślin gruntowych (rozcieńczenie 1:2)



Ryc. 67 Krzywa zdolności zmiatania rodnika DPPH przez ekstrakty z korzeni roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro* (rozcieńczenie 1:20)



Ryc. 68 Krzywa zdolności zmiatania rodnika DPPH przez ekstrakty z liści rozetkowych roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro* (rozcieńczenie 1:6)

Dla wszystkich analizowanych ekstraktów wykazano działanie przeciwrodnikowe w zróżnicowanym stopniu, zależnym od gatunku mikołajka, typu i pochodzenia organu oraz ilości surowca w próbce i mieszaninie reakcyjnej [Ryc. 62-68]. Najsilniejsze działanie przeciwrodnikowe wykazują korzenie *E. maritimum* i *E. planum* z kultur *in vitro* oraz korzenie *E. campestre* roślin, zarówno z kultur *in vitro* jak i gruntowych. Efektywne zmiatanie wolnego rodnika DPPH zaobserwowano również dla liści rozetkowych zregenerowanych w kulturach *in vitro* roślin *E. planum* i *E. campestre*. Natomiast ekstrakty metanolowe z korzeni roślin gruntowych *E. maritimum* i *E. planum* wykazują najslabsze działanie zmiatania wolnego rodnika. W każdym przypadku istnieje zależność pomiędzy ilością surowca w badanej próbce i mieszaninie reakcyjnej a siłą działania antyoksydacyjnego.

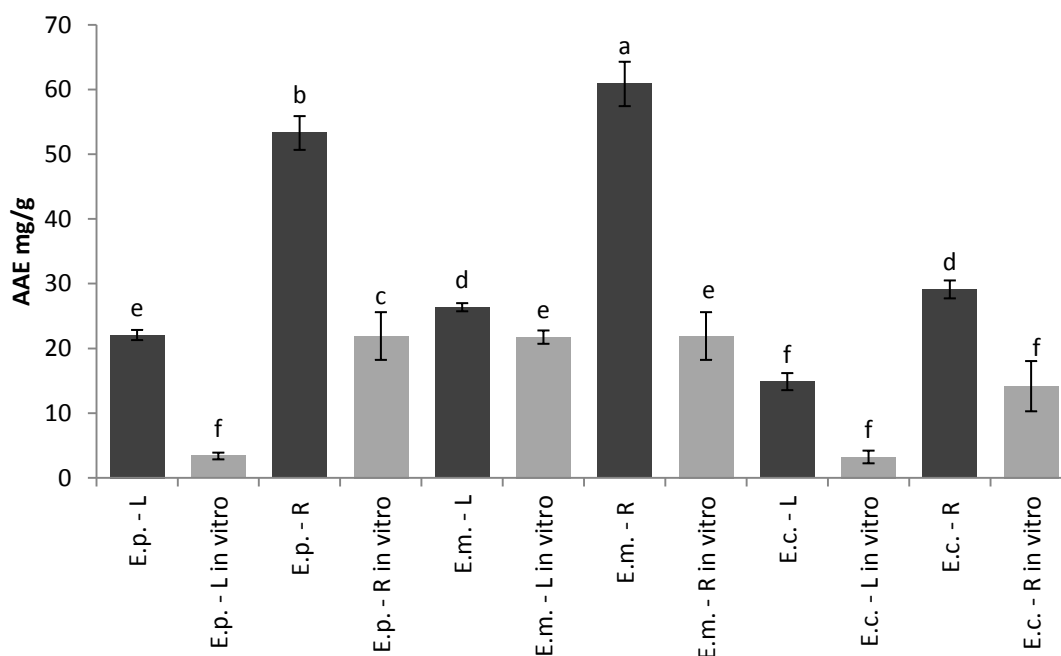
Wyniki badań wskazują, że wszystkie surowce z roślin zregenerowanych *in vitro* posiadają silniejsze działanie przeciwrodnikowe niż analogiczne organy roślin gruntowych.

3.3.2. Ocena zdolności redukcji jonów molibdenu w teście fosfomolibdenowym

Wyniki testu fosfomolibdenowego, wyrażone w ekwiwalentach kwasu askorbinowego (AAE), przedstawione zostały w Tab. 41 i zilustrowane na Ryc.69.

Tab. 41 Wyniki średnich wartości absorbancji i redukcji Mo w teście fosfomolibdenowym wyrażone jako ekwiwalenty kwasu askorbinowego (AAE) dla ekstraktów metanolowych

Materiał roślinny		Ilość surowca w próbce [mg]	Ilość surowca w mieszaninie reakcyjnej [mg]	Średnia wartość absorbancji ± SD	AAE ± SD	
<i>E. planum</i>	Rośliny gruntowe	Liście	0,8	0,2	0,2356 ± 0,0083	22,08 ± 0,78
		Korzenie	0,8	0,2	0,5687 ± 0,0279	53,29 ± 2,60
	Kultury <i>in vitro</i>	Liście	0,8	0,2	0,1812 ± 0,0276	3,39 ± 0,52
		Korzenie	0,8	0,2	0,4460 ± 0,0523	41,79 ± 4,91
<i>E. maritimum</i>	Rośliny gruntowe	Liście	0,8	0,2	0,2815 ± 0,0067	26,38 ± 0,63
		Korzenie	0,8	0,2	0,6495 ± 0,0366	60,87 ± 3,43
	Kultury <i>in vitro</i>	Liście	0,8	0,2	0,2322 ± 0,0110	21,75 ± 1,03
		Korzenie	0,8	0,2	0,2340 ± 0,0393	21,93 ± 3,69
<i>E. campestre</i>	Rośliny gruntowe	Liście	0,8	0,2	0,1588 ± 0,0140	14,88 ± 1,32
		Korzenie	0,8	0,2	0,3108 ± 0,0148	29,13 ± 1,38
	Kultury <i>in vitro</i>	Liście	0,8	0,2	0,1732 ± 0,0523	3,25 ± 0,98
		Korzenie	0,8	0,2	0,1513 ± 0,0414	14,18 ± 3,88

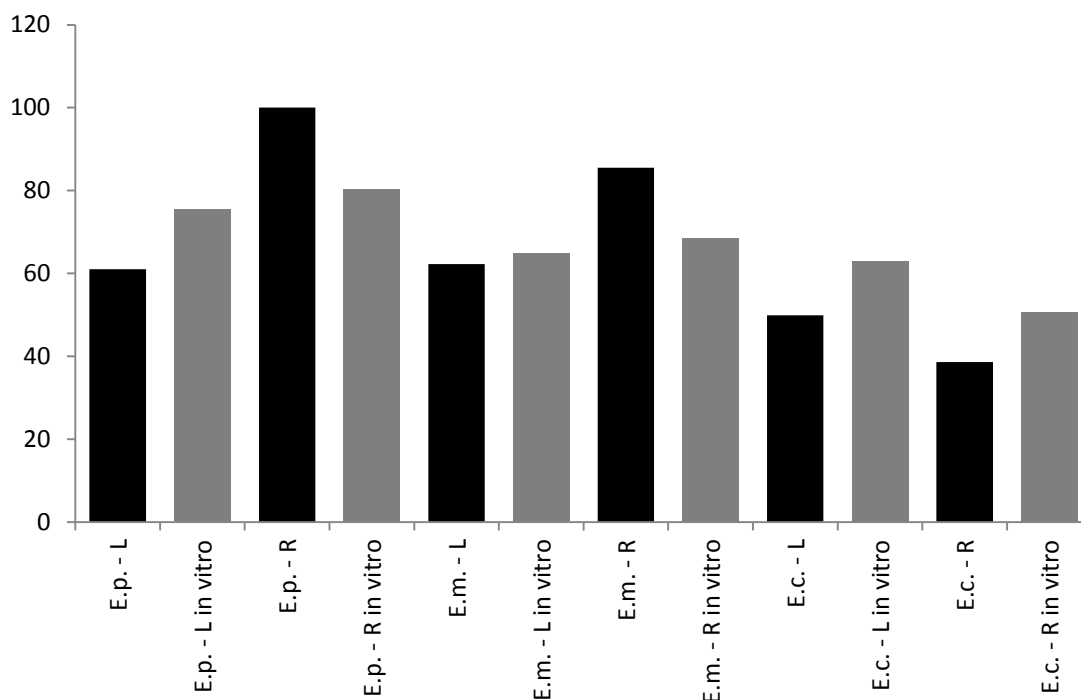


Ryc. 69 Wyniki redukcji jonów Mo w teście fosfomolibdenowym wyrażone jako ekwiwalenty kwasu askorbinowego (AAE) dla ekstraktów metanolowych. Średnie wartości z tą samą literą nie różnią się dla $P=0,05$ stosując test wielokrotnych porównań Duncana.

Dla wszystkich analizowanych ekstraktów wykazano zróżnicowaną aktywność redukcji jonów molibdenu w stopniu zależnym od gatunku mikołajka, typu i pochodzenia organu. Najsilniejszymi właściwościami redukcyjnymi odznaczają się ekstrakty z korzeni roślin gruntowych *E. maritimum* ($60,87 \pm 3,43 \text{ mg g}^{-1} \text{ AAE}$) i *E. planum* ($53,29 \pm 2,60 \text{ mg g}^{-1} \text{ AAE}$) oraz korzenie zregenerowanego w kulturach *in vitro* *E. planum* ($41,79 \pm 4,91 \text{ mg g}^{-1} \text{ AAE}$). Najsłabsze właściwości redukcyjne posiadają ekstrakty z liści rozetkowych namnożonych w kulturach *in vitro* *E. planum* ($3,39 \pm 0,52 \text{ mg g}^{-1} \text{ AAE}$) i *E. campestre* ($3,25 \pm 0,98 \text{ mg g}^{-1} \text{ AAE}$). Co ciekawe, w badanym teście wszystkie ekstrakty z organów zregenerowanych w warunkach *in vitro* krajowych gatunków mikołajków charakteryzują się słabszą aktywnością redukowania jonów fosfomolibdenowych niż analogiczne organy pochodzące z roślin gruntowych.

3.3.3. Ocena zdolności zahamowania degradacji oksydacyjnej 2-deoksyrybozy przez rodnik hydroksylowy

Wyniki testu zahamowania oksydacyjnej degradacji 2-deoksyrybozy przedstawiono na Ryc. 70. Do wykonania testu wyselekcjonowano ekstrakty w rozcieńczeniu 1:6, co oznacza, że ilość surowca w badanych próbach wynosiła 3,3 mg i 2 μg w mieszaninie reakcyjnej. Ze względu na silne właściwości ekstraktów z korzeni z roślin gruntowych *E. planum* i *E. maritimum* sporządzono bardziej rozcieńczone ekstrakty – dla mikołajka płaskolistnego 1: 16 (ilość surowca w badanej próbce wynosiła 1,25 mg i 0,75 μg w mieszaninie reakcyjnej) a dla mikołajka nadmorskiego 1:12 (ilość surowca w badanej próbce wynosiła 1,66 mg i 1 μg w mieszaninie reakcyjnej).



Ryc. 70 Wyniki zahamowania oksydacyjnej degradacji 2-deoksyrybozy wywołanej rodnikiem hydroksylowym przez analizowane metanolowe ekstrakty

Najsilniejsze właściwości ochronne przed oksydacyjną degradacją substratu charakteryzują korzenie roślin z gruntu *E. planum* (100%) i *E. maritimum* (85,5%). Wysoką aktywność wykazują organy mikołajka płaskolistnego hodowane w warunkach *in vitro* (75,44 i 80,23 % dla liści rozetkowych i korzeni). Najslabsze właściwości ochronne cechuje organy z roślin gruntowych mikołajka polnego. Nie wykazano korelacji pomiędzy działaniem ochronnym degradacji 2-deoksyrybozy między organami z roślin gruntowych a analogicznymi liśćmi rozetkowymi i korzeniami roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro*. Natomiast znaleziono inną zasadę – najsilniejsze właściwości hamowania oksydacyjnej degradacji substratu wywołanej rodnikiem hydroksylowym wykazano dla organów *E. planum*, a następnie analogicznych surowców *E. maritimum*, najslabsze właściwości wykazywał *E. campestre*.

DYSKUSJA

Jednym z ważniejszych obszarów biotechnologii roślin jest produkcja metabolitów wtórnych w warunkach *in vitro*. W świetle ograniczeń takich jak dostępność materiału roślinnego ze środowiska naturalnego, głównie ze względu na specyfikę wymagań klimatycznych czy ścisłej ochrony niektórych gatunków, produkcja metabolitów wtórnych z użyciem kultur *in vitro* wydaje się być atrakcyjnym rozwiązaniem. Ponadto w warunkach *in vitro* możliwa jest ścisła kontrola i optymalizacja procesów przyrostu biomasy roślinnej i biosyntezy związków o aktywności biologicznej. Ze względu na coraz większe wymagania względem jakości surowców zielarskich należy zapewnić jakość uzyskanych mikrosadzonek. Przy odpowiednio dobranej i przestrzeganej metodzie, rośliny z kultur *in vitro* będą genetycznie jednorodne i tożsame z rośliną rodzicielską, a uzyskany z nich surowiec leczniczy - jakościowo wyrównany. Znaczenie jakości surowców zielarskich w świetle nowych przepisów GLP, GMP, GAP – narzuca konieczność szerokiej oceny sadzonek pochodzących z kultur *in vitro*. Ocenie podlega również cały proces wytwarzania mikrosadzonek, który powinien być zgodny z wymogami Dobrej Praktyki Wytwarzania. Taka szeroka kontrola przyczyni się do zapewnienia jakości, a także może podnieść wartość przyszłych surowców zielarskich. Jest to ważne zagadnienie podkreślane przez ESCOP (European Scientific Cooperation for Phytotherapy) i komisje farmakopealne [Thiem, Kikowska 2008].

Podstawowym celem niniejszej pracy było rozstrzygnięcie czy i w jakim stopniu zregenerowane w kulturach *in vitro* krajowe gatunki z rodzaju *Eryngium* L. oraz kultury organów i kultury komórkowe, mogą stanowić źródło biologicznie czynnych metabolitów wtórnych, charakterystycznych dla roślin gruntowych. Podjęcie tych badań wymagało opracowania metod mikrorozmnażania tych roślin i określenia warunków korzystnych dla wzrostu pędów i korzeni w płynnych pożywkach. Ukierunkowanie badań na otrzymanie roślinnych kultur *in vitro* trzech gatunków mikołajków, charakteryzujących się wysoką zawartością związków biologicznie czynnych, skłoniło do przeprowadzenia zabiegów biotechnologicznych kultur pędowych i korzeniowych. Ze względu na fakt, że określone grupy związków chemicznych obecne w badanych gatunkach przejawiają różne właściwości biologiczne i farmakologiczne podjęto kilka badań aktywności biologicznych ekstraktów i ich frakcji z wyselekcjonowanych surowców, pochodzących z roślin gruntowych i kultur *in vitro*. Porównano poziom akumulacji wybranych związków bioaktywnych pomiędzy surowcami z roślin

gruntowych a analogicznymi organami roślin zregenerowanych w warunkach *in vitro*, a także pomiędzy kulturami organów a kulturami komórkowymi. W tym celu założono i zoptymalizowano warunki hodowli kalusa i zawiesiny komórkowej opisane w opublikowanej pracy [Kikowska i wsp. 2012].

Badania biotechnologiczne trzech krajowych gatunków z rodzaju *Eryngium* podjęte w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej podsumowane zostały w tabeli 42.

Tab. 42 Badania z zakresu kultur *in vitro*, ocena fitochemiczna i badania biologiczne krajowych gatunków z rodzaju *Eryngium*

Gatunek	Kultury <i>in vitro</i>				Ocena fitochemiczna		Badania biologiczne			
	Mikrorozmnażanie	Kultury organów		Kultury komórkowe		TLC	HPLC/UPLC	Aktywność proapoptotyczna	Aktywność przeciwdrobnoustrojowa	Aktywność antyoksydacyjna
		Pędowe	Korzeniowe	Kalus	Zawiesina					
<i>E. planum</i>	+	+ [e]	+ [e]	+	+ [e]	+ [iv, g, p,k,c,z]	+ [iv, g, p, c, z]	+ [g]	+ [iv, g, k, c, z]	+ [iv, g]
<i>E. maritimum</i>	+	+ [e]	+	-	-	+ [iv, g, p, k]	+ [iv, g, k]	-	+ [iv, g]	+ [iv, g]
<i>E. campestre</i>	+	+ [e]	+	-	-	+ [iv, g, p, k]	+ [iv, g]	-	+ [iv, g]	+ [iv, g]

e elicytacja iv organy roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro* g organy roślin gruntowych k kultury korzeniowe p kultury pędowe c kalus z zawiesina komórkowa

Rozmnażanie klonalne w warunkach *in vitro* znalazło zastosowanie w produkcji roślin elitarnych o dużej wartości jednostkowej, ale również roślin rzadkich i ginących, będących pod ochroną gatunkową. Badania krajowych gatunków z rodzaju *Eryngium* L. obejmowały opracowanie metod mikrorozmnażania badanych taksonów ze względu na ich ograniczony obszar występowania oraz status ochrony gatunkowej mikołajka nadmorskiego. Otrzymane kultury *in vitro* krajowych mikołajków stanowią formę ochrony roślin *ex situ* oraz stwarzają możliwość pozyskiwania surowców do badań bez uszczuplenia ich zasobów naturalnych.

Mikrorozmnażanie

W niniejszej pracy opracowano systemy propagacji w warunkach *in vitro* dla trzech krajowych gatunków z rodzaju *Eryngium* oraz porównano efektywność tych procesów pomiędzy badanymi taksonami.

Wprowadzenie wybranych gatunków do kultur *in vitro* poprzedzało poznanie biologii, cyklu życiowego i strategii reprodukcji badanych roślin [Szafer, Pawłowski 1960; Tutin i wsp. 1968; Heywood 1978; Atwater 1980; Cullen i wsp. 1997; Calvino i wsp. 2008].

W celu założenia aksenicznych kultur *in vitro* konieczne było opracowanie skutecznej metody dezynfekcji powierzchniowej owoców oraz przerwania spoczynku nasion mikołajków. Powierzchnia rozłupek pokryta jest łuskami, które często stanowią miejsce występowania licznych koloni grzybów, bakterii i fitoplazm. Taka specyficzna budowa owoców utrudnia odkażanie eksplantatów inicjalnych. Wyniki doświadczeń wskazują, że najefektywniejszym zabiegiem była podwójna dezynfekcja, zarówno powierzchni owoców jak i wyizolowanych nasion. Z kolei najkorzystniejszą strategią pobudzania nasion do kiełkowania było połączenie trzech zabiegów – stratyfikację owoców, izolowanie nasion z owoców i pozbawienie łupiny nasiennej oraz zastosowanie kwasu gibberelowego w pożywce inicjalnej.

Stratyfikację owoców i suplementację pożywki w kwas gibberelowy stosuje się często do zainicjowania kiełkowania u roślin z rodzaju *Eryngium* L., ponieważ nasiona tych gatunków cechuje niska siła kiełkowania [Mozumder, Hossain 2013; Necajeva, Ievinsh 2013]. Nasiona mikołajków kiełkują łatwo i szybko jedynie niezwłocznie po dojrzaniu owoców. Natychmiast po osiągnięciu dojrzałości wchodzi w stan uśpienia tzw. endogennego spoczynku morfologicznego [Atwater 1980; Njenga 1995]. Ponadto

E. maritimum, halofit nadmorski, narażony jest na częste wahania poziomu zasolenia podłoża, co niekorzystnie wpływa na proces kiełkowania nasion i prawidłowy rozwój siewek. W naturze często obserwuje się obfite kwitnienie i zawiązywanie owoców tego gatunku, jednakże znacznie rzadziej rozwijają się siewki. W kontekście braku rozwoju siewek, często notuje się ich wysoką śmiertelność i marginalne znaczenie rozmnażania generatywnego. Podobne problemy z rozmnażaniem generatywnym zaobserwowano także u innych halofitów – *Cakile maritima* Scop. [Debez i wsp. 2004], *Crithmum maritimum* L. [Meot-Duros, Magne 2008] czy *Hacquetia epipactis* Neck.ex DC [Nowak i wsp. 2011]. W badaniach nad mikrorozmnażaniem cieszynianki wiosennej (*H. epipactis*) nasiona tego gatunku charakteryzowały się bardzo niskim procentem kiełkowania, dlatego podobnie jak w przypadku *E. maritimum*, efektywnym okazało się inicjowanie kultur *in vitro* z pobudzonych do rozwoju merystemów pąków wierzchołkowych i bocznych roślin gruntowych [Nowak i wsp. 2011].

Dla *E. maritimum* opracowano metodę wyjaławiania powierzchniowego eksplantatów, pochodzących z roślin rosnących na sztucznej wydmy w Ogrodzie Botanicznym UAM, ponieważ mimo wielu prób nie udało się otrzymać z nasion aksenicznych siewek kontynuujących rozwój w kulturze *in vitro*.

Najprostszą i najbardziej odpowiednią dla gatunków leczniczych metodą rozmnażania roślin w warunkach *in vitro* jest pobudzenie do rozwoju istniejących już w roślinie pąków bocznych [Bajaj i wsp. 1988]. Pąki te dające początek bocznym odgałęzieniom pędu w warunkach naturalnych pozostają w stanie spoczynku, co ma związek z występowaniem zjawiska dominacji wierzchołkowej. W kulturach *in vitro* dominację merystemu wierzchołkowego znosi dodatek egzogennej cytokininy. Z istniejących w eksplantatach merystemów rozwijają się zawiązki pąków i powstają pędy boczne oraz tworzą się nowe pąki wierzchołkowe, które dalej proliferują w wielopędy. O prawidłowej morfogenezie decyduje odpowiednia proporcja między stężeniami egzogennych auksyn i cytokinin [Orlikowska 1997]. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń opracowano metody namnażania pędów krajowych gatunków z rodzaju *Eryngium* L. Wykazano, iż mikrorozmnażanie trzech gatunków mikołajków, z wykorzystaniem kultury szczytów pędów, poprzez rozwój pąków bocznych, jest szybką i efektywną strategią otrzymywania stosunkowo dużej liczby nowych pędów. Stwierdzono, że eksplantaty pędowe wszystkich badanych gatunków reagowały podobnie na zmianę składu podłoża eksperymentalnych, zwłaszcza

w zakresie regulatorów wzrostu i rozwoju roślin. Zjawisko to obserwowano na etapie namnażania pędów. Do inicjacji, a następnie wzrostu kultur pędowych i regeneracji największej liczby pędów dla trzech gatunków mikołajków najkorzystniejszą pożywką była MS z 1,0 mg l⁻¹ BAP i 0,1 mg l⁻¹ IAA. Ten wariant hormonalny pożywki namnażającej był najlepszy dla trzech gatunków mikołajków, mimo że charakteryzują się odmienną biologią. Badane gatunki różniły się zdolnością do tworzenia nowych pędów – współczynnik proliferacji pędów był najwyższy dla *E. planum*, nieco niższy dla *E. campestre* i stosunkowo niski dla *E. maritimum*. W opracowanych warunkach, w krótkim okresie, sześciu miesięcy, z jednego eksplantatu można otrzymać nawet ponad 83 000 jednorodnych sadzonek *E. planum*, ponad 38 000 sadzonek *E. campestre* i 254 sadzonek *E. maritimum*. Wprawdzie najmniej pędów uzyskano dla *E. maritimum* ale były one silne i okazałe. Ponadto zauważono, że przez pięć lat utrzymywania mikołajków w kulturach *in vitro*, współczynnik mnożenia pędów dla *E. planum* i *E. maritimum* nie obniżał się w kolejnych cyklach namnożeńiowych. Ważnym czynnikiem w procesie mikrorozmnażania była obecność cytokininy w pożywce. Zastosowanie wariantu pożywki bez BAP zawierającej tylko IAA dawało niską efektywność proliferacji pędów, co wskazuje, że proces ten był raczej spontaniczny i prawdopodobnie związany z obecnością endogennych cytokinin. Jak wynika z piśmiennictwa, wyższe stężenie BAP (bez względu czy stosowane pojedynczo czy w połączeniu z auksyną), wpływało na obniżenie liczby mikropędów powstających w kulturach *in vitro*. Tę zależność obserwowano również w przypadku innych gatunków należących do rodziny *Apiaceae*: *Thapsia garganica* L. [Makunga i wsp. 2003], *Arracacia xanthorrhiza* Bancr. [Sliva i wsp. 2010] czy *Anethum graveolens* L. [Jana, Shekhawat 2010]. Podobnie jak dla badanych mikołajków, korzystny wpływ BA i IAA na organogenezę i dalszą proliferację pędów z eksplantatów wierzchołkowych pąków wykazano dla *Eryngium foetidum* L. [Arockiasamy i wsp. 2002].

W badaniach własnych, w wyniku opracowanej metody mikrorozmnażania pędy potomne mikołajków powstają przede wszystkim poprzez rozwój pąków bocznych z istniejących w eksplantacie merystemów. Ten sposób regeneracji jest mniej zależy od genotypu i zdecydowanie ogranicza niebezpieczeństwo występowania niepożądanego zmienności somaklonalnej, która może pojawiać się w kulturach *in vitro* [Borkowska 1995]. Nowe pędy mikołajków mogą także sporadycznie powstawać z pąków przybyszowych regenerujących z niewielkiej ilości kalusa, który rozwijał się

u podstawy pędów, szczególnie u *E. maritimum*. Z tego powodu konieczne było przeprowadzenie kontroli cytogenetycznej zregenerowanych pędów. Ponadto, w warunkach *in vitro* rośliny narażone są na liczne czynniki stresowe mogące wywołać zmiany genetyczne i epigenetyczne. Ryzyko pojawienia się zmienności somaklonalnej, zwłaszcza podczas długiego okresu trwania kultur pod wpływem działania wysokich stężeń fitohormonów, wymusiło przeprowadzenie analiz cytogenetycznych zregenerowanych w kulturach *in vitro* roślin. Nawet jeżeli nie obserwuje się zmian fenotypowych to jednak ocena cytogenetyczna roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro* może wykazać odchylenia od wzorca gatunkowego [Sliwińska, Thiem 2007]. Szybką i precyzyjną metodą cytometrii przepływowej, stosowaną w tego typu badaniach, określono, że ploidalność zregenerowanych pędów mikołajków nie zmieniła się a oznaczona zawartość jądrowego DNA w komórkach z liści siewek stanowiących kontrolę i liści z pędów *Eryngium* zregenerowanych w kulturach *in vitro* była bardzo zbliżona. Podobną stabilność wielkości genomu odnotowano dla innych gatunków roślin leczniczych rozmnażanych w kulturach *in vitro*: *Oenothera paradoxa* Hudziok, *Inula verbascifolia* (Willd.) Hausskn., *Rubus chamaemorus* L., *Solidago virgaurea* L. i *S. graminifolia* (L.) Elliott [Sliwińska, Thiem 2007]. Należy podkreślić, że wielkość genomu gatunków *E. planum*, *E. maritimum* i *E. campestre* określono po raz pierwszy metodą cytometrii przepływowej. Dotychczasowe badania wielkości genomu gatunków z rodzaju *Eryngium*, przeprowadzone przez innych badaczy, opierały się na metodzie mikrodensytometrycznej Feulgena i dotyczyły gatunków: *E. coeruleum* Bieb, *E. variifolium* L. i *E. giganteum* L. [Le Coq i wsp. 1978].

Uzyskanie regeneratów o niezmienionej zawartości DNA jądrowego w wyniku mikrorozmnażania, po wielu cyklach namnożeń świadczy o prawidłowo opracowanym systemie propagacji *in vitro* dla *E. planum*, *E. maritimum* i *E. campestre*.

Dla trzech gatunków mikołajków wyselekcjonowano wspólną pożywkę MS o jednakowym wariacie hormonalnym, na której obserwowano namnażenie największej liczby pędów. Natomiast skład najkorzystniejszej pożywki ukorzeniającej był inny dla poszczególnych taksonów. Badane gatunki mikołajków różniły się zdolnością do ukorzenia. Pędy mikołajków reagowały odmiennie na warianty pożywek, zarówno w zakresie stężeń soli mineralnych, zawartości sacharozy jak i typu auksyny. Do ukorzenia pędów *E. campestre* najlepszym wariantem była pożywka MS wzbogacona w 50 g l⁻¹ sacharozy i 1,0 mg l⁻¹ IAA. Pędy *E. planum* największą

liczbę korzeni tworzyły na pożywce MS o zredukowanym stężeniu z 50 g l⁻¹ sacharozy i 0,1 mg l⁻¹ NAA. Największą liczbę korzeni dla pędów *E. maritimum* indukowała pożywka MS ze zredukowanymi o połowę stężeniami soli mineralnych i sacharozy, suplementowana w 0,1 mg l⁻¹ IAA. Najprawdopodobniej jest to związane z naturalnym warunkami, w jakich bytuje ten gatunek. Mikołajek nadmorski preferuje stanowiska ubogie w składniki odżywcze - wydmy, ugory czy przybrzeżne nieużytki. W takich warunkach rośliny wytwarzają długie korzenie, osiągające niekiedy do 4 m długości [Piękoś-Mirkowa, Mirek 2003]. W kulturze *in vitro* *E. maritimum*, również obserwowano rozwój dłuższych korzeni niż u pozostałych gatunków. Z kolei dla *E. campestre* i *E. planum* istotnym był dodatek podwyższonego stężenia sacharozy. Dane literaturowe dowodzą, że zwiększona zawartość cukru w podłożu korzystnie wpływała na rozwój korzeni oraz indukcję korzeni bocznych różnych gatunków roślin w kulturach *in vitro* [Kusakari i wsp. 2000; Karam i wsp. 2003; Wu i wsp. 2006].

Ukorzenione rośliny po przesadzeniu do doniczek, hartowaniu i przeniesieniu do gruntu przeżywały w 76-98%, w zależności od gatunku mikołajka. Jak wynika z piśmiennictwa adaptacja roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro* do warunków gruntowych jest silnym stresem dla regenerantów. Proces ten przeżywają jedynie rośliny będące w dobrej kondycji fizjologicznej, z dobrze rozwiniętym systemem korzeniowym [Borkowska 2001]. Z tego względu, w badaniach własnych, do wysadzenia do warunków *ex vitro* wybierano mikołajki o silnym i stosunkowo długim systemie korzeniowym z licznymi korzeniami bocznymi. Ocena morfologiczna sadzonek mikołajków polegała m.in. na porównaniu pokroju roślin, prawidłowości kształtu organów i intensywności wybarwienia liści, w stosunku do roślin kontrolnych wyprowadzonych bezpośrednio z nasion. Wyniki oceny morfologicznej wykazały brak znaczących różnic pomiędzy roślinami rozmnażanymi w kulturach *in vitro* a kontrolnymi z nasion. Populacja mikołajków rosnąca na poletku doświadczalnym utrzymała tożsamość fenotypową populacji donorowej.

Jak wynika z przeglądu dotychczasowego piśmiennictwa jedynym gatunkiem z rodzaju *Eryngium* wprowadzonym do kultur *in vitro* był *E. foetidum* L. (Culantro), roślina przyprawowa należąca do naturalnej roślinności Wysp Karaibskich oraz rozpowszechniona w części południowo-wschodniej Azji. Z powodu dużego zainteresowania aspektami leczniczymi *E. foetidum* badania z zakresu kultur *in vitro* tego gatunku rozpoczęły się pod koniec ubiegłego wieku i przez ponad 13 lat

opracowano metody regeneracji roślin poprzez organogenezę pośrednią [Arockiasamy, Ignacimuthu 1998] i bezpośrednią [Martin 2004a; Gayatri i wsp. 2006; Chandrika i wsp. 2011], organogenezę oraz embriogenezę indukowaną z kalusa [Ignacimuthu i wsp. 1999; Martin 2004b].

Doniesienia na temat metody regeneracji *E. foetidum* na drodze organogenezy pośredniej opublikowali w 1998 r. dwaj hinduscy badacze Arockiasamy i Ignacimuthu. Indukcja kalusa na eksplantatach liściowych najlepiej zachodziła na pożywce Linsmaiera i Skooga (LS) suplementowanej w 0,5 mg l⁻¹ 2,4-D, 1,0 mg l⁻¹ NAA i 2,0 mg l⁻¹ BAP. Po 15 dniach kultury kalusowej na pożywce wzbogaconej w 1,0 mg l⁻¹ BAP i 0,1 mg l⁻¹ IAA formowały się zawiązki pędów, które rozwijały się w 2-3 pędowe skupiska. W kolejnych pasażach na tej samej pożywce uzyskiwano 6,6 pędów z kalusa i 11,2 pędów z wierzchołków roślin zregenerowanych w kolejnych pasażach [Arockiasamy, Ignacimuthu 1998]. W badaniach własnych, dla tego samego wariantu hormonalnego, maksymalnie uzyskano 17 pędów z pojedynczego eksplantanu *E. planum*, 14 pędów dla *E. campestre* i jedynie 4 pędy dla *E. maritimum*. Jednak należy zauważyć, że w przypadku krajowych gatunków mikołajków podłożem namnażającym była pożywka podstawowa MS. Pędy *E. foetidum* w badaniach hinduskich badaczy z powodzeniem ukorzeniano na pożywce 0,1 mg l⁻¹ IBA i 1,0 mg l⁻¹ GA₃. System korzeniowy bez udziału kalusa pojawiał się po siedmiu dniach kultury. Rośliny przenoszono do warunków polowych z wydajnością 85-90% [Arockiasamy, Ignacimuthu 1998]. W niniejszej pracy wysoki procent zahartowanych regenerantów rosnących na poletku doświadczalnym uzyskano także dla krajowych gatunków mikołajków. Przeżywalność roślin różniła się w zależności od badanego gatunku i wynosiła 98% dla *E. planum*, 90% dla *E. maritimum* i 67% dla *E. campestre*.

W innych badaniach *E. foetidum* wskazywano na wpływ rodzaju eksplantatu i sacharozy na procent indukcji odpowiedzi oraz liczbę pędów i korzeni zregenerowanych w warunkach *in vitro* roślin. Eksplantaty łodygowe z okazów pochodzących z kolekcji *in vitro* rozwijały średnio 4,3 pędy o 5-6 liściach i 2-3 korzenie na pożywce podstawowej MS, bez regulatorów wzrostu i rozwoju roślin. Zaletą tej metody, podkreślaną przez autora, jest możliwość otrzymania w pełni wykształconych roślin na jednym wariantcie pożywki [Martin 2004a].

Gayatri wraz z zespołem opracował najwydajniejszy protokół regeneracji *E. foetidum* w kulturach *in vitro*. Autorzy przebadali wpływ pojedynczych regulatorów wzrostu: BAP i Kin w różnych stężeniach (0-2,5 mg l⁻¹) w kombinacji z 250 mg l⁻¹ poliwinylpirolidonu na regenerację roślin z eksplantatów liściowych i namnażanie pędów w kolejnych cyklach. Najwyższy współczynnik indukcji (80%), najwyższą liczbę pędów na pojedynczą kulturę (17,8 pędów) oraz liczbę korzeni (11,1) dla tego gatunku otrzymano na pożywce LS z 1,5 mg l⁻¹ BAP. Rośliny przenoszono na poletka doświadczalne z wydajnością 88% [Gayatri i wsp. 2006].

Natomiast Chandrika i współautorzy opracowali szybką metodę regeneracji *E. foetidum* z eksplantatów kwiatostanowych na pożywkach MS z BAP i Kin. W ciągu 4-6 dni otrzymano 2-4 pędy przybyszowe, które w kolejnych dniach wytworzyły 5-6 liści i 1-2 kwiatostany. Najlepszą pożywką dla proliferacji pędów (3,7 pędy na eksplantat) było podłoże MS z 3,0 mg l⁻¹ BAP i 1,0 mg l⁻¹ Kin. Na tej samej pożywce otrzymano ponad 7 korzeni na eksplantat. Autorzy podkreślają, że metoda ta skraca proces regeneracji roślin poprzez zastosowanie eksplantatów kwiatostanowych oraz zredukowanie czasochłonnego i kosztownego etapu ukorzeniania pędów. Efektywność procesu hartowania wynosiła ponad 90% [Chandrika i wsp. 2011].

Autor kolejnej publikacji opisał embriogenezę jako metodę rozmnażania *E. foetidum*. Martin [2004b] określił wpływ różnych typów regulatorów wzrostu i rozwoju roślin na indukcję kalusa embriogenego i embriogenezy pośredniej. Z eksplantatów liściowych i fragmentów łodyg otrzymano kruchy kalus na pożywce MS zawierającej 4,52 μM 2,4-D i 2,32 μM Kin, który po przełożeniu do płynnej pożywki ½ MS zawierającej 5-15% mleczka kokosowego formował zarodki i ich rozwój do stadium liścieni. Pożywka z 10% mleczkiem wpływała na rozwój około 510 zarodków z 10 mg kalusa. Zarodki przeniesione na zestaloną pożywkę w 98% przekształcały się w całe rośliny [Martin 2004b].

Inne warunki regeneracji *E. foetidum* poprzez embriogenezę somatyczną opisał zespół Ignacimuthu [1999]. Najwyższy współczynnik indukcji kalusa otrzymano z dojrzałych eksplantatów liściowych na pożywce LS wzbogaconej w 1,0 mg l⁻¹ 2,4-D i 1,0 mg l⁻¹ BAP. Natomiast największą liczbę zarodków (średnio 12 zarodków na kulturę) odnotowano na pożywce LS 0,1 mg l⁻¹ 2,4-D, 2,0 mg l⁻¹ BAP i 1,0 mg l⁻¹ GA₃. Struktury te zwane przez autorów zarodkami przekształcały się w dojrzałe rośliny (9 pędów na

kulturę) na pożywce MS +1,0 mg l⁻¹ GA₃. Zregenerowane pędy ukorzeniano na MS z 0,1 mg l⁻¹ IAA i 1,0 mg l⁻¹ GA₃ [Ignacimuthu i wsp. 1999].

Wyniki badań regeneracji *E. foetidum* były wskazówką w komponowaniu pożywek dla kultur *in vitro* krajowych gatunków *Eryngium*, dla których jednak wybrano zalecaną metodę mikrorozmnażania roślin leczniczych opartą na rozwoju pąków bocznych z istniejących w eksplantacie merystemów [Bajaj 1988].

Gatunki z rodzaju *Eryngium* należą do rodziny *Apiaceae* skupiającej szeregu taksonów bogatych w metabolity wtórne, głównie olejki eteryczne. Z tego względu wiele gatunków jest roślinami przyprawowymi bądź leczniczymi. Dla szeregu gatunków z rodziny *Apiaceae* zostały opracowane procedury mikrorozmnażania np. *Angelica* sp., *Foeniculum* sp., *Carum carvi* L., *Buplerum falcatum* L., *Levisticum officinale* Koch, *Apium graveolens* L. [Ekiert 2000]. Opracowano także systemy rozmnażania *in vitro* dla *Hacquetia epipactis*, która zaliczana jest, podobnie jak gatunki mikołajków, do podrodziny *Saniculoideae* [Nowak i wsp. 2011]. Jak ukazują niniejsze badania, krajowi przedstawiciele rodzaju *Eryngium*, charakteryzują się dużymi zdolnościami morfogenetycznymi. Pozwoliło to na rozwinięcie systemu wegetatywnego mnożenia mikołajków w oparciu o rozwój merystemów wierzchołkowych i pąków bocznych, opisanego dla *E. planum* w publikacji z badaniami własnymi [Thiem i wsp. 2013].

Utworzona kolekcja *in vitro* trzech krajowych gatunków *Eryngium* przyczynić się może do ich czynnej ochrony *ex situ*, zwłaszcza *E. maritimum* i *E. campestre*. W ramach innego projektu badawczego, dla *E. maritimum* i *E. campestre* opracowano także metodę otrzymywania somatycznych nasion, z kapsułkowanych w alginianie wapnia szczytów pędów i przechowywania krótkoterminowego w warunkach *in vitro* [Kikowska, Thiem 2011]. Jak podają Rybczyński i Mikuła [2006] na konferencji pt: "Rzadkie, ginące i reliktowe gatunki roślin i grzybów" – „Metody kultur tkankowych i biotechnologię uznać można za podstawowe narzędzie do wykorzystania w dalekosiężnej strategii ochrony zasobów genowych flory Polski (...) Dotychczas tylko nieliczne krajowe gatunki były obiektem badań z wykorzystaniem metod biotechnologicznych i współczesnej analizy materiału roślinnego” [Rybczyński, Mikuła 2006].

Kultury korzeniowe

Korzenie odgrywają istotną rolę nie tylko we wzroście i rozwoju rośliny, ale także stanowią miejsce akumulacji metabolitów wtórnych, w dużej części także tych użytecznych z farmaceutycznego punktu widzenia. Ponadto korzenie wykazują znaczną produktywność, dzięki czemu często są ważnym źródłem tych substancji [Fulzele i wsp. 2002; Martin i wsp. 2008]. W niniejszej pracy dla krajowych gatunków *Eryngium* opracowano metodę otrzymywania i prowadzenia kultur korzeniowych w płynnych pożywkach. Głównym surowcem farmaceutycznym mikołajków są korzenie roślin gruntowych, bogate w metabolity wtórne, dlatego założono kultury *in vitro* tych organów.

W badaniach własnych pomimo wielu prób, nie powiodły się doświadczenia dotyczące indukcji i prowadzenia kultur korzeni transformowanych dla badanych gatunków mikołajków. Z tego powodu podjęto szersze badania opracowania optymalnych warunków hodowli korzeni nietransformowanych, które również są dobrym systemem produkcji metabolitów wtórnych i zostały opisane w szeregu publikacjach [Fulzele i wsp. 2002; Langhansova i wsp. 2005; Martin i wsp. 2008; Wu i wsp. 2009].

Dla kultur korzeniowych badano wpływ różnych czynników na przyrost biomasy korzeni mikołajków: rodzaj eksplantatów inicjalnych, stężenia soli mineralnych lub/i witamin w pożywkach podstawowych MS i Gamborga B₅ i stężenia sacharozy oraz typ i stężenie auksyny. Eksplantatami do założenia kultur korzeniowych mikołajków w płynnych pożywkach były fragmenty korzeni siewek i zregenerowanych w kulturach *in vitro* roślin oraz korzonki powstałe w wyniku ryzogenezy pośredniej z ogonków liściowych. Spośród testowanych eksplantatów inicjalnych *E. planum*, najlepszym przyrostem biomasy charakteryzowały się kultury korzeniowe zapoczątkowane z fragmentów korzeni przybyszowych rozmnożonych *in vitro* roślin.

Korzenie przybyszowe wszystkich gatunków mikołajków charakteryzowały się wolnym tempem przyrostu biomasy na początku trwania kultur, zwiększającym się w miarę upływu czasu. Korzenie mikołajków początkowo były cienkie i delikatne, barwy białej. Z czasem trwania kultur zwiększały biomasę przyrastając na długość i grubość, wytwarzając korzenie boczne kolejnych rzędów oraz zmieniały barwę na brunatną. Podobne zmiany obserwowano w kulturach *in vitro* *Ophiorrhiza prostrata* D. Don, gdzie zabarwienie korzeni również zmieniało się z czasem trwania kultury

- z białego, poprzez żółte do brunatnego. Według autorów zmiana zabarwienia ma prawdopodobnie związek z akumulacją metabolitów wtórnych w organach roślinnych [Martin i wsp. 2008]. Można przypuszczać, że niski przyrost biomasy w początkowym okresie hodowli wiąże się z procesem adaptacji korzeni do nowych warunków fizykochemicznych. Podobną tendencję obserwowano w kulturach korzeni *Decalepis hamiltoni* Wight & Arn. [Giridhar i wsp. 2005] i *O. prostrata* [Martin i wsp. 2008].

Korzenie mikołajków rosnące w pożywce B₅ charakteryzowały się znacznie słabszym rozwojem, w porównaniu do podłoża MS. Pożywka Gamborga w przypadku mikołajków nie była odpowiednia do wzrostu i rozwoju tych organów. Podobnie, biomasa korzeniowa *Aloe vera* (L.) Burm. z kultur korzeniowych utrzymywanych w pożywce MS, narastała szybciej niż ta w pożywce B₅, przy zastosowaniu tej samej suplementacji hormonalnej [Lee 2011]. Zastosowanie dla *E. campestre* i *E. maritimum* pożywek MS o zredukowanym składzie mineralnym podyktowane było ich biologią. W naturze gatunki te preferują stanowiska ubogie w składniki odżywcze. Jak wynika z innych publikacji zubożenie składu pożywek sprzyjało rozwojowi kultur korzeniowych *Echinacea angustifolia* DC. [Wu i wsp. 2006] i *Withania somnifera* (L.) Dunal [Wadegaonkar i wsp. 2006]. Optymalne stężenia składników mineralnych pożywek jest czynnikiem determinującym wzrost i rozwój korzeni. Podwyższenie ich stężeń powyżej wartości optymalnej dla gatunku może skutkować zahamowaniem rozwoju kultur korzeniowych, a niekiedy także akumulacji metabolitów wtórnych. Zbyt wysokie zawartości składników odżywczych skutkowały obniżeniem wzrostu i rozwoju korzeni *E. angustifolia* [Wu i wsp. 2006] i *W. somnifera* [Wadegaonkar i wsp. 2006].

W badaniach własnych biomasa korzeniowa mikołajków wyraźnie powiększała się w pożywkach MS wraz ze wzrostem stężeń auksyn. Korzenie rosnące w obecności IAA i IBA charakteryzowały się dużym przyrostem biomasy oraz licznymi korzeniami bocznymi. Stanowi to istotną zaletę z punktu widzenia produkcji metabolitów wtórnych. Delikatne i młode korzonki boczne zwykle posiadają większą zdolność do akumulacji tych związków [Mathur i wsp. 2010]. Natomiast dodatek NAA lub wysokiego stężenia sacharozy skutkowało wytworzeniem się otoczki kalusowej na powierzchni korzeni głównych mikołajków, co niekorzystnie wpływało na rozwój kultury. Należy zaznaczyć, że wpływ auksyn na indukcję, wzrost i rozwój korzeni jest specyficzny dla danego gatunku. Znaczący wpływ IBA na powstawanie i rozwój korzeni bocznych obserwowano w kulturach korzeniowych *Karwinskia humboldtiana*

(Schult.) Zucc. [Kollárovà i wsp. 2004]. Duży przyrost biomasy korzeniowej zaobserwowano także w pożywce z IBA dla gatunków *E. angustifolia* oraz *Bupleurum falcatum* L. [Wu i wsp. 2006; Kusakari i wsp. 2000]. W badaniach własnych korzenie mikołajków rosnące w pożywce MS z NAA wykazywały skłonność do kalusowania i tworzyły mniej korzonków bocznych, niż eksplantaty rosnące w pozostałych wariantach pożywki. Podobne tendencje obserwowano w kulturach korzeniowych *Aloe vera* (L.) Burm. [Lee i wsp. 2011] oraz *K. humboldtiana* [Kollárovà i wsp. 2004] – grube korzenie charakteryzowały się obecnością kalusowej otoczki („callus-like mass”). Odmienne obserwacje poczyniono dla kultur korzeniowych *A. vera*. Suplementacja auksynami IAA i IBA nie wpływała korzystnie na rozwój korzeni, natomiast uzyskano dużą liczbę korzeni bocznych w pożywce z dodatkiem NAA [Lee i wsp. 2011].

Część kultur korzeniowych *Eryngium* L. prowadzono w pożywkach suplementowanych 60 g l⁻¹ sacharozy. Zawartość cukru w pożywkach zwiększono w oparciu o doniesienia literaturowe. Kultury korzeniowe *Salvia fruticosa* Mill. o największym przyroście biomasy uzyskano dla eksplantatów hodowanych w pożywkach z 40 g l⁻¹ sacharozą [Karam i wsp. 2003]. Wydajny rozwój korzeni *E. angustifolia* otrzymano w wyniku zwiększenia stężenia tego cukru do 50 g l⁻¹, natomiast największym tempem wzrostu i przyrostem biomasy charakteryzowały się korzenie umieszczone w pożywkach z 70 i 90 g l⁻¹ S [Wu i wsp. 2006]. Odmienne obserwacje poczyniono dla kultur korzeni *B. falcatum*. Podwyższenie stężenia sacharozy do 40 g l⁻¹ w płynnej pożywce powodowało wyraźne zahamowanie formowania korzeni bocznych [Kusakari i wsp. 2000]. Suplementacja pożywki MS wysokim stężeniem sacharozy nie wpłynęła na zahamowanie wzrostu korzeni mikołajków, jednakże skutkowała wytworzeniem otoczki kalusowej na powierzchni korzeni głównych wszystkich trzech gatunków.

Określona dynamika wzrostu korzeni w płynnych pożywkach pozwoliła oceniać rozwój organów i wybrać najlepszy wariant pożywki do namnożenia biomasy przeznaczonej do badań. Opracowane optymalne warunki indukcji i wzrostu kultur korzeniowych mogą być wykorzystane do zabiegów biotechnologicznych w celu podwyższenia zawartości metabolitów wtórnych.

W pracy podjęto próby indukcji korzeni włósnikowatych dla wszystkich trzech gatunków *Eryngium*, jednakże nie otrzymano ustabilizowanej kultury korzeni transformowanych. Jak wynika z przeglądu piśmiennictwa i baz internetowych kultury

transformowane otrzymano tylko dla kilku gatunków z rodziny *Apiaceae*: *Angelica gigas* Nakai, *Ammi majus* L., *Ammi visnaga* Lam., *Anethum graveolens* L., *Bupleium falcatum* L., *Centella asiatica* (L.) Urban, *Daucus carota* L., *Foeniculum vulgare* Mill., *Levisticum officinale* W.D.J Koch, *Pimpinella anisum* L. [Barański 2008]. Jednakże żaden z tych gatunków nie należy do podrodziny *Saniculoideae*. W piśmiennictwie brak jest informacji na temat kultur korzeni transformowanych gatunków należących do tej podrodziny, więc można wnioskować, że rośliny należące do taksonu *Saniculoideae* nie są wrażliwe na infekcję *Agrobacterium rhizogenes*, bądź wymagają zastosowania innych procedur. Z licznych opracowań wiadomo, iż zdolność do wytwarzania korzeni transformowanych zależy m.in. od gatunku i genotypu rośliny. Niektóre z nich są mało podatne na zakażenie *A. rhizogenes* [Wasilewska, Królicka 2005].

Kultury pędowe

Kultury pędowe mikołajków założono z uwagi na fakt, że w częściach nadziemnych tych gatunków akumuluje się inny zestaw związków aktywnych. W ziele, które również stanowi surowiec farmaceutyczny zachodzi produkcja innych saponin niż w korzeniu. Ten kompleks, obok kwasów fenolowych i flawonoidów, również może mieć znaczenie w aktywności biologicznej surowca.

W pracy określono dynamikę wzrostu kultur pędowych trzech gatunków mikołajków w płynnych pożywkach MS suplementowanych $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ BAP i $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ IAA, utrzymywanych przez okres 30 dni. Nieznaczny wzrost biomasy pędowej zauważony był w ciągu pierwszych 10 dni. Zjawisko to jest prawdopodobnie związane z przystosowaniem materiału roślinnego do warunków fizykochemicznych płynnych pożywek. Największy wzrost biomasy zaobserwowano między 10 a 15 dniem kultury. W kolejnych dniach hodowli tempo wzrostu pędów znacznie malało by osiągnąć fazę stacjonarną. Odmienną dynamikę wzrostu wykazywały kultury pędowe *Mitragyna speciosa* (Roxb.) Korth. inkubowane w płynnej pożywce WPM wzbogaconej w $2,0 \text{ mg l}^{-1}$ TDZ i $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ BAP. Przez pierwsze 25 dni biomasa pędowa wzrastała regularnie o pewną stałą wartość by nagle zmaleć w dniu 30 [Wungsintaweekul i wsp. 2012]. Natomiast kultury pędowe *Withania somnifera* hodowane w pożywce MS suplementowanej $0,6 \text{ mg l}^{-1}$ BAP i 20 mg l^{-1} spermidyny, w cyklu ośmiotygodniowym, w ciągu pierwszych pięciu tygodni przybierały masę w sposób liniowy by w piątym tygodniu osiągnąć największą wartość biomasy [Sivanandhan i wsp. 2013]. W ciągu

pierwszych 30 dni biomasa pędowa *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. wzrastała w płynnej pożywce MS 1,0 mg l⁻¹ BAP [Hernandez-Dominguez i wsp. 2004].

Kultury pędowe lub kultury całych roślin w płynnych pożywkach, chociaż rzadziej, są wykorzystywanym systemem w badaniach nad próbą zwiększania akumulacji pożądaných metabolitów wtórnych. Przykładem są kultury pędowe *Artemisia annua* L., będące źródłem leku antymalarycznego artemizyny, dla których skonstruowano specjalne bioreaktory rozpyłowe [Zhao, Liu 2007].

Kultury komórkowe

Otrzymane niezróżnicowane kultury komórkowe *E. planum* cechowały się dobrym przyrostem biomasy. Wyznaczona krzywa wzrostu zawiesiny mikołajka płaskolistnego charakteryzowała się typowym cyklem – wykazywała 5 faz wzrostu kultury. Namnożona kultura zawiesinowa posłużyła do przeprowadzenia zabiegów biotechnologicznych. Opis warunków otrzymywania kultury komórkowej podany jest w opublikowanych badaniach własnych [Kikowska i wsp. 2012].

Ocena fitochemiczna organów z roślin gruntowych i roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro*, kultur organów i komórkowych

Z farmaceutycznego punktu widzenia, głównym kierunkiem badawczym biotechnologii roślin są badania produkcji pożądaných biologicznie aktywných związków w kulturach *in vitro* [Ekiert 2009]. Dlatego w pracy przeprowadzono ocenę fitochemiczną wszystkich otrzymaných kultur *in vitro* jako potencjalnych surowców farmaceutycznych pod kątem zawartości związków biologicznie czynnych, uznanych za wiodące.

Przedmiotem oceny fitochemicznej były surowce roślinne polskich gatunków mikołajków, pochodzące z roślin gruntowych i otrzymane z kultur *in vitro*. Badano obecność wybranych metabolitów roślinnych, wykazujących szerokie spektrum działania biologicznego. W ostatnich latach liczne badania skupiają się na poszukiwaniu nowych źródeł metabolitów wtórnych pochodzących z roślinnych kultur *in vitro*. Gatunki z rodziny *Apiaceae* są źródłem wielu ważnych substancji o działaniu leczniczym. Prace dotyczą biosyntezy związków kumarynowych, saponin, kwasów fenolowych, fitosteroli czy związków lotnych z olejków eterycznych [Ekiert 2000]. Jednak rośliny gruntowe akumulują zwykle niską i często zmienną zawartość

metabolitów wtórnych. Interesujące zatem są badania wyjaśniające na jakim poziomie zachodzi biosynteza tych związków w roślinach otrzymanych w warunkach *in vitro*.

W niniejszej pracy na podstawie wstępnych analiz TLC oraz HPLC i UPLC wykazano, że badane gatunki z rodzaju *Eryngium* L. zregenerowane w warunkach *in vitro* oraz kultury pędów i korzeni zdolne są do biosyntezy metabolitów wtórnych, takich jakie produkują analogiczne organy roślin gruntowych. Liście rozetkowe mikołajków pochodzących ze stanowisk naturalnych i z roślin namnożonych w kulturach *in vitro* oraz kultury pędowe w płynnych pożywkach, których główną masę stanowiły właśnie liście rozetkowe, produkują saponiny triterpenowe, fenolokwasy (kwas rozmarynowy, chlorogenowy i kawowy) i flawonoidy (pochodne kemferolu i kwercetyny). W korzeniach roślin gruntowych i roślin zregenerowanych *in vitro* oraz kulturach korzeniowych w płynnych pożywkach stwierdzono obecność saponin i fenolokwasów, ale nie zaobserwowano flawonoidów. Interesujące są wyniki analiz kultur tkankowych *E. planum*. Wykazano, że niezróżnicowane kultury komórkowe mikołajka płaskolistnego – kalus i zawiesina zachowują zdolność biosyntezy saponin triterpenowych oraz fenolokwasów.

SAPONINY TRITERPENOWE

W niniejszej pracy, metodą UPLC MS/MS, przeprowadzono analizy obecności i ocenę zawartości kompleksu saponinowego w organach roślin gruntowych, liściach rozetkowych i korzeniach roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro* oraz kulturach korzeniowych i kulturach komórkowych wybranych mikołajków względem wzorców saponin wyizolowanych z korzenia mikołajka płaskolistnego. Saponiny te zostały wcześniej wyizolowane i zidentyfikowane przez zespół badaczy z Puław [Kowalczyk i wsp. 2013]. Natomiast cały zestaw saponin triterpenowych został przedstawiony na wykreślonych profilach dla każdego z trzech taksonów.

Istnieją zasadnicze różnice w składzie i zawartości saponin w zależności od badanego gatunku *Eryngium*, rodzaju i pochodzenia surowca oraz rodzaju kultury *in vitro*. Największą zawartością sumy badanych saponin (M1-M5) charakteryzują się organy *E. planum*, co jest związane z faktem, że są to saponiny charakterystyczne dla tego gatunku. Korzenie *E. maritimum* posiadają takie saponiny jak korzenie *E. planum*. Natomiast nie są to saponiny charakterystyczne dla *E. campestre*, co widać na wykreślonych metodą UPLC profilach. Badania ilościowe wskazują, że organy

pochodzące z roślin zregenerowanych w warunkach *in vitro* wszystkich badanych gatunków mikołajków akumulują więcej tych saponin niż analogiczne organy z roślin gruntowych. Ponadto zauważono, że korzenie posiadają bogatszy profil kompleksu saponinowego oraz większą zawartość sumy badanych saponin niż liście rozetkowe. Tendencja ta potwierdza się zarówno dla roślin gruntowych jak i z kultur *in vitro*. Ilościowej ocenie fitochemicznej poddano także kultury korzeniowe *E. maritimum*. Korzenie tego gatunku rosły w pożywkach płynnych MS wzbogaconych w auksyny w różnym stężeniu. W doświadczeniu tym badano wpływ egzogennych regulatorów wzrostu i rozwoju roślin na akumulację saponin triterpenowych w biomacie korzeniowej. Zauważono, że bez względu na rodzaj i stężenie auksyn korzenie utrzymywane w płynnych pożywkach wykazywały niższą akumulację saponin triterpenowych niż korzenie powstałe w wyniku ukorzeniania namnażanych w kulturach *in vitro* pędów oraz korzenie roślin gruntowych. W korzeniach rosnących w pożywce MS bez auksyn odnotowano znikomą zawartość saponin. Zawartość saponin triterpenowych była zbliżona we wszystkich kulturach korzeniowych, z wyjątkiem korzeni utrzymywanych w pożywce MS + 1,0 mg g⁻¹ IAA w których akumulacja saponin wzrosła. W przyszłych badaniach w celu przeprowadzenia zabiegów biotechnologicznych, które mogłyby zwiększyć produkcję tych związków, warto byłoby wybrać tę linię korzeniową ze względu na dobry przyrost biomasy korzeni i najwyższą akumulację saponin triterpenowych. Kultury korzeniowe wielu gatunków roślin leczniczych są cennym źródłem metabolitów wtórnych i stwarzają możliwość powiększenia skali badań z laboratoryjnej na przemysłową przy użyciu specjalnych bioreaktorów. Mimo, że korzenie roślin gruntowych *E. maritimum* i roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro* akumulowały wyższą zawartość saponin triterpenowych niż kultury korzeniowe to jednak system ten wart jest dalszych badań. Pobieranie korzeni z całych roślin jest zawsze dla nich destruktywne i staje się niemożliwe w przypadku roślin objętych ochroną gatunkową.

Często w kulturach *in vitro*, ze względu na sztuczność i odmienność panujących warunków, mogą powstawać nowe związki lub zupełnie nieznane połączenia. W niniejszej pracy odnotowano takie zjawisko. Zaobserwowano, że organy *E. campestre* z kultur *in vitro* produkują saponiny nieoznaczone w organach roślin rosnących w środowisku naturalnym.

Przykładem może być praca, w której autorzy badań mających na celu wskazanie wydajnego systemu kultur *in vitro*, ukierunkowanego na produkcję saponin z *Gypsophila paniculata* L., wykazali obecność saponin w kulturach komórkowych oraz pędach roślin namnożonych w kulturach *in vitro* roślin. Może to być zaskakujące ze względu na fakt, iż w roślinach gruntowych saponiny te akumulowane są tylko w korzeniach [Hanafy, Abou-Setta 2007].

Wyniki badań własnych wskazują, że kultury komórkowe *E. planum* produkują saponiny triterpenowe w ilości zbliżonej do zawartości w korzeniach roślin gruntowych tego gatunku. Niezróżnicowane kultury mikołajka płaskolistnego produkują znaczną ilość saponin, mimo, iż pożywka wzrostowa zawierała dodatek auksyny. Dane z piśmiennictwa wskazują, że w wielu przypadkach egzogeny dodatek auksyn do pożywek kultur komórkowych – kalusowych i zawiesiny - wywierał negatywny wpływ na produkcję metabolitów wtórnych np. antrachinonów [Arroo i wsp. 2005].

W światowym dorobku naukowym istnieje kilka doniesień na temat produkcji saponin w roślinnych kulturach *in vitro* na skalę pozalaboratoryjną. Klasycznym przykładem są ginsenozydy, których producentem jest japońska firma Nitto – Denko. Ze wszystkich typów kultur *in vitro* to właśnie kultury komórkowe *Panax ginseng* C.A. Mayer stanowią źródło dostępnych komercyjnie ginsenozydów, saponin triterpenowych stymulujących układ odpornościowy organizmu. Jak zauważają autorzy badań mających na celu zoptymalizowanie produkcji wysokich ilości tych związków, zarówno zawartość sumy saponin, jak i produkcja poszczególnych saponin, różni się w zależności od zastosowanego systemu kultury. W kulturach korzeniowych żeń-szenia właściwego profil saponinowy podobny był do kompleksu obecnego w korzeniach roślin z gruntu. Natomiast kultura komórkowa produkowała 4,3% saponin, jednakże o odmiennym profilu saponinowym [Langhansova i wsp. 2005].

Produkcję saponin w tkankach zróżnicowanych i niezróżnicowanych hodowanych w kulturach *in vitro* śledzono także w innej roślinie leczniczej – *Primula veris* L. Główna saponina z tego gatunku wytwarzana jest w korzeniach tej rośliny. W kulturach kalusowych i komórkowych akumulacja saponiny była 8-krotnie niższa niż w korzeniach roślin rosnących w środowisku naturalnym. Co zaskakujące, w kulturach *in vitro* - siewkach, korzeniach roślin rozmnażanych *in vitro* czy w kulturach korzeniowych odnotowano 1,5-razy mniejszą zawartość tej saponiny niż w korzeniach

z gruntu. Jednakże to właśnie kultury korzeniowe mogą być źródłem tej saponiny, ponieważ pierwiosnek lekarski zagrożony jest wyginięciem i objęty ochroną gatunkową [Okrslar i wsp. 2007].

FENOLOKWASY

Drugą główną grupą badanych w niniejszej pracy związków były fenolokwasy: kwas rozmarynowy i chlorogenowy. Istnieją zasadnicze różnice w składzie i zawartości wybranych kwasów i ich sumy w zależności od badanego gatunku, rodzaju i pochodzenia surowca oraz rodzaju kultury *in vitro*. Najwyższą zawartością sumy fenolokwasów charakteryzowały się organy *E. campestre*, pochodzące zarówno z roślin gruntowych jak i z kultur *in vitro*, w porównaniu do analogicznych organów *E. planum* i *E. maritimum*. Liście rozetkowe akumulowały wyższą zawartość sumy badanych kwasów fenolowych niż korzenie. Dotyczyło to zarówno roślin z naturalnych stanowisk jak i pochodzących z *in vitro*. Dane dotyczące produkcji kwasów fenolowych w *E. planum* zostały opublikowane [Thiem i wsp. 2013].

Kultury komórkowe *E. planum* produkowały znacznie większą ilość kwasu rozmarynowego i chlorogenowego niż pędy i korzenie okazów z kultur *in vitro*. Ilościowej ocenie fitochemicznej poddano również kultury korzeniowe *E. maritimum*. Korzenie tego gatunku rosły w pożywkach płynnych MS wzbogaconych w auksyny. Na podstawie danych literaturowych wiadomo, że skład hormonalny pożywki hodowlanej może prowadzić do zmian w zawartości metabolitów wtórnych. W doświadczeniu badano wpływ auksyn na akumulację metabolitów wtórnych w biomacie korzeniowej. Niestety, bez względu na rodzaj i stężenie auksyn korzenie utrzymywane w płynnych pożywkach wykazywały niższą akumulację kwasów fenolowych niż korzenie powstałe w wyniku ukorzeniania namnażanych w kulturach *in vitro* pędów oraz korzenie roślin gruntowych. W korzeniach rosnących w pożywce MS bez auksyn odnotowano znikomą zawartość metabolitów wtórnych – 0,006 mg g⁻¹ kwasów fenolowych. W pożywkach wzbogaconych niższymi stężeniami auksyn korzenie akumulowały wyższą zawartość fenolokwasów (1,23 – 1,36 mg g⁻¹) niż w pożywkach o wyższym ich stężeniu (0,50 – 0,95 mg g⁻¹). Wyniki tego doświadczenia wskazują na istotny wpływ auksyn na produkcję kwasów fenolowych, bardziej korzystny gdy występowały w niższych stężeniach. Najwyższą akumulacją fenolokwasów charakteryzowały się korzenie

rosnące w pożywce MS + 0,1 mg g⁻¹ IAA. Auksyna ta była najlepsza dla produkcji metabolitów wtórnych, zarówno fenolokwasów, jak i saponin triterpenowych.

Obecność wolnego kwasu rozmarynowego (RA) wykazano w ponad 100 gatunkach roślin, głównie w rodzinie *Lamiaceae*, podrodzynie *Nepetoideae* [Fecka 2002]. Jak wynika z piśmiennictwa, w rodzinie *Apiaceae*, kwas rozmarynowy występuje tylko w gatunkach z podrodziny *Saniculoidae*. W rodzaju *Eryngium* zawartość kwasu rozmarynowego w korzeniach roślin gruntowych w zależności od gatunku wynosiła od 0,4 mg g⁻¹ do 297 mg g⁻¹ [Le Claire i wsp. 2005; Marcetic i wsp. 2014]. Określona w niniejszej pracy zawartość kwasu rozmarynowego w korzeniach dwóch gatunków mikołajków – *E. maritimum* (0,495 mg g⁻¹) i *E. campestre* (2,644 mg g⁻¹) jest zgodna z wynikami analiz Le Claire i współpracowników. Korzenie z roślin gruntowych *E. planum* akumulowały niższą zawartość RA niż pozostałe gatunki (0,112 mg g⁻¹).

Natomiast zawartość kwasu chlorogenowego (CGA) określona została w organach roślin gruntowych następujących gatunków z rodzaju *Eryngium*: *E. foetidum* (określona obecność kwasu w liściach), *E. bourgatii* i *E. palmatum* (korzenie - 1,6 mg g⁻¹) [Mekhora i wsp. 2012; Cadiz-Gurrea i wsp. 2013; Marcetic i wsp. 2014]. Zawartość kwasu chlorogenowego w organach roślin gruntowych krajowych gatunkach z rodzaju *Eryngium* jest stosunkowo niska. Najwyższą akumulacją tego kwasu charakteryzują się organy *E. campestre*, dla których zawartość CGA jest zbliżona w liściach rozetkowych i korzeniach (1,093 i 1,041 mg g⁻¹, odpowiednio).

Produkcję bioaktywnych kwasów fenolowych w kulturach *in vitro* śledzono w różnych gatunkach roślin leczniczych. Akumulację wolnych kwasów fenolowych, w tym kawowego lub/i chlorogenowego badano w kulturach *in vitro* następujących gatunków: *Echinacea purpurea* L., *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott, *Ruta graveolens* L., *Ruta graveolens* ssp. *divaricata* (Tenore) Gams. [Wu i wsp. 2009; Szopa i wsp. 2012; 2013]. Jak wykazali autorzy zawartość kwasu kawowego w kulturze pędów *A. melanocarpa* (9,98 mg 100 g⁻¹) i w kulturze kalusa (7,31 mg 100 g⁻¹) była wyższa niż w owocach tego gatunku (3,96 mg 100 g⁻¹) [Szopa i wsp. 2013]. Wysoką produkcję kwasu kawowego i jego pochodnych otrzymano także w kulturze korzeni *E. purpurea* rosnącej w bioreaktorach [Wu i wsp. 2009]. Najwyższą akumulację kwasu chlorogenowego w kulturach *in vitro* *R. graveolens* ssp. *divaricata* otrzymano dla biomasy hodowanej w warunkach niebieskiego (9,10 mg 100 g⁻¹) i białego światła

(8,65 mg 100 g⁻¹). Pod kątem akumulacji kwasu chlorogenowego w nieodróżnicowanych kulturach *in vitro* badano *Eleutherococcus senticosus*. Najwyższą zawartością tego kwasu charakteryzowała się kultura zawieszinowa (29,7 mg g⁻¹), która akumulowała od ok. 15 do 50 – krotnie więcej CGA niż kalus wyprowadzony z różnych eksplantatów i rosnący na różnych pożywkach. Co zaskakujące, kwasu tego nie wykryto w liściach roślin gruntowych, a jego zawartość w korzeniach wynosiła 5,5 mg g⁻¹ [Floryanowicz-Czekalska i wsp. 2006].

Ocena fitochemiczna biomasy z wybranych kultur po zabiegach biotechnologicznych

Odpowiednio dobrane zabiegi biotechnologiczne pozwalają na podwyższenie produkcji pożądaných metabolitów w kulturach *in vitro*. Wyniki różnych publikacji ukazują istotne zmiany ilościowe poprzez regulację biosyntezy metabolitów wtórnych w kulturach pędowych wielu roślin leczniczych. Mechanizm działania elicytorów (zarówno biotycznych jak i abiotycznych) jest ogólnie uważany jako aktywujący ekspresję genów obronnych [Goyal i wsp. 2012].

Niewiele jest danych literaturowych dotyczących *Eryngium planum*, stąd szereg badań własnych obejmuje ten gatunek. W niniejszej pracy przeprowadzono elicytację kultur pędowych i korzeniowych oraz, dla porównania, kultury zawieszinowej mikołajka płaskolistnego.

Wyniki analiz ilościowych metodą HPLC wskazują, że po zastawieniu elicytorów-jasmonianu metylu i ekstraktu drożdżowego oraz sacharozy w podwyższonym stężeniu wpłynęło na zwiększenie akumulacji sumy fenolokwasów, jak i poszczególnych kwasów, w kulturach pędowych mikołajka płaskolistnego. Zastosowanie elicytorów zwiększyło akumulację metabolitów do poziomu zbliżonego lub przewyższającego zawartość w roślinach gruntowych. Obserwowany w pracy efekt elicytacji zależał od szeregu czynników, głównie rodzaju i stężenia badanego elicytora. Elicytacja jasmonianem metylu zwiększała produkcję kwasu rozmarynowego nawet 5,5-krotnie a sacharoza w stężeniu 50 g l⁻¹ w pożywce hodowlanej - 4,7-krotnie, w porównaniu do pędów nieelicytowanych. Najkorzystniejszym zabiegiem biotechnologicznym zwiększającym poziom fenolokwasów w pędach *E. planum* okazała się elicytacja jasmonianem metylu a najmniej skutecznym, elicytacja ekstraktem drożdżowym. Pędy

elicytowane posiadały znacznie wyższą zawartość fenolokwasów niż pędy roślin gruntowych i zregenerowanych w kulturach *in vitro*.

Traktowanie jasmonianem metylu jest często stosowaną strategią zwiększania produkcji związków biologicznie czynnych w kulturach *in vitro*, także pędowych. Jasmonian metylu zwiększył biosyntezę fenolokwasów w kulturze pędowej *Salvia miltiorrhiza* Bunge [Dreger i wsp. 2010]. Korzystny wpływ jasmonianu metylu na akumulację pożądaných metabolitów wtórnych w kulturach pędowych lub całych roślin w płynnych pożywkach wykazano dla szeregu gatunków: *Catharanthus roseus* L. G. Don. (windolina), *Drosera burmanii* Vahl. (plumbagina wzrosła 3 - krotnie), *Mitragyna speciosa* Korth. Havil. (mitragynina wzrosła 3 - krotnie), *Bacopa monnieri* (bakozyd wzrósł 1,8 - krotnie), *Withania somnifera* L. Dunal (witanolid A wzrósł 14 - krotnie, witanolid B 11 - krotnie, witaferyna A 13 - krotnie, withanone 12 - krotnie), *Pueraria lobata* Ohwi. (4 – krotnie izoflawony) [Vazquez - Flota i wsp. 2009; Thiem, Krawczyk 2010; Putalun i wsp. 2010; Wungsintaweekul i wsp. 2012; Sharma i wsp. 2013; Sivanandhan i wsp. 2013]. Ekstrakt drożdżowy natomiast wpływał na wzrost metabolitów wtórnych w pędowych kulturach *in vitro* *Centella asiatica* L. Urban. (azjatykozyd wzrósł 1,4 - krotnie), *D. burmanii* (plumbagina wzrosła 3,5 -krotnie) [Kim i wsp. 2004; Putalun i wsp. 2010; Wungsintaweekul i wsp. 2012].

Zaskakujące wyniki uzyskano w pracy dla kultur korzeniowych *E. planum*. Zastosowanie jasmonianu metylu jako elicytora kultur korzeniowych nie wpłynęło na podwyższenie zawartości fenolokwasów w korzeniach tego gatunku, co obserwowano na podstawie analiz metodą TLC-densytometryczną.

Jasmonian metylu wpłynął natomiast na zwiększenie zawartości sumy wybranych kwasów fenolowych, głównie kwasu rozmarynowego w kulturze zawiesinowej mikołajka płaskolistnego. Zawartość fenolokwasów w niezróżnicowanych kulturach komórkowych była znacznie wyższa niż w organach roślin gruntowych i zregenerowanych w kulturach *in vitro* [Kikowska i wsp. 2012]. Jak wynika z bogatego piśmiennictwa akumulację kwasu rozmarynowego, konstytutywnie akumulowanego związku obronnego, można zwiększyć w różnych typach kultur *in vitro* [Park i wsp. 2008] – najczęściej w zawiesinie komórkowej poprzez zastosowanie zabiegów biotechnologicznych - zwiększonego stężenia sacharozy (40-60 g l⁻¹) w kulturach komórkowych *C. blumei* [Martinez, Park 1993], pod wpływem ekstraktu drożdżowego

w kulturach komórkowych *Lithospermum erythrorhizon* Siebold & Zucc. [Mizukami i wsp. 1992] i *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. [Sumaryono i wsp. 1991]. Bardzo często jednak w tym celu stosowany jest jasmonian metylu. Elicytacja jasmonianem metylu powodowała wzrost zawartości kwasu rozmarynowego w kulturach komórkowych *Mentha × piperita* L. (1,5 krotnie) [Krzyżanowska i wsp. 2012]; *Lavandula vera* MM (2,4-krotnie) [Georgiev i wsp. 2007]; *C. blumei* (3-krotnie) [Szabo i wsp. 1999]; *Ocimum sanctum* L. (8,6-krotnie) [Hakkim i wsp. 2011]; *L. erythrorhizon* (10-krotnie) [Ogata i wsp. 2004].

Po zastosowaniu elicytacji kultur *in vitro* *Eryngium* spodziewano się, że w hodowlanym materiale uzyska się znaczne zwiększenie produkcji metabolitów wtórnych z grupy saponin triterpenowych, które należą do fitoaleksyn biorących udział w naturalnym mechanizmie obrony przed stresem. Niestety nie przeprowadzono oznaczeń ilościowych biomasy badanych kultur, jednakże ze wstępnych analiz półilościowych TLC można wnioskować, iż zawartość saponin triterpenowych w kulturach pędowych *E. planum* i *E. maritimum* oraz kulturze zawiesinowej *E. planum* wzrosła po zastosowaniu wybranych zabiegów biotechnologicznych, zwłaszcza pod wpływem elicytacji jasmonianem metylu. Wzrost zawartości saponin w elicytowanych kulturach *in vitro* zaobserwowano dla szeregu gatunków roślin leczniczych [Lambert i wsp. 2011]. W elicytowanej biomacie *Panax ginseng* odnotowano wzrost ginsenozydów - pod wpływem jasmonianu metylu i ekstraktu drożdżowego w kulturze zawiesinowej [Lu i wsp. 2001] oraz pod wpływem jasmonian metylu i kwasu salicyłowego w kulturach korzeniowych [Ali i wsp. 2006].

Wyniki prezentowanych badań biotechnologicznych wskazują, że mikołajki zregenerowane w kulturach *in vitro*, kultury organów i kultury niezróżnicowane produkują charakterystyczne dla gatunków związku aktywne. W kilku przypadkach zawartość tych związków jest wyższa niż w analogicznych organach roślin gruntowych. Ponadto udowodniono dostępnymi metodami, że akumulacja saponin triterpenowych oraz fenolokwasów, głównie kwasu rozmarynowego, w kulturach *in vitro* może być zwiększana pod wpływem zabiegów biotechnologicznych, głównie elicytacji jasmonianem metylu. W pracy stwierdzono, że kultury *in vitro* mikołajków mogą być rozpatrywane jako farmaceutyczne źródła ważnych substancji biologicznie czynnych.

Aktywność biologiczna ekstraktów i frakcji gatunków z rodzaju *Eryngium* L.

Po stwierdzeniu obecności głównych metabolitów wtórnych, jakimi są saponiny triterpenowe oraz kwas rozmarynowy i chlorogenowy, zarówno w roślinach gruntowych jak i otrzymanych w kulturach *in vitro* krajowych gatunków z rodzaju *Eryngium*, podjęto wybrane badania aktywności biologicznej ekstraktów alkoholowych i ich frakcji z surowców badanych taksonów.

Aktywność cytotoksyczna i proapoptotyczna frakcji *E. planum*

W ciągu ostatnich lat pojawiły się liczne doniesienia o surowcach roślinnych posiadających właściwości przeciwnowotworowe. Dane literaturowe dokumentują działanie cytotoksyczne w badaniach *in vitro* nie tylko czystych substancji, ale także ekstraktów roślinnych czy ich frakcji. Niekiedy efekt cytotoksyczny ekstraktów roślinnych lub frakcji na komórki nowotworowe jest silniejszy niż ich pojedynczych składników, co może być spowodowane synergizmem działania poszczególnych składników [Vickers 2002].

Przeprowadzone w pracy badania wpisują się w poszukiwanie nowych surowców, które mogą wchodzić w skład leków o działaniu przeciwnowotworowym lub być wykorzystywane w terapii prewencyjnej.

Do badań aktywności cytotoksycznej i proapoptotycznej wyselekcjonowano *Eryngium planum* L., ponieważ w piśmiennictwie istniały już doniesienia na temat aktywności cytotoksycznej tego gatunku. Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że dla mikołajka płaskolistnego wykazano aktywność cytotoksyczną ekstraktów z owoców, wobec różnych linii komórek nowotworowych białaczki [Bogucka-Kocka i wsp. 2008b].

Ze wszystkich badanych frakcji ekstraktów metanolowych z roślin gruntowych *E. planum*, najwyższą aktywność cytotoksyczną w stosunku do komórek nowotworu jajnika SKOV-3 (w badaniach metodami LDH i SRB), posiadały frakcje saponinowe z korzenia i liści rozetkowych. Jak wynika z piśmiennictwa, saponiny wykazujące dużą zmienność struktury różnią się aktywnością i mechanizmem działania [Man i wsp. 2010]. Saponiny triterpenowe wyizolowane z korzenia mikołajka płaskolistnego, obecne zarówno w częściach nadziemnych jak i podziemnych rośliny w różnych stężeniach, charakteryzują się obecnością aglikonu barygenolu, posiadającego w pozycji C-22 ugrupowanie angeloylowe [Kowalczyk i wsp. 2013]. Uważa się, że na

działanie cytotoksyczne saponin wpływ mają: rodzaj aglikonu, obecność co najmniej jednego ugrupowania angeloylowego w pozycji C-21 i C-22 oraz typ i rodzaj części cukrowej. Badania Chana wykazały, że obecność grupy angeloylowej w pozycji C21 i C22 saponin triterpenowych, będących pochodnymi barygenolu, jest niezbędna dla wysokiej aktywności cytotoksycznej tych związków. Autor badań udowadnia, że na inhibicję wzrostu linii komórek ludzkiego raka jajnika OVCAR3 wpływ miała liczba grup angeloylowych w pozycji C21 lub C22. Saponiny z jedną grupą posiadały niższą aktywność cytotoksyczną w porównaniu do saponin z dwoma grupami angeloylowymi. Usunięcie obu grup ze szkieletu barygenolu powodowało całkowite zniesienie aktywności cytotoksycznej saponin. Ponadto zauważono, że usunięcie grup cukrowych z pozycji C3 warunkowało utratę aktywności hamowania wzrostu komórek nowotworowych [Chan 2007]. W świetle tych doniesień, saponiny *Eryngium planum*, które posiadają ugrupowanie angeloylowe w pozycji C-22 mogą być odpowiedzialne za działanie cytotoksyczne.

Dokonując przeglądu piśmiennictwa można zauważyć, że aktywność cytotoksyczna wobec różnych komórek nowotworowych badana była dla wybranych ekstraktów, mieszanin saponin i izolowanych saponin z następujących gatunków mikołajków: *E. planum* L., *E. maritimum* L., *E. kotschy* Boiss., *E. creticum* L., *E. campestre* L., *E. yuccifolium* Michx. Zaobserwowano, że 24-godzinna ekspozycja komórek ostrej białaczki promielocytowej 1301 i HL60 na ekstrakt etanolowy z owoców *E. planum* w stężeniu 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$, wpływała na żywotność komórek nowotworowych, która odpowiednio wynosiła 62% i 55% [Bogucka-Kocka i wsp. 2008]. Z kolei aktywność liofilizowanych wodnych ekstraktów z części nadziemnych i korzeni *E. maritimum* i *E. kotschy*, badana na różnych liniach komórek nowotworowych testem MTT, wahała się w granicach IC_{50} 16,33 – 125,66 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Najwyższą aktywnością cytotoksyczną w stosunku do komórek nowotworu wątrobowo-komórkowego linii Hepg2 charakteryzowały się ekstrakty korzeniowe obu gatunków o IC_{50} =30,25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ dla *E. maritimum* i 32,86 $\mu\text{g ml}^{-1}$ dla *E. kotschy* [Yurdakok, Baydan 2013]. Wyniki testu XTT na linię komórkową gruczolakoraka piersi MCF7 wykazały, że metanolowe ekstrakty z liści i łodyg *E. creticum* hamowały wzrost komórek nowotworowych w odpowiednio 72 i 68% [Hassan i wsp. 2013]. Pięć saponin wyizolowanych z *E. campestre* posiadało umiarkowaną aktywność cytotoksyczną w stosunku do komórek raka okrężnicy linii HCT116 i HT29 [Kartal i wsp. 2006]. Badania Wanga

i współpracowników donoszą, że saponiny z *E. yuccifolium* charakteryzują się średnią aktywnością cytotoksyczną wobec komórek niedrobnokomórkowego raka płuc linii A549 i MRC5 oraz ostrej białaczki promielocytowej HL60 [Wang i wsp. 2010]. Autorzy powyższych badań nie podjęli się wyjaśnienia mechanizmu aktywności cytotoksycznej badanych ekstraktów i saponin wyizolowanych z różnych gatunków mikołajków.

Przeprowadzona w rozprawie doktorskiej ocena działania cytotoksycznego nie pozwoliła na rozróżnienie komórek apoptotycznych od nekrotycznych. Dlatego w celu wyjaśnienia mechanizmu cytotoksycznego działania frakcji saponinowych na komórki nowotworowe poprzez ocenę liczby komórek apoptotycznych i nekrotycznych, wykonano test Annexin V. Frakcje saponinowe indukowały apoptozę – saponiny z korzenia *E. planum* wykazywały silniejsze działanie proapoptotyczne niż saponiny z liści rozetkowych. Stopień aktywności proapoptotycznej wzrastał wraz ze wzrostem stężeń badanych frakcji. Z danych literaturowych wynika, że w obrębie rodzaju *Eryngium* badano jedynie wpływ ekstraktu metanolowego z owoców *E. planum* na indukcję apoptozy i nekrozy w komórkach nowotworowych 1301 i HL60 [Bogucka-Kocka i wsp. 2008]. Natomiast w kilku publikacjach dobrze udokumentowano pozytywny wpływ saponin triterpenowych na aktywność proapoptotyczną. Frakcja saponinowa z *Anemone flaccida* w stężeniu $40 \mu\text{mol l}^{-1}$ oraz pięć pojedynczych saponin znacząco wpływały na procent indukcji apoptozy w komórkach HeLa [Han i wsp. 2013]. Bogaty w saponiny ekstrakt z korzeni *Gypsophila oldhamiana* wpływał na indukcję programowanej śmierci w komórkach SMM-7721 [Zhang i wsp. 2013], a frakcja saponinowa w stężeniach 60 i $80 \mu\text{g ml}^{-1}$ z korzenia *Platycodon grandiflorum* indukowała apoptozę w komórkach HT29 [Kim i wsp. 2008].

W niniejszej pracy wykazano wzrost aktywności kaspazy 3 w linii komórkowej ludzkiego raka jajnika SKOV-3 pod wpływem frakcji saponinowych z liści rozetkowych i korzenia *E. planum*. Aktywność ta skorelowana była zarówno z rodzajem saponin jak i stężeniem frakcji – najwyższą aktywność kaspazy 3 odnotowano w komórkach rakowych traktowanych frakcją saponinową z korzenia w stężeniu $50 \mu\text{g ml}^{-1}$. Do tej pory nie ma prac, w których badano wpływ ekstraktów, frakcji czy związków (w tym saponin triterpenowych) innych gatunków z rodzaju *Eryngium* na indukcję aktywacji kaspazy 3 w komórkach nowotworowych. W licznych badaniach innych gatunków roślin dobrze udokumentowano pozytywny wpływ wybranych

ekstraktów bogatych w saponiny, mieszanin saponin i pojedynczych saponin triterpenowych na aktywność kaspazy 3. Ekstrakt z korzenia *Gypsophila oldhamiana* Miq. znacząco aktywował kaspazę 3 w linii raka wątroby SMMC-7721 [Zhang i wsp. 2013]. Frakcja saponinowa w stężeniu 40 $\mu\text{mol l}^{-1}$ oraz pięć pojedynczych saponin z *Anemone flaccida* Fr. Schmidt wpływały na aktywność kaspazy 3 w komórkach raka szyjki macicy linii HeLa [Han i wsp. 2013]. Platykodyna D – jedna z saponin triterpenowych wyizolowana z korzenia *Platycodon grandiflorum* Jacq. A.D.C. wpływała na aktywność kaspazy w komórkach rakowych Hepg2 [Qin i wsp. 2013], z kolei frakcja saponinowa (60 i 80 $\mu\text{g ml}^{-1}$) z korzenia *P. grandiflorum* indukowała aktywność kaspazy 3, 6 i 9 w komórkach nowotworu jelita grubego HT29 [Kim i wsp. 2008].

Apoptoza w zależności od wielu czynników może przebiegać w różny sposób. Dwie najlepiej poznane ścieżki to szlak wewnętrzny (mitochondrialny) i zewnętrzny (receptorowy). Jednoczesna analiza genów, których produkty białkowe zaangażowane są w proces apoptozy na drodze mitochondrialnej i receptorowej może dać szerszy wgląd w mechanizm działania frakcji saponinowej. Przeprowadzone w pracy badanie miało na celu wskazanie genów charakterystycznych dla szlaku, przez który saponiny indukują proces apoptozy w komórkach linii nowotworu jajnika. Wyniki wskazują, że profil ekspresji genów zaangażowanych w proces apoptozy po traktowaniu komórek frakcją saponinową z korzenia *E. planum* w stężeniu 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ jest wyraźnie różny od kontroli – komórek nietraktowanych. W regulacji procesu apoptozy biorą udział zarówno białka proapoptotyczne jak i antyapoptotyczne, a od ich wzajemnej relacji zależy czy w komórkach zostanie zaindukowana apoptoza. W linii komórkowej SKOV-3 pod wpływem frakcji saponinowej z mikołajka płaskolistnego nastąpił wzrost poziomu transkryptów: BAX, BID, PMAIP i HRK należących do jednej rodziny genów BCL2, a których produkty białkowe odgrywają kluczową rolę w indukcji szlaku wewnątrzkomórkowego. Jak wykazują badania lubelskiego zespołu badawczego, ekstrakt etanolowy z korzeni *Carex paniculata* (w którym obecne są saponiny) wykazywał wpływ na ekspresję genu BAX w komórkach ludzkich linii nowotworowych układu hematopoetycznego [Bogucka-Kocka i wsp. 2008]. W linii komórkowej SKOV-3 pod wpływem frakcji saponinowej *E. planum* nastąpił także wzrost transkryptów: DFFA, CASP3 i CASP9, których produkty białkowe również uczestniczą w indukcji programowanej śmierci komórek. W niniejszych badaniach

wskazany wzrost ekspresji genu CASP3 potwierdzony został analizami aktywności kaspazy 3. W komórkach nowotworowych stwierdzono znaczny wzrost aktywności tej wykonawczej kaspazy.

Wzrostowi ekspresji genów proapoptotycznych towarzyszyło obniżenie poziomu transkryptów TNFR2 i TRAF7.

W komórkach SKOV-3 obserwowano zmieniony poziom ekspresji genów – podwyższenie poziomu genów proapoptotycznych TNFRSF10A i obniżenie poziomu genu antyapoptotycznego TNFRSF10B, TNFRSF10C charakterystycznych dla mechanizmu zewnątrzkomórkowego apoptozy.

Według innych autorów badania ekspresji genów apoptotycznych w linii komórkowej raka okrężnicy HT29 traktowanych saikosaponiną D, wyizolowaną z korzenia *Bupleurum falcatum*, wykazały wzrost ekspresji genów proapoptotycznych CASP3 i CASP9 oraz TNFRSF10A i TNFRSF10B. Autorzy badań sugerują, że indukcja apoptozy w komórkach HT29 następuje poprzez receptor śmierci TRAIL. Ponadto dodają, że szlak mitochondrialny odgrywa znaczącą rolę w indukowanej saikosaponiną D apoptozie [Lu i wsp. 2013].

W wyniku przeprowadzonych badań można zatem stwierdzić, że frakcja saponinowa z korzenia mikołajka płaskolistnego moduluje w linii komórkowej SKOV-3 ekspresję genów, których produkty białkowe głównie kontrolują przepuszczalność błony mitochondrialnej, a więc regulują proces apoptozy zachodzący na drodze mechanizmu wewnątrzkomórkowego ale także dochodzi do zmiany ekspresji genów charakterystycznych dla mechanizmu zewnątrzkomórkowego.

Wyniki wykonanych doświadczeń udowadniają po raz pierwszy apoptotyczne działanie frakcji saponinowych z liści rozetkowych i korzeni *E. planum* na linię komórkową SKOV-3.

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa

W ostatnich latach obserwuje się wyraźny wzrost zainteresowania świata medycznego lekiem roślinnym, jako alternatywy do antybiotykoterapii. Nadużywanie w lecznictwie antybiotyków i silnych syntetycznych leków przeciwgrzybiczych oraz powstawanie szczepów drobnoustrojów opornych na ich działanie skłania naukowców do

poszukiwania substancji pochodzenia roślinnego, które mogą być aktywne w leczeniu różnych infekcji.

Wcześniejsze wstępne badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej trzech krajowych gatunków mikołajków wskazywały, że surowe alkoholowe ekstrakty z liści i korzeni roślin gruntowych posiadają słabą aktywność wobec bakterii *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus* oraz nieco silniejsze działanie przeciwgrzybicze przeciwko dermatofitom *Trichophyton mentagrophytes* i *Cryptococcus neoformans* [Thiem i wsp. 2008].

Badania przeciwdrobnoustrojowe badanych gatunków mikołajków objęte niniejszą pracą poszerzyły zakres analiz o frakcje wodno-metanolowe z korzeni trzech mikołajków rozdzielone na kolumnienkach Sep-Pak, frakcję saponinową z korzenia *E. planum* po rozdziale metodą chromatografii kolumnowej oraz metanolowe ekstrakty z niezróżnicowanej biomasy *E. planum* – kalusa i zawiesiny komórkowej i metanolowe ekstrakty z korzeni trzech gatunków *Eryngium* rozmnażanych w kulturach *in vitro*. Ponadto zbadano także wpływ ekstraktów i frakcji na wzrost wcześniej niebadanych gatunków: *Pseudomonas aeruginosa*, *Microsporum canis* i *Trichophyton rubrum*.

Wykazane w pracy działanie przeciwdrobnoustrojowe ekstraktów i frakcji z mikołajków najprawdopodobniej związane jest z synergistycznym działaniem saponin triterpenowych i kwasów fenolowych. Ze wszystkich badanych surowców roślinnych najefektywniej wzrost drobnoustrojów hamowały ekstrakty i frakcje z korzeni. Korzenie mikołajków, w porównaniu z liśćmi rozetkowymi, bogate są w saponiny triterpenowe oraz fenolokwasy. Ponadto z badań wynika, że frakcja saponinowa po rozdziale metodą chromatografii kolumnowej z korzeni roślin gruntowych *E. planum*, działa nieco słabiej niż 80% frakcja po rozdziale na mikrokolumnie Sep-Pak, w której oprócz saponin obecne są również kwasy fenolowe.

W piśmiennictwie istnieje szereg prac dokumentujących działanie hamujące saponin triterpenowych na wzrost bakterii i grzybów [Emam i wsp. 1996; Sindambiwe i wsp. 1998; Chouksey, Srivastava 2001; Wondemichael, Wink 2002; Avato i wsp. 2006], a także prace dotyczące działania przeciwbakteryjnego wybranych fenolokwasów [Gawlik – Dziki 2004].

Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że szereg gatunków z rodzaju *Eryngium* testowana była pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Wyniki wcześniejszych badań aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów z liści *E. maritimum* w stosunku do kilku szczepów bakterii i jednego drożdżaka ukazały, że frakcje niepolarne wykazywały wyższą aktywność niż frakcje polarne. *Pseudomonas aeruginosa* i *P. fluorescens* były najbardziej wrażliwymi na działanie ekstraktów szczepami bakteryjnymi. Jedynie 1 mg ml⁻¹ frakcji polarnej z liści mikołajka nadmorskiego wystarczało do zahamowania wzrostu *P. aeruginosa*. Inni autorzy również wykazali wysoką aktywność bójczą metanolowych ekstraktów z korzeni *E. maritimum* w stosunku do *P. aeruginosa* [Kholkhal i wsp. 2012]. Także ekstrakt chloroformowy z części nadziemnych bałkańskiego gatunku *E. palmatum* znacząco wpływał na zahamowanie aktywności tej Gram-ujemnej bakterii (MIC=7,8 µg ml⁻¹) [Marcetic i wsp. 2014]. W badaniach własnych wzrost *P. aeruginosa* najefektywniej hamowany był przez ekstrakt metanolowy z liści *E. planum* (MIC=15,6 mg ml⁻¹). Badania jakościowe i ilościowe przeprowadzone metodą UPLC wykazały, że liście rozetkowe *E. planum* posiadają bogatszy zestaw saponin triterpenowych oraz ich większą zawartość, niż pozostałe gatunki mikołajków.

W badaniach zespołu Meot-Duros proliferacja *Candida albicans* ulegała inhibicji po zastosowaniu niepolarniej frakcji z liści mikołajka nadmorskiego o stężeniu 100 mg ml⁻¹ [Meot-Duros i wsp. 2008]. Natomiast w innych badaniach metanolowe ekstrakty z korzeni *E. maritimum* posiadały umiarkowaną aktywność bójczą w stosunku do tego groźnego drożdżaka [Kholkhal i wsp. 2012]. Zarówno chloroformowe jak i metanolowe ekstrakty z części nadziemnych *E. palmatum* posiadały wysoką aktywność hamującą wzrost *C. albicans* (MIC=7,8 µg ml⁻¹). Do badań aktywności biologicznych zastosowano nie tylko ekstrakty i frakcje z mikołajków, ale także olejki eteryczne. Aktywność przeciwgrzybicza lotnych składników ekstraktu z *E. durami* wyniosła powyżej 20 µg ml⁻¹ w stosunku do *C. albicans* [Cavaleiro i wsp. 2011]. Ekstrakty metanolowe z korzeni trzech krajowych gatunków mikołajków, w porównaniu z innymi surowcami, posiadały silniejszą aktywność bójczą w stosunku do *C. albicans* (MIC=12,5 mg ml⁻¹).

Inni autorzy wskazują, że niepolarna frakcja z liści mikołajka nadmorskiego w stężeniu 10 mg ml⁻¹ wpływała na wzrost *Staphylococcus aureus* [Meot-Duros i wsp. 2008]. Wysoką aktywność przeciwbakteryjną w stosunku do *S. aureus* wykazywał etanolowy

ekstrakt (50%) z korzeni *E. maritimum* (MIC=10 mg ml⁻¹) [Holderna-Kedzia, Kędzia 2010]. Natomiast etanolowe ekstrakty z *E. caucaseum* i *E. bungei* umiarkowanie hamowały wzrost *S. aureus* [Alipour, Khanmohammadi 2011]. Pod kątem aktywności przeciw *S. aureus* przebadano także chloroformowe ekstrakty z części nadziemnych *E. palmatum*, dla którego wartość MIC wynosiła 7,8 µg ml⁻¹ [Marcetic i wsp. 2014]. Olejek z *E. thoriifolium* wykazywał wyższą aktywność przeciw bakteriom niż olejki z *E. campestre* i *E. creticum*, porównywalną nawet do związku referencyjnego – antybiotyku wankomycyny w stosunku do *S. aureus* [Celik i wsp. 2011]. W badaniach własnych wzrost *S. aureus* najefektywniej hamowany był przez frakcje saponinowo-fenolokwasowe z korzeni *E. maritimum* (MIC=1 mg ml⁻¹) i *E. planum* (MIC=2 mg ml⁻¹). Korzenie gruntowe tych dwóch gatunków charakteryzują się znacznie wyższą zawartością saponin triterpenowych niż korzenie mikołajka polnego.

Aktywność antyoksydacyjna

Stres oksydacyjny stanowi ważny czynnik etiologiczny zaangażowany w patogenezę wielu chorób. Brak równowagi między produkcją reaktywnych form tlenu a biologiczną zdolnością do ich redukcji prowadzi do zaburzeń, działających destrukcyjnie na białka, kwasy nukleinowe, lipidy, powodując uszkodzenia komórek, a także innych cząsteczek pełniących istotne funkcje w życiu komórek. Wiedza na temat szkodliwości wolnych rodników skłania do poszukiwania substancji wspomagających naturalną obronę antyoksydacyjną organizmu. Wtórne metabolity roślinne obecne w ekstraktach z roślin leczniczych często wykazują silne właściwości antyoksydacyjne. Są to głównie związki z grupy polifenoli: flawonoidy, kwasy fenolowe, ligniny czy taniny [Matkowski 2008].

Jednym z aspektów pracy była ocena potencjału antyoksydacyjnego organów pochodzących z roślin gruntowych i roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro* trzech krajowych gatunków mikołajków. Ocenę przeprowadzono dostępnymi metodami *in vitro* o różnych mechanizmach oksydacyjnych: zmiatania wolnego rodnika DPPH, w teście fosfomolibdenowym sprawdzającym potencjał redukcyjny analizowanych ekstraktów wobec jonów metali przejściowych oraz teście sprawdzającym stopień hamowania oksydacyjnej degradacji deoksyrybozy. Systemy *in vitro* są łatwiejsze do przeprowadzenia, szybsze i mniej kosztowne, w porównaniu z tradycyjnymi metodami *in vivo*. Wiadomo, że za właściwości antyoksydacyjne w głównej mierze odpowiadają polifenole, wśród których proste kwasy fenolowe, ich depsydy oraz flawonoidy

odgrywają kluczową rolę w determinacji tej aktywności. Jak wykazano w analizach HPLC i UPLC jednymi z głównych związków obecnych w badanych roślinach były polifenole, głównie fenolokwasy - w tym kwas rozmarynowy, kwas chlorogenowy, kwas kawowy. Taka kompozycja ekstraktów prawdopodobnie była odpowiedzialna za działanie antyoksydacyjne w analizowanych modelach. Kontrolę obecności związków czynnych w ekstraktach alkoholowych organów pochodzących z roślin gruntowych i kultur *in vitro* ograniczono do wybranych metabolitów wtórnych uznanych za główne, wiodące substancje obecne w tych taksonach. Wiadomo jednak, że aktywność biologiczna ekstraktów jest często efektem synergistycznego działania całego zestawu związków obecnych w surowcu. Na podstawie prezentowanych wyników z testów nie można jednoznacznie stwierdzić, jakie związki odpowiadają za działanie antyoksydacyjne ekstraktów z mikołajków.

Silne właściwości przeciwrodnikowe w teście DPPH wykazywały ekstrakty metanolowe z korzeni roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro* *E. planum* i *E. maritimum* oraz korzenie *E. campestre* pochodzące zarówno z roślin gruntowych jak i rosnących w warunkach *in vitro*. Najprawdopodobniej jest to związane z wysoką zawartością sumy polifenoli, głównie kwasu rozmarynowego i chlorogenowego. Za tą hipotezą przemawia obserwacja, że najsłabsze właściwości zmiatania wolnych rodników posiadały ekstrakty z korzeni roślin gruntowych *E. planum* i *E. maritimum*, bardzo ubogie w polifenole. Co ciekawe, zależności tej nie widać pomiędzy zawartością polifenoli a zdolnościami ekstraktów metanolowych organów krajowych mikołajków do redukcji jonów molibdenu w teście fosfomolibdenowym, gdzie najsilniejszą aktywność wykazują ekstrakty najuboższe w sumę polifenoli. Zaskakującym jest również fakt, że *E. campestre*, bogaty w polifenole, głównie fenolokwasy, wykazywał najsłabszą aktywność w teście zahamowania degradacji oksydacyjnej 2-deoksyrybozy przez rodnik hydroksylowy w porównaniu do dwóch pozostałych gatunków. W przypadku *E. planum* i *E. maritimum* najsilniejszym działaniem zahamowania degradacji substratu charakteryzowały się ekstrakty metanolowe z korzeni, które są ubogie w polifenole.

Właściwości przeciwutleniające surowców z mikołajków wykazano w licznych badaniach opartych na różnych mechanizmach działania. Analizowano gatunki: *E. alpinum*, *E. caucasicum*, *E. maritimum*, *E. campestre*, *E. creticum*. Badania mające na celu ocenę pojemności antyoksydacyjnej ekstraktu z korzeni *E. alpinum*, kwasu

chlorogenowego, kwasu rozmarynowego i jego pochodnej glukozydowej wykonano za pomocą metody opartej na badaniu zdolności do wymiatania anionorodników ponadtlenkowych generowanych chemiluminescencyjnie a wyniki przedstawiono w ekwiwalentach kwasu askorbinowego. Le Claire i wsp. wyjaśnili, iż za zmiatanie wolnych rodników przez ekstrakty z korzeni *E. alpinum* odpowiadają kwas chlorogenowy ($4,21 \pm 0,04$ mg AAE/mg próbki), kwas rozmarynowy ($3,86 \pm 0,03$) i glikozyd kwasu rozmarynowego ($1,98 \pm 0,00$) [Le Claire i wsp. 2005].

Silne właściwości antyoksydacyjne wykazano dla *E. caucasicum*. Sześcioma testami m.in. zmiatania wolnych rodników DPPH, rodników tlenu azotu czy mocy chelatowania jonów żelaza, mierzono właściwości antyoksydacyjne ekstraktów metanolowych mieszaniny liści i kwiatostanów oraz samych liści tego gatunku. Zaobserwowano, iż ekstrakty z liści wykazują silniejsze właściwości przeciwutleniające niż ekstrakty z mieszaniny liści i kwiatostanów. W teście DPPH ekstrakt z liści wykazywał silniejsze właściwości niż witamina C. Z kolei ten sam ekstrakt w badaniu określającym moc chelatowania jonów żelaza wykazywał większe zdolności chelatujące niż EDTA. Autorzy wspomnianego doświadczenia określili całkowitą zawartość sumy polifenoli oraz flawonoidów. Ekstrakty metanolowe z liści charakteryzowały się o połowę niższą zawartością polifenoli i 3,5-krotnie wyższą zawartością flawonoidów niż ekstrakty z liści i kwiatostanów *E. caucasicum* [Ebrahimzadeh i wsp. 2009].

Francuscy naukowcy badali właściwości antyoksydacyjne metanolowych ekstraktów z liści *E. maritimum* metodą z zastosowaniem wolnego rodnika ABTS oraz testem fosfomolibdenowym, które umożliwiają pomiar całkowitej aktywności antyoksydacyjnej badanych ekstraktów. Wyniki testu PMo wyrażone w ekwiwalentach kwasu askorbinowego wynosiły $32,74 \pm 1,11$ mg AAE g⁻¹ suchej masy, natomiast całkowita suma polifenoli $16,44 \pm 0,03$ mg GAE g⁻¹. Wykazano, że ekstrakt metanolowy z liści posiada słabe właściwości antyoksydacyjne, co prawdopodobnie wiąże się niską zawartością polifenoli [Meot-Duros i wsp. 2008]. Natomiast w teście DPPH najwyższą zdolność zmiatania wolnych rodników posiadał ekstrakt butanolowy z korzeni *E. maritimum*, którego aktywność była nieznacznie niższa od kwasu askorbinowego (IC₅₀ 0,0104 i 0,008 mg ml⁻¹) [Kholkhal i wsp. 2012]. W badaniach zmiatania wolnych rodników DPPH i ochrony deoksyrybozy przed degradacją antyoksydacyjną *in vitro* etanolowe ekstrakty z korzeni *E. campestre* wykazują silniejszą aktywność w porównaniu z ekstraktami z części nadziemnych rośliny.

Wysoka aktywność zmiatania wolnych rodników DPPH i OH nie korelowała z aktywnością antyoksydacyjną ekstraktów mierzona systemem β -karoten/ kwas linolowy [Nebija i wsp. 2009]. Natomiast inne badania (DPPH i inne testy redukcyjne) wykazały iż metanolowe ekstrakty z części nadziemnych *E. campestre* i wyizolowane flawonoidy posiadają spektrum działania antyoksydacyjnego od umiarkowanego do silnego [El-Kassem i wsp. 2013]. Farhan i wsp. stwierdzili aktywność antyoksydacyjną liofilizowanych wodnych ekstraktów *E. creticum*. Z badań wynika, iż liście posiadają bogatszy profil metabolitów i wyższą zawartość tych związków niż łodygi, podobnie zawierają wyższe stężenie witaminy C i zawartość sumy polifenoli, dlatego też właściwości przeciwutleniające dla tego gatunku różniły się w zależności od testowanego surowca. Ekstrakt z liści mikołajka kretańskiego wykazywał silniejsze właściwości zmiatania wolnego rodnika ABTS [Farhan i wsp. 2012].

Badania aktywności antyoksydacyjnej krajowych gatunków potwierdziły działanie przeciwutleniające wykazane wcześniej dla innych gatunków mikołajków, głównie europejskich taksonów. Konieczne są jeszcze dalsze badania wyjaśniające korelację pomiędzy aktywnością przeciwutleniającą a zawartością metabolitów wtórnych, innych niż te badane.

Dokonano przeglądu doniesień literaturowych na temat działania antyoksydacyjnego gatunków z rodzaju *Eryngium*. Dotychczas opracowano szereg metod badawczych, który pozwalają określić potencjał przeciwutleniający ekstraktów z roślin. Jednakże istnieje wiele wariantów danej metody, które różnią się warunkami pomiarów na tyle, że porównanie rezultatów staje się nie możliwe. Trudno także wskazać metodę najlepszą, obarczoną najmniejszymi błędami, pozbawioną niedociągnięć. Ponadto istnieje szereg czynników metodycznych mających wpływ na uzyskane wyniki, które nie zostały dotąd ujednoczone np. przygotowanie materiału, warunki fizyczne prowadzenia analiz. Z tego względu, pomimo, iż istnieje szereg metod służących do oceny właściwości antyoksydacyjnych nie ma standaryzacji uzyskanych wyników, a więc trudno je porównywać [Cybul, Nowak 2008].

Podsumowując, opracowano wydajną metodę mikrorozmnażania trzech krajowych gatunków *Eryngium*, co może być wykorzystane do mnożenia wartościowych odmian i genotypów mikołajków. Wykazano, że zastosowanie metod biotechnologicznych pozwala na uzyskanie bardziej wartościowych surowców, charakteryzujących się wyższą zawartością związków czynnych, niż rośliny gruntowe. Wybrane kultury *in vitro* badanych gatunków z rodzaju *Eryngium* mogą być rozpatrywane, jako alternatywne źródła substancji o znaczeniu farmaceutycznym. Ponadto stwierdzone w pracy działanie proapoptotyczne na ludzkie komórki raka jajnika, działanie przeciwdrobnoustrojowe, szczególnie przeciw dermatofitom oraz aktywność antyoksydacyjna wybranych surowców wskazują, że krajowe, mało znane gatunki z rodzaju *Eryngium* są cennymi taksonami o znaczeniu leczniczym, które powinny znaleźć szersze zastosowanie w nowoczesnej fitoterapii.

WNIOSKI

W wyniku zastosowania wybranych technik biotechnologicznych otrzymano różnego typu kultury *in vitro* trzech krajowych gatunków *Eryngium*: *E. planum*, *E. maritimum* i *E. campestre*. Były to zregenerowane rośliny, kultury pędów, kultury korzeni oraz kultury kalusa i zawieszinowe. Otrzymany materiał poddano ocenie fitochemicznej pod kątem obecności saponin triterpenowych i kwasów fenolowych oraz wybranym badaniom biologicznym. Materiał kontrolny stanowiły surowce z roślin gruntowych.

Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

1. Ze względu na specyficzną budowę owoców i zjawisko głębokiego spoczynku nasion *Eryngium*, wprowadzenie krajowych gatunków *Eryngium* do kultur *in vitro*, wymagało opracowania metody sterylizacji, zastosowania zabiegów stratyfikacji i odpowiedniej suplementacji pożywki indukcyjnej.
2. Badane taksony różniły się odpowiedzią na warunki kultur *in vitro*. Dla wszystkich gatunków opracowano wydajne metody mikrorozmnazania. Najwyższe współczynniki mnożenia metodą rozwoju pąków bocznych ze szczytów pędów opracowano dla *E. planum*, nieco niższe dla *E. campestre* i najniższe dla *E. maritimum*. Wszystkie gatunki ukorzeniono *in vitro*, jednakże na innych typach pożywek ze względu na odmienne wymagania glebowe mikroorganizmów.
3. W wyniku mikrorozmnazania *E. planum*, *E. maritimum* i *E. campestre* otrzymano genetycznie jednorodne rośliny, zgodne ze wzorcem gatunkowym, zdolne do dalszego rozwoju w gruncie. Oznaczona dla tych taksonów zawartość DNA pozwoliła określić po raz pierwszy wielkość ich genomu.
4. Wszystkie opracowane metody kultur *in vitro* i utrzymywana kolekcja roślin *in vitro* stanowią formę ochrony *ex situ* dla rzadkich w Polsce gatunków *E. planum* i *E. campestre* oraz objętego ścisłą ochroną gatunkową *E. maritimum*.
5. Otrzymane w wyniku mikrorozmnazania rośliny, kultury organów *in vitro* oraz niezróżnicowane kultury komórkowe badanych gatunków *Eryngium* zachowały zdolność do biosyntezy głównych metabolitów wtórnych – saponin triterpenowych i kwasów fenolowych, charakterystycznych dla organów roślin z naturalnych stanowisk. Na podstawie analiz ilościowych wykazano, że

wybrane kultury *in vitro* zdolne są do produkcji analizowanych metabolitów wtórnych w ilości większej niż organy roślin gruntowych.

6. Zabiegi biotechnologiczne (elicytacja jasmonianem metylu, ekstraktem drożdżowym i podwyższonym stężeniem sacharozy w pożywce) zwiększały poziom akumulacji saponin triterpenowych i wybranych fenolokwasów, jak i ich sumy w badanych kulturach pędowych *E. planum* i *E. maritimum*.
7. Założono i opracowano warunki kultur korzeni normalnych. Pożywka MS, w przeciwieństwie do Gamborga B₅, suplementowana IAA lub IBA najlepiej wpływała na morfologię korzeni, przyrost biomasy i akumulację wybranych metabolitów wtórnych w biomasie korzeniowej.
8. Frakcje saponinowe z liści rozetkowych i korzeni roślin gruntowych *E. planum* posiadają silne działanie cytotoksyczne w stosunku do ludzkich komórek nowotworowych jajnika SKOV-3. Wykazano, że działanie cytotoksyczne zachodzi na drodze apoptozy.
9. Ekstrakty z organów roślin gruntowych i z kultur *in vitro* badanych gatunków *E. planum*, *E. maritimum* i *E. campestre* wykazują działanie przeciwdrobnoustrojowe, głównie na *Staphylococcus aureus* i przeciwgrzybicze przeciw dermatofitom *Trichophyton mentagrophytes* i *T. rubrum*.
10. Ekstrakty z organów roślin gruntowych i z kultur *in vitro*, badane powszechnymi testami, posiadają aktywność przeciwutleniającą. Silne właściwości zmiatania wolnych rodników wykazują surowce bogate w polifenoli, głównie kwas rozmarynowy i chlorogenowy.
11. Bioaktywne metabolity badanych mikołajków - saponiny triterpenowe i kwasy fenolowe, produkowane są w dużej ilości, głównie w korzeniach ze zregenerowanych w kulturach *in vitro* roślin, które mogłyby stanowić alternatywne źródło tych związków.
- 12. Krajowe gatunki *Eryngium* zawierają bioaktywne związki z grupy saponin triterpenowych i kwasów fenolowych, które w wybranych kulturach *in vitro* kumulują się w ilości większej niż w organach roślin gruntowych. Poziom tych związków w różnych kulturach może być zwiększany, co warunkować będzie ich aktywność biologiczną i potencjalne zastosowanie w fitoterapii.**

STRESZCZENIE

Obiekt badań biotechnologicznych, fitochemicznych i biologicznych stanowiły nieznanne szerzej krajowe gatunki z rodzaju *Eryngium*: *E. planum* L., *E. maritimum* L. i *E. campestre* L., których ziele i korzenie stosowane są w medycynie tradycyjnej jako surowce lecznicze, charakteryzujące się szerokim spektrum działania.

Dla wybranych trzech gatunków mikołajków przeprowadzono ocenę zdolności do akumulacji aktywnych biologicznie związków w materiale roślinnym otrzymanym w kulturze *in vitro*: organach zregenerowanych roślin, kulturach zróżnicowanych – korzeniowych i pędowych oraz kulturach niezróżnicowanych – kalusie i kulturze komórkowej. Kontrole obecności, a następnie zawartości związków czynnych w różnych typach kultur *in vitro* ograniczono do wybranych metabolitów wtórnych, uznawanych za główne substancje obecne w tych taksonach – saponin triterpenowych i fenolokwasów. Badania fitochemiczne prowadzono metodami chromatografii cienkowarstwowej TLC, chromatografii HPLC i UPLC MS/MS. Podjęcie w niniejszej rozprawie badań dotyczących krajowych gatunków z rodzaju *Eryngium* wynikało ze skąpych informacji w piśmiennictwie na temat zawartości metabolitów wtórnych w tych taksonach oraz ich aktywności biologicznej, a także braku doniesień o kulturach *in vitro* tych gatunków i możliwościach biotechnologicznej produkcji związków czynnych.

Po raz pierwszy opracowano wydajne systemy klonalnego rozmnażania dla trzech gatunków roślin leczniczych. Metodą tą można otrzymać dużą liczbę jednolitych morfologicznie i jednorodnych genetycznie sadzonek do wykorzystania w potencjalnych uprawach polowych. Ocena morfologiczna, cytogenetyczna, fitochemiczna, aktywności przeciwdrobnoustrojowej i przeciwutleniającej ekstraktów ze zregenerowanych roślin potwierdziły, że opracowane systemy propagacji *in vitro* umożliwiają otrzymanie bardziej wartościowych mikrosadzonek. Ponadto w kontrolowanych warunkach *in vitro* istnieje możliwość wyselekcjonowania chemotypu, charakteryzującego się wyższą zawartością pożądaných bioaktywnych związków. Uprawy plantacyjne mikołajków mogą stać się alternatywnym źródłem wartościowego surowca na potrzeby rynku farmaceutycznego. Dla trzech gatunków oznaczono wielkość genomu określając zawartość jądrowego DNA metodą cytometrii przepływową.

Wszystkie opracowane metody kultur tkankowych i utrzymywana kolekcja roślin *in vitro* stanowią czynną formę ochrony *ex situ* dla rzadkiego w Polsce gatunku *E. campestre* oraz objętego ścisłą ochroną gatunkową *E. maritimum*. Na przykładzie krajowych taksonów *Eryngium*, w pracy wykazano, że gatunki rzadkie i chronione, dzięki zastosowaniu metod biotechnologicznych, mogą być źródłem surowców do badań fitochemicznych, biotechnologicznych i biologicznych bez naruszania ich zagrożonych naturalnych populacji.

Wyniki prezentowanych badań biotechnologicznych z zakresu kultur *in vitro* krajowych gatunków mikołajków oraz ich ocena fitochemiczna wskazują, że otrzymane w wyniku mikrorozmnażania rośliny, kultury organów oraz kultury nieodróżnicowane produkują charakterystyczne dla roślin *in vivo* bioaktywne związki, często w ilości wyższej niż w roślinach gruntowych. Ich wysoka zawartość w kulturach *in vitro* może być dodatkowo zwiększana w wyselekcjonowanych systemach poprzez zastosowanie zabiegów biotechnologicznych. Wybrane kultury *in vitro* badanych gatunków z rodzaju *Eryngium* mogą być rozpatrywane jako alternatywne źródła substancji o znaczeniu farmaceutycznym.

Znany z piśmiennictwa skład chemiczny gatunków z rodzaju *Eryngium* oraz właściwości farmakologiczne, potwierdzonych w badanym materiale z kultur *in vitro* grup metabolitów wtórnych, skłoniły do podjęcia badań biologicznych surowców pochodzących z roślin gruntowych i otrzymanych metodami biotechnologicznymi. Wykazane działanie proapoptotyczne na ludzkie komórki nowotworowe jajnika, działanie przeciwdrobnoustrojowe, szczególnie przeciw dermatofitom oraz antyoksydacyjne wybranych surowców wskazują, że krajowe, mało znane gatunki z rodzaju *Eryngium* są cennymi taksonami o znaczeniu leczniczym, które powinny znaleźć szersze zastosowanie w nowoczesnej fitoterapii. Kultury *in vitro* tych rzadkich i chronionych taksonów mogą stać się metodą otrzymywania surowców bogatych w związki o aktywności biologicznej.

SUMMARY

The object of biotechnological, phytochemical and biological research were broader unknown, native to Poland *Eryngium* species: *E. planum* L., *E. maritimum* L. and *E. campestre* L. whose herbs and roots are used in traditional medicine as medicinal raw material characterized by wide spectrum of activities.

For selected three species of sea hollies, the accumulation of biologically active compounds was assessed in the plant material obtained from *in vitro* cultures: organs of regenerated plants, differentiated cultures (roots and shoots) and undifferentiated cultures (callus and cell suspension culture). The monitoring of presence and content of the active compounds in different types of *in vitro* cultures has been limited to selected secondary metabolites, which are considered to be the main substances present in these taxa - triterpene saponins and phenolic acids. Phytochemical studies were carried out using thin layer chromatography TLC and chromatography HPLC, UPLC MS / MS. Adoption of this studies on native species of the genus *Eryngium* resulted from the scanty information in the literature on the content of secondary metabolites in these taxa and their biological activity and the lack of reports of *in vitro* cultures of these species and the possibilities of biotechnological production of active compounds.

For the first time, the efficient systems for clonal propagation of three species of medicinal plants were developed. A large number of genetically and morphologically uniform plantlets to be used in potential field cultivation by this method can be obtained. Morphological and cytogenetic analysis, phytochemical, antimicrobial and antioxidant activity evaluation of extracts from regenerated plants confirmed that developed *in vitro* propagation systems allow to obtain valuable microplants. Furthermore, under *in vitro* controlled conditions, there is the possibility of selecting chemotype, characterized by the increased content of the desired bioactive compounds. The plantation may become an alternative source of valuable raw material for the needs of the pharmaceutical market. For the three species of *Eryngium* the genome size was determined by estimation of nuclear DNA content using flow cytometry method.

All developed tissue culture methods and collection of plants maintained *in vitro* are an active form of *ex situ* conservation of *E. campestre*, rare species in Poland and *E. maritimum* under strict species protection. The example of domestic *Eryngium* taxa showed that the rare and protected species through the use of biotechnological methods,

can be a source of raw material for phytochemical, biotechnology and biological studies without disturbing their threatened natural populations.

The presented results of biotechnology research in the field of *in vitro* cultures of native to Poland *Eryngium* species and their phytochemical evaluation indicate that the micropropagated plants, organ and undifferentiated cultures produce a characteristic for *in vivo* plants bioactive compounds, often in quantities higher than in intact plants.

Their high content in *in vitro* cultures can be further increased through the use of selected systems of biotechnological treatments. The selected *in vitro* cultures of studied *Eryngium* species can be considered as an alternative source of substances of pharmaceutical interest.

The chemical composition of species of the genus *Eryngium* described in literature and pharmacological properties of the groups of secondary metabolites confirmed in the material from *in vitro* cultures, prompted to undertake a study of biological material derived from intact plants and *in vitro* cultures.

The proapoptotic effect on human ovarian cancer cells, antimicrobial activity, especially against dermatophytes and antioxidant activity of selected raw materials indicate that domestic, little-known species of the genus *Eryngium* are valuable taxa of medicinal importance, which should be more widely used in modern phytotherapy.

In vitro cultures of these rare and protected taxa may become a method for obtaining the raw material rich in compounds with biological activity.

WYKAZ FOTOGRAFII, RYCIN I TABEL

FOTOGRAFIE

Fot. 1 Pokroje roślin z rodzaju <i>Eryngium</i> : A <i>E. planum</i> B <i>E. maritimum</i> C <i>E. campestre</i>	21
Fot. 2 Kwiatostany gatunków z rodzaju <i>Eryngium</i> : A <i>E. planum</i> B <i>E. maritimum</i> C <i>E. campestre</i>	22
Fot. 3 Owoce gatunków z rodzaju <i>Eryngium</i> : A <i>E. planum</i> B <i>E. maritimum</i> C <i>E. campestre</i>	22
Fot. 4 <i>E. planum</i> A pokrój rośliny B kwiatostan C liść łodygowy D liść odziomkowy	24
Fot. 5 <i>E. maritimum</i> A pokrój rośliny B kwiatostan C liście odziomkowe	26
Fot. 6 <i>E. campestre</i> A pokrój rośliny B kwiatostan C liść odziomkowy	29
Fot. 7 <i>E. planum</i> w kulturze <i>in vitro</i> A pędy namnożone na pożywce MS +1,0 mg l ⁻¹ BAP i 0,1 mg l ⁻¹ IAA B pojedynczy pęd przeznaczony do ukorzenia po 8 tygodniach kultury	128
Fot. 8 <i>E. maritimum</i> w kulturze <i>in vitro</i> A pędy namnożone na pożywce MS +1,0 mg l ⁻¹ BAP i 0,1 mg l ⁻¹ IAA B pojedynczy pęd przeznaczony do ukorzenia	130
Fot. 9 <i>E. campestre</i> w kulturze <i>in vitro</i> A pędy namnożone na pożywce MS +1,0 mg l ⁻¹ BAP i 0,1 mg l ⁻¹ IAA B pojedynczy pęd przygotowany do ukorzenia po 8 tygodniach kultury	132
Fot. 10 Wpływ wariantu pożywki i auksyn (w stężeniu 0,1 mg l ⁻¹) na ukorzenie pędów <i>E. planum</i> po 6 tygodniach kultury	136
Fot. 11 Pędy <i>E. maritimum</i> ukorzone na podłożach A ½ MS z 15 g l ⁻¹ S B ½ MS z 15 g l ⁻¹ S + 0,1 mg l ⁻¹ IAA C ½ MS z 15 g l ⁻¹ S + 0,1 mg l ⁻¹ IBA D ½ MS z 15 g l ⁻¹ S + 0,1 mg l ⁻¹ NAA	137
Fot. 12 Pędy <i>E. campestre</i> ukorzone na podłożach A MS z 50 g l ⁻¹ B MS z 50 g l ⁻¹ + 1,0 g l ⁻¹ IBA C MS z 50 g l ⁻¹ + 1,0 g l ⁻¹ NAA	139
Fot. 13 Rośliny otrzymane w wyniku mikrorozmnażania przed przesadzeniem na poletko doświadczalne A <i>E. planum</i> B <i>E. campestre</i>	139
Fot. 14 <i>E. maritimum</i> – rośliny otrzymane w wyniku mikrorozmnażania, hartowane przed przesadzeniem na poletko doświadczalne	140
Fot. 15 <i>E. planum</i> – rozmnożone w kulturach <i>in vitro</i> rośliny na poletku doświadczalnym A pierwszy i B drugi rok wegetacji	140
Fot. 16 <i>E. maritimum</i> – rozmnożone w kulturach <i>in vitro</i> rośliny na poletku doświadczalnym A pierwszy i B drugi rok wegetacji	141

Fot. 17 <i>E. campestre</i> – rozmnożone w kulturach <i>in vitro</i> rośliny na poletku doświadczalnym A pierwszy i B drugi rok wegetacji	141
Fot. 18 Kultury korzeniowe <i>E. planum</i> (KPs) w płynnych pożywkach B ₅ po 18 tygodniach hodowli A B ₅ B B ₅ + 1,0 mg l ⁻¹ IAA C B ₅ + 1,0 mg l ⁻¹ IBA D B ₅ + 1,0 mg l ⁻¹ NAA	146
Fot. 19 Kultury korzeniowe <i>E. planum</i> (KPs) w płynnych pożywkach MS po 18 tygodniach hodowli A MS B MS + 1,0 mg l ⁻¹ IAA C MS + 1,0 mg l ⁻¹ IBA D MS + 1,0 mg l ⁻¹ NAA	146
Fot. 20 Kultury korzeniowe <i>E. planum</i> (KPr) w płynnej pożywce MS po 24 tygodniach hodowli A MS z 60 g l ⁻¹ S B MS z 60 mg l ⁻¹ S + 2,0 mg l ⁻¹ IAA C MS z 60 g l ⁻¹ S + 2,0 mg l ⁻¹ IBA D MS z 60 g l ⁻¹ S + 2,0 mg l ⁻¹ NAA	151
Fot. 21 Korzenie z kultury <i>E. planum</i> (KPr) w płynnej pożywce MS po 24 tygodniach hodowli A MS B MS + 1,0 mg l ⁻¹ IAA C MS + 1,0 mg l ⁻¹ IBA D MS + 1,0 mg l ⁻¹ NAA	152
Fot. 22 <i>E. planum</i> - namnożona biomasa korzeniowa (linia KPs15) w pożywce MS + 1,0 mg l ⁻¹ IAA	153
Fot. 23 <i>E. maritimum</i> A korzenie (linia KMr 97M) namnożone w pożywce MS + 2,0 mg l ⁻¹ IAA B biomasa przeznaczona do analiz fitochemicznych	158
Fot. 24 Kultury korzeniowe <i>E. campestre</i> (KCr) w płynnej pożywce MS po 24 tygodniach hodowli A MS B MS z 60 g l ⁻¹ S + 2,0 mg l ⁻¹ IAA C MS z 60 g l ⁻¹ S + 2,0 mg l ⁻¹ IBA D MS z 60 g l ⁻¹ S + 2,0 mg l ⁻¹ NAA	163
Fot. 25 <i>E. campestre</i> A korzenie (linia KCr 61M) namnożone w pożywce MS + 2,0 mg l ⁻¹ IBA B biomasa przeznaczona do analiz fitochemicznych	163
Fot. 26 Korzenie <i>E. planum</i> wyrastające z miejsc infekcji ogonków liściowych szczepem A4 <i>A. rhizogenes</i>	164
Fot. 27 <i>E. planum</i> w kulturze <i>in vitro</i> A kultury pędowe na wyrząsarce rotacyjnej B kultura pędowa w 30 dniu hodowli	167
Fot. 28 <i>E. planum</i> A pojedynczy pęd po 30 dniach hodowli B biomasa z kultur pędowych przeznaczona do oceny fitochemicznej	168
Fot. 29 <i>E. maritimum</i> A kultura pędowa w 30 dniu hodowli	170

B biomasa z kultur pędowych	
Fot. 30 <i>E. campestre</i> A kultura pędowa w 30 dniu hodowli B biomasa z kultur pędowych	171
Fot. 31 Kalus <i>E. planum</i> namnożony na pożywce MS z 1,0 mg l ⁻¹ 2,4-D i 1,0 mg l ⁻¹ BAP	174
Fot. 32 Zawiesina komórkowa <i>E. planum</i> w pożywce MS z 1,0 mg l ⁻¹ 2,4-D	174
Fot. 33 Chromatogramy TLC ekstraktów etanolowych z organów roślin gruntowych i z kultur <i>in vitro</i> <i>E. planum</i> - analiza obecności A saponin triterpenowych i B fenolokwasów	177
Fot. 34 Chromatogramy TLC ekstraktów etanolowych z pędów roślin gruntowych <i>E. planum</i> - analiza obecności fenolokwasów i flawonoidów	178
Fot. 35 Chromatogramy TLC ekstraktów etanolowych z pędów roślin <i>E. planum</i> z kultur <i>in vitro</i> - analiza obecności fenolokwasów i flawonoidów	178
Fot. 36 Chromatogram TLC ekstraktów etanolowych z organów roślin gruntowych i z kultur <i>in vitro</i> <i>E. maritimum</i> - analiza obecności saponin	179
Fot. 37 Chromatogram TLC ekstraktów etanolowych z organów roślin gruntowych i z kultur <i>in vitro</i> <i>E. maritimum</i> - analiza obecności fenolokwasów	180
Fot. 38 Chromatogramy TLC ekstraktów etanolowych z pędów roślin gruntowych <i>E. maritimum</i> - analiza obecności fenolokwasów i flawonoidów	180
Fot. 39 Chromatogramy TLC ekstraktów etanolowych z pędów roślin <i>E. maritimum</i> z kultur <i>in vitro</i> - analiza obecności fenolokwasów i flawonoidów	180
Fot. 40 Chromatogramy TLC ekstraktów etanolowych z organów roślin gruntowych i z kultur <i>in vitro</i> <i>E. campestre</i> - analiza obecności A saponin triterpenowych i B fenolokwasów	181
Fot. 41 Chromatogramy TLC ekstraktów etanolowych z pędów roślin gruntowych <i>E. campestre</i> - analiza obecności fenolokwasów i flawonoidów	182
Fot. 42 Chromatogram TLC ekstraktów etanolowych z kultur korzeniowych <i>E. planum</i> - analiza saponin	182
Fot. 43 Chromatogram TLC ekstraktów etanolowych z kultur korzeniowych <i>E. planum</i> - analiza fenolokwasów	183
Fot. 44 Chromatogramy TLC ekstraktów etanolowych z kultur korzeniowych <i>E. maritimum</i> - A analiza saponin triterpenowych i B fenolokwasów	184
Fot. 45 Chromatogram TLC ekstraktów etanolowych z kultur korzeniowych <i>E. campestre</i> - analiza saponin	184
Fot. 46 Chromatogram TLC ekstraktów etanolowych z kultur korzeniowych <i>E. campestre</i> - analiza fenolokwasów	186
Fot. 47 Chromatogramy TLC ekstraktów etanolowych z pędów roślin <i>E. campestre</i> z kultur - analiza obecności fenolokwasów i flawonoidów	186
Fot. 48 Chromatogram TLC ekstraktów etanolowych z elicytowanych kultur pędowych <i>E. planum</i> - analiza saponin	187
Fot. 49 Chromatogram TLC ekstraktów etanolowych z elicytowanych kultur pędowych <i>E. planum</i>	188

- analiza fenolokwasów	
Fot. 50 Chromatogram TLC ekstraktów etanolowych z elicytowanych kultur pędowych <i>E. maritimum</i> - analiza fenolokwasów	189
Fot. 51 Chromatogram TLC ekstraktów etanolowych z elicytowanych kultur zawiesinowych <i>E. planum</i> - analiza A saponin triterpenowych i B fenolokwasów	190
Fot. 52 Chromatogram TLC ekstraktów metanolowych z kultur komórkowych (kalus i zawiesina) <i>E. planum</i> – analiza obecności saponin	191
Fot. 53 Chromatogram TLC ekstraktów metanolowych z kultur <i>in vitro</i> <i>E. planum</i> - analiza obecności polifenoli	191

RYCINY

Ryc. 1 Występowanie <i>E. planum</i> na terenie Polski	25
Ryc. 2 Występowanie <i>E. maritimum</i> na terenie Polski	28
Ryc. 3 Występowanie <i>E. campestre</i> na terenie Polski	31
Ryc. 4 Struktury chemiczne saponin z korzeni <i>E. planum</i> i <i>E. maritimum</i>	34
Ryc. 5 Struktury chemiczne saponin triterpenowych <i>E. campestre</i>	35
Ryc. 6 Chromatogramy LC-MS metanolowych frakcji z korzeni A <i>E. campestre</i> B <i>E. maritimum</i> C <i>E. planum</i>	36
Ryc. 7 Struktura chemiczna kwasu rozmarynowego	43
Ryc. 8 Struktura chemiczna kwasu chlorogenowego	46
Ryc. 9 Struktura chemiczna kwasu kawowego	48
Ryc. 10 Struktury chemiczne flawonoli - kemferolu i kwercetyny	50
Ryc. 11 Struktura chemiczna izoprenu	54
Ryc. 12 Struktura chemiczna skoparonu	57
Ryc. 13 Struktura chemiczna falkarinolu	60
Ryc. 14 Struktury chemiczne wybranych fitosteroli A stigmasterol B β -sitosterol	62
Ryc. 15 Struktury chemiczne wybranych ekdysteroidów A 20-hydroksyekdyson B polipodyna B	63
Ryc. 16 Struktura chemiczna N,N,N- trimetyloglicyny	64
Ryc. 17 Pozyskiwanie metabolitów wtórnych z roślinnych kultur <i>in vitro</i> jako alternatywy do zbioru surowców z upraw i naturalnych stanowisk	72
Ryc. 18 Histogramy obrazujące zawartość DNA jądrowego w analizie cytometrycznej liści - kontrola wewnętrzna – <i>Petunia hybrida</i> i badany gatunek <i>Eryngium planum</i> L. A liście siewki B zregenerowane w kulturach <i>in vitro</i> pędy	133
Ryc. 19 Histogramy obrazujące zawartość DNA jądrowego w analizie cytometrycznej liści - kontrola wewnętrzna – <i>Solanum lycopersicum</i> i badany gatunek <i>Eryngium maritimum</i> L.	134

A liście młodej rośliny B zregenerowane w kulturach <i>in vitro</i> pędy	
Ryc. 20 Histogramy obrazujące zawartość DNA jądrowego w analizie cytometrycznej liści - kontrola wewnętrzna – <i>Petunia hybryda</i> i badany gatunek <i>Eryngium campestre</i> L. A liście siewki B zregenerowane w kulturach <i>in vitro</i> pędy	134
Ryc. 21 Przyrost biomasy w kulturze korzeniowej <i>E. planum</i> (KPs) w czterech wariantach pożywki B ₅ w czasie 18 tygodni (auksyny w stężeniu 1,0 mg l ⁻¹)	145
Ryc. 22 Przyrost biomasy w kulturze korzeniowej <i>E. planum</i> (KPs) w czterech wariantach pożywki MS w czasie 18 tygodni (auksyny w stężeniu 1,0 mg l ⁻¹)	145
Ryc. 23 Przyrost biomasy z kultury korzeniowej <i>E. planum</i> (KPr) w czterech wariantach pożywki B ₅ w czasie 24 tygodni (auksyny w stężeniu 0,1 mg l ⁻¹)	149
Ryc. 24 Przyrost biomasy z kultury korzeniowej <i>E. planum</i> (KPr) w czterech wariantach pożywki MS w czasie 24 tygodni (auksyny w stężeniu 0,1 mg l ⁻¹)	149
Ryc. 25 Przyrost biomasy z kultury korzeniowej <i>E. planum</i> (KPr) w czterech wariantach pożywki MS w czasie 24 tygodni (auksyny w stężeniu 1,0 mg l ⁻¹)	150
Ryc. 26 Przyrost biomasy z kultury korzeniowej <i>E. planum</i> (KPr) w czterech wariantach pożywki MS w czasie 24 tygodni (auksyny w stężeniu 2,0 mg l ⁻¹)	150
Ryc. 27 Przyrost biomasy z kultury korzeniowej <i>E. planum</i> (KPr) w czterech wariantach pożywki MS w czasie 24 tygodni (sacharoza w stężeniu 60 g l ⁻¹ ; auksyny w stężeniu 2,0 mg l ⁻¹)	151
Ryc. 28 Przyrost biomasy w kulturze korzeniowej <i>E. maritimum</i> (KMr) w czterech wariantach pożywki MS w czasie 24 tygodni (auksyny w stężeniu 0,1 mg l ⁻¹)	156
Ryc. 29 Przyrost biomasy w kulturze korzeniowej <i>E. maritimum</i> (KMr) w czterech wariantach pożywki MS w czasie 24 tygodni (auksyny w stężeniu 1,0 mg l ⁻¹)	156
Ryc. 30 Przyrost biomasy w kulturze korzeniowej <i>E. maritimum</i> (KMr) w czterech wariantach pożywki MS w czasie 24 tygodni (auksyny w stężeniu 2,0 mg l ⁻¹)	157
Ryc. 31 Przyrost biomasy w kulturze korzeniowej <i>E. maritimum</i> (KMr) w czterech wariantach pożywki ½ MS w czasie 24 tygodni (sacharoza w stężeniu 60 g l ⁻¹ , auksyny w stężeniu 0,1 mg l ⁻¹)	157
Ryc. 32 Przyrost biomasy w kulturze korzeniowej <i>E. maritimum</i> (KMr) w czterech wariantach pożywki MS w czasie 24 tygodni (sacharoza w stężeniu 60 g l ⁻¹ , auksyny w stężeniu 0,1 mg l ⁻¹)	158
Ryc. 33 Przyrost biomasy w kulturze korzeniowej <i>E. campestre</i> (KCr) w czterech wariantach pożywki MS w czasie 24 tygodni (auksyny w stężeniu 1,0 mg l ⁻¹)	161
Ryc. 34 Przyrost biomasy w kulturze korzeniowej <i>E. campestre</i> (KCr) w czterech wariantach pożywki MS w czasie 24 tygodni (auksyny w stężeniu 2,0 mg l ⁻¹)	161
Ryc. 35 Przyrost biomasy w kulturze korzeniowej <i>E. campestre</i> (KCr) w czterech wariantach pożywki MS w czasie 24 tygodni (sacharoza w stężeniu 60 g l ⁻¹ , auksyny w stężeniu 2,0 mg l ⁻¹)	162
Ryc. 36 Przyrost biomasy w kulturze korzeniowej <i>E. campestre</i> (KCr) w czterech wariantach pożywki ½ MS w czasie 24 tygodni (sacharoza w stężeniu 60 g l ⁻¹ , auksyny w stężeniu 2,0 mg l ⁻¹)	162
Ryc. 37 Krzywa przyrostu biomasy z kultury pędowej <i>E. planum</i> w czasie trwania 30 dniowej kultury	169
Ryc. 38 Krzywa przyrostu biomasy z kultury pędowej <i>E. maritimum</i> w czasie trwania 30 dniowej kultury	170
Ryc. 39 Krzywa przyrostu biomasy z kultury pędowej <i>E. campestre</i> w czasie trwania 30 dniowej kultury	171
Ryc. 40 Densytogram – chromatogram Video Scan TLC ekstraktów z kultur korzeniowych <i>E. maritimum</i> rosnących w pożywkach suplementowanych różnymi auksynami. Porównanie profili kwasów fenolowych ekstraktów z pikami wzorców	185

kwasu rozmarynowego (RA), chlorogenowego (CGA) i kawowego (CA)	
Ryc. 41 Densytoprogram – chromatogram Video Scan TLC ekstraktów z elicytowanych kultur pędowych <i>E. planum</i> . Porównanie profili kwasów fenolowych ekstraktów z pikami wzorców kwasu rozmarynowego (RA), chlorogenowego (CGA) i kawowego (CA)	189
Ryc. 42 Chromatogram HPLC frakcji fenolokwasowej z liści rozetkowych roślin gruntowych <i>E. planum</i>	192
Ryc. 43 Chromatogram HPLC frakcji fenolokwasowej z korzeni z roślin gruntowych <i>E. planum</i>	193
Ryc. 44 Chromatogramy LC-MS metanolowych ekstraktów z liści rozetkowych pochodzących z roślin gruntowych trzech gatunków <i>Eryngium</i> oraz z kultur <i>in vitro</i> <i>E. planum</i>	194
Ryc. 45 Chromatogramy LC-MS metanolowych ekstraktów z korzeni pochodzących z roślin gruntowych trzech gatunków <i>Eryngium</i> oraz z kultur <i>in vitro</i> <i>E. planum</i>	194
Ryc. 46 Chromatogramy LC-MS metanolowych ekstraktów z A liści rozetkowych i B korzeni z roślin gruntowych	196
Ryc. 47 Chromatogramy LC-MS metanolowych ekstraktów z A liści rozetkowych i B korzeni z roślin gruntowych <i>E. maritimum</i>	196
Ryc. 48 Chromatogramy LC-MS metanolowych ekstraktów z A liści rozetkowych i B korzeni z roślin gruntowych <i>E. campestre</i>	196
Ryc. 49 Chromatogram HPLC frakcji fenolokwasowej z kalusa <i>E. planum</i>	205
Ryc. 50 Chromatogram HPLC frakcji fenolokwasowej z zawiesiny komórkowej <i>E. planum</i>	205
Ryc. 51 Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu galusowego	206
Ryc. 52 Przeżywalność komórek raka jajnika SKOV-3 traktowanych frakcjami saponinowymi z liści rozetkowych i korzeni <i>E. planum</i>	209
Ryc. 53 Indukcja apoptozy i nekrozy w komórkach nowotworowych SKOV-3 poddanych działaniu frakcji saponinowych z korzeni <i>E. planum</i>	211
Ryc. 54 Analizy cytometryczne komórek nowotworowych SKOV-3 poddanych działaniu frakcji saponinowych z korzeni <i>E. planum</i>	211
Ryc. 55 Indukcja apoptozy i nekrozy w komórkach nowotworowych SKOV-3 poddanych działaniu frakcji saponinowych z liści rozetkowych <i>E. planum</i>	212
Ryc. 56 Analizy cytometryczne komórek nowotworowych SKOV-3 poddanych działaniu frakcji saponinowych z korzeni <i>E. planum</i>	212
Ryc. 57 Wpływ frakcji saponinowych z liści rozetkowych i korzeni <i>E. planum</i> na aktywność kaspazy 3 w komórkach SKOV-3	213
Ryc. 58 Wpływ frakcji saponinowej z korzenia <i>E. planum</i> w stężeniu 50 µg ml ⁻¹ na ekspresję genów proapoptotycznych	214
Ryc. 59 Wpływ frakcji saponinowej z korzenia <i>E. planum</i> w stężeniu 50 µg ml ⁻¹ na ekspresję genów antyapoptotycznych	214
Ryc. 60 Wpływ frakcji saponinowej z korzenia <i>E. planum</i> w stężeniu 50 µg ml ⁻¹ na ekspresję genów proapoptotycznych	215
Ryc. 61 Wpływ frakcji saponinowej z korzenia <i>E. planum</i> w stężeniu 50 µg ml ⁻¹ na ekspresję genów antyapoptotycznych	216
Ryc. 62 Krzywa zdolności zmiatania rodnika DPPH przez ekstrakty (rozcieńczenie 1:6) z organów roślin gruntowych i kultur <i>in vitro</i> <i>Eryngium</i> L	222

Ryc. 63 Wyniki badań zdolności zmiatania rodnika DPPH przez analizowane ekstrakty organów <i>Eryngium</i> L. w 5 minucie	222
Ryc. 64 Wyniki badań zdolności zmiatania rodnika DPPH przez analizowane ekstrakty organów <i>Eryngium</i> L. w 29 minucie	223
Ryc. 65 Krzywa zdolności zmiatania rodnika DPPH przez ekstrakty z liści rozetkowych roślin gruntowych (rozcieńczenie 1:2)	223
Ryc. 66 Krzywa zdolności zmiatania rodnika DPPH przez ekstrakty z korzeni roślin gruntowych (rozcieńczenie 1:2)	224
Ryc. 67 Krzywa zdolności zmiatania rodnika DPPH przez ekstrakty z korzeni roślin zregenerowanych w kulturach <i>in vitro</i> (rozcieńczenie 1:20)	224
Ryc. 68 Krzywa zdolności zmiatania rodnika DPPH przez ekstrakty z liści rozetkowych roślin zregenerowanych w kulturach <i>in vitro</i> (rozcieńczenie 1:6)	225
Ryc. 69 Wyniki redukcji jonów Mo w teście fosfomolibdenowym wyrażone jako ekwiwalenty kwasu askorbinowego (AAE) dla ekstraktów metanolowych	226
Ryc. 70 Wyniki zahamowania oksydacyjnej degradacji 2-deoksyrybozy wywołanej rodnikiem hydroksylowym przez analizowane metanolowe ekstrakty	228

TABELLE

Tab. 1 Zawartość kwasu R-(+)-rozmarynowego oraz R-(+)-3'-O-β-D-glukopiranozydu kwasu rozmarynowego w gatunkach z rodzaju <i>Eryngium</i> L.	43
Tab. 2 Przykłady wysokoproduktywnych korzeniowych kultur <i>in vitro</i>	78
Tab. 3 Przykłady produkcji metabolitów wtórnych w kulturach pędów <i>in vitro</i>	80
Tab. 4 Podstawowy skład pożywki Murashige-Skooga [1962]	90
Tab. 5 Podstawowy skład pożywki Gamborga [1968]	90
Tab. 6 Wariant pożywki stosowanej do indukcji sterylnych siewek	91
Tab. 7 Warianty pożywek stosowanych do namnażania pędów	92
Tab. 8 Warianty pożywek stosowanych do ukorzenia pędów	92
Tab. 9 Warianty pożywek stosowanych do indukcji ryzogenezy pośredniej z ogonków liściowych	93
Tab. 10 Warianty pożywek stosowanych do pobudzenia wzrostu i rozwoju korzeni w kulturze <i>in vitro</i>	94
Tab. 11 Wariant pożywki stosowanej dla kultur pędowych	94
Tab. 12 Wariant pożywki stosowanej do indukcji i proliferacji kalusa z eksplantatów siewek	94
Tab. 13 Wariant pożywki stosowany dla kultury komórkowej	94
Tab. 14 Zabiegi biotechnologiczne stosowane w kulturach <i>in vitro</i> badanych gatunków <i>Eryngium</i>	95
Tab. 15 Warunki wstępnej analizy TLC badanych ekstraktów i frakcji z roślin gruntowych i kultur <i>in vitro</i> <i>Eryngium</i> L.	105
Tab. 16 Masy poszczególnych organów <i>Eryngium</i> wykorzystane do analiz sumy polifenoli	111
Tab. 17 Ilość surowca w próbie i mieszaninie reakcyjnej dla testu DPPH w zależności od zastosowanego rozcieńczenia ekstraktów	120
Tab. 18 Wpływ stratyfikacji i wyjalawiania owoców/nasion na wydajność kiełkowania nasion <i>Eryngium</i> L. w warunkach <i>in vitro</i>	126
Tab. 19 Wpływ regulatorów wzrostu i rozwoju roślin [RWRR] na namnażanie pędów <i>E. planum</i> na pożywce MS po 6 tygodniach kultury	128
Tab. 20 Wpływ wariantu pożywki i regulatorów wzrostu i rozwoju roślin [RWRR] na namnażanie	130

pędów <i>E. maritimum</i> na pożywce MS po 6 tygodniach kultury	
Tab. 21 Wpływ wariantu pożywki i regulatorów wzrostu i rozwoju roślin [RWRR] na namnażanie pędów na pożywce MS <i>E. campestre</i> po 6 tygodniach kultury	132
Tab. 22 Zawartość 2C DNA w liściach <i>Eryngium</i> L. – pobranych z siewek/ roślin gruntowych i pędów z kultur <i>in vitro</i>	133
Tab. 23 Wpływ wariantu pożywki i auksyn na ukorzenianie pędów <i>E. planum</i> po 6 tygodniach kultury	135
Tab. 24 Wpływ wariantu pożywek, auksyn i sacharozy na ukorzenianie pędów <i>E. maritimum</i> po 6 tygodniach kultury	137
Tab. 25 Wpływ auksyn i sacharozy na ukorzenianie pędów <i>E. campestre</i> po 6 tygodniach kultury	138
Tab. 26 Wpływ składu mineralnego pożywek i typu auksyny na przyrost biomasy korzeni <i>E. planum</i> indukowanych z wierzchołków korzeni siewek w czasie trwania 18 tygodniowej kultury	144
Tab. 27 Wpływ składu mineralnego pożywek i typu auksyny na przyrost biomasy korzeni <i>E. planum</i> indukowanych z wierzchołków korzeni pędów w czasie 24 tygodni kultury	148
Tab. 28 Wpływ składu mineralnego pożywek i typu auksyny na przyrost biomasy korzeni <i>E. maritimum</i> indukowanych z wierzchołków korzeni pędów w czasie 18 tygodni kultury	155
Tab. 29 Wpływ składu mineralnego pożywek i typu auksyny na przyrost biomasy korzeni <i>E. campestre</i> indukowanych z wierzchołków korzeni pędów w czasie 18 tygodni kultury	160
Tab. 30 Zawartość (mg g ⁻¹ s.m.) wybranych saponin triterpenowych (M1,M2A,M2B,M3,M4,M5) oraz ich sumy (M1-M5) w organach z roślin gruntowych i namnożonych w kulturach <i>in vitro</i> oraz kulturach niezróżnicowanych <i>E. planum</i> . oznaczona metodą UPLC	199
Tab. 31 Zawartość (mg g ⁻¹ s.m.) wybranych saponin triterpenowych (M1,M2A,M2B,M3,M4,M5) oraz ich sumy (M1-M5) w organach z roślin gruntowych i namnożonych w kulturach <i>in vitro</i> <i>E. maritimum</i> oznaczona metodą UPLC	199
Tab. 32 Zawartość (mg g ⁻¹ s.m.) wybranych saponin triterpenowych (M1,M2A,M2B,M3,M4,M5) oraz ich sumy (M1-M5) w organach z roślin gruntowych i namnożonych w kulturach <i>in vitro</i> <i>E. campestre</i> oznaczona metodą UPLC	200
Tab. 33 Zawartość (mg g ⁻¹ s.m.) wybranych fenolokwasów: kw. rozmarynowego (RA) i chlorogenowego (CGA) oraz ich sumy (RA+CGA) w organach z roślin gruntowych i namnożonych w kulturach <i>in vitro</i> <i>Eryngium</i> oznaczona metodą UPLC	200
Tab. 34 Zawartość (mg g ⁻¹ s.m.) fenolokwasów: kw. rozmarynowego (RA), kw. chlorogenowego (CGA) i saponin (M1,M2A, M2B) w korzeniach <i>E. maritimum</i> rosnących w płynnych pożywkach MS wzbogaconych w auksyny mierzona metodą UPLC	202
Tab. 35 Zawartość (mg g ⁻¹ s.m.) fenolokwasów: kw. rozmarynowego (RA), kw. chlorogenowego (CGA) i kawowego (CA) w pędach <i>E. planum</i> rosnących w płynnych pożywkach MS po elicytacji jasmonianem metylu (MeJa), ekstraktem drożdżowym (YE) oraz sacharozą (S) o podwyższonym stężeniu mierzona metodą HPLC	203
Tab. 36 Zawartość (mg g ⁻¹ s.m.) fenolokwasów: kw. rozmarynowego (RA) i kw. chlorogenowego (CGA) w metanolowych ekstraktach z kalusa i zawiesiny komórkowej <i>E. planum</i> mierzona metodą HPLC	204
Tab. 37 Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwasu galusowego	206
Tab. 38 Zawartość sumy polifenoli w ekstraktach metanolowo-wodnych	207
Tab. 39 Wartości MIC dla metanolowych ekstraktów, wodno-metanolowych frakcji i frakcji saponinowej roślin gruntowych i kultur <i>in vitro</i> <i>Eryngium</i> L. przeciw wybranym mikroorganizmom	219
Tab. 40 Wartość MBC/MFC dla metanolowych ekstraktów, wodno-metanolowych frakcji i frakcji	220

saponinowe roślin gruntowych i kultur <i>in vitro</i> <i>Eryngium</i> L. przeciw wybranym mikroorganizmom	
Tab. 41 Wyniki średnich wartości absorbancji i redukcji Mo w teście fosfomolibdenowym wyrażone jako ekwiwalenty kwasu askorbinowego (AAE) dla ekstraktów metanolowych	216
Tab. 42 Badania z zakresu kultur <i>in vitro</i> , ocena fitochemiczna i badania biologiczne krajowych gatunków z rodzaju <i>Eryngium</i>	231

- Abou-Jawdah Y, Sobh H, Salameh A** (2002) Antimycotic activities of selected plant flora, growing wild in Lebanon, against phytopathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(11):3208-3213
- Adrian-Romero M, Wilson SJ, Blunden G, Yang M-H, Carabot-Cuervo A, Bashir AK** (1998) Betaines in coastal plants. *Biochemical Systematics and Ecology* 26:535-543
- AGP** (The Angiosperm Phylogeny Group) (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: AGPIII. *Botanical Journal of Linnnean Society* 161:105-121
- Ali MB, Yu KW, Hahn E-J, Peak K-Y** (2006) Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. *Plant Cell Reports* 25:613-620
- Alipour M, Khanmohammadi O** (2011) Antibacterial activity of plant extracts against oral and skin pathogens. *African Journal of Microbiology Research* 5(19):2909-2911
- Alkofahi A, Sallal AJ, Disi AM** (1997) Effect of *Eryngium creticum* on the haemolytic activities of snake and scorpion venoms. *Phytotherapy Research* 11(7):540-542
- Apers S, Varonikova S, Sindambiwe J-B, Witvrouw M, De Clercq E, Vanden Berghe D, Van Marck E, Vlietinck A, Pieters L** (2001) Antiviral, hemolytic and molluscicidal activities of triterpenoid saponins from *Maesa lanceolata*: establishment of structure – activity relationships. *Planta Medica* 67:528-532
- Arct J, Pytkowska K** (2008) Flavanoids as components of biologically active cosmeceuticals. *Clinics in Dermatology* 26(4):347-357
- Arockiasamy S, Ignacimuthu S** (1998) Plant regeneration from mature leaves and roots of *Eryngium foetidum* L., a food flavouring agent. *Current Science* 75:664-666
- Arockiasamy S, Prakash S, Ignacimuthu S** (2002) Direct organogenesis from mature leaf and petiole explants of *Eryngium foetidum* L. *Biologia Plantarum* 45:129-132
- Arroo RRRJ, Develi A, Meijers, H, Van de Westerlo, E, Kemp AK, Croes AF** (1995) Effect of exogenous auxin on root morphology and secondary metabolism in *Tagetes patula* hairy root cultures. *Physiologia Plantarum* 93:233-240
- Atwater BR** (1980) Germination, dormancy and morphology of the seeds of herbaceous ornamental plants. *Seed Science and Technology* 8:523-573
- Avato P, Bucci R, Tava A, Vitali C, Rosato A, Biały Z, Jurzysta M** (2006) Antimicrobial activity of saponins from *Medicago* sp.: structure-activity relationship *Phytotherapy Research* 20:454-457
- Ayoub N, Kubeczka KH** (2001) Composition of essential oils from *Eryngium amethystinum*, *E.alpinum* and *E.planum* (Apiaceae). 32nd International Symposium on Essential Oils September 9-12, Wrocław (ISEO) 2001; 95
- Bach A, Pawłowska B** (2009) Procesy rozwojowe w kulturze *in vitro* i typy kultury. W: Malepszy S (red.) *Biotechnologia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 21-40

- Bai X, Liang W, Cheng J, Ma L-G, Liu Y-B, Shi G-L, Wang Y-N, Gu J-Ch** (2012) Inhibitory effect and antifungal mechanism of umbelliferone on plant pathogenic fungi. *Information Technology and Agricultural Engineering. Advances in Intelligent and Soft Computing* Vol. 134, 2012, pp 693-702
- Baíza AM, Quiroz A, Ruíz JA, Maldonado-Mendoza I** (1998) Growth patterns and alkaloid accumulation in hairy root and untransformed root cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54(2):123-130
- Bajaj YPS, Furmanowa M, Olszowska O** (1988) Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. W: Bajaj YPS (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 4, Medicinal and Aromatic Plants I*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 60-103
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M** (2008) Biological effects of essential oils-a review. *Food Chemistry and Toxicology* 46(2):446-475
- Barański R** (2008) Genetic transformation of carrot (*Daucus carota*) and other Apiaceae species. *Transgenic Plant Journal* 2(1):18-38
- Bartnikowska E** (2012) Biological activities of phytosterols with particular attention to their effects on lipid metabolism. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 59(2):105-112
- Báthori M, Pongrácz Z** (2005) Phytoecdysteroids – from isolation to their effects on humans. *Current Medical Chemistry* 12(2):153-172
- Betsui F, Tanaka-Nishikawa N, Shimomura K** (2004) Anthocyanin production in adventitious root cultures of *Raphanus sativus* L. cv. Peking Koushin. *Plant Biotechnology* 21(5):387–391
- Bhojwani SS, Razdan MK** (1996) *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Elsevier Science BV
- Bialecka B, Kępczyński J** (1998) Rola kwasu jasionowego i jego estru metylowego we wzroście i rozwoju roślin. *Wiadomości Botaniczne* 42:61-78
- Bin H-Sh, Jeong J-H, Choi U-U** (2013) Chlorogenic acid promotes osteoblastogenesis in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Food Science and Biotechnology* 22(S):107-112
- Blunden G, Patel AV, Armstrong N, Adrian Romero M, Melendez P** (2005) Betaine distribution in Angiosperms. *Biochemical Systematics and Ecology* 33:904-920
- Bogucka-Kocka A, Smolarz HD, Kocki J** (2008a) Apoptotic activities of ethanol extracts from some *Apiaceae* on human leukaemia cell lines. *Fitoterapia* 79:487–497
- Bogucka-Kocka A, Janyszek M, Kocki J, Smolarz HD, Cioch M, Dmoszyńska A** (2008b) Ekspresja genu BAX w komórkach linii nowotworowych układu hematopoetycznego – stymulowanych ekstraktem etanolem z *Carex paniculata* L. *Acta Haematologica Polonica* 39(2):277-285
- Bołonkowska O, Pietrosiuk A, Sykłowska-Baranek K** (2011) Roślinne związki barwne, ich właściwości biologiczne oraz możliwości wytwarzania w kulturach *in vitro*. *Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego* 1:1-27 (<http://biuletynfarmacji.wum.edu.pl>)

- Bondet V, Brand-William W, Berset C** (1997) Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lwt-Food science and Technology* 30(6):609-615
- Borkowska B** (1995) Zmienność w kulturach *in vitro*. *Wiadomości Botaniczne* 39(3/4):53-57
- Borkowska B** (2001) Fizjologiczna ocena roślin z kultur *in vitro*. *Biotechnologia* 2(53):133-138
- Brophy JJ, Goldsack RJ, Copeland LM, Pala-Paul J** (2003) Essential oil of *Eryngium* L. species from New South Wales (Australia) *Journal of Essential Oil Research* 15:392-397
- Budryn G, Nebesny E** (2006) Fenolokwasy – ich właściwości, występowanie w surowcach roślinnych, wchłanianie i przemiany metaboliczne. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* 39(2):103-110
- Calderón-Montaño JM, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, López-Lázaro M** (2011) A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry* 11:298-344
- Calviño CI, Martínez SG, Downie SR** (2008) The evolutionary history of *Eryngium* (*Apiaceae*, *Saniculoideae*): Rapid radiations, long distance dispersals, and hybridizations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46:1129-1150
- Cadiz-Gurrea ML, Fernandez-Arroyo S, Joven J, Segura-Carretero A** (2013) Comprehensive characterization by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS from an *Eryngium bourgatii* extract and their antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Research International* 50:197-204
- Cavaleiro C, Gonçalves MJ, Serra D, Santoro G, Tomi F, Bighelli A, Salgueiro L, Casanova J** (2011) Composition of a volatile extract of *Eryngium duriaei* subsp. *juresianum* (M. Lainz) M. Lainz, signalled by the antifungal activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 54:619-622
- Celik A, Aydinlik N, Arslan I** (2011) Phytochemical constituents and inhibitory activity towards methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of *Eryngium species* (*Apiaceae*). *Chemistry & Biodiversity* 8(3):454-9
- Chan P-K** (2007) Acylation with diangeloyl groups AT C21-22 positions in triterpenoid saponins is essential for cytotoxicity towards tumor cells. *Biochemical Pharmacology* 73(3):341-350
- Chandra S, Chandra R** (2011) Engineering secondary metabolite production in hairy roots. *Phytochemistry Review* 10(3):371-395
- Chandrika R, Vyshali P, Saraswathi KJT, Kaliwal BB** (2011) Rapid multiplication of mature flowering plant of *Eryngium foetidum* L by *in vitro* technique. *IJBA* 3(4):114-117
- Chang X, Li W, Jia Z, Satou T, Fushiya S, Koike K** (2007) Biologically active triterpenoid saponins from *Ardisia japonica*. *Journal of Natural Products* 70(2):179-87
- Chen QC, Lee JP, Jin WY, Youn UJ, Kim HJ, Lee IS, Zhang XF, Song KS, Seong YH, Bae KH** (2007) Cytotoxic constituents from *Angelica sinensis* Radix. *Archives of Pharmaceutical Research* 30:565-569
- Chkhikvishvili ID, Kharebava GI** (2001) Chicoric and chlorogenic acids in plant species from Georgia. *Applied Biochemistry and Microbiology* 37(2):188-191

- Chmielewski M, Linke K, Zabel M** (2008) Metody wykrywania zjawiska apoptozy w komórkach wątrobowych *in situ*. *Nowiny Lekarskie* 77(3):223-226
- Chomczyński P, Sacchi N** (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156-159
- Chouksey BK, Srivastava SK** (2001) Antifungal agent from *Terminalia arjuna*. *Indian Journal of Chemistry* 40B:354-356
- Christensen L P** (2009) Bioactivity of polyacetylenes in food plants. W: Watson RR, Preedy VR (Eds.) *Bioactive Foods in Promoting Health*. Oxford Academic Press 285-306
- Christensen LP, Brandt K** (2006) Bioactive polyacetylenes in food plants of the *Apiaceae* family: occurrence, bioactivity and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41:683-693
- Cullen J, Alexander JCM, Brady A, Brickell CD, Green PS, Heywood VH, Jörgensen PM, Jury SL, Knees SG, leslie AC, Matthews VA, Robson NKB, Walters SM, Wijnands DO, Yeo PF** (1997) *The European Garden Flora*. Vol V Cambridge University Press, London 396-398
- Cybul M, Nowak R** (2008) Przegląd metod stosowanych w analizie właściwości antyoksydacyjnych wyciągów roślinnych. *Herba Polonica* 54(1):68-78
- Darriet F, Bendahou M, Desjobert J-M, Costa J, Muselli A** (2012) Bicyclo[4.4.0]decane oxygenated sesquiterpenes from *Eryngium maritimum* essential oil. *Planta Medica* 78:386-389
- Debergh PC, Maene LJ** (1981) A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae* (14):335-345
- Debez A, Ben Hamed K, Grignon C, Abdely C** (2004) Salinity effects on germination, growth, and seed production of the halophyte *Cakile maritime*. *Plant Soil* 262: 179-189
- Derda M, Thiem B, Budzianowski J, Hadaś E, Wojt WJ, Wojtkowiak-Giera A** (2013) The evaluation of the amebicidal activity of *Eryngium planum* extracts. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research* 70(6):1027-1034
- Detmar M, Dumas M, Bonte F, Meybeck A, Orfanos CE** (1994) Effects of ecdysterone on the differentiation of normal human keratinocytes *in vitro*. *European Journal of Dermatology* 4:558-569
- Diettrich B** (2003) Techniki *in vitro* z użyciem roślin leczniczych do produkcji metabolitów wtórnych. W: Kayser O, Müller RH (Ed.) *Biotechnologia farmaceutyczna*. Wydawnictwo lekarskie PZWL 164-175
- Dinan L, Savchenko T, Whiting P** (2001) On the distribution of phytoecdysteroids in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58(8):1121-1132
- Dinda B, Debnath S, Mohanta BC, Harigaya Y** (2010) Naturally occurring triterpenoid saponins. *Chemistry & Biodiversity* 7:2327-2346
- Dreger M, Krajewska-Patan A, Górska-Paukszta M, Pieszak M, Buchwald W** (2010) Production of secondary metabolites in *Salvia miltiorrhiza in vitro* cultures. *Herba Polonica* 56(4):78-90

- Duke JA, Boegenschütz-Godwin MJ, du Cellier J, Duke PA** (2002) Handbook of medicinal herbs. CRC Press, 2002; 277-278
- Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM** (2009) Antioxidant activity of leaves and inflorescence of *Eryngium caucasicum* Trautv at flowering stage. Pharmacognosy Research 1(6):435-439
- Ekiert H** (2009) Farmaceutyczne aspekty biotechnologii roślin. Część I. Wprowadzenie- metodyka i główne kierunki badawcze. Biotechnologia 65(1):69-77
- Ekiert H** (2000) Medicinal plant biotechnology: the *Apiaceae* family as the example of rapid development. Pharmazie 55(8):561-567
- El-Kassem LTA, Hawas UW, Awad H, Taie H** (2013) Flavonoids from the aerial parts of *Eryngium campestre* L. with antioxidant and anti-alzheimer activities. Planta Medica 79-PJ2 (Congress Abstract)
- Emam AM, Moussa AM, Faure R, Favel A, Delmas F, Elias R, Balansard G** (1996) Isolation and biological study of a triterpenoid saponin, mimengoside A, from the leaves of *Buddleja madagascariensis*. Planta Medica 62:92-93
- Epifano F, Molinaro G, Genovese S, Ngomba RT, Nicoletti F, Curini M** (2008) Neuroprotective effect of prenyloxycoumarins from edible vegetables. Neuroscience Letters 443:57-60
- Erdelmeier CAJ, Sticher O** (1985) Coumarrin derivatives from *Eryngium campestre*. Planta Medica 51:407-409
- Farhan H, Malli F, Rammal H, Hijazi A, Bassal A, Ajouz N, Badran B** (2012) Phytochemical screening and antioxidant activity of Lebanese *Eryngium creticum* L. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2(3):1217-1220
- Fecka I, Mazur A, Cisowski W** (2002) Kwas rozmarynowy, ważny składnik terapeutyczny niektórych surowców roślinnych. Postępy Fitoterapii 8(1-2):20-25
- Floryanowicz-Czekalska K, Podsędek A, Wysokińska H** (2006) Chlorogenic acid in *in vitro* culture of *Eleutherococcus senticosus*. Herba Polonica 52(1/2):67-74
- Fokialakis N, Kalpoutzakis E, Tekwani BL, Khan SI, Kobaisy M, Saltounis AL., Duke SO** (2007) Evaluation of the antimalarial and antileishmanial activity of plants from greek island of Crete. Journal of Natural Medicines 61:38-45
- Fu Ch-X, Xu Y-J, Zhao D-X, Ma FS** (2006) A comparison between hairy root cultures and wild plants of *Saussurea involucreata* in phenylpropanoids production. Plant Cell Reports 24(12):750-4
- Fulzele DP, Satdive RK, Pol BB** (2002) Untransformed root cultures of *Nathapodytes foetida* and production of camptothecin. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69:285-288
- Furmanowa M** (1992) Mikrorozmnażanie roślin leczniczych. Biotechnologia 4(19):15-19
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP and Firoozabady E** (1983) Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. Science 220:1049-1051
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K** (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research 50:151-158

- Gauthier Ch, Legault J, Girard-Lalancette K, Mshvildadze V, Pichette A** (2009) Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupine- and oleanane-type saponins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17:2002-2008
- Gayatri MC, Madhu M, Kavyashree R, Dhananjaya SP** (2006) A protocol for *in vitro* regeneration of *Eryngium foetidum* L. *Indian Journal of Biotechnology* 5:249-251
- Gawlik-Dziki U** (2004) Fenolokwasy jako bioaktywne składniki żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 4(41):S29-40
- George EF, Hall MA, De Klerk G-J** (2008) *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd Edition. Volume 1. The background. Springer
- Georgiev MI, Ilieva MP; Kuzeva SL, Pavlov AI, Kovacheva EG** (2007) Elicitation of rosmarinic acid by *Lavandula vera* MM cell suspension culture with abiotic elicitors. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(2):301-304
- Germoprez N, Maes L, van Puyvelde L, van Tri M, Tuan DA, De Kimpe N** (2005) *In vitro* and *in vivo* anti-leishmanial activity of triterpenoid saponins isolated from *Maesa balansae* and some chemical derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* 13; 48(1):32-37
- Giridhar P, Rajasekaran T, Ravishankar GA** (2005) Production of a root-specific flavour compound, 2-hydroxy-4-methoxy benzaldehyde by normal root cultures of *Decalepis hamiltonii* Wight and Arn (*Asclepiadaceae*). *Journal of the Science of Food Agriculture* 85:61-64
- Głowniak K, Madej A, Żak D** (2004) Chromatographic analysis of petroleum ether extract and methanol extract from fruits of *Eryngium campestre* L. 4th International Symposium on Chromatography of Natural Products 14-17.VI.2004 Lublin-Kazimierz Dolny (Poland) 106
- Goyal S, Lambert C, Cluzet S, Mérillon JM, Ramawat KG** (2012) Secondary Metabolites and Plant Defence. *Plant Defence: Biological Control - Progress in Biological Control* 12: 109-138
- Góra J, Lis A** (2005) Najcenniejsze olejki eteryczne. Wydawnictwo Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń
- Guillon S, Tremouillaux-Guiller J, PK Pati, Rideau M, Gantet P** (2006) Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. *Trends in Biotechnology* 24(9):403-409
- Gutteridge JM, Halliwell B** (1988) The deoxyribose assay: an assay both for 'free' hydroxyl radical and for site-specific hydroxyl radical production. *The Biochemical Journal* 253(3):932-933
- Hakkim L, Kalyani S, Essa M, Girja S, Song H** (2011) Production of rosmarinic in *Ocimum sanctum* cell cultures by the influence of sucrose, phenylalanine, yeast extract, and methyl. *International Journal of Biological & Medical Research* 2(4):1070-1074
- Han L-T, Fang Y, Li M-M, Yang H-B, Huang F** (2013) The antitumor effects of triterpenoid saponins from the *Anemone flaccida* and the underlying mechanism. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* ID 517931 <http://dx.doi.org/10.1155/2013/517931>
- Hanafy MS, Abou-Setta LM** (2007) Saponins production in shoot and callus cultures of *Gypsophila paniculata*. *Journal of Applied Sciences Research* 3(10):1045-1049

- Harborne JB, Baxter H** (1993) *Phytochemical Dictionary. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants.* Taylor & Francis Ltd
- Hassan R, Hussein F, Hawaraa M, Akram H, Ahmad K, Ahmad D, Bassam B** (2013) Antioxidant, cytotoxic properties and phytochemical screening of two Lebanese medicinal plants. *International Research Journal of Pharmacy* 4(5):132-136
- Hänsel R, Sticher O** (2010) *Pharmakognosie – Phytopharmazie.* Springer London Limited
- He Z, Qiao Ch, Han Q, Wang Y, Ye W, Xu H** (2005) New triterpenoid saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum*. *Tetrahedron* 61(8):2211-2215
- Hegnauer R** (1973) *Chemotaxonomie der Pflanzen. Band 6.* Birkhäuser Verlag Berlin 563-627
- Hegnauer R** (1990) *Chemotaxonomie der Pflanzen. Band 9.* Birkhäuser Verlag Berlin 678-679
- Hernández-Domínguez E, Campos-Tamayo F, Vázquez-Flota F** (2004) Vindoline synthesis in *in vitro* shoot cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnology Letters* 26(8):671-674
- Heywood VH** (1978) *Umbelliferae.* W: Heywood V.H. (red.) *Flowering plants of the world.* Oxford University Press, Oxford, London 219-221
- Hiller K, Friedrich E** (1974) Antimycotic effect of *Astrantia*-, *Eryngium*- and *Sanicula* saponins. *Pharmazie* 29(12):787-8
- Hiller K, Keipert M, Pfeifer S** (1969) New estersapogenins from *Eryngium planum* L. *Pharmazie* 24(2):119
- Hiller K, Keipert M, Pfeifer S** (1972) Isolierung von Estern des Barringtonenols C aus *Eryngium planum* L. *Pharmazie* 27(5):341-342
- Hiller K, Keipert M, Pfeifer S, Kraft R** (1974) Das Blattsapogeninspektrum in *Eryngium planum* L. *Pharmazie* 29(1): 54-57
- Hiller K, Otto A, Gruncemann E** (1980) Isolierung von Kampferol-3-O-(6-O-β-D-glucopyranosyl)-β-D-galaktopyranosid einem neuen Flavonolglykosid aus *Eryngium planum* L. *Pharmazie* 35(2):113-114
- Hiller K, Pohl B, Franke P** (1981) Flavonoid spectrum of *Eryngium maritimum* L. Part 35. Components of Saniculoide. *Pharmazie* 36(6):451-452
- Hiller K, von Mach B, Franke P** (1976) On the saponines of *Eryngium maritimum* L. Part 25. Toward information on components of some *Saniculoideae*. *Pharmazie* 31: 53
- Hiller K, Voight, G** (1977) New results in the research of triterpene saponins. *Pharmazie* 32:365-394
- Hohmann J, Páll Z, Günther G, Máthé I** (1997) Flavonolacyl glycosides of the aerial parts of *Eryngium campestre*. *Planta Medica* 63(1):96
- Holm PI, Ueland PM, Vollset SE, Midttun O, Blom HJ, Keijzer MB, den Heijer M** (2005) Betaine and folate status as cooperative determinants of plasma homocysteine in humans. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 379-85

- Holderna-Kedzia E, Kędzia B** (2010) Ocena aktywności antybiotycznej wyciągów roślinnych. *Postępy Fitoterapii* (2):59-70
- Hong MLK, Bhat A, Ping NS, Keng ChL** (2012) Detection of elicitation effect on *Hyoscyamus niger* L root cultures for the root growth and production of tropane alkaloids. *Romanian Biotechnology Letters* 17(3): 7340-7351
- Huang T, Gao WY, Wang J, Cao Y, Zhao X, Huang LQ, Liu CX** (2010) Selection and optimization of a high-producing tissue culture of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Acta Physiologiae Plantarum* (2010) 32:765–772
- Hur Y-G, Suh C-H, Kim S, Won J** (2007) Rosmarinic acid induces apoptosis of activated T cells from rheumatoid arthritis patients via mitochondrial pathway. *Journal of Clinical Immunology* 27(1):36-45
- Ignacimuthu S, Arockiasamy S, Antonysamy M, Ravichandran P** (1999) Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature leaf explants of *Eryngium foetidum*, a condiment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56:131-137
- Jabłońska A, Czerpak R** (2005/2006) Hydroksykwas w kosmetyce i terapii – ze szczególnym uwzględnieniem fenolokwasów. *Medycyna Estetyczna i Przeciwstarzeniowa* 4(13)
- Jachak SM** (2002) Herbal drugs as antidiabetic: an overview. *CRIPS* 3(2):9-13
- Jacker HJ, Hiller K** (1976) The antiexudative effect of saponin-5 from *Eryngium planum* L. and *Sanicula europaea* L. *Pharmazie* 31(10):747-8
- Jaghabir M** (1991) Hypoglycemic Effects of *Eryngium creticum*. *Archives of Pharmacal Research* 14(4):295-297
- Jana S, Shekhawat GS** (2012) *In vitro* regeneration of *Anethum graveolens*, antioxidative enzymes during organogenesis and RAPD analysis for clonal fidelity. *Biologia Plantarum* 56:9-14
- Jędrzejko K** (2001) Wykaz roślin i surowców leczniczych stosowanych w Polsce. Śląska Akademia Medyczna, Katowice 2001
- Jung HJ, Lee CO, Lee KT, Choi J, Park HJ** (2004) Structure-activity relationship of oleanane disaccharides isolated from *Akebia quinata* versus cytotoxicity against cancer cells and NO inhibition. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 27(5):744-747
- Kamiński B, Głowniak K, Majewska A, Petkowicz J, Szaniawska-Dekundy D** (1978) Poszukiwanie związków kumarynowych w nasionach i owocach. I. Owoce rodziny baldaszkowatych (Umbelliferae-Apiaceae). *Farmacja Polska* 34:25-28
- Kang J-W, Kima D-W, Choib J-S, Kimc J-S, Leea S-M** (2013) Scoparone attenuates d-galactosamine/lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure through inhibition of toll-like receptor 4 signaling in mice. *Food and Chemical Toxicology* 57:132–139
- Kang NJ, Lee KW, Shin BJ, Jung KS, Hwang MK, Bode AM, Heo Y-S, Lee HJ, Dong Z** (2009) Caffeic acid, a phenolic phyto-chemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. *Carcinogenesis* 30(2):321–330

- Karam NS, Jawad FM, Arikat NA, Shibli RA** (2003) Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 73:117-121
- Kartal M, Mitaine-Offer AC, Abu-Asaker M, Miyamoto T, Calis I, Wagner H, Lacaille-Dubois MA** (2005) Two new triterpene saponins from *Eryngium campestre*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 53:1318-1320
- Kartal M, Mitaine-Offer AC, Paululat T, Abu-Asaker M, Wagner H, Mirjolet JF, Guilbaud N, Lacaille-Dubois MA** (2006) Triterpene saponins from *Eryngium campestre*. *Journal of Natural Products* 69:1105-1108
- Karting Th, Wolf J** (1993) Flavonoide aus den oberirdischen Teilen von *Eryngium campestre*. *Planta Medica* 59(3):285
- Karuppusamy S** (2009) A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research* 3(13):1222-1239
- Khader M, Bresgen N, Eckl PM** (2010) Antimutagenic effects of ethanolic extracts from selected Palestinian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 127:319-324
- Holkhal W, Ilias F, Bekhechi Ch, Bekkara FA** (2012) *Eryngium maritimum*: a rich medicinal plant of polyphenols and flavonoids compounds with antioxidant, antibacterial and antifungal activities. *Current Research Journal of Biological Sciences* 4(4):437-443
- Kikowska M, Budzianowski J, Krawczyk A, Thiem B** (2012) Accumulation of rosmarinic, chlorogenic and caffeic acids in *in vitro* cultures of *Eryngium planum* L. *Acta Physiologiae Plantarum* 34(6):2425-2433
- Kikowska M, Thiem B** (2011) Alginate-encapsulated shoot tips and nodal segments in micropropagation of medicinal plants. A review. *Herba Polonica* 57(4):45-57
- Kim J-Y, Park K-W, Moon K-D, Lee N-K, Choi J, Yee S-T, Shim K-H, Seo K-I** (2008) Induction of apoptosis in HT29 colon cancer cells by crude saponin from *Platycodi Radix*. *Food and Chemical Toxicology* 46:3753-3758
- Kim OT, Kim MY, HONG MH, Ahn JC, Hwang B** (2004) Stimulation of asiaticoside accumulation in the whole plant cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban by elicitors. *Plant Cell Reports* 23:339-334
- Kollárová K, Lišková D, Kakoniova, D, Lux A** (2004). Effect of auxins on *Karwinskia humboldtiana* root cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79(2):213-221
- Korbel E, Bighelli A, Kurowska A, Kalembe D, Casanova J** (2008) New cis-chrysanthenyl esters from *Eryngium planum* L. *Natural Product Communications* 3(2):113-116
- Kowalczyk M, Masullo M, Thiem B, Piacente S, Stochmal A, Oleszek W.** Triterpene saponins from roots of *Eryngium planum* and *Eryngium maritimum*. *Natural Product Research* DOI: 10.1080/14786419.2014.896722
- Kubeczka KH, Ayoub N, Nawwar M, Saleh M** (1999) The essential oil and polyacetylenes from *Eryngium campestre* L. (Apiaceae). 30th International Symposium on Essential Oils (30th ISEO) 05–08.IX. 1999 Leipzig–Miltitz 105

- Kusakari K, Yokoyama M, Inomata S** (2000) Enhanced production of saikosaponins by root culture of *Bupleurum falcatum* L. using two-step control of sugar concentration. *Plant Cell Reports* 19(11):1115-1120
- Köpeli E, Kartal M, Aslan S, Yesilada E** (2006) Comparative evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activity of Turkish *Eryngium* species *Journal of Ethnopharmacology* 107(1):32-37
- Krief S, Thoison O, Sevenet T, Wrangham RW, Lavaud C** (2005) Triterpenoid saponin anthranilates from *Albizia grandibracteata* leaves ingested by primates in Uganda. *Journal of Natural Products* 68(6):897-903
- Krzyżanowska J, Czubačka A, Pecio Ł, Przybys M, Doroszeńska T, Stochmal A, Oleszek W** (2012) The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in *Mentha × piperita* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108(1):73-81
- Lafont R, Dinan L** (2003) Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. *Journal of Insect Science* 3(7):30
- Lambert E, Faizal A, Geelen D** (2011) Modulation of triterpene saponin production: *in vitro* cultures, elicitation, and metabolic engineering. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 164(2):220-237
- Langhansova L, Marsik P, Vanek T** (2005) Production of saponins from *Panax ginseng* suspension and adventitious root cultures. *Biologia Plantarum* 49(3):463-465
- Le Claire E, Schwaiger S, Banaigs B, Stuppner H, Gafner F** (2005) Distribution of a new rosmarinic acid derivative in *Eryngium alpinum* L. and other *Apiaceae*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53:4367-4372
- Le Coq C, Guervin C, Hamel JL, Jolinon D** (1978) La quantité d'ADN nucléaire et la garniture chromosomique chez quelques Umbellifères. Actes 2e Sympos. Internat. sur Umbellifères. Contributions pluridisciplinaires à la systématique, pp. 281-291
- Lee J, Kim YS, Park D** (2007) Rosmarinic acid induces melanogenesis through protein kinase A activation signaling. *Biochemical Pharmacology* 74(7):960-8
- Lee YS, Yang TJ, Park SU, Baek JH, Wu S, Lim KB** (2011) Induction and proliferation of adventitious roots from *Aloe vera* leaf tissues for *in vitro* production of aloe-emodin. *Plant Omics Journal* 4(4):190
- Leokadia SP** (1983) Kaempferol 3,7-dirhamnoside from *Eryngium planum* L. *Zeitschrift fuer chemie* 23(8):294-295
- Liakoura V, Manetas Y, Karabourniotis G** (2001) Seasonal fluctuations in the concentration of UV-absorbing compounds in the leaves of some Mediterranean plants under field conditions. *Physiologia Plantarum* 111:491-500
- Lino CS, Taveira ML, Viana GSB, Matos FJA** (1997) Analgesic and antiinflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its main constituents: coumarin and umbelliferone. *Phytotherapy Research* 11 (3): 211–215
- Lippert W, Podlech D** (1995) Rośliny śródziemnomorskie: Rozpoznawanie i oznaczanie roślin zielnych i krzewów. MUSA S.A., Warszawa 234-235

- Lisciani R, Fattorusso E, Surano V, Cozzolino S, Giannattasio M, Sorrentino L** (1984) Anti-inflammatory activity of *Eryngium maritimum* L. rhizome extracts in intact rats. *Journal of Ethnopharmacology* 12(3):263-270
- Lu MB, Wong HL, Teng WL** (2001) Effects of elicitation on the production of saponin in cell culture of *Panax ginseng*. *Plant Cell Reports* 20:674-677
- Lu M, Sunlu H, Yang J, Wang L** (2013) Effects of Saikosaponin D on apoptosis genes expression profile of the colon cancer cells HT-29. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 7(24):1640-16443
- Lucchesini M, Mensuali-Sodi A** (2010) Plant tissue culture--an opportunity for the production of nutraceuticals. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 698:185-202
- Łabuz TA** (2007) Evaluation of past and present sea holly (*Eryngium maritimum*) habitats on Polish coastal dunes. *Acta Universitatis Latviensis, 723, Biology* 99–114
- Łojkowska E** (2003) Mikrorozmnażanie roślin chronionych. X Ogólnopolska Konferencja Kultur *In vitro* i Biotechnologii Roślin. 15-17 września 2003 Bydgoszcz
- MacGregor DR, Deak KI, Ingram PA, malamy JE** (2008) Root system architecture in *Arabidopsis* grown in culture is regulated by sucrose uptake in the aerial tissues. *The Plant Cell* 20:2643-2660
- Madej A, Aligiannis N, Głowniak K, Skaltsounis AL** (2006) Chemical composition of *Eryngium planum* L. (Apiaceae). 5th International Symposium on Chromatography of Natural Products (ISCNP) June 19-22, Lublin, Poland pp 151
- Majewska M, Czeczot H** (2009) Flawonoidy w profilaktyce i terapii. *Farmacja Polska* 65(5):369-377
- Makunga NP, Jäger AK, van Staden J** (2003) Micropropagation of *Thapsia garganica* – a medicinal plants. *Plant Cell Reports* 21:967-973
- Malolepsza U, Urbanek H** (2000) Flawonoidy roślinne jako związki biochemicznie czynne. *Wiadomości Botaniczne* 44:(3/4): 27-37
- Man S, Gao W, Zhang Y, Huang L, Liu Ch** (2010) Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia* 81:703-714
- Marcetic MD, Petrovic SD, Milenkovic MT, Niketic MS** (2014) Composition, antimicrobial and antioxidant activity of the extracts of *Eryngium palmatum* Pancic and Vis. (Apiaceae). *Central European Journal of Biology* 9(2):149-155
- Markham KR** (2002) Techniques of flavonoids identification. Academic Press London
- Martin KP, Sabovljevic A, Madassery J** (2011) High-frequency transgenic plant regeneration and plumbagin production through methyl jasmonate elicitation from hairy roots of *Plumbago indica* L. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 14(3):205-212
- Martin KP, Zhang CL, Hembrom ME, Slater A, Madassery J** (2008) Adventitious root induction in *Ophiorrhiza prostrata*: a tool for the production of camptothecin (an anticancer drug) and rapid propagation. *Plant Biotechnology Reports* 2(2):163-169

- Martin KP** (2004a) *In vitro* propagation of the herbal spice *Eryngium foetidum* L. on sucrose-added and sucrose-free medium without growth regulators and CO₂ enrichment. *Scientia Horticulturae* 102(2):277-181
- Martin KP** (2004b) Efficacy of different growth regulators at different stages of somatic embryogenesis in *Eryngium foetidum* L. – a rare medicinal plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 40(5):459-463
- Martinez BC, Park CH** (1993) Characteristic of batch suspension cultures of preconditioned *Coleus blumei* cells: sucrose effect. *Biotechnology Progress* 9:97-100
- Mathur A, Gangwar A, Mathur AK, Verma P, Uniyal GC, Lal RK** (2010) Growth kinetics and ginsenosides production in transformed hairy roots of American ginseng – *Panax quinquefolium* L. *Biotechnology Letters* 32:457-461
- Matlawska I** (Red.) (2006) *Farmakognozja*. UM Poznań 218-235
- Matkowski A** (2008) Plant *in vitro* culture for the production of the antioxidants-a review. *Biotechnology Advances* 26:548-560
- Mekhora C, Muangnoi C, Chingsuwanrote P, Dawilai S, Svasti S, Chasri K I** wsp. (2012) *Eryngium foetidum* suppresses inflammatory mediators produced by macrophages. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 13:653-664
- Meng CC, Jalil AMM, Ismail A** (2009) Phenolic and theobromine contents of commercial dark, milk and white chocolates on the Malaysian market. *Molecules* 14(1):200-9
- Meot-Duros L, Magne Ch** (2008) Effect of salinity and chemical factors on seed germination in the halophyte *Crithmum maritimum* L. *Plant Soil* 313:83-87
- Meot-Duros L, Cerantola S, Talarmin H, Le Meur Ch, Le Floch G, Magne Ch** (2010) New antibacterial and cytotoxic activities of faltarindiol isolated in *Crithmum maritimum* L. leaf extract. *Food and Chemical Toxicology* 48(2):553-557
- Mizukami H, Ogawa T, Ohashi H, Ellis BE** (1992) Induction of rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures by yeast extract. *Plant Cell Reports* 11:480-483
- Mozumder SN, Hossain MM** (2013) Effect of seed treatment and soaking duration on germination of *Eryngium foetidum* L. seeds. *International Journal of Horticultural Science* 3(10):46-51
- Mulabagal V, Tsay H-SH** (2004) Plant cell cultures – an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering* 2(1):29-48
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497
- Nebija F, Stefkov G, Karapandzova M, Stafilov T, Kadifkova Panovska T, Kulevanova S** (2009) Chemical characterization and antioxidant activity of *Eryngium campestre* L., Apiaceae from Kosovo. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin* 55(1,2):22-32

- Necajeva J, Ievinsh G** (2013) Seed dormancy and germination of an endangered coastal plant *Eryngium maritimum* (Apiaceae). Estonian Journal of Ecology 62(2):150-161
- Negi JS, Negi PS, Pant GJ, Rawat MSM, Negi SK** (2013) Naturalny occurring saponins: chemistry and biology. Journal of Poisonous and Medicinal Plant Research 1(1):6-11
- Njenga J** (1995) Production of *Eryngium*. N.C. Flower Growers' Bulletin 40:9-11
- Nowak G, Moroch A, Urbańska M, Nawrot J, Ratajczak L, Dawid-Pač R** (2012) Ekdysony roślinne. Postępy Fitoterapii 1:15-21
- Nowak B, Sitek E, Gajewski Z** (2011) *Hacquetia epipactis* (Apiaceae) - rozmnażanie *in vitro* i zdolność kiełkowania nasion w warunkach *ex situ* W: Kącki Z., Stefańska-Krzaczek E. (red.) Synantropizacja w dobie zmian różnorodności biologicznej. Acta Botanica Silesiaca 6: 239-248.
- Ogata A, Tsuruga A, Matsuno M, Mizukami H** (2004) Elicitor-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures: Activities of rosmarinic acid synthase and the final two cytochrome P450-catalyzed hydroxylations. Plant Biotechnology 21(5), 393–396
- Okršlar V, Plaper I, Kovac M, Erjavec A, Obermajer T, Rebec A, Ravnikar M, Zel J** (2007) Saponins in tissue culture of *Primula veris* L. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant 43:644-651
- Oleszek WA** (2002) Chromatographic determination of plant saponins. Review. Journal of Chromatography A 967:147-162
- Olszowska O** (2000) Transformowane korzenie jako źródło wtórnych metabolitów. Biotechnologia (49):54-63
- Olthof MR, Hollman PCH, Katan MB** (2001) Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. Journal of Nutrition 131:66-71
- Orhan I, Aslan S, Kartal M, Sener B, Baser KHC** (2008) Inhibitory effect of Turkish *Rosmarinus officinalis* L. on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. Food Chemistry 108:663-668
- Orlikowska T** (1997) Regulatory roślinne w kulturach *in vitro*. W: Jankiewicz LS (Red.) Regulatory wzrostu i rozwoju roślin. Tom 2. Zastosowanie w ogrodnictwie, rolnictwie, leśnictwie i w kulturach tkanek. Wydawnictwo PWN 219-247
- Ostrowska J, Skrzydlewska E** (2005) Aktywność biologiczna flawonoidów. Postępy Fitoterapii 3-4:71-79
- Ożarowski M, Mikolajczak PL, Bogacz A, Gryszczynska A, Kujawska M, Jodynis-Libert J, Piasecka A, Napieczynska H, Szulc M, Kujawski R, Bartkowiak-Wieczorek J, Cichocka J, Bobkiewicz-Kozłowska T, Czerny B, Mrozikiewicz PM** (2013) *Rosmarinus officinalis* L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain. Fitoterapia 91(2013):261-271
- Qin H, Du X, Zhang Y, Wang R** (2013) Platycodin D, a triterpenoid saponin from *Platycodon grandiflorum*, induces G2/M arrest and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells by modulating the PI3K/Akt pathway. Tumor Biology 35(2):1267-1274

- Panya A, Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P, Weiss J, McClements DJ, Decker EA** (2010) Effects of chitosan and rosmarinate esters on the physical and oxidative stability of liposomes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 12;58(9):5679-84
- Park SU, Uddin MR, Xu H, Kim YK, Lee SY** (2008) Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant. *African Journal of Biotechnology* 7(25):4959-4965
- Parus A** (2013a) Właściwości farmakologiczne saponin. *Postępy Fitoterapii* 3:200-204
- Parus A** (2013b) przeciwutleniające i farmakologiczne właściwości kwasów fenolowych. *Postępy Fitoterapii* 1:48-53
- Patlolla JM, Raju J, Swamy MV, Rao CV** (2006) Beta-escin inhibits colonic aberrant crypt foci formation in rats and regulates the cell cycle growth by inducing p21(waf1/cip1) in colon cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 5(6):1459-1466
- Paul JHA, Seaforth CE, Tikasingh T** (2011) *Eryngium foetidum* L.: A review. *Fitoterapia* 82:302–308
- PDR for Herbal Medicines** (2000) Medical Economics Company, Montvale New Jersey
- Pereira P, Tysca D, Oliveira P, De Silva Brum LF, Picada JN, Ardenghi P** (2005) Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. *Pharmacological Research* 52(3):199-203
- Perez-Fons L, Garzón MT, Micol V** (2010) Relationship between the antioxidant capacity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 13;58(1):161-171
- Petersen M** (2013) Rosmarinic acid: new aspects. *Phytochemistry Reviews* 12:207-227
- Petersen M, Simmonds MSJ** (2003) Molecules of Interest: Rosmarinic Acid. *Phytochemistry* 62:121-125
- Petersen M, Abdullah Y, Benner J, Eberle D, Gehlen K, Hücherig S, Janiak V, Kim KH, Sander M, Weitzel C, Wolters S** (2009) Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry* 70(15-16):1663-79
- Piechal A, Klecharz-Klin K, Widy-Tyszkiewicz E** (2005) Kasztanowiec zwyczajny (*Aesculus hippocastani*) we współczesnej terapii. *Przewodnik Lekarza* 4:74-81
- Pietrosiuk A., Furmanowa M** (2006) Biotechnologia roślin w ochronie zdrowia człowieka. *Biotechnologia* 4(75):116-123
- Piękoś-Mirkowa H, Mirek Z** (2003) Flora polski. Atlas roślin chronionych. Multico Oficyna, Warszawa 46-47
- Pobłocka-Olech L, Marcinkowska K, Krauze-Baranowska M** (2006) Naryngenina i jej pochodne – flawanony o wielokierunkowej aktywności farmakologicznej. *Postępy Fitoterapii* 1:16-22
- Podolak I, Galanty A, Sobolewska D** (2010) Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochemistry Reviews* 9(3):425–474
- Prasad A, Mathur A, Singh M, Gupta MM, Uniyal GC, Lal RK, Mathur AK** (2011) Growth and asiaticoside production in multiple shoot cultures of a medicinal herb, *Centella asiatica* (L.) Urban, under the influence of nutrient manipulations. *Journal of Natural Medicines* 66(2):383-387

- Praveen N, Murthy HN** (2010) Production of withanolide A from adventitious root cultures of *Withania somnifera*. *Acta Physiologiae Plantarum* 32:1017-1022
- Prieto P, Pineda M, Aguilar** (1999) Spectrophotometric Quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry* 269(2):337-341
- Putalun W, Udomsin O, Yusakul G, Juengwatanatrakul T, Sakamoto S, Tanaka H** (2010) Enhanced plumbagin production from *in vitro* cultures of *Drosera burmanii* using elicitation. *Biotechnology Letters* 32:721-724
- Ramalingam R, Vaiyapuri M** (2013) Effects of umbelliferone on lipid peroxidation and antioxidant status in diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. *Journal of Acute Medicine* 3(3):73–82
- Rees WA, Yager TD, Korte J, von Hippel PH** (1993) Betaine can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting. *Biochemistry* 32(1):137-144.
- Rout GR, Samantaray S, Das P** (2000) *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances* 18:91-120
- Rybczyński JJ, Mikula A** (2006) Biotechnologia w zachowaniu różnorodności flory Polski. Rzadkie, ginące i reliktowe gatunki roślin i grzybów. Problemy zagrożenia i ochrony różnorodności flory Polski. Materiały ogólnopolskiej konferencji naukowej. Kraków 30-31 maja 2006, 31-32
- Sáenz MT, Fernández MA, García MD** (1997) Antiinflammatory and analgesic properties from leaves of *Eryngium foetidum* L. (Apiaceae). *Phytotherapy Research* 11(5):380–383
- Sánchez-Campillo M, Gabaldon JA, Castillo J., Benavente-García O, Del Baño MJ, Alcaraz M, Vicente V, Alvarez N, Lozano JA** (2009) Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. *Food and Chemical Toxicology* 47(2):386-392
- Sang SM, Lao AN, Leng Y, Cao L, Chen ZL, Uzawa J, Shigeo Y, Fujimoto Y** (2002) A new triterpenoid saponin with inhibition of luteal cell from the seeds of *Vaccaria segetalis*. *Journal of Asian Natural Products Research* 4(4):297-301
- Santas J, Codony R, Rafecas M** (2013) Phytosterols: Beneficial effects. *Natural Products* 3437-3464
- Sathyanarayana BN, Varghese DB** (2007) *Plant Tissue Culture: Practices and New Experimental Protocols*. I.K. International Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, India
- Sellés M, Bergonón S, Viladomat, F, Bastida J, Codina C** (1997) Effect of sucrose on growth and galanthamine production in shoot-clump cultures of *Narcissus confusus* in liquid-shake medium. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 49(2):129-136
- Seo Y, Hoch J, Abdel-Kader M, Malone S, Derveld I, Adams H, Werkhoven MC, Wisse JH, Mamber SW, Dalton JM, Kingston DG** (2002) Bioactive saponins from *Acacia tenuifolia* from the suriname rainforest. *Journal of Natural Products* 65(2): 170-174
- Sędek Ł, Michalik M** (2005) Nowe badania nad saponinami ujawniają ich liczne lecznicze właściwości. *Kosmos* 54(4):345-356

- Shabani L, Ehsanpour AA, Asghari G, Emami J** (2009) Glycyrrhizin production by *in vitro* cultured *Glycyrrhiza gabra* elicited by methyl jasmonate and salicylic acid. *Russian Journal of Plant Physiology* 56(5):621-626
- Sharma Sh, Shahzad A** (2013) Elicitation: an alternative approach towards commercialization of secondary metabolites production. Chapter 4. W: Shahid et al (eds.) *Recent trends in biotechnology and therapeutic applications of medicinal plants*. Springer Science & Business Media Dordrecht 2013
- Sharma P, Yadav S, Srivastava A, Shrivastava N** (2013) Methyl jasmonate mediates upregulation of bacoside A production in shoot cultures of *Bacopa monnieri*. *Biotechnology Letters* 35:1121-1125
- Sindambiwe JB, Calomme M, Geerts S, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe DA** (1998) Evaluation of biological activities of triterpenoid saponins from *Maesa lanceolata*, *Journal of Natural Products* 61 585-590
- Sivanandhan G, Rajesh M, Arun M, Jeyaraj M, Dev GK, Arjunan A, Manickavasagan M, Muthuselvan M, Selvaraj N, Ganapathi A** (2013) Effect of culture conditions, cytokinins, methyl jasmonate and salicylic acid on the biomass accumulation and production of withanolides in multiple shoot culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal using liquid culture. *Acta Physiologiae Plantarum* 35:715-728
- Sliwinska E and Thiem B** (2007) Genome size stability in six medicinal plant species propagated *in vitro*. *Biologia Plantarum* 51:556-8
- Sliva Š, Viehmannova I, Vitamvas J** (2010) Micropropagation and morphogenesis of Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). *Agriculture Tropical et Subtropical* 43:206-211
- Son IH, Park IH, Lee SI, Yang HD, Moon H-I** (2007) Neuroprotective activity of triterpenoid saponins from *Platycodi radix* against glutamate-induced toxicity in primary cultured rat cortical cells. *Molecules* 12:1147-1152
- Sparg SG, Light ME, van Staden J** (2004) Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology* 94:219-243
- Stalińska K, Guzdek A, Rokicki M, Koj A** (2005) Transcription factors as targets of the anti-inflammatory treatment. A cell culture study with extracts from some Mediterranean diet plants. *Journal of Physiology and Pharmacology* 56(1):157-159
- Staniforth V, Chiu L-T, Yang N-S** (2006) Caffeic acid suppresses UVB radiation-induced expression of interleukin-10 and activation of mitogen-activated protein kinases in mouse. *Carcinogenesis* 27(9):1803-1811
- Strzelecka H, Kowalski J** (Red.) (2000) *Encyklopedia zielarstwa i ziołolecznictwa*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 338
- Suciu S, Brodoki E, Vlase L** (2006) Comparative phytochemical study on *Eryngium* sp. from Romania. 4th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of South-East European Countries. Iasi, Romania 28-31 May 2006
- Sul D, Kim HS, Lee D, Joo SS, Hwang KW, Park SY** (2009) Protective effect of caffeic acid against beta-amyloid-induced neurotoxicity by the inhibition of calcium influx and tau phosphorylation. *Life Science* 27;84(9-10):257-62

- Sumaryono W, Proksch P, Hartmann T, Nimt M, Wray V** (1991) Induction of rosmarinic acid accumulation in cell suspension cultures of *Orthosiphon aristatus* after treatment with yeast extract. *Phytochemistry* 0(10): 3267-3271
- Szabo E, Thelen A, Petersen M** (1999) Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in *in vitro*-cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Reports* 18:485-489
- Szafer W, Pawłowski B** (Red.) (1960) *Flora Polska. Rośliny naczyniowe Polski i ziem ościennych. Tom IX.* Wydawnictwo Naukowe PWN, Kraków 20-25
- Szopa A, Ekiert H, Muszyńska B** (2013) Accumulation of hydroxybenzoic acids and other biologically active phenolic acids in shoot and callus cultures of *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott (black chokeberry). *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 113:323-329
- Szopa A, Ekiert H, Szewczyk A, Fugas E** (2012) Production of bioactive phenolic acids and furanocoumarins in *in vitro* cultures of *Ruta graveolens* L. and *Ruta graveolens* ssp. *divaricata* (Tenore) Gams. under different light conditions. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 110:329-336
- Szpitter A, Królicka A** (2005) Stymulujący wpływ elicytorów biotycznych na produkcję farmakologicznie czynnych metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro*. *Biotechnologia* 4(71):82-108
- Ślusarczyk S, Hajnos M, Skalicka-Woźniak K, Matkowski A** (2009) Antioxidant activity of polyphenols from *Lycopus lucidus* Turcz. *Food Chemistry* 113:134-138
- Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T, Kubo M** (2002) Identification of rosmarinic acid as a novel antidepressive substance in the leaves of *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo (*Perillae Herba*). *Japanese Journal of Psychopharmacology* 22(1):15-22
- Tezuka Y, Honda K, Banskota AH, Thet MM, Kadota S** (2000) Kinmoonosides A-C, three new cytotoxic saponins from the fruits of *Acacia concinna*, a medicinal plant collected in myanmar. *Journal of Natural Products* 63(12):1658-64
- Thiem B, Budzianowski J, Wesolowska M, Ratajczak L, Mrozowska M, Skrzypczak L** (2008) Secondary metabolites of *in vitro* cultures of selected Polish rare and endangered plants. *Herba Polonica* 54(4):158-167
- Thiem B, Goślińska O, Kikowska M, Budzianowski J** (2010) Antimicrobial activity of three *Eryngium* L. species (Apiaceae). *Herba Polonica* 56(4):52-59
- Thiem B, Kikowska M** (2008) Zapewnienie jakości roślin leczniczych rozmnażanych w kulturach *in vitro*. *Herba Polonica* 54(4):168-178
- Thiem B, Kikowska M** (2009) Hairy roots and untransformed root culture of *Eryngium* L. species. *Acta Biochimica Polonica* vol. 56 suppl. 278-79
- Thiem B, Kikowska M, Krawczyk A, Więckowska B, Śliwińska E** (2013) Phenolic acids and DNA contents of micropropagated *Eryngium planum* L. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 114(2):197-206
- Thiem B, Kikowska M, Kurowska A, Kalemba D** (2011) Essential oil composition of the different parts and *in vitro* shoot culture of *Eryngium planum* L. *Molecules* 16(8):7115-7124

- Thiem B, Krawczyk A** (2010) Enhanced isoflavones accumulation in methyl jasmonate-treated *in vitro* cultures of kudzu (*Pueraria lobata* Ohwi). *Herba Polonica* 56:48-56
- Thiem B, Wiatrowska I** (2007) *Eryngium campestre* L. (mikołajek polny) i inne gatunki *Eryngium* L. - mało znane rośliny lecznicze. *Herba Polonica* 53(1):93-102
- Tian J, Jiang W** (2006) Rosmarinic acid inhibits acute renal injury and cyst formation in cisplatin-treated rat kidney. *Toxicology Letters* 164:265
- Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Valentine DH, Walters SM, Webb DA** (1986) *Flora Europaea. Rosaceae to Umbelliferae* Vol. 2 Cambridge University Press
- Vazquez-Flota F, Hernandez-Dominguez E, de Lourdes Miranda-Ham M, Monforte-Gonzalez M** (2009) A differential response to chemical elicitors in *Catharanthus roseus in vitro* cultures. *Biotechnology Letters* 31:591-595
- Veljkovic V, Mouscadet JF, Veljkovic N i wsp.** (2007) Simple criterion for selection of flavonoid compounds with anti-HIV activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17(5):1226-1232
- Venugopala KN, Rashmi V, Odhav B** (2013) Review on natural coumarins lead compounds for their pharmacological activity. *BioMed Research International* ID 963248
- Vickers A** (2002) Botanical medicines for the treatment of cancer: rationale overview of current data and methodological considerations for Phase I and II trials. *Cancer Investigation* 20:1069–1079
- Wadegaonkar PA, Bhagwat KA, Rai MK** (2006) Direct rhizogenesis and establishment of fast growing normal root organ culture of *Withania somnifera* Dunal. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 84(2):223-225
- Wang H, Gao J, Zhu D, Yu B** (2006) Two new triterpenoid saponins isolated from *Polygala japonica*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 54 (12): 1739-1742
- Wang P, Ownby S, Zhang ZZ, Yuan W, Li SY** (2010) Cytotoxicity and inhibition of DNA topoisomerase I of polyhydroxylated triterpenoids and triterpenoid glycosides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20:2790-2796
- Wang P, Su Z, Yuan W, Deng G, Li Sh** (2012) Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Eryngium* L. (Apiaceae). *Pharmaceutical Crops* 3:99-120
- Wasilewska A, Królicka A** (2005) Otrzymywanie i charakterystyka kultur korzeni włośnikowatych. *Biotechnologia* 4(71):173-188
- Wei F, MA L-Y, Jin WT, Ma SC, Han GZ, Khan IA, Lin RC** (2004) Antiinflammatory triterpenoid saponins from the seeds of *Aesculus chinensis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 52
- Weiss RF** (1991) *Herbal Medicine*. AB Arcanum, Gothenburg, Sweden. Beaconsfield Publishers LTD, Beaconsfield, England. p. 211
- Wiland-Szymańska J** (1999) Kolczasta ozdoba wydym. *Salamandra* (1/1999) 10

- Wilczańska-Barska A, Glód D, Majdan M, Krauze-Baranowska M, Królicka M, Kawiak A** (2012) Enhanced accumulation of secondary metabolites in hairy root cultures of *Scutellaria lateriflora* following elicitation. *Biotechnology Letters* 34:1757-1763
- Woldemichael GM, Wink M** (2002) Triterpene glycosides of *Lupinus angustifolius*. *Phytochemistry* 60
- Wongwicha W, Tanaka H, Shoyama Y, Putalun W** (2011) Methyl jasmonate elicitation enhances glycyrrhizin in *Glycyrrhiza inflata* hairy roots cultures. *Zeitschrift für Naturforschung* 66c:423-428
- Wolff H** (1913) Umbelliferae-Saniculoideae. W: Engler A (red.) *Das Pflanzenreich* Vol.4 (228) Leipzig: Engelmann
- Wörz A** (1999) A Taxonomic Index of the species of *Eryngium* L. – *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde A* 596:1-48
- Wörz A** (2004) On the Distribution and Relationships of the South- West Asian Species of *Eryngium* L. (*Apiaceae-Saniculoideae*). *Turkish Journal of Botany* 28:85-92
- Wörz A** (2005) A new subgeneric classification of the genus *Eryngium* L. (*Apiaceae, Saniculoideae*)” *Botanische Jahrbücher für Systematic* 126(2):253-259
- Wörz A, Diekmann H** (2010) Classification and evolution of the genus *Eryngium* L. (*Apiaceae-Saniculoideae*): results of fruit anatomical and petal morphological studies. *Plant Diversity and Evolution* 128(3-4):387-408
- Wu CH, Dewir YH, Hahn EJ, Paek KY** (2006) Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. *Journal of Plant Biology* 49(3):193-199
- Wu CH, Murthy HN, Hahn EJ, Paek KY** (2009) Large-scale cultivation of adventitious roots of *Echinacea purpurea* in airlift bioreactors for the production of chichoric acid, chlorogenic acid and caftaric acid. *Methods in Molecular Biology* 547:3-16
- Wu L-L, Yang X-B, Huang Z-M, Liu H-Z and Wu G-X** (2007) *In vivo* and *in vitro* antiviral activity of hyperoside extracted from *Abelmoschus manihot* (L) medic. *Acta Pharmacologica Sinica* 28:404–409
- Wungsintaweekul J, Choo-Malee J, Charoonratana T, Keawpradub N** (2012) Methyl jasmonate and yeast extract stimulate mitragynine production in *Mitragyna speciosa* (Roxb.) Korth. shoot culture. *Biotechnology Letters* 34(10):1945-1950
- Wysokińska H, Chmiel A** (2006) Produkcja roślinnych metabolitów wtórnych w kulturach organów transformowanych. *Biotechnologia* 4(75):124-135
- Yang X-W, Zhao J, Cui Y-X, Liu X-H, Ma Ch-M, Hattori M, Zhang L-H** (1999) Anti-HIV-1 protease triterpenoid saponins from the seeds of *Aesculus chinensis*. *Journal of Natural Products* 62(11):1510-1513
- Yang JY, Koo JH, Song YG, Kwon KB, Lee JH, Sohn HS, Park BH, Jhee EC, Park JW** (2006) Stimulation of melanogenesis by scoparone in B16 melanoma cells. *Acta Pharmacologica Sinica* 27(11):1467-73
- Yang YJ, Lee HJ, Lee BK, Lim SC, Lee Ch K, Lee MK** (2010) Effects of scoparone on dopamine release in PC12 cells. *Fitoterapia* 81:497-502
- Yao LH, Jiang YM, Shi J I wsp.** (2004) Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition* 59(3):113-122

- Yurdakok B, Baydan E** (2013) Cytotoxic effects of *Eryngium kotschyi* and *Eryngium maritimum* on Hep2 and HepG2, Vero and U138MG cell lines. *Pharmaceutical Biology* 51(12):1579-1585
- Zhang J, Gao W-Y, Wang J, Li X-L** (2012) Effect of sucrose concentration and exogenous hormones on growth and periplocin accumulation in adventitious roots of *Periploca sepium* Bunge. *Acta Physiologiae Plantarum* 34:1345-1351
- Zhang W, Luo JG, Zhang C, Kong LY** (2013) Different apoptotic effects of triterpenoid saponin-rich *Gypsophyla oldhamiana* root extract on human hepatoma SMM-7721 and normal human hepatic L02 cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 36(7):1080-1087
- Zhang H, Memelink J** (2009) Regulation of secondary metabolism by jasmonate hormones. *Plant-derived Natural Products*: 181-194
- Zhao Y, Liu C** (2007) Biological production of artemisin for malaria therapy. W: Kayser O, Quax (Eds.) *Medicinal Plant Biotechnology*. Vol II Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 529-539
- Zidorn C, Johrer K, Ganzera M, Schubert B, Sigmund EM, Mader J, Greil R, Ellmerer EP, Stuppner H** (2005) Polyacetylenes from the Apiaceae vegetables carrot, celery, fennel, parsley, and parsnip and their cytotoxic activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:2518-2523
- Żukowski W, Jackowiak B** (1995) Ginące i zagrożone rośliny naczyniowe Pomorza Zachodniego i Wielkopolski. *Bogucki Wydawnictwo Naukowe, Poznań* 22-25, 43

Strony Internetowe:

www.plantsystematics.org/reveal

www.plantsystematics.org

Dziennik ustaw

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem pracy doktorskiej pt.:

„Krajowe gatunki rodzaju *Eryngium* L. w kulturze *in vitro* – mikrorozmnażanie, kultury organów, ocena fitochemiczna i aktywność biologiczna”

Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem **stopnia doktora nauk farmaceutycznych**, a złożona przeze mnie dyskietka/płytą CD zawiera elektroniczny zapis przedstawionej przeze mnie pracy.

Jednocześnie oświadczam, że nieodpłatnie udzielam Uniwersytetowi Medycznemu im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu licencji do korzystania z wyżej wymienionej pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych w zakresie obrotu nośnikami, na których pracę utrwalono przez: wprowadzanie do obrotu, użyczenie lub najem egzemplarzy w postaci elektronicznej a nadto upoważniam Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu do przechowywania i archiwizowania pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania i udostępniania w formie elektronicznej oraz drukowanej.

Imię i nazwisko.....

Data, podpis.....

OŚWIADCZENIE

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej rozprawy doktorskiej w Czytelni Naukowej Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego im. K.Marcinkowskiego w Poznaniu oraz w formie elektronicznej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej (www.wbc.poznan.pl).

Poznań, dnia.....

.....

(podpis)