

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

mgr farm. Marta Krzemińska

**Kultury transformowanych korzeni i pędów *Salvia bulleyana*  
Diels jako źródło bioaktywnych metabolitów.**

Cultures of transformed roots and shoots of *Salvia bulleyana* Diels as a source of bioactive metabolites.

**Promotor rozprawy:** prof. UM dr hab. n. farm. Izabela Grzegorzczak-Karolak

Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej,

Katedra Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź 2023



## Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania mojej Promotor Pani Profesor dr hab. n. farm. Izabeli Grzegorzczak-Karolak za opiekę naukową, cenne uwagi i wskazówki, a także nieprzebrane pokłady cierpliwości, wyrozumiałości i życzliwości. Dziękuję za nieocenioną pomoc i poświęcony czas w trakcie realizacji badań, przygotowywaniu publikacji oraz redagowaniu pracy. Dziękuję za motywację i wiarę w moją osobę.

Chciałabym również podziękować za współpracę i poświęcony czas Pani Profesor dr hab. n. farm. Monice Olszewskiej, Pani Profesor dr hab. Annie Kiss, Pani Profesor dr hab. Magdalenie Mikołajczyk-Chmieli, Pani dr Aleksandrze Owczarek-Januszkiewicz, Pani dr Renacie Grąbkowskiej, Pani dr Katarzynie Hnatuszko-Konce, Pani dr Weronice Gonciarz oraz wszystkim, którzy przyczynili się do powstania niniejszej pracy.

Dla Andrzeja...

## Spis treści

1. Skróty stosowane w pracy .....	7
2. Wstęp.....	13
2.1. Systematyka i charakterystyka morfologiczna <i>Salvia bulleyana</i> Diels. ....	13
2.2. Zastosowanie <i>S. bulleyana</i> w medycynie tradycyjnej. ....	14
2.3. Metabolity wtórne <i>S. bulleyana</i> .....	17
2.3.1. Polifenole .....	17
2.3.2. Diterpeny .....	33
2.3.3. Kwasy organiczne.....	37
2.4. Biotechnologia roślin.....	37
2.4.1. Mikrorozmnażanie .....	38
2.4.2. Warunki prowadzenia kultur <i>in vitro</i> .....	39
2.4.3. Transformacja genetyczna roślin .....	42
2.4.4. Kultury transformowane gatunków z rodzaju <i>Salvia</i> .....	48
3. Cel pracy.....	52
4. Materiały i metodyka.....	53
4.1. Materiał roślinny .....	53
4.2. Potwierdzenie transformacji.....	53
4.3. Analiza fitochemiczna .....	56
4.3.1. Przygotowanie ekstraktów.....	56
4.3.2. Analiza jakościowa .....	56
4.3.3. Analiza ilościowa.....	57
4.4. Korzenie transformowane .....	58
4.4.1. Wstępna selekcja klonów korzeni transformowanych .....	58
4.4.2. Optymalizacja warunków hodowli korzeni transformowanych <i>S. bulleyana</i> .....	58
4.4.3. Krzywa wzrostu kultury korzeni transformowanych .....	60
4.4.4. Elicytacja.....	61
4.4.5. Zwiększenie skali hodowli korzeni transformowanych <i>S. bulleyana</i> .....	61
4.5. Pędy transformowane .....	64

4.5.1.	Wybór odpowiednich warunków oświetlenia.....	64
4.5.2.	Wybór odpowiedniej cytokininy i jej stężenia .....	67
4.5.3.	Hodowla pędów transformowanych w podłożu płynnym.....	67
4.5.4.	Hodowla pędów transformowanych w bioreaktorach typu Rita i PlantForm.....	68
4.6.	Podłoża stosowane w pracy .....	69
4.6.1.	Podłoża stosowane w hodowli korzeni i pędów transformowanych <i>S. bulleyana</i> ....	69
4.6.2.	Podłoże stosowane w hodowli <i>Rhizobium rhizogenes</i> (YMB).....	70
4.7.	Badania biologiczne.....	70
4.7.1.	Aktywność antyoksydacyjna .....	70
4.7.2.	Aktywność cytotoksyczna.....	74
4.7.3.	Aktywność przeciwdrobnoustrojowa.....	75
4.8.	Analiza statystyczna .....	76
5.	Wyniki.....	78
5.1.	Potwierdzenie transformacji.....	78
5.2.	Korzenie transformowane .....	80
5.2.1.	Analiza jakościowa metanolowo-wodnych ekstraktów z korzeni transformowanych <i>S. bulleyana</i> .....	80
5.2.2.	Selekcja klonu.....	82
5.2.3.	Optymalizacja warunków hodowli korzeni transformowanych klonu C4 <i>S. bulleyana</i> .....	88
5.2.4.	Elicytacja.....	108
5.2.5.	Zwiększenie skali hodowli .....	116
5.3.	Pędy transformowane .....	123
5.3.1.	Analiza jakościowa metanolowo-wodnych ekstraktów z pędów transformowanych <i>S. bulleyana</i> .....	123
5.3.2.	Wybór odpowiednich warunków oświetlenia.....	125
5.3.3.	Wybór odpowiedniej cytokininy i jej stężenia .....	133
5.3.4.	Hodowla pędów transformowanych w warunkach podłoża płynnych.....	140
5.3.5.	Hodowla pędów transformowanych w bioreaktorach typu PlantForm i Rita.....	148
5.4.	Aktywność biologiczna.....	156

5.4.1.	Aktywność antyoksydacyjna .....	156
5.4.2.	Aktywność cytotoksyczna .....	164
5.4.3.	Aktywność przeciwdrobnoustrojowa .....	165
6.	Dyskusja .....	167
6.1.	Korzenie transformowane .....	167
6.2.	Pędy transformowane .....	180
6.3.	Zwiększanie skali hodowli .....	189
6.4.	Aktywność biologiczna .....	192
7.	Wnioski .....	198
8.	Streszczenie w języku polskim i angielskim .....	200
9.	Bibliografia .....	204
10.	Wykaz publikacji i komunikatów zjazdowych .....	237

## 1. Skróty stosowane w pracy

0V – brak witamin

½V – połowa zawartości witamin

¼V – jedna czwarta zawartości witamin

4C-pHPL 3H i 3'H – 3/3'-hydroksylazy 4-kumarylo-4'-hydroksyfenylomlekowe

3CLpro – proteaza 3CL-podobna

4C-DHPL 3H – 3-hydroksylaza 4-kumarylo-3',4'-dihydroksyfenylomlekowa

4CL – ligaza hydroksycynamoil-CoA

AAPH – dihydrochlorek 2,2'-azobis(amidynopropanu)

ABTS – 2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)

AGS – ludzka linia komórkowa raka żołądka

ALT – aminotransferaza alaninowa

AMPK – kinaza aktywowana 5' AMP

AST – aminotransferaza asparaginianowa

ATCC – ang. *American Type Culture Collection*

B5 – podłoże wg Gamborga

BAP – 6-benzyloaminopuryna

BAPR – rybozyd 6-benzyloaminopuryny

Bax – białko proapoptotyczne z rodziny Bcl-2 (ang. *Bcl-2-like protein 4*)

Bad – białko proapoptotyczne z rodziny Bcl-2 (ang. *Bcl-2-like protein 4*)

Bcl-2 – ang. *B-cell lymphoma 2*

BHA – butylohydroksyanizol

BHT – butylohydroksytoluen

BPA – N-benzylo-9-(2-tetrahydropiranylo)-adenina

C2C12 – linia komórkowa mysich mioblastów

C3H – 3-hydroksylaza 4-kumarowa

C4H – 4-hydroksylaza kwasu cynamonowego

CA – kwas kawowy

CAD – pochodna kwasu kawowego

Caf-pHPL 3' – 3'-hydroksylaza kawoilo-4'-hydroksyfenylomlekowa

CAT – katalaza

Cd – kadm w postaci soli chlorkowej

CRP – białko C-reaktywne

CT – kryptotanszynon

CTA – pochodna kwasu kawoilo-treonowego

DAM - diacetylmartynozyd

DPP-IV – dipeptydylopeptydaza IV

DPPH – 2,2-difenylo-1-pikrohydrazyl

Drp1 – ang. dynamin related protein 1

EMT – przejście epitelialno-mezenchymalne

FRAP – metoda oznaczania zdolności redukcji jonów żelaza (ang. *ferric ion reducing antioxidant parameter*)

FV – pełna zawartość witamin

GI – indeks wzrostu

GPx – dysmutaza glutationowa

GSH - glutation

GSH-Px – peroksydaza glutationowa

H1299 – linia komórkowa ludzkiego nie drobnokomórkowego raka płuc

HCT116 – linia komórkowa raka jelita grubego (okrężnicy)



HeLa – ludzka linia komórek nowotworowych szyjki macicy

HIF-1 $\alpha$  – czynnik indukowany hipoksją 1 $\alpha$

HIV – ludzki wirus niedoboru odporności

HT29 – linia komórkowa ludzkiego gruczolaka jelita

Huh7 – linia komórkowa ludzkiego raka wątroby

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa

HPPR – reduktaza hydroksyfenylopirogronianowa

HUVECs - ludzkie komórki śródbłonkowe żyły pępowinowej

IAA – kwas indoilo-3-octowy

IC<sub>50</sub> – połowa maksymalnego stężenia hamującego

IFN- $\gamma$  – interferon  $\gamma$

IGFBP3 – białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu

L929 – linia komórkowa mysich fibroblastów

IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 – interleukina 1 $\beta$ , 6, 8

iNOS – indukowalna syntaza tlenku azotu

LED – dioda elektroluminescencyjna (ang. *light-emitting diode*)

LoVo – ludzka linia komórek gruczolaka okrężnicy

LOX-1 – ang. *lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1*

LPS – lipopolisacharyd

LS – izomer kwasu litospermowego

MBC – minimalne stężenie bakteriobójcze

MCP-1 – białko chemotaktyczne monocytów-1

MDA – aldehyd malonowy

MDA-MB-468 – ludzka linia komórkowa raka gruczołu sutkowego

MDA-MB-231 – linia ludzkiego gruczolakoraka piersi

MEP – plastydowy szlak niezależny od mewalonianu

MFC – minimalne stężenie grzybobójcze

MG63 – ludzka linia komórkowa kostniakomięsa

MHCC97-h – ludzka linia komórkowa raka wątrobowokomórkowego

MIC – minimalne stężenie hamujące

MJA – jasmonian metylu

MMP-1 – metaloproteinaza macierzy 1

MMP-9 – metaloproteinaza macierzy 9

MR – rozmarynian metylu

MS – podłoże wg Murashige-Skoog'a

m-Top – meta-topolin

MTT – bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazolinowy

MUC-1 – mucyna 1

MVA – cytoplazmatyczny szlak mewalonowy/izoprenoidowy

NADH – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy

NBT – błękit nitrotetrazolinowy

NF- $\kappa$ B – jądrowy czynnik transkrypcyjny NF

NSCLC – niedrobnokomórkowy rak płuc

NOX-2 – oksydaza NADPH 2

NOX-4 – oksydaza NADPH 4

Nrf-2 – czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2

OSI – indeks stresu oksydacyjnego

PAL – liaza fenyloalaninoamoniowa

PCR – reakcja łańcuchowej polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)

PLS – izomer kwasu protolitospermowego

PPAR $\gamma$  – receptor aktywowany proliferatorami peroksysomów  $\gamma$

PTP – ang. *pollen-tube pathway*

RA – kwas rozmarynowy

RAH – heksoza kwasu rozmarynowego

RAS – syntaza kwasu rozmarynowego

RBL-2H3 – szczurza linia komórkowa białaczki bazofilowej

ROS – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)

SAA – kwas salwianolowy A

SAB – kwas salwianolowy B

SAE – kwas salwianolowy E

SAF – kwas salwianolowy F

SAK – kwas salwianolowy K

SARS-CoV-2 – drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego

Sirt1 – sirtuina 1

SH – podłoże wg Schenk’a i Hildebrandt’a

SM – sucha masa

SOD – dysmutaza ponadtlenkowa

ŚM – świeża masa

TIIA – tanszinon IIA

*t-A* – *trans*-anetol

TAC – całkowity potencjał antyoksydacyjny

TAT – aminotransferaza tyrozynowa

TBARS – substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym (ang. *thiobarbituric acid reactive substances*)

TGF-1 $\beta$  – transformujący czynnik wzrostu 1 $\beta$

TNF- $\alpha$  – czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$

TNBC – komórki potrójnie negatywnego raka piersi

TOA – całkowita aktywność oksydacyjna

TPC – całkowita zawartość polifenoli (ang. *total polyphenol content*)

TPTZ – 2,4,6-tris(2-pirydylo)-s-tiazyna

UHPLC–PDA–ESI–MS – ultra wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrem mas

WP – podłoże Woody-Plant

VEGF – czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego

YE – ekstrakt drożdżowy

## 2. Wstęp

### 2.1. Systematyka i charakterystyka morfologiczna *Salvia bulleyana* Diels.

*Salvia bulleyana* Diels. (戟叶鼠尾草 *ji ye shu wei cao*; Zi Danshen) jest rośliną należącą do klasy dwuliściennych (*Magnoliopsida*), rzędu jasnotowców (*Lamiales*), rodziny jasnotowatych (*Lamiaceae*), rodzaju szalwii (*Salvia*). Wraz z 83 innymi gatunkami szalwii, *S. bulleyana* naturalnie występuje w Chińskiej Republice Ludowej. Według Flory Chińskiej gatunki szalwii występujące w Chinach są podzielone na cztery podrodzaje: *Salvia*, *Sclarea*, *Jungia* i *Allagospadonopsis* (Li i in., 2010). *S. bulleyana* należy do podrodzaju *Salvia*, do sekcji *Eurysphace* obok takich gatunków jak *S. castanea* Diels, *S. flava* Forrest ex Diels, *S. roborowskii* Maxim. czy *S. przewalskii* Maxim. (Li i in., 2013a). Gatunek ten porasta górskie zbocza położone na wysokości 2100-3400 m n.p.m. w prowincji Yunnan zlokalizowanej w południowo-zachodniej części Chin (Xu i in., 2018).



Fotografia 1. *Salvia bulleyana*.

*Salvia bulleyana* (fotografia 1) jest rośliną wieloletnią, kwitnącą i owocującą w sierpniu. Jej łodyga jest rozgałęziona, w górnej części gęsto pokryta brązowożółtymi włoskami gruczołowymi, a jej dolna część jest gładka. Liście łodygowe położone są naprzeciwlegle; mają ogonki liściowe o długości 0,5-12 cm. Blaszka liściowa ma kształt jajowaty lub trójkątno-jajowaty oraz wymiary 2,5-6 cm. Brzuszna strona liścia jest delikatnie owłosiona, a grzbietowa pokryta jest jedynie na nerwach nielicznymi fioletowo-brązowymi włoskami gruczołowymi. Nasada blaszki liściowej jest sercowata lub strzałkowata, brzeg

ząbkowany bądź ząbkowano-piłkowany, a szczyt zaokrąglony lub lekko zaokrąglony. Kwiatostany typu grono lub wiecha są gęsto pokryte brązowo-żółtymi włoskami. Podsadki są szeroko-jajowate lub jajowate, wielkości 1 cm. Kwiaty ułożone są po 4 w nibyokółkach. Kielich jest dzwonkowaty, dwuwargowy wielkości ok. 1 cm, pokryty żółto-brązowymi włoskami oraz nielicznymi fioletowo-brązowymi włoskami gruczołowymi. Górna warga jest szeroko trójkątnie-jajowata, ostro zakończona o wymiarach 4x7 mm. Dolna z kolei jest ząbkowana, również ostro zakończona, wielkości 5x7 mm. Korona jest dwuwargowa, ok. 2 cm o fioletowo-niebieskiej barwie. Jest ona na zewnątrz owłosiona, w szczególności w części grzbietowej. Rurka korony o długości ok. 1,5 cm jest zwężona u dołu, rozszerza się pod kielichem i jest delikatnie zaokrąglona u szczytu. Wewnątrz znajduje się niewyraźny pierścień włosków. Warga górna ma wielkość ok. 5 mm, a dolna jest niewiele dłuższa. Środkowy płatek ma kształt wachlarzykowaty, a boczne są niewyraźnie owalne. Roślina posiada 2 pręciki, których nitki mają długość 5 mm, a łączniki 8 mm. Słupek jest górny. Owocem jest rozłupnia, wielkości ok. 1,5 cm, barwy brązowej, pokryta fioletowymi plamkami. Korzenie są barwy brązowo-czarnej („Flora of China”, 2008; Xu i in., 2018).

*S. bulleyana* jest gatunkiem mało rozpowszechnionym i rozpoznawalnym na kuli ziemskiej. W związku z czym jest często mylona z *Salvia flava*, która również naturalnie występuje w Chinach, w prowincji Yunnan i Syczuan. Cechą różnicującą te dwa gatunki jest barwa kwiatu, która w przypadku *S. bulleyana* jest fioletowoniebieska, a u *S. flava* żółta lub żółto-brązowa z fioletową plamką na środkowym płatku dolnej wargi. Według Flory Chińskiej *S. flava* jest ściśle spokrewniona z *S. bulleyana* („Flora of China”, 2008). W krajach europejskich można zakupić nasiona *S. flava* pod nazwą *S. bulleyana*.

## **2.2. Zastosowanie *S. bulleyana* w medycynie tradycyjnej.**

Według danych literaturowych, przez tysiące lat wiele gatunków szalwii było wykorzystywanych w medycynie ludowej na całym świecie w ponad sześćdziesięciu różnych schorzeniach (Li i in., 2013b). Najprawdopodobniej z tego względu nazwę rodzajową *Salvia* zaczerpnięto od łacińskiego słowa *salvare*, które oznacza „leczyć”, a jednym z najpowszechniejszych gatunków występujących w Europie jest szalwia lekarska – *Salvia officinalis* L. W Farmakopei Polskiej XII możemy odnaleźć monografię surowca jakim jest liść szalwii lekarskiej – *Salviae officinalis folium*, który jest stosowany jako remedium w stanach zapalnych przewodu pokarmowego i jamy ustnej, w nadmiernej

potliwości, w mieszankach przeciwcukrzycowych oraz jako środek odkażający (Sharma i in., 2019). Na polskim rynku obecne są preparaty, zawierające ten surowiec, których zastosowanie i skuteczność opiera się na doświadczeniu i wielowiekowym stosowaniu. Oprócz liścia szałwii lekarskiej, w Farmakopei Polskiej XII oraz Farmakopei Europejskiej XI znajdują się również monografie takich surowców jak: olejek eteryczny szałwii lawendolistnej – *Salviae lavandulifoliae aetheroleum*, olejek eteryczny szałwii muszkatołowej – *Salviae sclareae aetheroleum*, liść szałwii greckiej – *Salviae trilobae folium*, nalewka szałwiowa – *Salviae tinctura* oraz korzeń wraz z kłączem szałwii czerwonokorzeniowej – *Salviae miltiorrhizae radix et rhizoma*.

W Chinach od tysięcy lat w różnych schorzeniach wykorzystuje się około 40 gatunków szałwii. Jako surowce były wykorzystywane: korzenie wraz z kłączami (27), ziele (15), nasiona i owoce (3), kwiaty (2), liście (1) oraz mieszaniny korzeni i liści (1). Najczęściej przygotowywano z nich wywary oraz napary (Li i in., 2013a). Jednym z najlepiej poznanych chińskich gatunków jest szałwia czerwonokorzeniowa (*S. miltiorrhiza* Bunge), której wysuszone i sproszkowane korzenie oraz kłącza są znane jako *Danshen* i posiadają swoją monografię w Farmakopei Chińskiej Republiki Ludowej. Pierwsze doniesienia o tym surowcu pochodzą z wczesnego okresu panowania Dynastii Han, z dzieła *Shennong Bencaojing* (神農本草經/*Classic of the Materia Medica/Shen-nong's Herbal Classics*, 102 – 200 A.D.) (Li i in., 2008a). Jednakże w związku z rozbieżnościami w opisach morfologicznych surowca pochodzących z czasów panowania różnych Dynastii, trudno było odróżnić *S. miltiorrhiza* od spokrewnionych z nią innych gatunków. W związku z czym, w różnych regionach Chin nie tylko korzenie szałwii czerwonokorzeniowej stosowano jako *Danshen* i nawet do dziś mamy do czynienia ze sprzedażą korzeni lokalnie występujących gatunków jako powyższego surowca.

Przyjmuje się, że około 20 gatunków (nie licząc podgatunków) było i jest stosowanych jako substytuty *Danshen*, a jednym z nich jest *Salvia bulleyana* (Li i in., 2013b, 2008a). Zgodnie z zaleceniami *Danshen* stosowany był przede wszystkim w chorobach układu krążenia, w tym w dusznicy bolesnej. Wykorzystywano go także jako środek leczniczy w zapaleniu i marskości wątroby, przy bolesnym miesiączkowaniu oraz w bezsenności (Kasimu i in., 1998; Li i in., 2008b). Ponadto, w medycynie ludowej stosowano ten surowiec w celu poprawy cyrkulacji krwi, aby zapobiec jej zastojom, w łagodzeniu bóli różnego pochodzenia, w chorobach nerek czy krwawych wymiotach.

Przypisywano mu również działanie wyciszające oraz relaksujące mięśnie i ścięgna (Li i in., 2013a).

Leki roślinne, również te, które wywodzą się z chińskiej medycyny ludowej cieszą się obecnie dużym zainteresowaniem. Biorąc pod uwagę skuteczność potwierdzoną wielowiekowym stosowaniem i niską toksyczność, tradycyjne formułacje i związki pochodzenia roślinnego dają nadzieję na wykorzystanie ich w leczeniu wielu jednostek chorobowych dotyczących współczesnego człowieka. Pierwszym chińskim ziołowym lekiem, który przeszedł trzecią fazę badań klinicznych i został zaaprobowany przez amerykańską Agencję Żywności i Leków jest bazujący na *Danshen*, Dantonic Pill (Compound Danshen Dripping Pill lub Cardiotonic Pill). Lek ten zawiera ekstrakt z korzeni *Salvia miltiorrhiza* (*Danshen*) oraz *Panax notoginseng* (Burkill) F. H. Chen (*Sanqi*) i syntetyczny borneol, a stosowany jest w leczeniu choroby niedokrwiennej serca i dusznicy bolesnej (Bu i in., 2020; Wang, 2010; Xu i in., 2018). W badaniu randomizowanym, przeprowadzonym metodą podwójnej ślepej próby wykazano, że stosowanie tego produktu może zredukować używanie nitrogliceryny o 25% w porównaniu do placebo oraz zmniejszyć częstotliwość napadów dusznicy bolesnej. Nie zaobserwowano istotnych działań niepożądanych podczas stosowania preparatu. Innym lekiem, wywodzącym się z Chińskiej Medycyny Tradycyjnej, który został zatwierdzony przez chińską Narodową Administrację Produktów Leczniczych jako produkt leczniczy zalecany w tych samych jednostkach chorobowych co Dantonic Pill, jest Qishen Yiqi dripping pill. Składnikami aktywnymi tego preparatu są: *Astragalus mongholicus* Bunge, *Salviae miltiorrhizae radix et rhizoma*, *Panax notoginseng* i olejek drzewny *Dalbergia*. Lek jest stosowany w leczeniu skojarzonym pacjentów cierpiących na chorobę niedokrwinną serca, u których został zdiagnozowany deficyt energii życiowej oraz zastoje krwi lub niedokrwieny zawał serca (Mao i in., 2020).



## 2.3. Metabolity wtórne *S. bulleyana*

### 2.3.1. Polifenole

#### 2.3.1.1. Kwasy fenolowe i ich pochodne

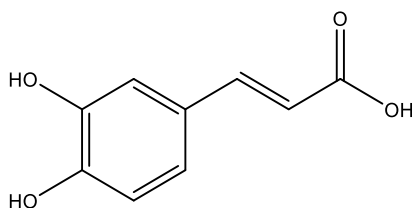
Fenolokwasy to grupa metabolitów wtórnych powszechnie występująca w świecie roślinnym, w cząsteczce których można wyróżnić hydroksylową grupę fenolową oraz grupę karboksylową. Najważniejszymi w tej grupie są związki będące pochodnymi kwasu benzoowego i cynamonowego. W chińskich gatunkach z rodzaju *Salvia* dominują związki będące połączeniami estrowymi, glikozydowymi lub depsydami kwasu kawowego, tj. kwasu 3,4-dihydroksycynamonowego. W zależności od liczby cząsteczek kwasu kawowego fenolokwasy można podzielić na monomery (tj. kwas kawowy czy salwianowy A), dimery (tj. kwas rozmarynowy), trimery (tj. kwas salwianolowy A, kwas litospermowy), tetrametry (kwas salwianolowy B) oraz inne oligomery (Kohlmünzer, 1998; Xu i in., 2018). Zawartość fenolokwasów w surowcach roślinnych jest zmienna, jednakże można przypuszczać, że ich rozpowszechnienie wśród gatunków z rodzaju szalwia może być istotne pod względem filogenetycznym.

W korzeniach i pędach *S. bulleyana* zidentyfikowano:

- ❖ kwas rozmarynowy
- ❖ kwas salwianolowy K oraz jego izomer
- ❖ kwas salwianolowy B oraz jego izomery
- ❖ izomery kwasu salwianolowego F
- ❖ kwas kawowy
- ❖ heksozę kwasu rozmarynowego
- ❖ kwas dehydrorozmarynowy
- ❖ rozmarynian metylu
- ❖ kwas junanowy E
- ❖ salwiaflazyd
- ❖ izomery kwasu litospermowego
- ❖ danszenu
- ❖ kwasy kawoilo-treonowe
- ❖ heksozę i pochodną kwasu synapinowego (Grzegorzczuk-Karolak i in., 2020b; Kasimu i in., 1998; Li i in., 2008b).

### 2.3.1.1.1. Kwas kawowy

Kwas kawowy (kwas 3,4-dihydroksycynamonowy; CA; rycina 1) należy do pochodnych kwasu cynamonowego, a w biosyntezie tego związku substratem jest fenyloalanina (rycina 3). W świecie roślinnym kwas kawowy występuje najczęściej w postaci depsydów, np. kwasu chlorogenowego czy rozmarynowego. Niemniej jednak spotyka się go także w postaci wolnej (Kohlmünzer, 1998). Wykazano też, że kwas kawowy wchłania się w jelicie cienkim znacznie lepiej w postaci wolnej (ok. 95%) niż związanej (ok. 33%) (Kołodziejczyk-Czepas i in., 2015).



Rycina 1. Struktura chemiczna kwasu kawowego.

Kwas kawowy posiada istotne aktywności biologiczne, wśród których można wyróżnić aktywność przeciwdrobnoustrojową, antyoksydacyjną, przeciwzapalną czy przeciwnowotworową.

W procesach fizjologicznych, reaktywne formy tlenu są produkowane podczas oddychania komórkowego w reakcjach katalizowanych przez oksydazy: ksantynową oraz NADPH, jak i syntazę tlenu azotu. Ponadto, do zwiększonej generacji ROS mogą prowadzić czynniki zewnętrzne takie jak promieniowanie UV, a także metabolizm ksenobiotyków i procesy zapalne przebiegające w organizmie (Kołodziejczyk-Czepas i in., 2015). W wyniku zaburzenia równowagi dochodzi do przewagi wytwarzania ROS nad ich neutralizacją przez mechanizmy ochronne komórek, co prowadzi do powstania stresu oksydacyjnego. Jest to stan, w którym dochodzi do uszkodzenia komórek oraz tkanek, który skutkuje stymulacją procesów patologicznych w organizmie. W związku z tym, istotna wydaje się być identyfikacja substancji mających aktywność przeciwutleniającą, do których należy kwas kawowy, kwas rozmarynowy oraz inne związki polifenolowe.

Aktywność przeciwutleniająca kwasów fenolowych opiera się na kilku różnego rodzaju mechanizmach. Związki te mogą być donorami elektronów czy atomów wodoru, przez co redukują wolne rodniki, a także mogą je wiązać poprzez stabilizację lub delokalizację niesparowanych elektronów. Kwasy fenolowe mogą działać jako inhibitory oksydaz, a także stabilizować wolne rodniki poprzez ich kompleksowanie. Ponadto, mogą

chelatować jony metali niezbędne w przebiegu reakcji utleniania (Parus, 2013). Działanie antyoksydacyjne kwasu kawowego bazuje zarówno na grupach hydroksylowych jak i ich lokalizacji w cząsteczce. Ugrupowania te są donorami protonów, co skutkuje tworzeniem się rodnika fenoksylogo, który jest stabilny oraz mało reaktywny (Kołodziejczyk-Czepas i in., 2015; Parus, 2013). CA jako donor wodoru zobojętniał rodnik DPPH. Gülçin (2006) zaobserwował, że aktywność kwasu kawowego w stężeniu 20 µg/ml wobec rodnika DPPH była większa niż BHA, BHT α-tokoferolu i troloksu, ale nieco mniejsza niż butylohydroksytoluenu zastosowanych w tym samym stężeniu (Gülçin, 2006). CA hamował także utlenianie kwasu linolowego w większym stopniu niż wszystkie powyższej wymienione znane antyoksydanty (Kołodziejczyk-Czepas i in., 2015). Paciello i wsp. (2020) sugerują, że suplementacja CA może wpływać łagodząco na indukowaną hałasem utratę słuchu i uszkodzenie ślimaka u szczurów. Mechanizm tej aktywności bazował na przeciwzapalnych i antyoksydacyjnych właściwościach CA, który obniżał ekspresję NF-κβ i IL-1β w ślimaku, a także redukował stres oksydacyjny i nitrozacyjny oraz peroksydację lipidów (Paciello i in., 2020). Stwierdzono, że CA hamował aktywność oksydazy ksantynowej w linii komórkowej raka nabłonka jelitowego na poziomie porównywalnym z allopurynolem, który jest silnym inhibitorem tego enzymu (Kołodziejczyk-Czepas i in., 2015).

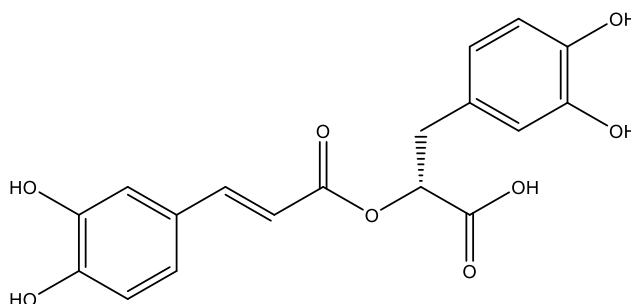
Kwas kawowy wykazywał aktywność cytotoksyczną w przypadku nowotworów: piersi, macicy, wątrobowokomórkowemu czy neuroblastomie (Mirzaei i in., 2021). Min i wsp. (2018) wykazali, że kwas kawowy w wysokich dawkach lub niższych, ale podawany wraz z paklitakselem hamował wzrost linii komórkowej H1299 niedrobnokomórkowego raka płuc i indukował apoptozę komórek nowotworowych (Min i in., 2018). Ponadto, w badaniach *in vitro* wykazano, że CA indukował apoptozę, pobudzał zatrzymanie cyklu komórkowego, a także zmniejszał przeżywalność oraz zdolność do tworzenia kolonii w przypadku linii komórkowej czerniaka (Pelinson i in., 2019).

Określano działanie przeciwbakteryjne CA wobec 23 szczepów *Staphylococcus aureus* pozyskanych klinicznie (Kępa i in., 2018). Okazało się, że poszczególne szczepy różniły się istotnie wrażliwością na kwas kawowy, a uzyskane wartości MIC wahały się w zakresie 0,256-1,024 mg/ml. Ponadto zaobserwowano synergistyczny efekt działania CA z wykorzystywanymi w leczeniu antybiotykami: erytromycyną, klindamycyną oraz cefoksytyną; niektóre szczepy gronkowca wykazały znacznie większą wrażliwość na antybiotyki w obecności kwasu kawowego (Kępa i in., 2018).

CA jak i jego pochodne zawierające część kawoilową wykazywały właściwości przeciwwirusowe w stosunku do wirusa opryszczki (*Herpes simplex*), grypy A, HIV czy wirusa nosówki psów. Ponadto zastosowanie kwasu kawowego w formie chelatów, a w szczególności połączeń z  $Fe^{3+}$ , zwiększało aktywność przeciwwirusową związku wobec wirusa opryszczki ludzkiej nawet stukrotnie. Działanie to związane było głównie z hamowaniem przyłączania wirusa do komórek gospodarza (Langland i in., 2018).

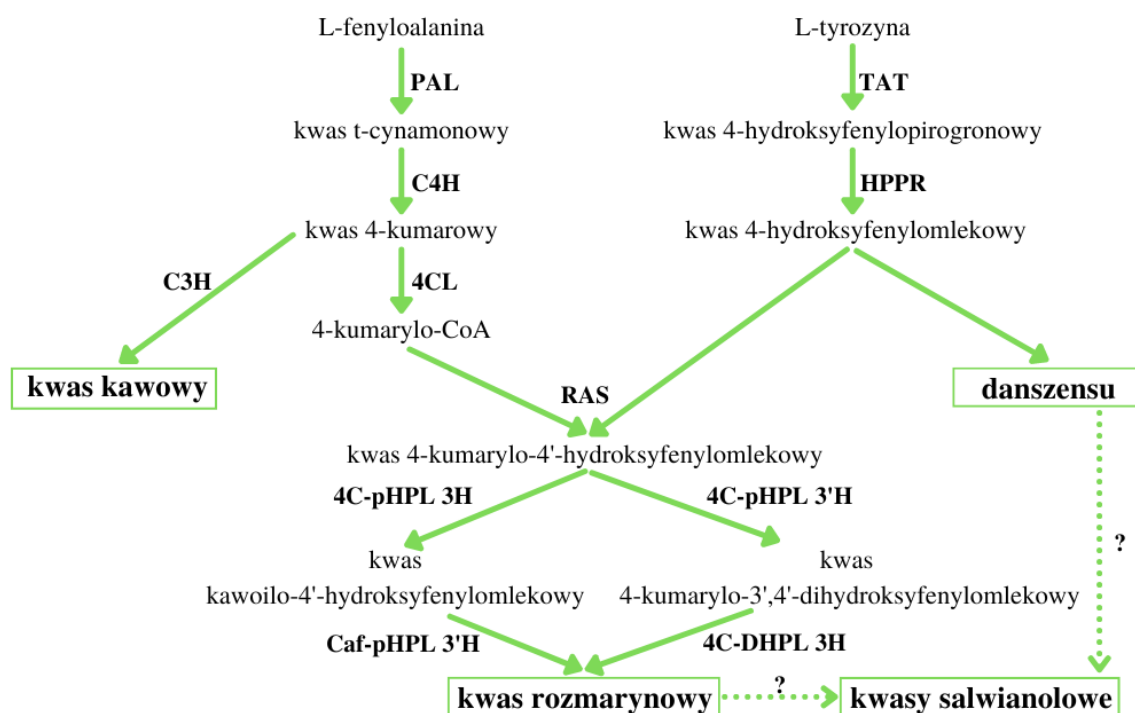
#### 2.3.1.1.2. Kwas rozmarynowy

Kwas rozmarynowy (RA) jest rozpuszczalnym w wodzie depsydem kwasu kawowego i kwasu  $\alpha$ -hydroksydihydrokawowego. Został po raz pierwszy wyizolowany w 1958 we Włoszech, z rozmarynu lekarskiego – *Rosmarinus officinalis* L. (rycina 2) (Scarpati i Oriente, 1958). Jest on w szczególności powszechny w roślinach z rodzin Jasnotowatych (*Lamiaceae*) i Ogórecznikowatych (*Boraginaceae*).



Rycina 2. Struktura chemiczna kwasu rozmarynowego.

Wiadomo, że substratami w procesie biosyntezy kwasu rozmarynowego są L-feniloalanina i L-tyrozyna, z których powstają odpowiednio pośrednie prekursorzy – 4-kumaryloCoA oraz kwas 4-hydroksyfenylomlekowy (rycina 3). Po raz pierwszy RA został zsyntetyzowany w 1991 roku i od tego czasu na drodze syntezy udało się też uzyskać jego pochodne – stereoizomery oraz ester metylowy (Petersen i Simmonds, 2003). Na przestrzeni lat zgłębiano przebieg biosyntezy tego związku w surowcach roślinnych, ale wciąż jest to pole do badań ze względu na możliwe różnice związane z aparatem enzymatycznym i alternatywnymi drogami metabolicznymi u poszczególnych grup roślin.



Rycina 3. Biosynteza kwasów fenolowych (Habtemariam, 2018; Li i in., 2020b; Petersen i in., 2009). **PAL** – liaza fenyloalaninoamoniowa; **C4H** – 4-hydroksylaza kwasu cynamonowego; **4CL** – ligaza hydroksycynamoil-CoA; **TAT** – aminotransferaza tyrozynowa; **HPPR** – reduktaza hydroksyfenylopirogrońianowa; **C3H** – 3-hydroksylaza 4-kumarowa; **RAS** – syntaza kwasu rozmarynowego; **3-H i 3'- 4C-pHPL** – 3/3'-hydroksylazy 4-kumarylo-4'-hydroksyfenylomlekowe; **Caf-pHPL 3'H** – 3'-hydroksylaza kawoilo-4'-hydroksyfenylomlekowa; **4C-DHPL 3H** – 3-hydroksylaza 4-kumarylo-3',4'-dihydroksyfenylomlekowa.

Kwas rozmarynowy jest związkiem dominującym w pędach oraz drugim, co do ilości w korzeniach *Salvia bulleyana* (Grzegorzczak-Karolak i in., 2020b). Posiada on szeroki wachlarz aktywności, które nie ograniczają się jedynie do lecznictwa, ponieważ RA może być wykorzystywany także w przemyśle spożywczym i kosmetycznym.

W badaniach *in vitro* porównano aktywność RA oraz innych naturalnych i syntetycznych przeciwutleniaczy takich jak kwas askorbinowy,  $\alpha$ -tokoferol i butylohydrotoluen wobec rodnika DPPH. Okazało się, że stężenie RA potrzebne do zubożenia wolnych rodników było niższe niż pozostałych związków i wynosiło  $2,9 \pm 0,3$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  (Tepe i in., 2007). W badaniach *in vivo* na szczurach, u których wywoływano niedokrwienie poprzez zastosowanie manewru Pringle'a, a następnie przywracano krążenie wykazano, że RA znacząco zmniejszał stres oksydacyjny (wyrażony za pomocą całkowitej

aktywności oksydacyjnej – TOA, całkowitego potencjału antyoksydacyjnego – TAC oraz indeksu stresu oksydacyjnego – OSI) i obniżał wartości parametrów wątrobowych (ALT, AST i MDA). Ponadto, związek ten ograniczał występowanie nieprawidłowości histopatologicznych w wątrobach szczurów z zespołem poreperfuzyjnym wątroby, co może świadczyć o potencjalnym działaniu hepatoprotekcyjnym kwasu rozmarynowego (Oğuz i in., 2020). Pérez-Fons i wsp. (2010) zasugerowali, że działanie antyoksydacyjne RA jest związane ze stabilizacją błon komórkowych i ograniczeniem tworzenia się wolnych rodników (Pérez-Fons i in., 2010). Standaryzowane wyciągi z *Thunbergia laurifolia* Lindl., które charakteryzowały się wysoką zawartością kwasu rozmarynowego i kawowego w komórkach ludzkich fibroblastów skóry, które poddawano działaniu nadtlenu wodoru i promieniowaniu UVA „zobojętniały” aniony ponadtlenkowe, hamowały peroksydację lipidów, produkcję ROS i MMP-1. Ponadto, oba te kwasy fenolowe chroniły przed degradacją kolagenu oraz hamowały tworzenie tlenku azotu i syntazy tlenku azotu w mysich makrofagach narażonych na działanie lipopolisacharydu oraz IFN- $\gamma$  (Pattananandecha i in., 2021). Dzięki tym właściwościom, standaryzowane ekstrakty bogate w kwas rozmarynowy i kawowy mogą znaleźć zastosowanie w kosmetykach chroniących przed promieniowaniem UV. W celu zwiększenia penetracji RA przez skórę przeprowadzono doświadczenie, w którym cząsteczki RA umieszczono w liposomach i etosomach. Zarówno jedna, jak i druga forma podania RA, oprócz zwiększonej biodostępności, wykazywała aktywność antyoksydacyjną oraz hamowała działanie kolagenazy i elastazy. Jednakże forma etosomów okazała się lepszym wyborem, ponieważ wykazywała lepsze parametry przechodzenia do głębszych warstw skóry. Badacze sugerują, że RA w formie etosomów może być skutecznym środkiem ochraniającym skórę przed ROS, a przez to, opóźniającym proces jej starzenia się (Yücel i in., 2019).

Raportowano również o możliwości wykorzystania RA, jak i ekstraktów bogatych w ten związek, do konserwacji żywności. Przeprowadzono analizy z wykorzystaniem różnych modeli żywnościowych, takich jak: napoje, nabiał, przetworzone mięso czy oleje jadalne. W badaniach oceniano stabilność i działanie RA oraz ekstraktu z rozmarynu jako antyoksydantów i stabilizatorów pigmentów w celu zabezpieczenia żywności przed utlenianiem podczas przechowywania (Marchev i in., 2021). W jednym z eksperymentów, RA dzięki zdolności „zmiatania” wolnych rodników zmniejszyła tworzenie się amin heterocyklicznych biorących udział w procesach karcynogenezy, które powstają podczas grillowania bądź gotowania mięsa w wysokich temperaturach (Brglez Mojzer i in., 2016).

Oprócz działania antyoksydacyjnego, warto pamiętać, że w przypadku konserwacji żywności istotne może być również działanie przeciwdrobnoustrojowe RA.

Kwas rozmarynowy charakteryzuje się właściwościami przeciwzapalnymi. Jego aktywność zaobserwowano w badaniach *in vitro* i *in vivo* w przebiegu takich jednostek chorobowych jak zapalenie stawów, okrężnicy, trzustki, w atopowym zapaleniu skóry, w chorobach przyzębia czy astmie (Luo i in., 2020a). W przypadku astmy alergicznej u myszy, RA okazał się czynnikiem ochronnym przed stresem oksydacyjnym i uszkodzeniami związanymi z toczącymi się w płucach procesami zapalnymi. Związek skutecznie zmniejszył liczbę komórek zapalnych (neutrofilii, limfocytów i eozynofili), produkcję interleukin IL-4, IL-5 i IL-3 oraz ekspresję oksydaz NADPH: NOX-2 i NOX-4 w tkankach. Ponadto, zwiększył on sekrecję IFN- $\gamma$ , aktywność SOD, GPx oraz CAT (Liang i in., 2020). Premedykacja z wykorzystaniem RA skutkowała zahamowaniem ekspresji cytokin prozapalnych (IL-6, TNF- $\alpha$ , CRP) oraz obniżeniem poziomu czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B w modelu poreperfuzyjnego uszkodzenia serca. Co więcej, RA zmniejszał obszar uszkodzenia mięśnia sercowego dzięki aktywacji PPAR $\gamma$  prowadząc do zahamowania aktywności czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B. W konsekwencji, dochodziło do supresji zarówno procesu zapalnego jak i apoptozy komórek mięśnia sercowego (Han i in., 2017). Tymczasem Chung i wsp. (2020) zasugerowali, że kwas rozmarynowy w formie nanocząsteczek może być środkiem wykorzystanym w leczeniu ostrego nieswoistego zapalenia jelit. Ta postać skutecznie „wymiałała” wolne rodniki tlenowe i chroniła komórki przed ich negatywnym działaniem. Ponadto, taka forma podania RA poprawiała farmakokinetykę tego związku i umożliwiała ukierunkowanie terapii na tkanki objęte procesem zapalnym, co może być punktem wyjściowym do rozszerzenia spektrum działania RA i użycia tego związku w innych schorzeniach (Chung i in., 2020).

Choroby neurodegeneracyjne charakteryzują się powolną i postępującą dysfunkcją neuronów, która jest indukowana przez procesy degeneracyjne zachodzące w komórkach centralnego układu nerwowego. Wśród przyczyn występowania tego typu chorób, wyróżnia się uwarunkowania genetyczne, a także czynniki niezwiązane z genomem, takie jak nieprawidłowości w układzie odpornościowo-zapalnym czy też stres oksydacyjny (Fachel i in., 2019). Działanie neuroprotekcyjne kwasu rozmarynowego zostało potwierdzone w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*. Co więcej, aktywność antyoksydacyjna i przeciwzapalna RA może przyczyniać się do pozytywnego oddziaływania tego związku w stanach patologicznych układu nerwowego. Fallarini i wsp. (2009) zaobserwowali, że RA wykazuje

działanie ochronne na neurony w trzech różnych modelach śmierci komórkowej jakimi były: stres oksydacyjny, toksyczność z pobudzenia oraz uszkodzenia związane z wystąpieniem zespołu poreperfuzyjnego. Premedykacja tym związkiem zwiększała poziom GSH wewnątrz komórek, hamowała peroksydację lipidów, zapobiegała przeładowaniu jonami wapnia oraz modulowała ekspresję genu c-fos (Fallarini i in., 2009). RA hamował procesy zapalne poprzez zmniejszenie ekspresji czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B oraz cytokin prozapalnych: IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i MCP-1 u szczurów z uszkodzeniem rdzenia kręgowego indukowanego laminektomią. Ponadto, redukował powstawanie ROS i peroksydację lipidów, a także usprawniał przebieg procesów antyoksydacyjnych poprzez zwiększenie ekspresji Nrf-2 (Shang i in., 2017). W badaniach *in vivo* na szczurach z chorobą Parkinsona wywołaną 6-hydroksydopaminą (6-OHDA), RA obniżał poziom żelaza w istocie czarnej oraz regulował ekspresję genów Bcl-2/Bax, dzięki czemu wykazywał działanie neuroprotektcyjne na nigrostriatalny szlak dopaminergiczny (Wang i in., 2012). Okazało się także, że RA zapobiegał utracie neuronów w hipokampie w przebiegu padaczki skroniowej wywołanej kwasem kainowym u szczurów. Pod wpływem RA zaobserwowano ograniczenie częstości ataków, złagodzenie stresu oksydacyjnego i peroksydacji lipidów (Khamse i in., 2015). Pojawiły się również doniesienia o aktywności RA związanej z zapobieganiem chorobie Alzheimera. Potencjał RA na tym polu wiąże się m. in. z antagonizmem  $\beta$ -amyloidu, zahamowaniem hiperfosforylacji białka tau czy inhibicją acetylo- i butyrylocholinoesterazy (Habtemariam, 2018). Powyższe wyniki sugerują, że mechanizmy aktywności neuroprotektcyjnej kwasu rozmarynowego są różnorodne i może on być potencjalnym środkiem leczniczym w terapii różnych schorzeń układu nerwowego.

Nowotwory, oprócz chorób sercowo-naczyniowych, są obecnie jednymi z najczęstszych przyczyn zgonów na świecie. Jednak pomimo znaczącego rozwoju medycyny w kierunku terapii celowanej, chemio- i radioterapii czy samych zabiegów operacyjnych, w dalszym ciągu poszukuje się nowych skutecznych związków o właściwościach cytotoksycznych oraz o jak najslabszych efektach ubocznych. W tym celu prowadzi się również badania z wykorzystaniem znanych już substancji, zarówno pochodzenia syntetycznego jak i naturalnego. Również kwas rozmarynowy był oceniany w tym zakresie. Wyniki analiz wskazują na potencjał cytotoksyczny tego związku.

Badanie na dwóch liniach komórkowych potrójnie negatywnego raka piersi wykazało wpływ RA na ekspresję genów związanych z apoptozą komórek rakowych. Co ciekawe, związek ten różnie oddziaływał na poszczególne linie komórkowe; jego



działanie polegające na zatrzymaniu procesu mitozy i indukowaniu apoptozy było silniejsze w przypadku komórek linii MDA-MB-468 niż MDA-MB-231. W przypadku komórek linii MDA-MB-468, RA nasilał również ekspresję proapoptycznych genów BNIP3, TNF i GADD45A oraz hamował aktywność antyapoptotycznej proteiny BIRC5 (Messeha i in., 2020). W przypadku nowotworu okrężnicy i odbytu, RA hamował proliferację komórek raka poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego i pobudzanie apoptozy. Ponadto, zmniejszał on zdolność do przerzutów, ograniczał zjawisko przejścia epithelialno-mezenchymalnego, migrację i inwazję poprzez aktywację AMPK (Han i in., 2018). Ma i wsp. (2020) wykazali, że kwas rozmarynowy hamował proliferację, indukował apoptozę i zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M oraz modyfikował inwazję, migrację i EMT również w przypadku komórek kostniakomięsaka. Działanie to związane jest najprawdopodobniej z hamowaniem funkcji białka DJ-1, które jest potencjalnym onkogenem związanym z wieloma procesami biologicznymi (Ma i in., 2020). Z kolei Radziejewska i wsp. (2021) zaproponowali terapię skojarzoną z udziałem RA oraz przeciwciał anti-MUC1, co okazało się być skuteczniejsze niż monoterapia tymi związkami zastosowana w przypadku linii komórkowej raka żołądka (Radziejewska i in., 2021). Jednoczesne zastosowanie obu środków zmniejszało ekspresję MUC1, której nadekspresja jest obserwowana w wielu typach nowotworów i która bierze udział w przekazywaniu sygnałów w procesach ich rozwoju. Ponadto, mucyna 1 utrudnia przenikanie terapeutyków do komórek raka (Gornowicz i in., 2019). Terapia skojarzona RA i przeciwciała anti-MUC1 stymulowała także produkcję czynników proapoptotycznych (Bax, Bad) oraz aktywność kaspazy-3 i 9, a hamowała ekspresję czynników antyapoptotycznych, enzymów odpowiedzialnych za produkcję antygenów związanych z nowotworem jak i czynników biorących udział w metastazie (Radziejewska i in., 2021).

Chorobą metaboliczną dotykającą coraz większy odsetek społeczeństwa w krajach wysoko rozwiniętych jest cukrzyca będąca zaburzeniem wydzielania i/lub działania insuliny. W badaniach *in vitro* i *in vivo* kwas rozmarynowy wykazał potencjalną aktywność przeciwcukrzycową. Stwierdzono, że jest on inhibitorem DPP-IV oraz stymuluje pobór glukozy przez komórki mięśniowe poprzez aktywację fosforylacji AMPK. Ponadto, RA regulował poziom glukozy w osoczu i zwiększał wrażliwość na insulinę w przebiegu hiperglikemii (Ngo i in., 2018).

Slobodníková i wsp. (2013) ocenili aktywność przeciwbakteryjną RA wobec 16 szczepów *Staphylococcus aureus* pozyskanych w warunkach klinicznych. Wartości

minimalnego stężenia hamującego i minimalnego stężenia bakteriobójczego wahały się w granicach 0,625-1,25 mg/ml. Co więcej, naukowcy zbadali wpływ RA na biofilm bakteryjny, który jest osiadłym skupiskiem mikroorganizmów należących do jednego lub wielu gatunków, którego strukturę stabilizują wydzielane pozakomórkowo związki polimeryczne. Bardzo istotny jest fakt, że wchodzące w jego skład drobnoustroje są często bardziej inwazyjne i przez to zdolne do wywoływania groźnych zakażeń u człowieka (Kołwzan, 2011). Funkcją biofilmu jest także ochrona mikroorganizmów przed czynnikami zewnętrznymi, np. antybiotykami, których minimalne stężenia potrzebne do eradykacji tej formy zakażenia zazwyczaj muszą być kilkukrotnie wyższe niż wartości MIC stosowane w przypadku komórek występujących w stanie wolnym. RA ograniczał tworzenie biofilmu przez *S. aureus* jedynie podczas zastosowania we wczesnych fazach tworzenia się tej struktury (Slobodníková i in., 2013). W innych badaniach RA zmniejszała ryzyko rozwinięcia się zapalenia płuc wywołanego przez metycylinooporny szczep *S. aureus*. Aktywacja jądrowego czynnika transkrypcyjnego Nrf-2, która następowała po zastosowaniu RA, inicjowała ścieżki auto- i mitofagii w celu wzmocnienia aktywności bakteriobójczej makrofagów oraz złagodzenia stresu oksydacyjnego w mitochondriach, co prowadziło do przyspieszonej eradykacji bakterii, zniesienia stanu zapalnego i powrotu do zdrowia (Zhang i in., 2021). Ciekawe wnioski przedstawili Bittner Fialová i wsp. (2019), ponieważ zgodnie z ich badaniami, sole fosfonowe (RAP1 i RAP2) kwasu rozmarynowego mają zdecydowanie wyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową przeciwko bakteriom *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* niż RA w czystej postaci. Wartości MIC otrzymane dla soli RA wahały się w granicach od 0,05 do 0,74  $\mu\text{M}$  i były niższe od tych, otrzymanych dla RA (1,73-3,47  $\mu\text{M}$ ) o od 4 do nawet 70 razy w zależności od szczepu bakterii jak i pochodnej kwasu (Bittner Fialová i in., 2019).

Kwas rozmarynowy jak i jego pochodne wykazały także właściwości przeciwgrzybicze. W przypadku *Trichoderma viridae*, *Mucor racemosus* oraz *Candida albicans* wartości MIC soli RA, zarówno RAP1 jak i RAP2 były ponownie 2-14 razy niższe niż dla samego RA. Co więcej, związki te wykazały umiarkowaną aktywność przeciwpierwotniakową wobec *Acanthamoeba* spp (Bittner Fialová i in., 2019). Oceniono także wpływ kwasu rozmarynowego na pierwotniaki z rodzaju *Leishmania*: *L. major*, *L. donovani*, *L. guyanensis*, *L. killicki*. RA wykazał umiarkowane działanie wobec postaci amastigota badanych gatunków pasożyta, ponieważ otrzymane wartości MIC wynosiły

59,2-84,2 nM i były 5-8-krotnie wyższe niż wartości otrzymane dla związku referencyjnego jakim był Pentostam (Radtko i in., 2003).

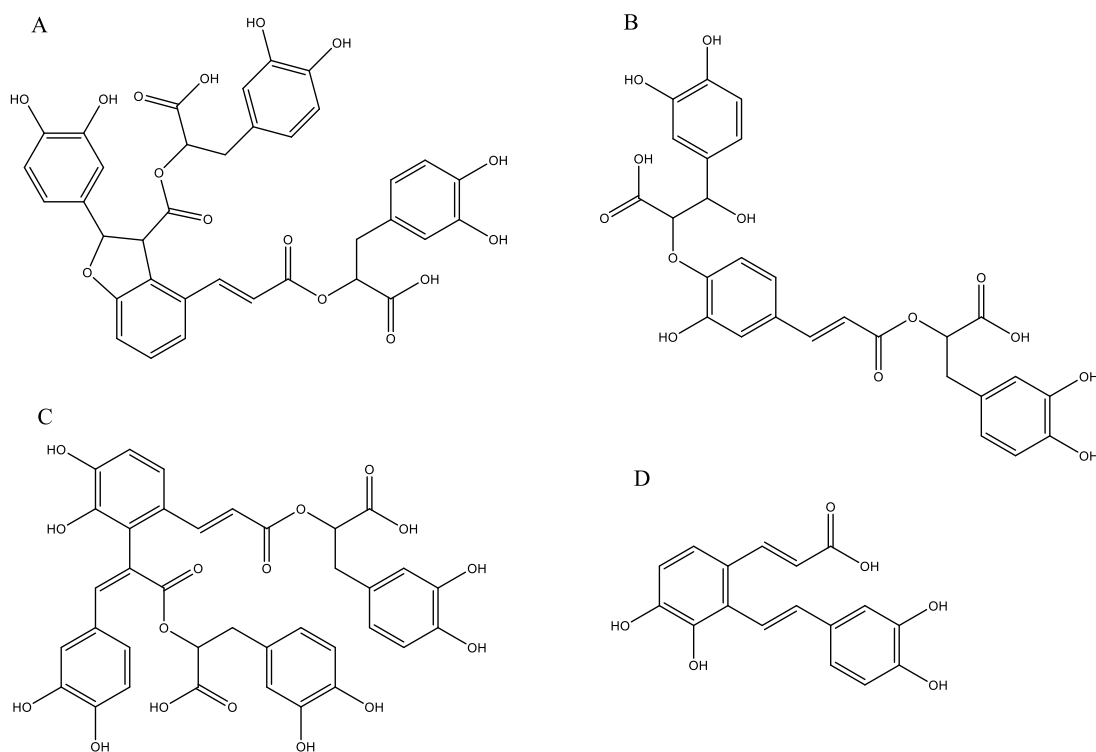
Są również doniesienia na temat przeciwwirusowej aktywności RA. W badaniach *in vivo* na myszach kwas rozmarynowy ograniczał replikację wirusa japońskiego zapalenia mózgu w komórkach mózgowych oraz wtórną reakcję zapalną związaną z aktywacją mikrogleju (Swarup i in., 2007). Astani i wsp. (2014) zaobserwowali, że RA hamuje wiązanie wirusa opryszczki ludzkiej (*Herpes simplex*) do komórek gospodarza w sposób dawkozależny, zarówno w przypadku szczepów wrażliwych jak i opornych na leczenie acyklowirem (Astani i in., 2014). RA wykazał również szeroką aktywność przeciwwirusową w badaniach *in vitro* i *in vivo* wobec enterowirusa A71 mogącego wywołać chorobę dłoni, stóp i jamy ustnej (Hsieh i in., 2020; Lin i in., 2019). Ostatnie badania wskazują także na powinowactwo RA do białka S wirusa SARS-CoV-2, które odpowiada za łączenie się z błoną komórkową komórek gospodarza. Takie oddziaływanie może przyczyniać się do ograniczenia zaraźliwości wirusa, poprzez ograniczenie jego wnikania do organizmu (Elebeedy i in., 2021). Co więcej, Kumar i wsp. (2021), wykorzystując metodę dokowania molekularnego, wskazali na potencjał RA do wiązania białka Nsp15 wirusa SARS-CoV-2, które bierze udział w jego replikacji skutkiem czego dochodzi do zahamowania jego namnażania (Kumar i in., 2021).

#### **2.3.1.1.3. Kwasy salwianolowe**

Kwasy salwianolowe są związkami rozpuszczalnymi w wodzie, w większości należącymi do oligomerów kwasu kawowego. Najprawdopodobniej w syntezie części z nich, substratem pośrednim mogą być cząsteczki kwasu rozmarynowego (rycina 2). Tak jak sam RA, posiadają one różnorodną aktywność biologiczną, w tym antyoksydacyjną, przeciwwirusową, ochronną na układ sercowo-naczyniowy a także przeciwnowotworową. Pośród obecnych w *Salvia bulleyana* kwasów salwianolowych największe zainteresowanie wzbudza kwas salwianolowy B (litospermowy B, SAB) (rycina 4) – strukturalny dimer kwasu rozmarynowego, który jest polifenolem dominującym w oryginalnym *Danshen* i którego zawartość w surowcu jest określona w Farmakopei Chińskiej. Związek ten posiada przede wszystkim istotną aktywność biologiczną w obszarze ochrony mięśnia sercowego.

Choroby układu krążenia, określane także mianem chorób sercowo-naczyniowych są jedną z głównych przyczyn zgonów zarówno na świecie jak i w Polsce. Wykazano, że

niektóre kwasy salwianolowe mają działanie protekcyjne na układ sercowo-naczyniowy. Li i wsp. (2020) zaobserwowali, że podaż SAB łagodziła dysfunkcję lewej komory, jej przebudowę oraz zmniejszała odkładanie się kolagenu w sercach myszy, u których sztucznie indukowano cukrzycę. Naukowcy sugerują, że działanie to może być związane z pobudzeniem procesów angiogenezy oraz zwiększeniem ekspresji receptora i czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) w sposób dawkozależny. Ponadto, SAB obniżał ekspresję białka wiążącego insulinopodobny czynnik wzrostu (IGFBP3) (Li i in., 2020a). Powyższe obserwacje wskazują na możliwość zastosowania SAB w terapii kardiomiopatii cukrzycowej. Premedykacja kwasem salwianolowym B ochraniała mięsień sercowy przed cytotoksycznym działaniem cisplatyny u myszy poprzez ograniczenie apoptozy i dysfunkcji komórek serca. Ponadto, zastosowanie SAB powodowało złagodzenie stresu oksydacyjnego wywołanego przez reaktywne formy tlenu powstające w kardiomiocytach pod wpływem stymulacji cytostatykiem. W warunkach *in vivo* zaobserwowano zmniejszenie pod wpływem SAB poziomu aldehydu dimalonowego w tkankach oraz pobudzenie ekspresji czynnika transkrypcyjnego Nrf-2, który bierze udział regulacji ekspresji genów kodujących oksydoreduktazę. W warunkach *in vitro*, kwas salwianolowy B podnosił dodatkowo aktywność SOD (Lin i in., 2021). SAB wykazywał także zdolność do inhibicji szlaku NF- $\kappa$ B, co prowadziło do złagodzenia zwłóknienia mięśnia sercowego wywołanego działaniem angiotensyny II (Wang i in., 2018). Co więcej, stwierdzono korzystne działanie tego związku na serca szczurów po uszkodzeniu poreperfuzyjnym. SAB łagodził stres oksydacyjny, redukował przeładowanie jonami wapnia oraz poprawiał czynność śródbłonna (Xue i in., 2014). Podobny potencjał ochronny na mięsień sercowy stwierdzono w przypadku innych kwasów fenolowych. Lv i wsp. (2021), po przeanalizowaniu składu kapsułek Naoxintong stosowanych w chorobie niedokrwiennej serca, przeprowadzili badania mające na celu określenie, które związki w największym stopniu przyczyniały się do aktywności farmakologicznej tego leku. Zaobserwowano, że poza kwasem salwianolowym B między innymi kwasy: salwianolowy E (SAE) i F (SAF) (rycina 3) miały zdolność do hamowania zarówno ekspresji NF- $\kappa$ B, MMP-9 jak i wytwarzania tlenku azotu w komórkach. Ponadto, działały one synergistycznie wraz z innymi składnikami tego leku (Lv i in., 2021).



Rycina 4. Struktury chemiczne kwasów: salwianolowego B (A); salwianolowego K (B); salwianolowego E (C); salwianolowego F (D).

Raportowano również o potencjale przeciwnowotworowym kwasów salwianolowych, a w szczególności kwasu salwianolowego B i A (SAA). Wykazano, że SAB hamował proliferację oraz indukował apoptozę linii komórkowej MG63 kostniakomięsaka. Przypuszcza się, że działanie to jest związane z aktywacją białka p38 regulującego generowanie ROS w komórkach nowotworowych (Zeng i in., 2018). Z kolei, w przypadku dwóch linii komórkowych raka okrężnicy HCT116 oraz HT29, SAB indukował śmierć komórkową i pobudzał ich autofagię poprzez supresję szlaku sygnałowego AKT/mTOR (Jing i in., 2016). Najprawdopodobniej na drodze indukowania apoptozy, redukcji stresu oksydacyjnego, zahamowaniu stanu zapalnego oraz angiogenezy, SAB wykazał także aktywność cytotoksyczną skierowaną przeciwko komórkom raka piersi (Katarý i in., 2019). Pojawiły się doniesienia, że SAB pobudza apoptozę oraz ogranicza proliferację komórek potrójnie negatywnego raka piersi (TNBC) poprzez regulację funkcjonowania enzymów odpowiadających za glikozylację ceramidów (Sha i in., 2018).

Aktywność kwasu salwianolowego B nie ogranicza się jednak tylko do wyżej opisanych. Ma on potencjalne działanie ochronne przeciwko ototoksycznemu działaniu cisplatyny oraz antybiotyków aminoglikozydowych głównie poprzez hamowanie produkcji ROS i ograniczenie mitochondrialnej apoptozy (Zheng i in., 2020). W doświadczeniach na

szczurach z indukowaną stresem depresją SAB w połączeniu z fluoksetyną wykazywał działanie przeciwdepresyjne i zwiększał funkcje poznawcze (Yu i in., 2016). Ponadto, Zhou i wsp. (2019) sugerują, że suplementacja SAB może działać ochronnie przeciwko uszkodzeniom związanym z promieniowaniem  $\gamma$ . Suplementacja SAB u myszy wystawionych na działanie promieniowania skutkowało wzrostem liczby elementów morfotycznych krwi: białych i czerwonych krwinek oraz płytek krwi we krwi obwodowej. Co więcej, pod wpływem SAB zanotowano obniżenie poziomu aldehydu malonowego oraz aktywację Nrf2-zależnego szlaku antyoksydacyjnego, a także podwyższenie wartości indeksów grasicy i śledziony wyrażanych jako masa organu (mg) dzielona przez masę ciała (g) (Zhou i in., 2019).

W literaturze można także odnaleźć doniesienia o potencjalnym zastosowaniu kwasów salwianolowych jako środków przeciwdrobnoustrojowych. Kwas salwianolowy B, w postaci 70% oczyszczonego ekstraktu z korzeni *S. miltiorrhiza*, hamował wiązania dwoinek zapalenia opon mózgowych (*Neisseria meningitidis*) do komórek gospodarza, co może przyczyniać się do obniżenia infekcyjności tych bakterii (Huttunen i in., 2016). Co więcej, na podstawie analiz komputerowych stwierdzono, że SAB może być potencjalnym lekiem w terapii COVID-19, dzięki zdolności wiązania specyficznego białka 3CLpro – biorącego udział w replikacji oraz białka kolca odpowiedzialnego za wnikanie do organizmu gospodarza (Elmaaty i in., 2021).

W korzeniach z gleby *S. bulleyana* dominuje kwas salwianolowy K (SAK) (rycina 3) (Grzegorzczak-Karolak i in., 2020b), na temat którego nie ma dotychczas wielu doniesień. Można jednak przypuszczać, że będzie on wykazywał zbliżone właściwości do pozostałych związków z tej grupy. Kwas salwianolowy K okazał się mieć potencjalne działanie głównie przeciwko postaciom amastigota pierwotniaków z rodzaju *Leishmania* (*L. major*, *L. donovani*, *L. guyanensis*, *L. killicki*). Wartości  $IC_{50}$  uzyskane dla tego związku (13,3-18,3 nM), były niewiele wyższe niż te dla preparatu kontrolnego (10,1-11,2 nM), którym był stosowany w leczeniu leiszmanioz, niedopuszczony do obrotu w Polsce, Pentostam zawierający antymonoglukonian sodu. Co więcej, SAK miał najsilniejsze działanie spośród wykorzystanych w tym badaniu kwasów salwianolowych. Jedynie ester metylowy kwasu salwianolowego I okazał się bardziej skuteczny od SAK w przypadku *L. major* i *L. killicki* (Radtke i in., 2003).

### 2.3.1.2. Flawonoidy

Flawonoidy są polifenolami, które mają charakter barwników, a ich podstawowy szkielet jest zbudowany z 15 atomów węgla. Jest to grupa związków bardzo rozpowszechniona w świecie roślinnym, a w szczególności wśród roślin kwiatowych. W postaci glikozydów są one z reguły rozpuszczalne w wodzie. Z kolei ich aglikony rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych.

W pędach *S. bulleyana* stwierdzono obecność następujących pochodnych flawonu:

- ❖ *O*-ramnoheksozyd luteoliny
- ❖ *O*-heksuronid luteoliny
- ❖ *O*-heksozydo-*O*-heksuronid luteoliny
- ❖ *O*-heksozydo-*O*-heksuronid hydroksyluteoliny
- ❖ *O*-diheksozydo-*O*-heksuronid hydroksyluteoliny
- ❖ *O*-ramnoheksozyd trihydroksyflawonu
- ❖ *O*-ramnoheksozyd trihydroksymetoksyflawonu
- ❖ *O*-heksuronid trihydroksyflawonu (Grzegorzczuk-Karolak i in., 2020b).

Flawonoidy posiadają szerokie spektrum aktywności, których specyfika i siła działania są zależne od struktury chemicznej poszczególnych związków. Większość wykrytych do tej pory w surowcu flawonoidów stanowią pochodne luteoliny i hydroksyluteoliny. Luteolina jest flawonem o czterech grupach hydroksylowych. Opisano jej działanie przeciwzapalne, antyoksydacyjne, neuro- i kardioprotekcyjne, przeciwdepresyjne oraz przeciwwirusowe (Manzoor i in., 2019). Związek ten posiada także właściwości przeciwnowotworowe i co ważne, wykazano, że oddziaływanie cytotoksyczne luteoliny jest selektywne wobec komórek nowotworowych (Knurek i Buchaj, 2017). Luteolina może również wspomagać leczenie nadciśnienia tętniczego, ponieważ wykazano, że skutecznie hamuje aktywność konwertazy angiotensynowej. Ponadto, stymuluje wazodylatację uzależnioną od śródbłonna poprzez usprawnienie syntezy tlenu azotu (Guerrero i in., 2012; Różańska i Regulska-Iłow, 2019). Zaobserwowano także, że luteolina wykazuje potencjalne działanie przeciwcukrzycowe. Wykazano, że zwiększa ona aktywność insuliny w adipocytach poprzez bezpośrednią aktywację szlaku PPAR- $\gamma$ , a także szlaku sygnalizacyjnego insuliny (Ding i in., 2010).

### 2.3.1.3. Fenyloetanoidy

Fenyloetanoidy są związkami fenolowymi, które charakteryzuje struktura alkoholu fenyletanowego. Mogą występować w postaci glikozydów. Jest to grupa metabolitów, która nie jest często spotykana w rodzaju szalwia, choć ich obecność opisano na przykład w pędach *Salvia viridis* (Grzegorzczak-Karolak i Kiss, 2018).

W organach *S. bulleyana* zidentyfikowano:

- ❖ martynozyd
- ❖ acetylmartynozyd
- ❖ diacetylmartynozyd (Grzegorzczak-Karolak i in., 2020b).

W literaturze pojawiają się doniesienia o działaniu antyoksydacyjnym, a nawet potencjale przeciwnowotworowym martynozydu. Souza i wsp. (2011) zaobserwowali, że spośród głównych składników *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, dwa fenyletanoidy: werbaskozyd i martynozyd wykazały najsilniejszą aktywność antyoksydacyjną. Połowa maksymalnego stężenia hamującego (IC<sub>50</sub>) „wymiatającego” ROS dla obu tych związków wynosiła 0,54 μM (Souza i in., 2011). Niemniej jednak wartości IC<sub>50</sub>, które hamowały powstawanie rodnika DPPH oraz rodnika hydroksylowego okazały się być niższe dla martynozydu niż dla werbaskozydu (Domínguez i in., 2011). Badania przeprowadzone metodą analizy komputerowej ujawniły, że związki pochodzenia naturalnego, takie jak martynozyd wchodzi w interakcję z białkami ROCK I i ROCK II, których nadekspresja prowadzi do zwiększonej inwazyjności oraz przerzutowości niektórych nowotworów. Są one izoformami o wysokim stopniu homologii i pełnią funkcję kinaz wykonawczych. Jednakże problemem może być farmakokinetyka tych związków, ponieważ posiadają one słabe właściwości ADME (wchłanianie/dystrybucja/metabolizm/wydalanie) (Arya i in., 2020). Można więc przypuszczać, że dopiero modyfikacja ich struktur może przynieść korzystny efekt w leczeniu nowotworów.



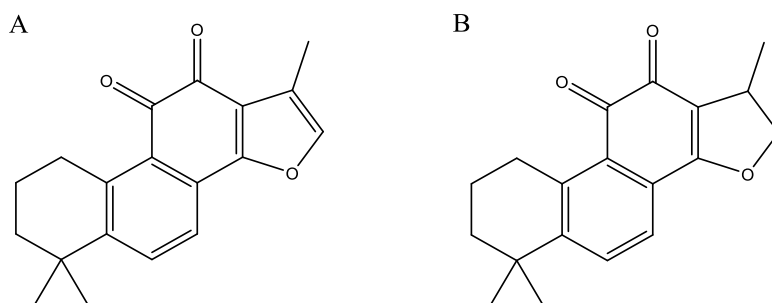
### 2.3.2. Diterpeny

Tanszinony to grupa metabolitów wtórnych należąca do diterpenoidów, a dokładniej do diterpenów abietanowych, które są związkami dominującymi w chińskich, leczniczych gatunkach szalwii. Po raz pierwszy tanszinony zostały wyizolowane w 1934 z korzeni *Salvia miltiorrhiza* (Nakao i Fukushima, 1934; Zhang i in., 2012). Biosynteza tanszinonów przebiega dwójako – na drodze cytoplazmatycznego szlaku mewalonowego/izoprenoidowego (MVA) oraz plastydowego szlaku niezależnego od mewalonianu (MEP) (Xing i in., 2018b). Tanszinony są związkami o charakterze lipofilowym (Zhao i in., 2011) i występują zazwyczaj w częściach podziemnych roślin (Li i in., 2010; Topçu, 2006).

Tanszinony mogą być również wykorzystywane jako markery w badaniach chemotaksonomicznych. Niektórzy autorzy wskazują, że występuje bliska relacja między gatunkami przypisanymi do sekcji *Drymosphare* i *Eurysphace*, do której należy *S. bulleyana*. Pierwotnie, według Benthama, gatunki te należały do jednej grupy *Drymosphare*, a dopiero Stibal wyodrębnił z niej sekcję *Eurysphace* (Li i in., 2010). Z kolei Walker i Stysma (2007), na podstawie badań genetycznych z wykorzystaniem DNA chloroplastów, zasugerowali, że rodzaj szalwia nie jest jednorodny i wszystkie azjatyckie gatunki szalwii stanowią niezależną linię filogenetyczną – kład III, który pokrywa się z sekcją *Drymosphare* oryginalnie opisaną wg Benthama (Walker i Sytsma, 2007).

W przypadku *S. bulleyana*, tanszinony oznaczono jedynie w korzeniach i są to:

- ❖ tanszinon IIA
- ❖ kryptotanszinon (Li i in., 2013a).



Rycina 5. Struktura chemiczna: tanszinonu IIA – A; kryptotanszinonu – B.

Tanszinony posiadają szerokie spektrum aktywności biologicznych. Wśród nich można wyróżnić działanie przeciwbakteryjne, antyoksydacyjne, oddziaływanie na układ sercowo-naczyniowy oraz potencjał przeciwnowotworowy.

Liczne badania *in vitro* i *in vivo* na liniach komórkowych i zwierzętach wskazują na potencjał antyoksydacyjny tanszinonu IIA (TIIA) i kryptotanszinonu (CT). TIIA zmniejszał obszar objęty zawałem u szczurów z uszkodzeniem niedokrwienno-reperfuzyjnym mięśnia sercowego. Wykazano, że działanie to było związane z pobudzaniem aktywności enzymów SOD, GSH-Px, a także redukcją stężenia MDA. Ponadto TIIA ograniczał reakcję zapalną poprzez obniżenie poziomu TNF- $\alpha$ , IL-6 oraz iNOS w surowicy (Hu i in., 2015). Huang i wsp. (2018) sugerują, że TIIA ma zdolność ochrony mięśnia sercowego myszy przed zwłóknieniem spowodowanym ekspozycją na LPS. Jest to najprawdopodobniej związane z hamowaniem aktywności oksydazy NADPH (NOX2) stymulowanej przez LPS i ograniczeniem nadprodukcji wolnych rodników (Huang i in., 2018). Analizowano mechanizm działania TIIA na stymulowane lipopolisacharydem bydłce nabłonkowe komórki endometrium. TIIA znacząco hamował produkcję MDA oraz zwiększał aktywność katalaz i dysmutazy ponadtlenkowej, co potwierdza jego aktywność antyoksydacyjną. Ponadto, związek ten wykazywał właściwości przeciwzapalne – hamował produkcję cytokin prozapalnych: IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 (Fu i in., 2021). Natomiast Ran i wsp. (2016) określili wpływ kryptotanszinonu na proces indukowania ekspresji LOX-1 przez TNF- $\alpha$  w ludzkich komórkach śródbłonkowych żyły pępowinowej (HUVECs). Okazało się, że suplementacja CT zmniejszała tworzenie się indukowanych przez TNF- $\alpha$  ROS w HUVECs i szczurzej aorticie, co hamowało ekspresję LOX-1, a więc może mieć znaczenie w profilaktyce miażdżycy (Ran i in., 2016).

Kryptotanszinon może mieć też znaczenie w terapii cukrzycy i otyłości. Jego działanie w tym zakresie bazuje najprawdopodobniej na redukcji międzykomórkowego poziomu ATP skutkującej aktywacją AMPK. W badaniu na linii komórkowej mysich mioblastów C2C12 wykazano, że wpływ CT na AMPK był szybszy niż metforminy. CT zwiększał też pobór glukozy przez miotubule na poziomie podobnym do insuliny oraz potęgował jej działanie. *In vivo*, związek ten powodował redukcję masy ciała, w tym tkanki tłuszczowej oraz ilości pobieranego przez myszy pokarmu. Ponadto, u zwierząt zanotowano spadek poziomu triglicerydów, cholesterolu i glukozy w osoczu (Kim i in., 2007). Podobne wyniki otrzymano w przypadku zwierząt z otyłością indukowaną dietą, u których CT hamował działanie białkowej fosfatazy tyrozynowej 1B odpowiedzialnej za insulinooporność. Tymczasem TIIA uwrażliwiał komórki na działanie insuliny poprzez potęgowanie autofosforylacji receptora insulinowego (Jung i in., 2009).

Tanszinony stały się także obiektem badań pod kątem ich potencjalnego działania przeciwnowotworowego. Szczególną uwagę zwrócił tanszinon IIA, którego potencjał na tym polu okazał się być wielokierunkowy. TIIA hamował wzrost i proliferację komórek nowotworu płuc, piersi, wątroby, jelita grubego i białaczki oraz zmniejsza migrację komórek rakowych (Fu i in., 2020). Związek ten indukował apoptozę i powodował zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie S poprzez regulację szlaku PI3K-Akt. TIIA indukował autofagię ludzkich komórek kostniakomięsaka, w których autofagocytoza była pobudzana przez oddziaływanie na szlak PI3K/AKT (Yen i in., 2018). Tymczasem Sui i wsp. (2017) donoszą, że TIIA ograniczał angiogenezę raka okrężnicy i odbytu zarówno w warunkach normoksji jak i hipoksji poprzez hamowanie odpowiednich szlaków sygnałowych. TIIA działał hamująco na szlak  $\beta$ -katenina/TCF3/LEF1, który przy normalnym poziomie tlenu jest pobudzany przez TGF-1 $\beta$ , a w warunkach obniżonej zawartości tlenu jest pobudzany przez czynnik indukowany hipoksją (HIF-1 $\alpha$ ) (Sui i in., 2017). Zahamowanie procesu angiogenezy po zastosowaniu TIIA zaobserwowano również w komórkach kostniakomięsaka, raka piersi i komórkach śródbłónka naczyniowego (Fu i in., 2020).

Tymczasem CT hamował proliferację, indukował apoptozę, a także blokował zdolność do przerzutów w przypadku komórek raka jajnika. Związek zwiększał też podatność tych komórek na chemioterapię z zastosowaniem cisplatyny poprzez wzmocnienie jej działania uszkadzającego DNA komórek rakowych (Jiang i in., 2017a). W przypadku dwóch linii raka wątrobowokomórkowego Huh7 i MHCC97-H, CT hamował proliferację i indukował apoptozę komórek zarówno w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Działania te były związane z hamowaniem szlaku PI3K/AKT/mTOR, co skutkowało zahamowaniem wzrostu guza (Luo i in., 2020b). Raportowano, że CT wywołuje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie S, apoptozę i fragmentację mitochondriów w komórkach kostniakomięsaka. Związek ten pobudzał interakcję białka Drp1 (*dynamamin-related protein*), będącego mediatorem podziału mitochondrium z białkiem Bax przyspieszającym apoptozę, co zwiększało translokację Bax z cytoplazmy do mitochondrium i skutkowało apoptotyczną fragmentacją tego organellum (Yen i in., 2019). Li i wsp. (2013) porównali działanie CT i TIIA na wzrost niedrobnokomórkowego raka płuc. Okazało się, że oba badane związki ograniczały proliferację linii komórkowych NSCLC poprzez indukcję apoptozy i zatrzymanie cyklu komórkowego (Li i in., 2013c).

Tanszinonowi IIA przypisuje się również aktywność przeciwalergiczną. W badaniach *in vitro* przeprowadzonych na szczurzej linii komórkowej RBL-2H3, TIIA

hamował degranulację mastocytów, zaliczanych do komórek odporności wrodzonej. Degranulacja komórek tucznych, która ma miejsce po ekspozycji na antygen, skutkuje blokadą wydzielania przez te komórki histaminy, leukotrienów i prostaglandyn indukujących procesy alergiczne. Li i wsp. (2018) udowodnili, że TIIA hamował aktywację komórek tucznych i związaną z nimi reakcją anafilaktyczną poprzez aktywację sirtuiny 1, która jest ważnym elementem szlaku Sirt1-LKB1-AMPK (Li i in., 2018). Ponadto, TIIA hamował astmę wywołaną białkiem jaja kurzego u myszy już w dawce 10 mg/kg masy ciała redukując stan zapalny oraz produkcję mucyny (Heo i Im, 2019).

Wśród tanszinonów, zawartych w korzeniach *S. bulleyana*, związkiem o silnej aktywności przeciwbakteryjnej jest kryptotanszinon, z kolei tanszinon IIA wykazuje średnie działanie przeciwdrobnoustrojowe. CT hamował wzrost bakterii Gram+, takich jak: *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis* (Lee i in., 1999). Zhou i wsp. (2011) przeprowadzili badanie z udziałem zarówno bakterii Gram+ i Gram-, a także grzybów, które wykazało, że aktywność przeciwdrobnoustrojowa CT jest zbliżona do aktywności siarczanu streptomycyny, mającego działanie przeciwbakteryjne, jak i karbendazymu o działaniu przeciwgrzybiczym. W przypadku *Xanthomonas vesicatoria*, *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis* wartość MIC dla CT była niższa niż dla kontroli, którą stanowił antybiotyk – streptomycyna (Zhou i in., 2011). Z kolei Dang i wsp. (2018) określili ich aktywność przeciwdrobnoustrojową wyizolowanych z korzeni szaławii tanszinonu IIA oraz kryptotanszinonu wobec *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii*. Okazało się, że wartości MIC dla TIIA i CT były porównywalne i od 2 (wobec *A. baumannii*) do 50 (wobec *S. aureus*) razy wyższe od wartości MIC otrzymanych dla kontroli, którą stanowiły wankomycyna i cefotaksym (Dang i in., 2018). Działanie przeciwdrobnoustrojowe tanszinonów może być związane z wytwarzaniem rodników ponadtlenkowych i/lub z samą strukturą tych związków. Zasugerowano, że wiązanie etylenowe między węglem w pozycji C15 i C16, jak i konformacja grupy metylowej w pozycji C16 może wpływać na aktywność przeciwdrobnoustrojową tych związków (Lee i in., 1999; Zhou i in., 2011).

### 2.3.3. Kwasy organiczne

Kwasy organiczne charakteryzują się obecnością jednej lub wielu grup karboksylowych w cząsteczce i mogą mieć strukturę alifatyczną, cykliczną lub aromatyczną. Są one bardzo rozpowszechnione w świecie roślinnym i mogą występować w postaci wolnej, jako sole lub estry. Kwasem organicznym, niebędącym fenolokwasem, oznaczonym w pędach *S. bulleyana* jest kwas chinowy (Grzegorzczak-Karolak i in., 2020b).

## 2.4. Biotechnologia roślin

Surowce roślinne od wieków są wykorzystywane przez ludność całego świata nie tylko w celach kulinarnych, ale również – leczniczych. Są one źródłem cennych związków aktywnych, które w czasach współczesnych, w których coraz częściej zwraca się uwagę na produkty pochodzenia naturalnego i ekologię, mogą być dobrą alternatywą dla substancji pochodzenia chemicznego, nie tylko w przemyśle farmaceutycznym, ale i kosmetycznym czy spożywczym.

Biotechnologia roślin jest dziedziną nauki zajmującą się wykorzystaniem roślinnych kultur *in vitro* w praktyce, tj. leśnictwie, ogrodnictwie, rolnictwie czy farmacji. Kluczowym zjawiskiem w kulturach tkankowych jest zjawisko totipotencji, które oznacza, że z pojedynczej komórki somatycznej można odtworzyć całą roślinę. Hodowle *in vitro* umożliwiają uprawę protoplastów, komórek, tkanek, organów, fragmentów, a także całych roślin na odpowiednio dobranych, sztucznych podłożach w ściśle określonych, sterylnych warunkach. Dzięki tym zabiegom uzyskuje się kulturę niezależną od czynników środowiskowych, pór roku i naturalnej zmienności. Wyselekcjonowany materiał uzyskany z takiej hodowli charakteryzuje się wysoką jakością i stabilnością. Co więcej, prowadzenie kultury w warunkach *in vitro* skraca czas uprawy, ogranicza redukcję populacji ze stanowisk naturalnych i umożliwia pozyskiwanie materiału roślinnego poza miejscem jego naturalnego występowania. Wpływa to na ograniczenie kosztów związanych ze zbiorem, przewozem materiału roślinnego, a także oszczędza czas.

Prowadzenie kultury w warunkach *in vitro* daje także możliwość wykorzystania jej jako źródła metabolitów wtórnych. Związki te są substancjami, które w warunkach fizjologicznych stanowią ochronę dla wytwarzających je roślin przed różnorodnymi stresorami, jakimi mogą być drobnoustroje, insekty czy inne szkodniki. Jednakże związki te mogą mieć również nieoceniony wpływ prozdrowotny na organizm człowieka i wykazywać

wielokierunkową aktywność. Na produkcję związków aktywnych można wpływać na różne sposoby. Optymalizacja warunków hodowli jest niezwykle istotna, ponieważ dzięki niej można uzyskać zwielokrotnioną, w stosunku do roślin macierzystych, akumulację interesujących nas związków. Podobny efekt można obserwować podczas hodowli materiału w warunkach stresowych. Roślinne kultury *in vitro* mogą być także wykorzystywane do przeprowadzania procesów biotransformacji, która polega na przekształcaniu dodawanych do podłoża substancji w aktywne biologicznie produkty dzięki zachodzeniu reakcji enzymatycznych. Substratami wykorzystywanymi w biokonwersji mogą być prekursorzy procesów metabolicznych, czy związki nieprodukowane w normalnych warunkach przez rośliny, tj. ksenobiotyki. Procesy te mogą prowadzić do zwiększenia produkcji metabolitów wtórnych czy nawet syntetyzowania związków aktywnych nie występujących w warunkach naturalnych w roślinie macierzystej. Warto również zwrócić uwagę, że potencjał produkcyjny można zwiększać poprzez modyfikacje organizmów roślinnych bazujące na inżynierii genetycznej.

#### **2.4.1. Mikrorozmnażanie**

Mianem mikrorozmnażania określa się wegetatywne rozmnażanie roślin w warunkach *in vitro*. Posiada ono wiele zalet, ponieważ pozwala na uzyskanie wielu roślin z niewielkiej ilości materiału wyjściowego, które charakteryzują się określonym genotypem i fenotypem. Jednocześnie umożliwia odseparowanie hodowanych roślin od uwarunkowań zewnętrznych, takich jak warunki klimatyczne, pory roku czy czynniki chorobotwórcze. Co więcej, mikrorozmnażanie umożliwia namnażanie roślin, których nasiona są trudno dostępne, drogie lub mają niską siłę kiełkowania, dzięki temu, że w teorii kulturę można zainicjować z każdego organu rośliny. Mikropropagacja pozwala także na ochronę gatunków zagrożonych wyginięciem stwarzając możliwość zabezpieczenia ich puli genowej. Korzystna jest także perspektywa zwiększenia skali hodowli z zastosowaniem bioreaktorów prowadząca do zintensyfikowania produkcji biomasy oraz związków aktywnych w materiale roślinnym.

Proces mikrorozmnażania składa się z kilku etapów. Inicjowanie aseptycznej kultury następuje przy użyciu odpowiednio dobranego materiału wyjściowego, który zostaje poddany sterylizacji i umieszczony na podłożu zawierającym stymulatory wzrostu. Następnie namnaża się otrzymane pąki i pędy boczne, które w kolejnym etapie poddaje się

ukorzenianiu i aklimatyzacji do nie sterylnych warunków wzrostu.

Można wyróżnić kilka metod proliferacji w warunkach *in vitro*:

- ❖ Rozmnażanie klonalne – stymulacja rozwoju pąków bocznych z merystemów bocznych lub wierzchołkowych, które są obecne w eksplantacie.
- ❖ Organogeneza:
  - Pośrednia – pąki przybyszowe tworzą się z centrów merystematycznych, powstających w wyniku redyferencjacji kalusa, stanowiącego etap pośredni w całej procedurze.
  - Bezpośrednia – pąki powstają bezpośrednio z komórek somatycznych eksplantatu: liści, łodyg, korzeni itp.
- ❖ Somatyczna embriogeneza – całe rośliny można otrzymać z zarodków tworzących się z komórek somatycznych, które wykazują podobieństwo do zarodków zygocycznych. W tym przypadku również może dojść do embriogenezy bezpośredniej z tkanek eksplantatu lub pośredniej z udziałem kalusa (Tripathi i Tripathi, 2003).

#### **2.4.2. Warunki prowadzenia kultur *in vitro***

Roślinne kultury *in vitro* prowadzone są w warunkach aseptycznych, co jest istotnie nie tylko podczas zakładania hodowli, ale i na każdym następnym etapie. Na wzrost, namnażanie oraz produkcję roślinnych kultur *in vitro* wpływa wiele różnorodnych czynników zarówno chemicznych jak i fizycznych. Niezwykle ważny jest skład podłoża wzrostowego pod kątem zawartych w nim mikro- i makroelementów, witamin, źródła węgla, regulatorów wzrostu czy składników żelujących.

Do makroelementów można zaliczyć azot, dodawany najczęściej w postaci związków nieorganicznych, fosfor, potas, siarkę, chlor, wapń oraz magnez, które biorą udział w procesach enzymatycznych oraz powstawaniu elementów strukturalnych komórek. Wśród mikroelementów wyróżnia się takie pierwiastki jak bor, miedź, mangan, cynk, kobalt, jod, glin i nikiel, które są dostarczane w postaci soli i pełnią rolę kofaktorów enzymów roślinnych (Ekiert, 2009). Zarówno zawartość w podłożu poszczególnych minerałów, jak i stosunek między nimi mogą mieć znaczący wpływ na wzrost i produkcję. Z reguły, w hodowli *in vitro* wykorzystuje się pożywki ze zdefiniowanym składem chemicznym, a do najczęściej stosowanych należą podłoża według Murashige-Skoog'a (Murashige i Skoog,

1962), Gamborga – B5 (Gamborg, 1967), Schenka i Hildebrandt'a (Schenk i Hildebrandt, 1972), a także podłoże Lloyd'a i McCown'a – Woody Plant (Lloyd i McCown, 1980) różniące się między sobą zawartością minerałów, witamin oraz aminokwasów. Istotny jest również dodatek do podłoża węglowodanów najczęściej w postaci sacharozy lub glukozy biorących udział we wzroście, rozwoju i produkcji związków aktywnych (Weremczuk-Jeżyna i in., 2016).

Do ukierunkowania kultury często konieczny jest dodatek substancji wzrostowych, regulatorów wzrostu. W kulturach *in vitro* sięga się najczęściej po związki należące do jednej z dwóch grup: auksyn i/lub cytokinin (Phillips i Garda, 2019). Pierwsza odpowiada za pobudzanie wzrostu wydłużeniowego, dominację wierzchołkową, indukcję powstawania korzeni, kalusa oraz za somatyczną embriogenezę. Z kolei zasadniczy wpływ cytokinin obejmuje znoszenie dominacji wierzchołkowej i pobudzenie rozwoju pędów. Stosunek ilościowy pomiędzy zastosowanymi regulatorami ma wpływ na różnicowanie komórek kultury oraz jej morfologię i należy go dostosować do rodzaju prowadzonej kultury (Phillips i Garda, 2019).

Oprócz doboru odpowiedniej pożywki pod względem jakościowym i ilościowym, istotna jest również jej konsystencja. Dodatek substancji żelujących, spośród których najszerzej wykorzystywaną jest agar, wpływa na dostępność składników niezbędnych do rozwoju roślin. Warunki podłoży płynnych mogą ułatwiać pobór mikro- i makroelementów i obniżać koszty hodowli, jednakże w przypadku kultur pędowych mogą nieść ze sobą zagrożenie wystąpienia zjawiska szklistości (Grzegorzczak-Karolak i in., 2021a). Objawia się ono charakterystycznymi zmianami morfologicznymi, takimi jak kruchość i łamliwość łodyg, pomarszczenie liści, a także ich przerost. Ponadto obserwuje się półprzezroczystość tych struktur, która związana jest z nadmierną akumulacją wody w komórkach roślinnych, zmniejszoną zawartością chlorofilu oraz anomaliami w budowie ścian komórkowych. Przyczyną występowania tego zjawiska jest najprawdopodobniej nadmierne zanurzenie eksplantatów podczas prowadzenia hodowli w warunkach podłoża płynnego, co jest stanem atypowym dla roślin lądowych i może wywoływać w ich komórkach stres. Wystąpienie cech szklistości w kulturze uniemożliwia dalszą jej propagację, utrudnia ukorzenianie się oraz może negatywnie wpływać na produkcję metabolitów wtórnych (Grzegorzczak-Karolak i in., 2021a).

Na akumulację biomasy oraz wytwarzanie związków aktywnych mają wpływ także



inne czynniki fizyczne, takie jak światło, temperatura oraz wilgotność powietrza. Odpowiednia intensywność oraz jakość oświetlenia ma znaczenie w przebiegu procesów biochemicznych i fizjologicznych przebiegających w organizmach roślinnych, do których można zaliczyć kiełkowanie, zielenienie, kwitnienie, owocowanie czy starzenie się. Ogół modyfikacji, mających miejsce podczas ekspozycji na światło nosi miano fotomorfogenezy. W hodowlach *in vitro* stosuje się różne źródła oświetlenia, od świetlówek po lampy LED, dzięki czemu można manipulować długościami fali i otrzymywać różniące się morfogenetycznie okazy (Woźny, 2012). Niemniej jednak istotne może okazać się zachowanie zbliżonych do warunków naturalnych schematów oświetlenia, co osiąga się dzięki zachowaniu fotoperiodu bądź hodowli korzeni w ciemności. Temperatura z kolei, reguluje wiele procesów fizjologicznych zachodzących w organizmach roślinnych, tj. oddychanie czy fotosynteza. W mikrorozmnażaniu najczęściej stosowanym zakresem temperatur jest 20 - 27°C, jednakże optymalna wartość temperatury zależy od gatunku hodowanej rośliny (Read i Preece, 2003).

Po skutecznej optymalizacji warunków hodowli kultur *in vitro*, dzięki której otrzymano zadowalającą akumulację zarówno biomasy jak i metabolitów wtórnych, można podjąć próbę dalszej stymulacji w celu uzyskania jeszcze wyższej produkcji. Zabiegiem wykorzystywanym w tym celu jest elicytacja. Elicytorami są związki przyczyniające się do powstania warunków stresowych, odpowiedzią na które jest stymulacja pewnych szlaków metabolicznych i zwiększona produkcja metabolitów wtórnych. Można wyróżnić dwa typy elicytorów: biotyczne – pochodzenia biologicznego (poli- czy oligosacharydowe, grzybicze, bakteryjne) jak i abiotyczne, wśród których można wyróżnić czynniki fizyczne, np. temperaturę oraz chemiczne, np. sole nieorganiczne lub jony metali ciężkich. Do elicytorów można zakwalifikować również zaliczane do związków sygnałowych pochodne kwasu jasmonowego i salicylowego, a także hormony roślinne, tj. cytokininy czy gibereliny (Baenas i in., 2014). Związkiem, który znalazł szerokie zastosowanie w biotechnologii roślin jest ester metylowy kwasu jasmonowego – jasmonian metylu, którego działanie polega na indukowaniu ekspresji genów szeregu szlaków biosyntetycznych obecnych w roślinach, co skutkuje zwiększoną produkcją różnych grup związków bioaktywnych. Przykładem może być wytwarzanie solasodiny w kulturach korzeni transformowanych *Solanum trilobatum* L. Zastosowanie jasmonianu metylu w stężeniu 4  $\mu\text{M}$  skutkowało niemalże dwukrotnym zwiększeniem akumulacji solasodiny w powyższej kulturze (Shilpha i in., 2015). Z kolei w przypadku elicytacji korzeni włośnikowatych *Valeriana officinalis* L. przy użyciu 100  $\mu\text{M}$

MJA zawartość kwasu walerenowego w kulturze, w porównaniu z tą stwierdzoną w korzeniach transformowanych nie traktowanych tym elicytorem, wzrosła 6-krotnie (Torkamani i in., 2014).

### 2.4.3. Transformacja genetyczna roślin

Proces transformacji genetycznej opiera się na wprowadzeniu obcego materiału genetycznego, fragmentu DNA, do genomu gospodarza, w wyniku czego otrzymuje się organizm o nowych cechach. Metody transformacji powszechnie klasyfikuje się jako bezwektorowe i wektorowe.

Transformacja bezwektorowa przebiega pod wpływem zastosowania czynników fizycznych – elektroporacji bądź chemicznych – z wykorzystaniem glikolu polietylenowego. Można również wykorzystać metodę mikrowstrzeliwania, która polega na bezpośrednim wprowadzeniu DNA umieszczonego na mikronośniku, tj. mikrocząsteczce metalu szlachetnego, do konkretnych komórek czy organelli komórkowych (Tuleja, 2013). Powyższe metody ułatwiają przerwanie ciągłości błon komórkowych i przedostanie się materiału genetycznego do komórek docelowych. Metoda PTP (*pollen tube pathway*) także może zostać zastosowana do przeprowadzenia bezpośredniej transformacji. W tym przypadku, obcy materiał genetyczny jest umieszczany na skróconej szyjce słupka po usunięciu znamienia. Do integracji transgeny z komórką jajową, jądrem zygoty lub zarodkiem dochodzi w sytuacji, gdy przedostanie się on w podobnym czasie, co komórka plemnikowa do woreczka zalążkowego (Luo i Wu, 1989).

Tymczasem w transformacji wektorowej do przenoszenia fragmentów DNA wykorzystuje się pośrednictwo bakterii lub wirusów. Biorą one udział we wprowadzaniu, namnażaniu oraz niekiedy, ekspresji danych cech w komórkach gospodarza. W biotechnologii roślin, jako wektory wykorzystuje się często bakterie z rodzajów *Agrobacterium* oraz *Rhizobium*, a konkretnie *A. tumefaciens* oraz *R. rhizogenes*. Kluczowym elementem w procesie agroinfekcji tymi bakteriami jest przenoszenie plazmidu, odpowiednio, Ti (*tumor inducing*) lub Ri (*root inducing*). Istotnymi elementami plazmidowego DNA jest region wirulencji *vir* oraz transferowy DNA – T-DNA.

Niezwykle ważnym etapem w przebiegu procesu transformacji genetycznej jest adhezja bakterii do ścian komórkowych zakażanej rośliny. W procesie tym biorą udział białka wytwarzane w wyniku ekspresji genów *chv*. Z kolei region zawierający geny *vir* jest

odpowiedzialny za wirulencję szczepu bakteryjnego, czyli zdolność do wnikania oraz namnażania w organizmie żywiciela.

W wyniku ekspresji genów *R. rhizogenes* takich jak *ops* (kodujących syntazy opin) oraz *ocs* (odpowiadających za ich sekrecję), które zostały wbudowane do genomu gospodarza, produkowane są opiny. Są one pochodnymi aminokwasów i stanowią źródło węgla i azotu dla bakterii. Nie są wytwarzane w warunkach fizjologicznych przez komórki roślinne. W związku z tym, mogą stanowić markery procesu transformacji. Rodzaj opin jest związany z rodzajem wytwarzających je bakterii *R. rhizogenes*; w związku z czym szczepy bakterii można podzielić na: agropinowe, mannopinowe, mikimopinowe i kukumipinowe (Hnatuszko-Konka i in., 2009; Wysokińska, 2000).

Obszar T-DNA poza wspomnianymi powyżej genami odpowiadającymi za syntezę opin, zawiera także onkogeny, których ekspresja prowadzi do powstania korzeni transformowanych. Oprócz nadmiernego rozwoju tkanek, mogą one także wpływać na produkcję hormonów roślinnych, uwrażliwiać tkanki na działanie endogennych hormonów i uczestniczyć w przebudowie chromatyny (Gelvin, 2009). W szczepach agropinowych, transferowy DNA jest podzielony na dwie części: prawą - T<sub>R</sub> oraz lewą – T<sub>L</sub>. T<sub>R</sub>-DNA zawiera geny odpowiedzialne za biosyntezę opin oraz auksyn (*aux* geny). Z kolei T<sub>L</sub>-DNA zawiera onkogeny, które określane są jako geny *rol* (*rolA*, *rolB*, *rolC* oraz *rolD*). Obydwa fragmenty są jednocześnie przenoszone do komórek roślinnych, jednakże ich integracja z genomem gospodarza zachodzi niezależnie. W przypadku szczepów typu mannopinowego i kukuminopinowego, T-DNA nie jest podzielony na fragmenty. Co więcej, jest on homologiczny do lewej części transferowego DNA szczepu agropinowego. W związku z tym można przypuszczać, że to właśnie geny *rol* są najistotniejsze w procesie ryzogenezy oraz dla fenotypu powstałych korzeni (Chandra, 2012; Hnatuszko-Konka i in., 2009; Wysokińska, 2000).

Badania wykazały, że w biotechnologii mogą być także wykorzystane gatunki *Sinorhizobium meliloti* oraz *Mesorhizobium loti*. Jednakże, w przypadku wymienionych powyżej bakterii, konieczne do przebiegu procesu transformacji jest wprowadzenie do komórek bakteryjnych sekwencji genów wirulencji oraz regionu T-DNA (Bandurska i in., 2016; Hnatuszko-Konka i in., 2009).

Efektywność transformacji genetycznej roślin jest zależna od wielu czynników. Istotny jest gatunek rośliny poddawanej procedurom transformacji, jej wiek czy typ

eksplantatu. Ponadto duże znaczenie ma gatunek oraz szczep użytych bakterii, przebieg procesu, czas oraz warunki hodowli zakażonych eksplantatów, a wcześniej używanych do zakażenia bakterii. Efektywność transformacji można także zwiększać dodając do pożywki związki fenolowe takie jak acetosyringon, które pełnią funkcję atraktantów i powodują wzrost aktywności bakterii (Agrawal i Rami, 2022).

#### **2.4.3.1. Kultury korzeni transformowanych**

Korzenie transformowane, określane także mianem włóśnikowatych czy transgenicznych, są kulturami otrzymanyymi w wyniku transformacji genetycznej za pośrednictwem bakterii *Rhizobium rhizogenes*. W wyniku integracji plazmidowego T-DNA z genomem eksplantatu roślinnego i ekspresji zlokalizowanych w nim genów, dochodzi do utworzenia w miejscu zakażenia jednego lub kilku korzeni włóśnikowatych. Każdy tak powstały korzeń daje początek jednemu klonowi korzeni transformowanych, które mogą się od siebie różnić praktycznie pod każdym względem, tj. cechami morfologicznymi, produkcją biomasy oraz akumulacją związków aktywnych biologicznie.

Powstałe w miejscu nakłucia korzenie, wraz z fragmentami eksplantatów, odcina się i przenosi do płynnego podłoża. Następnym etapem jest eliminacja pozostałych po zakażeniu bakterii. W tym celu, za pomocą sterylnego sączka, do pożywki dodaje się antybiotyk. Korzenie pasażuje się w krótkich odstępach czasu do momentu wyeliminowania bakterii. Po tym czasie korzenie wykazują lepszy wzrost, który jest możliwy bez dodatku regulatorów.

Kolejnym etapem jest potwierdzenie transformacji genetycznej. W tym celu wykorzystuje się reakcję łańcuchowej polimerazy – PCR. Jest to technika wykorzystywana w biologii molekularnej do zwielokrotniania określonych sekwencji DNA. W przypadku potwierdzania transformacji kultur *in vitro*, wykorzystuje się geny pochodzenia bakteryjnego, tj. geny *rol* czy *aux*, których sekwencje, jeżeli występują w genomie roślinnym, są amplifikowane w trakcie reakcji łańcuchowej polimerazy. Wyróżnia się trzy główne etapy w reakcji PCR. Pierwszym jest denaturacja, która prowadzi do rozpadu pod wpływem temperatury wiązań wodorowych między nićmi DNA, co skutkuje ich rozpadem. Drugim etapem jest przyłączanie starterów (primerów) do konkretnych miejsc w sekwencjach DNA. Z kolei trzecim – jest elongacja, tj. wydłużanie, podczas którego następuje synteza nici komplementarnych odpowiadających danym fragmentom DNA,

z wykorzystaniem enzymu polimerazy. Cykl ten powtarza się kilkakrotnie, aby w krótkim czasie uzyskać dużą ilość kopii DNA (Mohini i Deshpande, 2010). Następnie, produkty reakcji, tj. fragmenty odpowiadające określonym genom, nanosi się na żel agarozowy i poddaje rozdzielni elektroforetycznej. W celu wizualizacji wyników analizy, które przyjmują postać prążków, dodaje się wnikający między zasady azotowe obecne w DNA bromek etydy, który jest barwnikiem świecącym w świetle UV.

W kolejnym etapie, spośród klonów, których transformacja została potwierdzona reakcją łańcuchowej polimerazy, do dalszych badań wybiera się te charakteryzujące się szczególnie intensywnym wzrostem oraz wysoką produkcją metabolitów wtórnych.

Korzenie włósnikowate wyraźnie różnią się morfologicznie od niezmienionych genetycznie odpowiedników, ponieważ wytwarzają liczne odgałęzienia boczne oraz charakteryzuje je brak geotropizmu (Angulo-Bejarano i in., 2019). Do wzrostu nie wymagają obecności fitohormonów w podłożu. Charakteryzują się wysokim przyrostem biomasy, stabilnością genetyczną oraz wydajną produkcją związków aktywnych. Dzięki temu mogą być wykorzystywane jako źródło cennych metabolitów, a także jako modele szlaków biosyntetycznych związków, które są produkowane właśnie w tym organie.

Podjmuje się wiele starań mających na celu zwiększenie zarówno akumulacji biomasy jak i metabolitów wtórnych w korzeniach transformowanych różnych gatunków roślin. Wśród stosowanych w tym celu strategii, tak jak w przypadku wszystkich innych kultur, można wyróżnić selekcję klonu o najlepszych parametrach wzrostu i produkcji, optymalizację składu podłoża i warunków hodowli, a także suplementację prekursorami, które są wykorzystywane w szlakach biosyntetycznych. Ponadto można rozważyć dodanie fitohormonów lub elicytorów, które stymulują odpowiedź obronną rośliny na stres, co może skutkować zwiększeniem produkcji metabolitów wtórnych. Po doborze optymalnych warunków hodowli, aby stała się ona opłacalna konieczne jest zwiększenie jej skali. Wykorzystując różnego rodzaju bioreaktory dąży się do osiągnięcia w krótkim czasie dużej ilości wysoko produktywnego materiału roślinnego (Halder i in., 2018).

Istotnym obszarem badań nad korzeniami transformowanymi jest ich zdolność do produkcji wartościowych substancji leczniczych, które należą do bardzo zróżnicowanych grup chemicznych. Na przestrzeni lat otrzymano korzenie włósnikowate, które dostarczają alkaloidów, terpenów, olejków eterycznych, irydoidów, sekoirydoidów, steroidów, saponin oraz związków fenolowych. Zwiększona synteza substancji bioaktywnych w korzeniach

transformowanych w porównaniu do ich zawartości w korzeniach roślin macierzystych jest często raportowana dla tych kultur. Przykładowo, zawartość hioscyjminy i skopolaminy w korzeniach transformowanych *Hyoscyamus reticulatus* L. była odpowiednio ponad 2 i 7 razy wyższa niż w korzeniach rośliny nietransformowanej (Zesynali, Hosseini i Rezaei, 2016). Również Bonhomme i wsp. (2000) zanotowali od 4 do 28 razy wyższą sumaryczną ilość powyższych alkaloidów tropanowych w korzeniach transgenicznych pokrzyku wilczej jagody (*Atropa belladonna* L.) w porównaniu z tą w korzeniach niezmienionych genetycznie. Jednocześnie poziomy alkaloidów w poszczególnych badanych klonach były różne i wyższą produkcją charakteryzowały się te, w których genomie stwierdzono obecność tylko genu *rolC* (Bonhomme i in., 2000). W jednym z otrzymanych klonów (14P) korzeni transformowanych *Picrorhiza kurroa* Royle ex Benth. produkcja charakterystycznych dla tego gatunku glikozydów irydooidowych – pikrozydu I i kutkozydu była niemal trzykrotnie wyższa w porównaniu z zawartością tych związków w korzeniach nietransformowanych, które zostały użyte jako materiał kontrolny (Verma i in., 2007). Również produkcja werbaskozydu, izowerbaskozydu i katalpozydu w korzeniach transformowanych *Rehmania glutinosa* (Gaertn.) DC. klonu RS-2 była od 2 do 3 razy wyższa (zależnie od związku) od tej stwierdzonej w korzeniach nietransformowanych hodowanych *in vitro* oraz 3-4-krotnie od tej, w korzeniach roślin rosnących w glebie (Piątczak i in., 2012). W wyniku transformacji *Dracocephalum forrestii* W. W. Smith przy pomocy *R. rhizogenes* otrzymano korzenie włóśnikowate, w których zawartość kwasu rozmarynowego 4-krotnie przewyższała tą raportowaną dla korzeni roślin macierzystych rosnącej w gruncie (Weremczuk-Jeżyna i in., 2016).

#### **2.4.3.2. Kultury pędów transformowanych**

Pomimo faktu, że większość prowadzonych kultur dotyczy transformowanych korzeni, to jednak w literaturze można odnaleźć również doniesienia odnoszące się do transformowanych pędów. Kultury pędowe, podobnie do korzeniowych, wykazują cechy stabilności genetycznej, a także mogą być źródłem cennych związków bioaktywnych.

Zmienione genetycznie pędy, zwane także teratomami, są najczęściej pozyskiwane poprzez infekcję bakteriami należącymi do gatunku *Agrobacterium tumefaciens* (Bourgaud i in., 2001). Rezultatem zakażenia jest powstanie na eksplantatach tkanki tumorowej, z której w odpowiednich warunkach różnicują się pędy przybyszowe. Przykładem tak otrzymanej

kultury mogą być pędy transgeniczne *Medicago truncatula* Gaertn. zregenerowane z tkanki kalusowej powstałej na skutek transformacji *A. tumefaciens* (Crane i in., 2006). Teratomy *Artemisia annua* L. pozyskano również w wyniku transformacji *A. tumefaciens*. Okazały się one wysokoproduktywne w odniesieniu do artemizyny, której poziom w nich był 3-krotnie wyższy niż w pędach nietransformowanych hodowanych *in vitro* (Ghosh i in., 1997). Z kolei w przypadku transformowanych pędów *Solanum dulcamara* L. zawartość glikoalkaloidów 5-krotnie przewyższała tę opisaną w roślinie macierzystej (Ehmke i in., 1995).

Pędy zmienione genetycznie można również otrzymać poprzez umieszczenie korzeni włośnikowatych uzyskanych na drodze infekcji *R. rhizogenes* na podłożu zawierającym hormony roślinne, które stymulują tworzenie się na korzeniach pędów przybyszowych. Może czasem także dojść do spontanicznej regeneracji pędów transformowanych bezpośrednio z korzeni włośnikowatych. Dużą zaletą tych procesów jest pominięcie fazy powstawania tkanki kalusowej i ewentualnej zmienności somaklonalnej (Giri i Narasu, 2000).

Pędy transformowane często charakteryzują się specyficznymi cechami morfologicznymi. Wśród nich wymienia się skrócone międzywęzła, ograniczoną dominację wierzchołkową, pomarszczone liście oraz lepsze ukorzenianie w porównaniu do pędów nietransformowanych. Występowanie powyższych cech może być związane ze stabilną integracją T-DNA z genomem roślinnym (Piątczak i in., 2015). Kulturę transformowanych pędów *Centaurea erythraea* Rafn otrzymano w wyniku spontanicznej regeneracji z korzeni transgenicznych powstałych poprzez infekcję *R. rhizogenes* szczepu LBA 9402. Kultura ta charakteryzowała się 8-krotnie wyższą produkcją związków sekoirydoidowych niż dostępne komercyjne ziele tego gatunku. Ponadto, zaobserwowano różnice morfologiczne charakterystyczne dla roślin transformowanych między zregenerowanymi z transgenicznych pędów roślinami i roślinami matecznymi. Było to najprawdopodobniej związane ze stymulacją wytwarzania przez tkanki endogennych hormonów, do czego przyczyniła się ekspresja genów *rol* pochodzenia bakteryjnego (Piątczak i in., 2006). Spontaniczną regenerację pędów na korzeniach transformowanych zaobserwowano również dla *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin niezależnie od tego, czy korzenie hodowano na świetle czy w ciemności. Otrzymane pędy transformowane ukorzeniono, a następnie aklimatyzowano do warunków środowiska zewnętrznego. Zawartość wtórnych metabolitów w transformowanych roślinach okazała się być wyższa niż ta, którą oznaczono w roślinach roślin macierzystych wyhodowanych z nasion (Skała i in., 2019).

#### 2.4.4. Kultyury transformowane gatunków z rodzaju *Salvia*

Jak powszechnie wiadomo, rośliny należące do rodzaju szalwia są bogate w metabolity wtórne o szerokim zastosowaniu i są często wykorzystywane w lecznictwie ludowym. Pomimo faktu, że rodzaj szalwia jest najliczniejszym w rodzinie jasnotowatych i obejmuje ok. 1000 gatunków, tylko dla niewielu z nich otrzymano kultyury transformowane. W tym celu wykorzystywano różne gatunki oraz szczepy bakterii, a także różne eksplantaty.

Wspomniana już wcześniej, szalwia czerwonokorzeniowa (*Salvia miltiorrhiza*), będąca źródłem *Danshen*, jest jednym z najszerzej przebadanych gatunków szalwii. Studia nad tą rośliną dotyczą również badań z zakresu biotechnologii, a udaną transformację genetyczną szalwii czerwonokorzeniowej przeprowadzono już w latach dziewięćdziesiątych. W wyniku zakażenia różnymi szczepami *Rhizobium rhizogenes* pozyskano kilka klonów korzeni transformowanych tego gatunku różniących się akumulacją diterpenów, wśród których dominowały takie związki jak kryptotanszynon oraz tanszynon IIA (Zhi i Alfermann, 1993). W korzeniach włośnikowatych *S. miltiorrhiza* zanotowano także obecność związków polifenolowych. Elicytacja z udziałem jasmonianu metylu skutkowałą zwiększeniem zawartości polifenoli w korzeniach w znacznie wyższym stopniu niż w przypadku tanszynonów. Elicytor oddziaływał szczególnie korzystnie na produkcję kwasu rozmarynowego, cynamonowego oraz salwianolowego B. W przypadku tanszynonów pobudzenie biosyntezy odnotowano jedynie w przypadku kryptotanszynonu i dihydrotanszynonu I (Xing i in., 2018a).

Kuźma i współpracownicy (2011) uzyskali korzenie włośnikowate szalwii austriackiej, *S. austriaca* Jacq. stosując szczep A4 *Rhizobium rhizogenes*. Po 4 tygodniach zanotowali 50% odpowiedź zarówno dla eksplantatów liściowych, które zakażano w ogonek/blaszkę liściową, jak i eksplantatów pędowych, infekowanych poniżej pąka szczytowego (Kuźma i in., 2011).

W przypadku transformacji genetycznej szalwii lekarskiej, *S. officinalis* wykorzystano dwa szczepy *R. rhizogenes*: A4 i ATCC 15834. W doświadczeniu jako eksplantaty stosowano nakłuwane w węzeł pędy oraz nakłuwane w nerw liście. Oceniano także wpływ acetosyringonu dodawanego do podłoża na efektywność procesu transformacji (Grzegorzczuk i in., 2006). Tylko eksplantaty pędowe okazały się odpowiednie dla uzyskania korzeni włośnikowatych szalwii lekarskiej, a użycie szczepu ATCC 15834 skutkowało istotnie wyższym odsetkiem odpowiedzi (57%) niż szczepu A4 (37%). Dodatek



acetosyringonu wpływał korzystnie na przebieg procesu transformacji jedynie w przypadku szczepu A4, kiedy związek ten był dodawany do podłoża wzrostowego dla bakterii.

Korzenie włośnikowate szaławii muszkatołowej, *S. sclarea* L. uzyskano w wyniku zakażenia szczepem LBA 9402 *R. rhizogenes*. Jednocześnie wykazano, że kultura prowadzona na świetle dostarczała trzykrotnie więcej związków diterpenowych (171,5 mg/l kultury) niż korzenie hodowane w ciemności (54,5 mg/l podłoża) (Kuźma i in., 2006).

Innym gatunkiem poddanym transformacji genetycznej była *S. virgata* Jacq. W powyższym eksperymencie wykorzystano 4 szczepy *R. rhizogenes* (A4, ATCC 15834, R1000, GM1534 oraz C58C1), które okazały się mieć różną efektywność w odniesieniu do indukcji procesu transformacji na eksplantatach liściowych. Najlepszą odpowiedź wynoszącą 56% uzyskano dla szczepu ATCC 15834. Co więcej, jeden z otrzymanych w ten sposób klonów charakteryzował się najwyższym przyrostem biomasy (2,29 g suchej masy) oraz najwyższą zawartością kwasu rozmarynowego (0,45 mg/g suchej masy) (Abrishamchi i in., 2022).

Kulturę korzeni transgenicznych uzyskano także dla szaławii zielonej, *Salvia viridis* L. Została ona zainicjowana w wyniku zakażenia *R. rhizogenes* szczepem A4. Najwyższy procent transformacji (45%) uzyskano podczas infekcji pędów bakteriami hodowanymi na podłożu wzbogaconym o acetosyringon. Analiza jakościowa metanolowo-wodnych ekstraktów wykazała, że związkiem dominującym we wszystkich otrzymanych klonach był kwas rozmarynowy. Najbardziej produktywny klon (K3) wytwarzał 35,8 mg RA na g suchej masy, co było wartością 8-krotnie wyższą od tej raportowanej dla korzeni rośliny macierzystej (Grzegorzczak-Karolak i in., 2018).

Z kolei Li i współpracownicy (2016), na skutek transformacji genetycznej szczepem ATCC 15834 *R. rhizogenes* otrzymali korzenie włośnikowate *S. castanea* Diels f. *tomentosa* Stib. Otrzymaną kulturę poddano elicytacji ekstraktem drożdżowym, jonami srebra oraz jasmonianem metylu istotnie zwiększając w niej poziom tanszinonów (Li i in., 2016). Również korzenie transformowane *S. przewalskii* otrzymane w wyniku transformacji *R. rhizogenes* ATCC 15834 poddano elicytacji. Kwas salicylowy w stężeniu 50  $\mu\text{M}$  i jasmonian metylu w stężeniu 400  $\mu\text{M}$  okazały się optymalne dla zwiększenia akumulacji związków polifenolowych i tanszinonów w kulturze (J. Li i in., 2020).

Odnotowano również udaną transformację genetyczną *S. tomentosa* Mill. W badaniu, wykorzystując szczep ATCC 15834 *R. rhizogenes*, zastosowano dwie procedury zakażenia

– kokultywację z bakteriami oraz bezpośrednio nakłucie eksplantatu. Ostatecznie otrzymano 111 klonów korzeni transformowanych spośród których 35% wykazało stabilny wzrost i zostało wyselekcjonowane do dalszych etapów badań (Marchev i in., 2011).

Poprzez infekcję tym samym szczepem bakterii, ATCC 15834, uzyskano także korzenie włósnikowate *S. broussonetti* Benth. (Fraga i in., 2005) oraz *S. corrugata* Vahl. (Kentsop i in., 2021). W tym ostatnim przypadku otrzymaną kulturę hodowano na większą skalę w systemie okresowego zalewania, w bioreaktorze typu Rita i oceniono w niej produkcję związków terpenowych. Okazało się, że korzenie transformowane *S. corrugata* mają inny profil fitochemiczny niż korzenie roślin macierzystych tego gatunku. Związkiem występującym w obu kulturach był wprawdzie feruginol, lecz jedynie w korzeniach włósnikowatych zanotowano obecność agastolu (Kentsop i in., 2021).

W innych badaniach, Ruffoni i wsp. (2016) przeprowadzili transformację *S. wagneriana* Polak., w której jako eksplantaty wykorzystano ogonki i blaszki liściowe zakażane jednym z dwóch szczepów *R. rhizogenes* (ATCC-15834 i NCPPB-1855). Naukowcy zaobserwowali, że otrzymana przez nich kultura korzeni wytwarza większą ilość kwasu rozmarynowego niż roślina macierzysta. Co więcej, dodatek hydrolizatu kazeiny wpłynął korzystnie na akumulację tego metabolitu zwiększając jego ilość ponad dwukrotnie (Ruffoni i in., 2016).

Norouzi wraz z zespołem (2017) przeprowadzili transformację 7 gatunków szałwii, wykorzystując 4 szczepy *R. rhizogenes* (1724, 2659, ATCC-15834 oraz A4). Efektywność transformacji i liczba powstałych na eksplantat korzeni zależała zarówno od gatunku rośliny jak i zastosowanego szczepu bakterii. Szczep A4 okazał się korzystny w przypadku *S. eremophila* Boiss. i *S. reuteriana* Boiss., dając, odpowiednio, 3,3 i 3,9 korzeni na jednym eksplantacie; szczep 2659 dla *S. nemorosa* L. (2,6), *S. multicaulis* Vahl. (4,4) i *S. verticillata* L. (5,0), a szczep ATCC-15834 dla *S. macrosiphon* Boiss. (5,1) oraz *S. virgata* (3,0) (Norouzi i in., 2017).

Tymczasem dane literaturowe donoszą o kulturach transformowanych pędów tylko w przypadku dwóch gatunków szałwii. Pędy transgeniczne *S. miltiorrhiza* zostały uzyskane w dwóch niezależnych eksperymentach. Yan i Wang (2007) otrzymali je w wyniku kokultywacji fragmentów liści z zawieszoną bakteryjną *A. tumefaciens* (Yan i Wang, 2007). Z kolei Wang i wsp. (2013) zregenerowane rośliny uzyskali na bazie korzeni włósnikowatych wyłożonych na podłożu MS wzbogacone w regulatory wzrostu. Otrzymane

w 2013 roku roślin *Salvia miltiorrhiza* charakteryzowały się cechami typowymi dla organów transformowanych: miały pomarszczone liście oraz długie i grube korzenie (Wang i in., 2013; Yan i Wang, 2007). Zmienione genetycznie rośliny rosły szybko i w korzeniach akumulowały 1,8- oraz 4,7-krotnie więcej tanshinonów w porównaniu z, odpowiednio, korzeniami transformowanymi i korzeniami roślin niezmienionymi genetycznie (Wang i in., 2013). Poprzez infekcję *A. tumefaciens* uzyskano również zmienione genetycznie pędy *Salvia chinensis* Benth. (Xu i Yang, 1993).

### 3. Cel pracy

*Salvia bulleyana* jest rośliną wykorzystywaną w chińskiej medycynie ludowej, której potencjał leczniczy związany jest z obecnością w surowcu tanszidonów oraz związków polifenolowych. Biotechnologia roślin umożliwia pozyskiwanie znacznych ilości wysokiej jakości surowców roślinnych, które są bogate w metabolity wtórne. Szczególnie korzystnym zabiegiem jest prowadzenie kultur organów transgenicznych. Celem mojej pracy było zastosowanie wybranych technik biotechnologicznych dla uzyskania wysoko produktywnych kultur korzeni i pędów transformowanych *S. bulleyana*. Badania składały się z kilku etapów:

- ❖ Potwierdzenie transformacji czterech klonów korzeni transformowanych (C1-C4) oraz spontanicznie zregenerowanych pędów transgenicznych *Salvia bulleyana* otrzymanych w wyniku zakażenia *Rhizobium rhizogenes* szczepu A4.
- ❖ Analiza fitochemiczna metanolowo-wodnych ekstraktów z korzeni i pędów transformowanych.
- ❖ Selekcja klonu korzeni włósnikowatych charakteryzującego się najwyższą produktywnością, a następnie optymalizacja warunków wzrostu korzeni transformowanych linii C4 obejmująca dobór odpowiedniego podłoża wzrostowego, stężenia witamin oraz sacharozy w podłożu, a także warunków oświetlenia w celu otrzymania jak najwyższej akumulacji biomasy oraz produkcji polifenoli.
- ❖ Wykonanie krzywej wzrostu i produkcji korzeni włósnikowatych (C4) w celu określenia optymalnego dnia zbioru materiału roślinnego.
- ❖ Ocena wpływu elicytorów biotycznych i abiotycznych na produkcję związków polifenolowych w korzeniach transformowanych hodowanych w optymalnych warunkach.
- ❖ Optymalizacja warunków wzrostu pędów transgenicznych *S. bulleyana* obejmująca dobór odpowiedniego oświetlenia, wybór cytokininy i jej stężenia, a także ocenę wpływu hodowli w warunkach podłoża płynnych na akumulację biomasy i produkcji związków polifenolowych.
- ❖ Próba zwiększenia skali hodowli korzeni i pędów transformowanych w systemach czasowego zalewania, tj. bioreaktorach typu PlantForm i Rita.
- ❖ Wstępna ocena aktywności biologicznej metanolowo-wodnych ekstraktów przygotowanych z wybranego materiału z transformowanych kultur *S. bulleyana*.

## 4. Materiały i metodyka

### 4.1. Materiał roślinny

Materiałem wyjściowym do podjętych w ramach pracy doktorskiej badań były cztery klony korzeni transformowanych *Salvia bulleyana* (C1-C4) otrzymane w ramach pracy magisterskiej w wyniku transformacji genetycznej przy użyciu bakterii *Rhizobium rhizogenes* szczepu A4 (Wojciechowska, 2017). Klony C1-C3 zostały zapoczątkowane na eksplantatach liściowych, a C4 powstał w węźle pędu. Ponadto, klony C2 oraz C3 otrzymano podczas tury zakażenia, w której do podłoża dla bakterii dodano 200  $\mu\text{M}$  acetosyringonu. Po wyeliminowaniu bakterii, kultury uzyskanych korzeni hodowano w kolbach Erlenmayera o pojemności 300 ml zawierających 80 ml podłoża płynnego WP bez dodatku regulatorów wzrostu i pasażowano co 5 tygodni. Kolby z materiałem roślinnym inkubowano na wytrząsarce rotacyjnej (70 rpm) w fitotronie, w temperaturze  $26\pm 2^\circ\text{C}$  przy wilgotności 80-90%, w ciemności.

Jako materiał do badań użyto również kultury pędów uzyskanych w wyniku spontanicznej regeneracji na korzeniach transformowanych (klony korzeni C7 i C9) (P7 oraz P9). Kultury te wstępnie hodowano na podłożu MS zestalonym agarą (0,7%) i uzupełnionym 0,1 mg/l IAA (kwas indolo-3-octowy) oraz 1 mg/l m-Top (meta-topolin). Kultywacja pędów odbywała się w fitotronie, w temperaturze  $26\pm 2^\circ\text{C}$ , przy wilgotności 80-90% i oświetleniu lampami fluorescencyjnymi (PPFD 40  $\mu\text{M}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ) z zastosowaniem fotoperiodu światło/ciemność (16/8 h).

### 4.2. Potwierdzenie transformacji

W celu potwierdzenia procesu transformacji genetycznej czterech wyselekcjonowanych klonów korzeni *S. bulleyana* zastosowano łańcuchową reakcję polimerazy, PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*). Negatywną próbę kontrolną stanowiły korzenie roślin macierzystych rosnących w glebie. Podobne badania wykonano dla potencjalnie transformowanych kultur pędów (P7 i P9), a kontrolę w tym eksperymencie stanowiła kultura niezmienionych pędów uzyskanych z wysterylizowanych nasion.

Plazmidowy DNA bakterii *R. rhizogenes* hodowanych przez 24 h w płynnym podłożu YMB (Hooykaas i in., 1977) na wytrząsarce rotacyjnej (70 rpm) stanowił kontrolę pozytywną.

Do izolacji DNA pochodzącego z materiału roślinnego wykorzystano zestaw Syngen

Plant DNA Mini Kit (Syngen Biotech Sp. z o. o, Polska), a DNA bakteryjnego – Plasmid Mini Kit (A&A Biotechnology, Polska).

Pierwszym etapem izolacji roślinnego DNA było zmacerowanie 100 mg świeżej tkanki zamrożonej w ciekłym azocie (-80°C). Zmikronizowany materiał przenoszono do próbówki, dodawano do niego 400 µl buforu lizującego oraz 8 µl roztworu RNAzy A i mieszano, aż do zajścia całkowitej lizy tkanki. Następnie inkubowano w 65°C przez 10 min. Do próbówki dodawano 130 µl buforu lizującego, mieszano i inkubowano przez 5 min w warunkach obniżonej temperatury, na lodzie. Na kolumnkę klarującą, umieszczoną w 2 ml próbówce, przenoszono przygotowany wcześniej lizat. Zawartość wirowano przez 3 min z maksymalną prędkością. Sklarowany lizat umieszczano w nowej próbówce z 1,5 objętości buforu wiążącego i mieszano. 700 µl mieszaniny przenoszono na nową kolumnkę i wirowano przez 2 min z maksymalną prędkością. Otrzymany przesącz wylewano i powtarzano procedurę do momentu wykorzystania całego lizatu. Następnie, aby oczyścić kolumnki dodano 500 µl buforu płuczającego i wirowano. Przesącz wylewano i procedurę powtarzano z 750 µl buforu. Membranę suszono wirując ją z maksymalną prędkością przez 3 min. Osuszoną kolumnkę przenoszono do próbówki elucyjnej i dodawano 200 µl podgrzanego buforu do elucji. Próbkę inkubowano przez 3 min do wchłonięcia buforu przez membranę. Po odwirowaniu, wyizolowany DNA przechowywano w temperaturze -20°C do momentu przeprowadzenia dalszych analiz.

W przypadku izolacji plazmidowego DNA, 3 ml nocnej hodowli *R. rhizogenes* wirowano. Uzyskany supernatant wylewano, a do osadu dodawano roztwór do zawieszania komórek. Po całkowitym rozpuszczeniu osadu dolewano 200 µl roztworu lizującego i delikatnie mieszano do momentu, aż zaszła całkowita liza. Następnie mieszaninę inkubowano 3 min w temperaturze pokojowej do uzyskania klarownej, malinowej barwy. Dodatek 400 µl roztworu zobojętniającego i ostrożne wymieszanie skutkowało zanikiem malinowego koloru lizatu, który następnie wirowano przez 10 min przy 15000 rpm. Supernatant przenoszono na minikolumnę i ponownie wirowano przez 1 min. Uzyskany przesącz wylewano, a kolumnkę przepłukiwano 500 µl roztworu płuczającego, usuwając odwirowany płyn. Procedurę powtarzano z wykorzystaniem 600 µl drugiego roztworu płuczającego. Minikolumnę przenoszono do nowej próbówki i nanoszono na nią 60 µl buforu. Próbkę inkubowano przez 3 min w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano przez 1 min. Uzyskany plazmidowy DNA przechowywano w temp. 4-8°C do momentu przeprowadzenia dalszych analiz.

Do reakcji PCR wykorzystano geny: *aux1*, *aux2*, *rolB*, *rolC*, *rolD* oraz *virG*. Reakcję

proszono w termocyklerze MJ Mini™ Thermal Cykler z gradientem termicznym firmy Bio-Rad (Stany Zjednoczone). Sekwencje użytych starterów przedstawiono w tabeli 1. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: 2,5 µl 10-razy stężonego buforu reakcyjnego TaqNova, 2 µl 0,2 mM mieszaniny deoksynukleotydów (dNTPs), 1 µl 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl 2 U/µl polimerazy DNA *TaqNova*, 9,5 µl H<sub>2</sub>O, 4 µl primerów (2 µl forward i 2 µl reverse) i 5 µl wyizolowanego DNA. Najpierw przeprowadzono wstępną denaturację w temp. 95°C przez 3 min. Kolejny etap składał się z 36 cykli, w które wchodziły: denaturacja (95°C; 0,3 min), przyłączanie primerów (55°C; 0,3 min) oraz elongacja (72°C; 1,1 min). Końcowa elongacja trwała 3 min i przebiegała w temp. 72°C. Następnie produkty reakcji, tj. fragmenty odpowiadające analizowanym genom oraz standardowy marker DNA (M100-1000) nanoszono na 1,2% żel agarozowy. Elektroforezę prowadzono w buforze TBE, przez 1 h, pod napięciem 90 V. Następnie, żel umieszczano w roztworze bromku etydyliny i wizualizowano w transiluminatorze w świetle UV o długości fali 320 nm. Przy użyciu DNR BioImaging System MiniBIS Pro (Israel) wykonano fotografie żelu.

Tabela 1. Sekwencje starterów i wielkość genów użytych do reakcji PCR.

Gen	Sekwencja primera	Wielkość amplifikowanych genów (pz)
<i>aux1</i>	5' ATC TTA GTC ACT TCA TAG CAG TT 3' 5' CTT TTT GAG ATA GAA GAA CAA G 3'	500
<i>aux2</i>	5' ATA TCT GCT TCA ACA AAA GTA AC 3' 5' TGA GTT AAT CGA AAC GAT AAT A 3'	774
<i>rolB</i>	5' GCT CTT GCA GTG CTA GAT TT 3' 5' GAA GGT GCA AGC TAC CTC TC 3'	386
<i>rolC</i>	5' CTC CTG ACA TCA AAC TCG TC 3' 5' TGC TTC GAG TTA TGG GTA CA 3'	582
<i>rolD</i>	5'-CGTCAATTGGACAACATTCG-3' 5'-ACTCCAAAACCAATTGCCAG-3'	204
<i>virG</i>	5' AGT TCA ATC GTG TAC TTT CCT 3' 5' CTG ATA TTC AGT GTC CAG TCT 3'	319

### **4.3. Analiza fitochemiczna**

#### **4.3.1. Przygotowanie ekstraktów**

100 mg liofilizowanego i zmikronizowanego materiału roślinnego poddano ekstrakcji 30 ml mieszaniny metanolu z wodą (8:2 v/v) przy użyciu łaźni ultradźwiękowej UD-20, w temp. 40°C przez 15 min. Procedura ta była powtórzona dwukrotnie z użyciem 15 ml rozpuszczalnika. Otrzymane ekstrakty łączono i odparowywano do sucha na wyparce rotacyjnej w warunkach zmniejszonego ciśnienia. Suche ekstrakty przechowywano w lodówce (4°C) do momentu wykonywania dalszych analiz. W przypadku przygotowywania ekstraktów z pędów, po roztarciu materiału roślinnego, wstępnie zalewano go 15 ml chloroformu w celu usunięcia substancji balastowych takich jak chlorofil. Otrzymaną zawiesinę sonifikowano w temperaturze pokojowej przez 15 min, a następnie sączono. Następnie odsączony materiał roślinny ekstrahowano roztworem metanolu z wodą zgodnie z opisaną powyżej procedurą.

#### **4.3.2. Analiza jakościowa**

Analiza jakościowa związków polifenolowych obecnych w metanolowo-wodnych ekstraktach była przeprowadzona przy użyciu ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas (UHPLC-PDA-ESI-MS). Wykorzystano aparat UHPLC-300 RS (Dionex, Niemcy) wyposażony w detektor PAD (Waters 2998), spektrometr mas AmaZon SL z interfejsem ESI (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Niemcy) oraz kolumnę Zorbax SB C18 (150 x 2,1 mm, 1,9 µm; Agilent, USA). Fazę ruchomą stanowił 0,5% kwas ortofosforowy, a fazę ruchomą B – acetonitryl. Fazy były dostarczane zgodnie z gradientem: 0-1 min 5% B (v/v), 1-16 min 5-30% B, 16-17 min 30-50% B, 17-19 min 50% B, 19-20 min 50-5% B, 20-25 min 5% B (wyrównanie). Prędkość przepływu wynosiła 1,4 ml/min, a temperatura kolumny była utrzymana na poziomie 30°C dzięki zastosowaniu termostatu Jetstream Plus 5480 (Thermotechnic Products, Langenzersdorf, Austria).

Otrzymane anality zostały zidentyfikowane na podstawie czasów retencji, widm MS/MS oraz UV-vis, które porównywano do wzorców i danych literaturowych (Grzegorzczak-Karolak i in., 2020b; Liu i in., 2007; S. J. Zhao i in., 2011).



### 4.3.3. Analiza ilościowa

Do określenia zawartości zidentyfikowanych związków zastosowano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Suche ekstrakty rozpuszczano w 10 ml mieszaniny metanolu z wodą (8:2 v/v), a następnie sączono przy pomocy niesterylnych sączków (o średnicy porów 0,22  $\mu\text{m}$ ) do wialek chromatograficznych o pojemności 1,5 ml. Do przeprowadzenia analizy użyto systemu LaChrom Hitachi wyposażonego w pompę L-2130, autosampler L-2200 i termostat L-2350 oraz zastosowano kolumnę Ascentis Express C-18 (7,5 cm x 4,6 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ ; Supelco, USA). Fazę ruchomą A stanowił 0,5% kwas ortofosforowy, a ruchomą fazę B – acetonitryl. Prędkość przepływu faz była równa 1,6 ml/min i były one dostarczane zgodnie z gradientem: 0-1 min 5% ruchomej fazy B (elucja izokratyczna), 1-16 min 5-30% B (gradient liniowy, v/v), 16-25 min 30-50% B, 25-26 min 50% B, 26-27 min 50-5% B, 27-32 min 5% B (wyrównanie). Analiza została przeprowadzona w 35°C, a wielkość nastrzyku wynosiła 5  $\mu\text{l}$ . Widmo zebrano w zakresie 220-700 nm, a oznaczenie ilościowe przeprowadzono przy długości fali równej 325 nm.

Do procesów kalibracyjnych zastosowano wzorce: kwas kawowy (CA; Sigma Aldrich, St. Louis, USA), kwas rozmarynowy (RA; Extrasynthese, Genay, France) oraz kwasy salwianolowe A (SAA; ChemFaces, Hubei, China), B (SAB; Sigma Aldrich, St. Louis, USA) i F (SAF; ChemFaces, Hubei, China). Krzywe kalibracyjne wykonano w zakresie stężeń 1-100  $\mu\text{g/ml}$ , na podstawie pól pod pikami, które odpowiadały danym związkom. Wyznaczono równania regresji dla każdej z krzywych wzorcowych:  $y = 63565x$  ( $R^2 = 0,9998$ ) dla CA;  $y = 35532x$  ( $R^2 = 0,9998$ ) dla RA,  $y = 15383x$  ( $R^2 = 0,9999$ ),  $y = 11256x$  ( $R^2 = 0,9997$ ) dla SAB,  $y = 27876x$  ( $R^2 = 0,9999$ ) dla SAF. Dla związków, dla których nie można zakupić gotowych wzorców wykorzystano krzywe wykonane dla substancji o podobnej strukturze. Krzywą wzorcową wyznaczoną dla SAB użyto do oznaczenia zawartości kwasu salwianolowego E, SAA – dla kwasu salwianolowego K oraz litospermowego, SAF – dla izomerów tego związku, RA – dla heksozy kwasu rozmarynowego, rozmarynianu metylu, kwasu dehydrorozmarynowego i kwasu protolitospermowego oraz CA – dla pochodnych kwasu kawowego oraz kwasu kawoilotreoninowego.

#### **4.4. Korzenie transformowane**

##### **4.4.1. Wstępna selekcja klonów korzeni transformowanych**

W celu określenia wzrostu czterech wykazujących obiecujący wzrost klonów korzeni transformowanych, C1-C4, 0,4 - 0,5 g świeżej masy inokulatu (0,04 - 0,06 g suchej masy) było przenoszone do 80 ml świeżego podłoża WP i hodowane na wytrząsarce rotacyjnej (70 rpm) przez 5 tygodni. Kultury były inkubowane w fitotronie w temp  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , w ciemności. Po upływie 5 tygodni hodowli oznaczono przyrost biomasy korzeni włóśnikowatych, który wyrażono jako świeża ( $\acute{S}M$ ) i sucha masa ( $SM$ ). Świeżą masę ważono po wyjęciu korzeni z kolb Erlenmayera oraz odsączeniu podłoża. Materiał roślinny zamrażano i następnie liofilizowano. Po ponownym zważeniu określano wartości suchej masy. Indeks wzrostu ( $GI$ ) został obliczony jako  $[\acute{S}M(SM)_f - \acute{S}M(SM)_i] / \acute{S}M(SM)_i$ , gdzie:  $\acute{S}M(SM)_f$  – ostateczna świeża (sucha) masa;  $\acute{S}M(SM)_i$  – świeża (sucha) masa inokulatu. Eksperyment został powtórzony trzykrotnie (pasaże 29-31).

##### **4.4.2. Optymalizacja warunków hodowli korzeni transformowanych *S. bulleyana***

Biorąc pod uwagę akumulację biomasy jak i produkcję związków polifenolowych, korzenie transformowane klonu C4 zostały wybrane do dalszych badań. Pierwszy etap tych eksperymentów stanowiła optymalizacja warunków hodowli.

###### **4.4.2.1. Wpływ podłoża hodowlanego na wzrost i produkcję związków polifenolowych**

Do hodowli korzeni transformowanych najlepiej rosnącego i wysoko produktywnego klonu C4 *S. bulleyana* wykorzystano cztery standaryzowane podłoża wzrostowe: WP, SH, MS oraz B5, które zawierały pełną lub obniżoną o połowę zawartość mikro- oraz makroelementów ( $\frac{1}{2}WP$ ,  $\frac{1}{2}SH$ ,  $\frac{1}{2}MS$ ,  $\frac{1}{2}B5$ ). Inokulat był przenoszony do kolb Erlenmayera zawierających 80 ml podłoża i inkubowany na wytrząsarce rotacyjnej (70 rpm), w  $26^{\circ}\text{C}$ , w ciemności. Po 5 tygodniach hodowli zbierano materiał w celu określenia wpływu różnych wariantów podłoża na akumulację biomasy ( $\acute{S}M$ ,  $SM$ ,  $GI$ ) (pomiar wzrostu jak opisano powyżej w podrozdziale 4.4.1.) i związków polifenolowych (zgodnie z analizą opisaną w podrozdziale 4.3.3). Eksperyment powtórzono trzykrotnie (pasaże 32-34).

#### **4.4.2.2. Wpływ zawartości witamin na wzrost i produkcję związków polifenolowych**

Wpływ witamin na wzrost i produkcję korzeni transformowanych *S. bulleyana* (C4) badano wykorzystując wybrane wcześniej podłoża SH oraz ½SH. W standardowym podłożu SH stężenia witamin wynoszą: 5 mg/l kwasu nikotynowego, 5 mg/l chlorowodoru tiaminy, 0,5 mg/l chlorowodoru pirydoksyny oraz 1000 mg/l myo-inozytolu. W doświadczeniu użyto pełnej (FV), połowy (½V) oraz jednej czwartej (¼V) zawartości witamin, a także określono wpływ ich braku (0V) na kulturę korzeni włóśnikowatych *S. bulleyana*. Po 5 tygodniach hodowli w opisanych powyżej warunkach, określono wartości świeżej oraz suchej masy i indeks wzrostu kultury (pomiar wzrostu jak opisano powyżej w podrozdziale 4.4.1.) oraz przeprowadzono analizę ilościową związków polifenolowych (wg metodyki opisanej w podrozdziale 4.3.3.). Eksperyment powtórzono trzykrotnie (pasaże 34-36).

#### **4.4.2.3. Wpływ stężenia cukru w podłożu na wzrost i produkcję związków polifenolowych**

W celu oceny wpływu zawartości cukru w podłożu na akumulację biomasy i produkcję związków bioaktywnych, kultura korzeni transformowanych (C4) była hodowana w pożywce ½SH uzupełnionej połową zawartości witamin oraz różnymi stężeniami sacharozy: 2%, 3%, 4% i 5%. Po 5 tygodniach hodowli w opisanych powyżej warunkach, oznaczono wartości świeżej i suchej masy, indeks wzrostu (pomiar wzrostu jak opisano powyżej w podrozdziale 4.4.1.) oraz zawartość metabolitów wtórnych (wg metody opisanej w podrozdziale 4.3.3.). Eksperyment powtórzono trzykrotnie (pasaże 37-39).

#### **4.4.2.4. Wpływ warunków oświetlenia na wzrost i produkcję związków polifenolowych**

Kolejnym etapem optymalizacji warunków wzrostu klonu C4 było określenie wpływu warunków oświetlenia na akumulację biomasy i związków aktywnych w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* hodowanych w podłożu płynnym ½SH z dodatkiem połowy zawartości witamin oraz 3% stężeniem sacharozy. Kultura była inkubowana na wytrząsarkach rotacyjnych (70 rpm) w fitotronie, z zachowaniem fotoperiodu światło ciemność (16/8 h), w różnych warunkach oświetlenia wykorzystującego lampy LED, które charakteryzowały się różnymi długościami fali. Wykorzystano światło białe (390-760 nm), niebieskie (430 nm), czerwone (670 nm) oraz mieszane (70% światła czerwonego i 30% światła niebieskiego) (PMX

Sp. z o. o., Niepołomice, Polska). Zakres długości fal emitowanych przez lampy LED był mierzony przy pomocy testera BTS256-LED. Kontrolę stanowiły korzenie hodowane w ciemności. Po 5 tygodniach oceniono parametry wzrostu kultury, tj. świeżą i suchą masę, indeks wzrostu (pomiar wzrostu jak opisano powyżej w podrozdziale 4.4.1.) oraz zawartość polifenoli (wg metody opisanej w podrozdziale 4.3.3.). Eksperyment powtórzono trzykrotnie (pasaże 40-42).

#### 4.4.3. Krzywa wzrostu kultury korzeni transformowanych

Po optymalizacji warunków wzrostu wykonano krzywą wzrostu korzeni włośnikowatych. Analizę wzrostu prowadzono w cyklu 50 dniowym. W 5-dniowych odstępach czasu zbierano materiał w celu określenia wartości świeżej i suchej masy korzeni (g/kolbę) (pomiar wzrostu jak opisano powyżej w rozdziale 4.4.1.), a także przeprowadzono analizę ilościową zawartych w nich związków polifenolowych (wg metody opisanej w podrozdziale 4.3.3.). Na podstawie pozyskanych danych obliczono szybkość wzrostu korzeni ( $\mu$ ) oraz czas wymagany do podwojenia biomasy (dt). W każdym punkcie czasowym pobierano 3 kolby zawierające materiał roślinny.

$$\mu = \frac{2,303(\lg x - \lg x_0)}{t - t_0} \qquad dt = \frac{2,303 \lg 2}{\mu}$$

$\mu$  – szybkość wzrostu kultury (dzień<sup>-1</sup>)

dt – czas potrzebny do podwojenia biomasy (dni)

x – średnia świeża (sucha) masa (g/kolbę) w czasie t

$x_0$  – średnia świeża (sucha) masa (g/kolbę) w czasie  $t_0$

t – dzień zakończenia wykładniczej fazy wzrostu badanej kultury

$t_0$  – dzień rozpoczęcia wykładniczej fazy wzrostu badanej kultury

Eksperyment powtórzono trzykrotnie (pasaże 46-48).

#### 4.4.4. Elicytacja

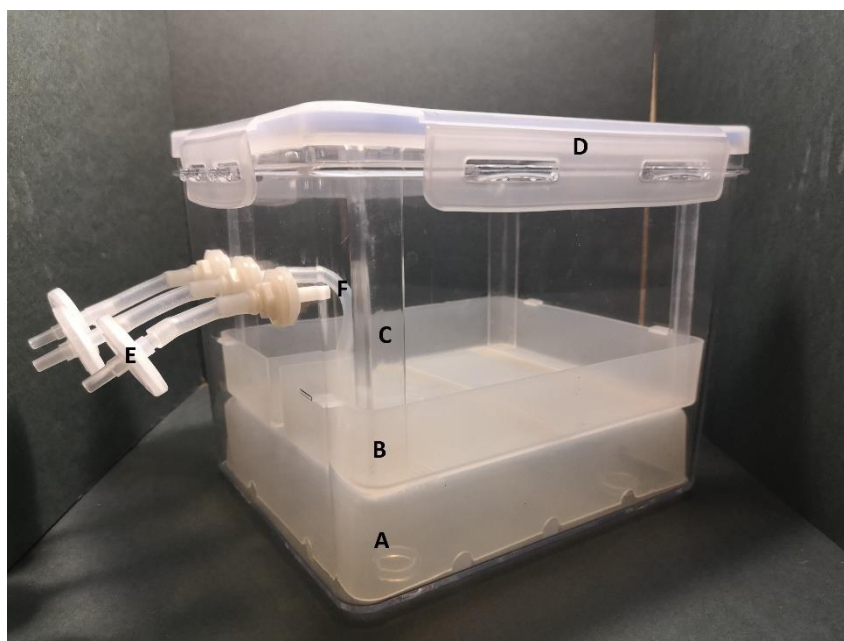
Klon C4 korzeni transformowanych hodowany na wytrząsarce rotacyjnej (70 rpm), w optymalnych warunkach składu podłoża ( $\frac{1}{2}$ SH,  $\frac{1}{2}$ V, 3% sacharozy) i oświetlenia (w ciemności) poddano działaniu czterech elicytorów w celu określenia ich wpływu na produkcję metabolitów wtórnych w kulturze. W eksperymencie wykorzystano cztery elicytory, każdy w dwóch różnych, wybranych na podstawie danych literaturowych, stężeniach. Aby określić oddziaływanie ekstraktu drożdżowego (YE) i kadmu w postaci soli chlorkowej (Cd) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy), ich skoncentrowane i wysterylizowane wodne roztwory dodawano pipetą o sterylnej końcówce do kolb Erlenmayera zawierających 80 ml płynnego podłoża uzyskując ostateczne stężenia: 100 i 200 mg/l dla YE oraz 50 i 100  $\mu$ M dla Cd. W przypadku jasmonianu metylu (MJA) i *trans*-anetolu (*t*-A) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy) ich stężone etanolowe roztwory sterylizowano przy pomocy sącza o średnicy porów 0,22  $\mu$ m i dodawano do kultury aby otrzymać końcowe stężenia: 50 i 100  $\mu$ M dla MJA oraz 5 i 10  $\mu$ M dla *t*-A. Elicytory były dodawane w 33 dniu hodowli, który został wybrany na podstawie wykonanej wcześniej krzywej wzrostu i produkcji kultury. Aby przeanalizować wpływ czasu na przebieg elicytacji materiał zbierano w czterech punktach czasowych: 1, 3, 5 oraz 7 dni po aplikacji elicytora. Następnie dla zebranego materiału roślinnego określono wartości świeżej oraz suchej masy, indeks wzrostu (pomiar wzrostu wykonano jak opisano powyżej w podrozdziale 4.4.1.) i zawartość polifenoli w materiale roślinnym (wg metody opisanej w podrozdziale 4.3.3.). Kontrolę dla traktowań YE i Cd stanowiły korzenie włośnikowate hodowane w tych samych warunkach (kontrola I, CI), a dla MJA i *t*-A korzenie, do których dodano taką samą objętość 96% etanolu (10  $\mu$ l), co roztworu elicytora, dla którego stanowił on rozpuszczalnik (kontrola II, CII). Każdy wariant doświadczenia wykonano trzykrotnie (pasaże 48-51).

#### 4.4.5. Zwiększenie skali hodowli korzeni transformowanych *S. bulleyana*

Próbie zwiększenia skali hodowli korzeni włośnikowatych klonu C4 przeprowadzono stosując systemy okresowego zalewania w postaci bioreaktorów typu PlantForm (PlantForm AB, Szwecja) oraz Rita (Réipient á Immersion Temporaire Automatique, VITROPIC, Francja).

Bioreaktor PlantForm (fotografia 2) ma wymiary 180x150x150 mm, a do jego wykonania wykorzystano przezroczysty poliwęglan, który jest odporny na temperatury do 120°C, więc można go poddawać procesowi sterylizacji. Wymiana gazowa jest kontrolowana

przez 3 otwory wlotowe/wylotowe, które są zakotwiczone w zewnętrznych ściankach bioreaktora za pomocą nakrętek i zacisków połączonych ze sobą silikonowymi uszczelkami. Gazy przechodzą przez sterylne sączi zamocowane do otworów silikonowymi wężykami. Środkowy filtr jest połączony osobnym wężykiem z wewnętrzną podstawą i to przez niego jest podawane ciśnienie, które sprawia, że podłoże jest czasowo wypychane go góry, aby zalać materiał roślinny. Wewnętrzna podstawa, znajdująca się na dnie bioreaktora, posiada 3 wyżłobienia po dłuższej oraz 2 po krótszej stronie, co usprawnia dostarczanie podłoża pod wpływem ciśnienia. Na podstawie zlokalizowana jest platforma, na której umieszcza się materiał roślinny. Jej dno jest perforowane, co umożliwi swobodny przepływ pożywki pod ciśnieniem i zalewanie materiału. 4-nożna ramka dociska platformę zapobiegając jej unoszeniu się pod wpływem cieczy pod ciśnieniem. Zamykana na zatrzaski pokrywa wyposażona jest w silikonową uszczelkę zapewniającą szczelność systemu.

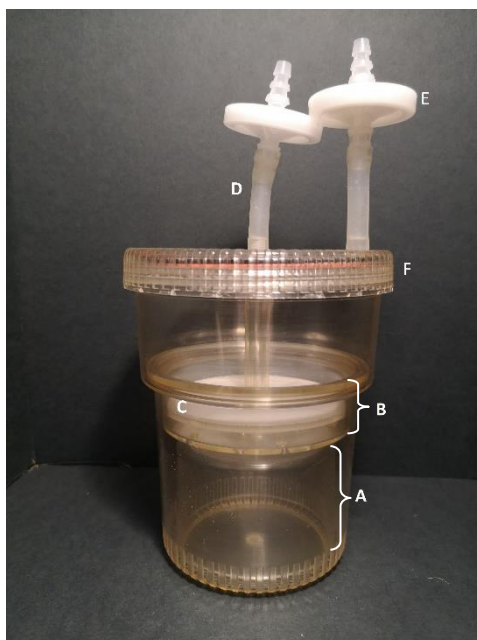


Fotografia 2 Budowa bioreaktora PlantForm: A – wewnętrzna podstawa; B – platforma; C – 4-nożna ramka; D – pokrywa; E – sterylne sączi; F – silikonowy wężyk połączony ze środkowym sączkiem.

Bioreaktor PlantForm uzupełniany 500 ml podłoża płynnego napowietrzany jest przy pomocy pompy Optima (Hagen, Kanada) o objętościowej prędkości przepływu równej  $0,6 \text{ m}^3/\text{h}$ .

Bioreaktor Rita (fotografia 3) składa się polipropylenowego naczynia o pojemności 500 ml, które można poddawać procesowi sterylizacji. Wewnątrz znajduje się podstawa tworząca dolną komorę, a nad nią nadstawka z otworami będąca komorą górną (hodowlaną), nad której dnem znajduje się okrągłe sito, na które wykłada się materiał roślinny. Wszystkie te

części skrócone są ze sobą przy pomocy rurki, a między sitem a dnem komory górnej znajduje się uszczelka. Naczynie zamknięte jest uszczelnioną, zakręcaną pokrywą, w której znajdują się dwa porty. Od każdego z nich odchodzi silikonowy wężyk, w którym umieszczane są sterylne saszki. Port centralny połączony jest z rurką przechodzącą przez wewnętrzne elementy bioreaktora i odpowiada za dostarczenie do dolnej komory, wypełnionej podłożem, naciśnięcia pochodzącego z podłączonej do niego pompy. Dzięki temu dochodzi do uniesienia podłoża i zalania materiału roślinnego.



Fotografia 3. Budowa bioreaktora Rita: A – wewnętrzna podstawa; B – komora hodowlana; C – okrągłe sito; D – port główny; E – sterylne saszki; F – zakręcana pokrywa.

W przypadku bioreaktora typu Rita stosuje się 250 ml podłoża, którego dostarczenie jest kontrolowane przy użyciu pompy ciśnieniowej DT4.4 (Becker, Niemcy) o objętościowej prędkości przepływu na poziomie  $4,2 \text{ m}^3/\text{h}$  i ciśnieniu 1000 mbar.

W doświadczeniu wykorzystano podłoże płynne  $\frac{1}{2}\text{SH}$  zawierające połowę zawartości witamin oraz 3% sacharozy. Bioreaktor typu PlantForm inokulowano 4 fragmentami korzeni, których średnia świeża masa wynosiła 0,569 g, a sucha 0,079 g. Z kolei w przypadku Rit użyto 2 fragmentów korzeni, z czego każdy ważył średnio 0,739 g, co odpowiadało 0,101 g suchej masy.

W badaniach wstępnych zastosowano 2 tryby czasowego zalewania inokulatu pożywką: 3 min co 1,5 h oraz 10 min co 3 h. Kultura była prowadzona w fitotronie, w ciemności.



Po 40 dniach inkubacji, zebrano materiał roślinny i określono wartości świeżej oraz suchej masy (pomiar wzrostu jak opisano powyżej w podrozdziale 4.3.1.), a także przeprowadzono analizę fitochemiczną (wg metody opisanej w podrozdziale 4.3.3). Każdy z wariantów doświadczenia powtórzono trzykrotnie (pasaże 53-56).

## **4.5. Pędy transformowane**

### **4.5.1. Wybór odpowiednich warunków oświetlenia**

Pąki szczytowe pędów transformowanych *S. bulleyana* klonu P7 o długości 0,5-1,0 cm były hodowane na zestalonym agarem (0,7 %) podłożu MS zawierającym 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l m-Top w różnych warunkach oświetlenia. W doświadczeniu wykorzystano cztery warianty oświetlenia lampami LED: światło czerwone (670 nm), niebieskie (430 nm), białe (390-760 nm) oraz mieszane (70% światła czerwonego i 30% światła niebieskiego) (PMX Sp. z o. o., Niepołomice, Polska). Zakres długości fali emitowanych przez lampy LED był mierzony przy pomocy testera BTS256-LED. Kontrolę stanowiły pędy hodowane pod oświetleniem lampami fluorescencyjnymi (PPFD 40  $\mu\text{M}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ). Pędy hodowano w fitotronie, w temperaturze  $26\pm 2^\circ\text{C}$ , przy wilgotności 80-90% z zastosowaniem fotoperiodu: 16 h światła i 8 h ciemności. Po pięciu tygodniach wzrostu określano morfologię kultury, określano długość pędu głównego (cm), liczbę pędów bocznych/przybyszowych (struktury  $\geq 0,5$  cm) i pąków (struktury  $< 0,5$  cm) oraz ich długość (cm), świeżą i suchą masę kultury (pomiar wzrostu jak opisano powyżej w podrozdziale 4.4.1.), zawartość barwników fotosyntetycznych oraz aktywność enzymów antyoksydacyjnych. Obliczono także współczynnik mnożenia, który jest wyrażany jako średnia wartość sumy wykształconych pędów i pąków na jeden eksplantat. Otrzymany materiał roślinny analizowano pod kątem zawartości związków polifenolowych (wg metody opisanej w podrozdziale 4.3.3.). Doświadczenie zostało powtórzone trzykrotnie (pasaże 27-29).

#### **4.5.1.1. Analiza zawartości barwników fotosyntetycznych**

W pędach klonu P7 hodowanych w różnych warunkach oświetlenia oznaczano zawartość barwników asymilacyjnych. Analizę wykonano według metody opisanej przez Lichtenthalera i Buschmanna (Lichtenthaler i Buschmann, 2001).

200 mg świeżej masy, pochodzącej z każdego traktowania światłem LED, zmikronizowano z 2 ml 80% acetonu o temperaturze  $4^\circ\text{C}$ . Po wirowaniu, supernatant przeniesiono do kolby miarowej i uzupełniono acetonem do 10 ml. Następnie zmierzono



absorbancję otrzymanego roztworu używając Spektrofotometru UV-1800 UV/VIS (Rayleigh, Pekin, Chiny) przy długościach fali: 664 nm dla chlorofilu *a*, 647 nm dla chlorofilu *b*, 470 nm dla karotenoidów. Zawartości chlorofilu obliczono przy pomocy wzorów:

$$C_{\text{ChlA}}=12,25 \times A_{(664)}-2,79 \times A_{(647)}$$

$$C_{\text{ChlB}}=21,50 \times A_{(647)}-5,10 \times A_{(664)}$$

Wyniki wyrażano na mg/g ŚM. Doświadczenie powtórzono trzykrotnie.

#### **4.5.1.2. Oznaczenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych**

Pędy P7 hodowane w warunkach oświetlenia LED o różnej długości fali badano również pod kątem wpływu warunków oświetlenia na aktywność enzymów antyoksydacyjnych.

##### **4.5.1.2.1. Oznaczanie aktywności SOD**

Do oceny aktywności SOD zastosowano metodę opisaną przez Giannopolitis i Ries (1977) polegającą na pomiarze stopnia redukcji błękitu nitrotetrazolinowego (NBT) przez anionorodnik ponadtlenny ( $\text{O}_2^-$ ), który powstaje w wyniku redukcji ryboflawiny (Giannopolitis i Ries, 1977). 50  $\mu\text{l}$  ekstraktu (zawierającego ok. 80  $\mu\text{g}$  białka) zostało dodane do mieszaniny reakcyjnej, w której skład wchodziło: 2,2 ml 0,1 M buforu fosforanowego o pH=7,8, 0,25 ml 0,015 mM ryboflawiny, 75  $\mu\text{l}$  NBT, 0,25 ml 0,156 M L-metioniny oraz 100  $\mu\text{l}$  EDTA. Po uzupełnieniu wodą do 3 ml dokonano pomiaru absorbancji mieszaniny przy długości fali 560 nm. Do próby kontrolnej zamiast ekstraktu, dodano taką samą objętość wody.

Wyniki przedstawiono w jednostkach aktywności enzymu na miligram białka (U/mg białka), którego ilość w pędach z poszczególnych traktowań oznaczono według metody opisanej poniżej w podrozdziale 4.5.1.3. Wszystkie odczynniki użyte w oznaczeniu zostały zakupione w firmie Merck KGaA (Niemcy).

##### **4.5.1.2.2. Oznaczanie aktywności POD**

Do oznaczenia aktywności POD wykorzystano metodę wg. Hemedy i Kleina (1990), która ocenia szybkość utleniania gwajakolu w obecności nadtlenu wodoru pod wpływem enzymu zawartego w określonej objętości próbki (Hemeda i Klein, 1990). Mieszaninę

reakcyjną stanowiło: 0,15 ml 0,2 M buforu fosforanowego (pH = 6), 0,15 ml 0,2 M gwajakolu, 0,5 ml 0,01 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w buforze fosforanowym, 0,5 ml 10% kwasu siarkowego, 0,5 ml 10% siarczynu sodowego, 0,5 ml wyciągu roślinnego oraz 0,7 ml wody. Zastosowano 3 rodzaje prób: kontrolną (bez ekstraktu roślinnego), ślełą (bez dodatku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oraz pełną (zawierającą wszystkie odczynniki i badany ekstrakt), które inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej. Pomiar aktywności enzymu był oznaczany jako wzrost absorbancji (przy długości fali 470 nm), który był uzależniony od stopnia utleniania gwajakolu.

Wyniki przedstawiono w jednostkach aktywności enzymu na miligram białka (U/mg białka), którego ilość w pędach z poszczególnych traktowań oznaczono według metody opisanej poniżej w podrozdziale 4.5.1.3. Wszystkie użyte w powyższym oznaczeniu odczynniki zostały zakupione w firmie Merck KGaA (Niemcy).

#### **4.5.1.2.3. Oznaczanie aktywności CAT**

Aktywność CAT oznaczono zgodnie z metodą zaproponowaną przez Aebi (Aebi, 1983). Została ona wyrażona jako spadek ilości nadtlenu wodoru w ciągu 1 minuty, który nastąpił w wyniku dodania 0,15 ml 2 mM roztworu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w buforze fosforanowym do wytrząsanej przez 30 min mieszaniny reakcyjnej (1,825 ml 0,067 M buforu fosforanowego o pH = 7,0 oraz 50 µl ekstraktu). Próbę referencyjną stanowił bufor fosforanowy z dodatkiem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 240nm.

Wyniki przedstawiono w jednostkach aktywności enzymu na miligram białka (U/mg białka), którego ilość w pędach z poszczególnych traktowań oznaczono według metody opisanej poniżej w podrozdziale 4.5.1.3. Wszystkie odczynniki użyte w oznaczeniach zostały zakupione w firmie Merck KGaA (Niemcy).

#### **4.5.1.3. Oznaczanie zawartości białka w materiale roślinnym**

Do oznaczenia ilości białka w materiale roślinnym wykorzystano metodę wg Bradforda (1976), która polega na łączeniu się cząsteczek białka z barwnikiem, błękitem brylantowym (Bradford, 1976). Krzywa wzorcowa została wykonana z wykorzystaniem albuminy pochodzącej z surowicy bydłowej (BSA) rozpuszczonej w 0,9% roztworze chlorku sodu w zakresie stężeń 1 – 10 µg. Absorbancję mierzono przy długości fali równej 595 nm.

100 mg świeżej masy pochodzącej z każdego wariantu oświetlenia rozcierano, dodając

trzykrotnie 0,5 ml buforu do oznaczania białek (50mM Tris (2-amino-2-(hydroksymetylo)-1,3-propandiol) w 0,2 M HCl; pH=7,5). Po uzupełnieniu buforem do 2 ml, mieszaninę wirowano przez 10 min (18000 rpm). Otrzymany supernatant, po odpowiednim rozcieńczeniu, został wykorzystany do spektrofotometrycznego oznaczenia ilości białek w materiale roślinnym (595 nm). Próbę badaną stanowił roztwór zawierający: 2 ml odczynnika Bradforda (kwas ortofosforowy, etanol, błękit brylantowy), 2 ml Tris oraz 50 µl rozcieńczonego ekstraktu. Natomiast próbę kontrolną stanowiły 2 ml odczynnika Bradforda oraz 2 ml Tris. Wyniki wyrażone w µg/ml na podstawie odczytu z krzywej wzorcowej (R=0,9796) przeliczano na mg/g ŚM:

$$c = \frac{A - 0,1180}{0,051}$$

c – zawartość białka [µg/ml]

A – absorbancja

#### **4.5.2. Wybór odpowiedniej cytokininy i jej stężenia**

Fragmety szczytowe pędów transformowanych P7 o długości 0,5-1,0 cm hodowano w fitotronie w warunkach światła białego LED na stałym podłożu MS zawierającym 0,1 mg/l IAA oraz jedną z cytokinin: rybozydem 6-benzylaminopuryny (BAPR), meta-topolinem (m-Top) lub N-benzyl-9-(2-tetrahydropiranylo)-adeniną (BPA) w stężeniach 0,5, 1,0 lub 2,0 mg/l. Po pięciu tygodniach inkubacji oceniono współczynnik mnożenia kultury, długość pędów głównych oraz powstałych pędów bocznych/przybyszowych, ich liczbę oraz liczbę wytworzonych pąków, a także świeżą oraz suchą masę kultury (pomiar wzrostu jak opisano powyżej w podrozdziale 4.4.1.). Przeprowadzono również analizę ilościową związków polifenolowych zawartych w otrzymanym materiale roślinnym (wg metody opisanej w podrozdziale 4.3.3.). Doświadczenie zostało przeprowadzone trzykrotnie (pasaże 34-36).

#### **4.5.3. Hodowla pędów transformowanych w podłożu płynnym**

Podjęto się prowadzenia kultury pędów transformowanych w podłożu płynnym wykorzystując cztery warianty hodowli. Kulturę hodowano przy oświetleniu lampami fluorescencyjnymi (PPFD 40 µM/m<sup>2</sup>·s) z zastosowaniem fotoperiodu w podłożu MS z dodatkiem 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l BAPR. Pierwszy wariant stanowiła płynna hodowla

stacjonarna bez wykorzystania materiałów podporowych, drugi – hodowla stacjonarna z wykorzystaniem nanocelulozy bakteryjnej (5 x 5 x 0,5 cm; Instytut Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej, Łódź, Polska) jako podpory, trzeci zaś kultura stacjonarna z użyciem jako podpory pianki poliuretanowej (5 x 5 x 0,7 cm; Eurofoam Polska sp. z o. o., Zgierz, Polska). Pędy transformowane *S. bulleyana* hodowano również w podłożu płynnym wytrząsanym z wykorzystaniem wytrząsarki rotacyjnej (70 rpm). Kultury prowadzone w warunkach stacjonarnych były inkubowane w słoikach hodowlanych o pojemności 200 ml, a w wytrząsanych – w kolbach Erlenmayera o pojemności 300 ml. W każdym naczyniu umieszczono dwa wierzchołki pędów. Próbę kontrolną stanowiły pędy hodowane na analogicznym podłożu stałym (0,7%).

Po pięciu tygodniach hodowli określono średnią długość pędu głównego oraz liczbę i długość pędów bocznych/przybyszowych, średnią liczbę pąków, współczynnik mnożenia, morfologię kultury oraz jej średnią świeżą i suchą masę (pomiar wzrostu wykonano jak opisano powyżej w podrozdziale 4.4.1.). Przeprowadzono również analizę fitochemiczną materiału roślinnego z poszczególnych traktowań (wg metody opisanej w podrozdziale 4.3.3.). Doświadczenie zostało powtórzone trzykrotnie (pasaże 37-40).

#### **4.5.4. Hodowla pędów transformowanych w bioreaktorach typu Rita i PlantForm**

Ostatecznie w celu zwiększenia skali hodowli kultura pędów P7 była prowadzona w dwóch systemach czasowego zalewania, w bioreaktorach typu PlantForm (PlantForm AB, Szwecja) oraz Rita (Récipient á Immersion Temporaire Automatique, VITROPIC, Francja) opisanych szczegółowo w podrozdziale 4.4.5. PlantForm zawierał 500 ml, a Rita 250 ml podłoża MS zawierającego 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l BAPR. Inokulat stanowiło w przypadku bioreaktora PlantForm 20 wierzchołków pędów o świeżej masie równej 0,618 g oraz suchej 0,079g, a Rita 10 wierzchołków pędów o świeżej masie 0,309 g, a suchej 0,039 g. W obu przypadkach kultura była zalewana podłożem przez 3 min w przeciągu 1,5 h. Po pięciu tygodniach oceniono morfologię kultury, długość pędów głównych, długość i liczbę pędów bocznych/przybyszowych, liczbę powstałych pędów i pąków oraz obliczono współczynnik mnożenia. Ponadto wyznaczono wartości świeżej i suchej masy (jak opisano powyżej w podrozdziale 4.4.1.), a także wykonano analizę fitochemiczną pozyskanego materiału roślinnego (wg metody opisanej w podrozdziale 4.3.3.). Doświadczenie przeprowadzono trzykrotnie (pasaże 48-50).

## 4.6. Podłoża stosowane w pracy

### 4.6.1. Podłoża stosowane w hodowli korzeni i pędów transformowanych *S.*

#### *bulleyana*

Wszystkie podłoża były sterylizowane w autoklawie, w temperaturze 121°C, przy ciśnieniu 1 atm, przez 20 min. Przed sterylizacją podłoża doprowadzono do pH = 5,7-5,8 stosując 0,1 M roztwór NaOH lub 5% roztwór HCl. Zawartość agaru w podłożu stałym, w którym hodowano pędy transformowane wynosiła 7,2 g/l.

Związek	Zawartość w mg/l podłoża			
	WP	SH	MS	B5
<b>Mikroelementy</b>				
CoCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O	-	0,10	0,025	0,025
CuSO <sub>4</sub> x5H <sub>2</sub> O	0,25	0,20	0,025	0,025
FeNaEDTA	36,70	19,80	36,70	36,70
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20	5,00	6,20	3,00
KI	-	1,00	0,83	0,75
MnSO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O	22,30	10,00	16,90	10,00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	0,25	0,10	0,25	0,25
ZnSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	8,60	1,00	8,60	2,00
<b>Makroelementy</b>				
CaCl <sub>2</sub>	72,50	151,00	332,02	113,23
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00	-	170,00	-
KNO <sub>3</sub>	-	2500,00	1900,00	2500,00
MgSO <sub>4</sub>	180,54	195,05	180,54	121,56
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400,00	-	1650,00	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	-	130,44
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	134,00
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x4H <sub>2</sub> O	471,26	-	-	-
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	990,00	-	-	-
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	300,00	-	-
<b>Witaminy</b>				
Glicyna	2,00	-	2,00	-
Myo-inozytol	100,00	1000,00	100,00	100,00
Kwas nikotynowy	0,50	5,00	0,50	1,00
Chlorowodorek pirydoksyny	0,50	0,50	0,50	1,00
Chlorowodorek tiaminy	1,00	5,00	0,10	10,00
Sacharoza	30000,0	30000,0	30000,0	30000,0

#### 4.6.2. Podłoże stosowane w hodowli *Rhizobium rhizogenes* (YMB) (Hooykaas i in., 1977)

Podłoże było sterylizowane w autoklawie, w temperaturze 121°C, przy ciśnieniu 1 atm, przez 20 min. Przed sterylizacją zostało doprowadzone do pH = 7,0-7,2 stosując 0,1 M roztwór NaOH lub 5 % roztwór HCl. Zawartość agaru w podłożu wynosiła 15 g/l.

Związek	Zawartość w g/l
mannitol	10,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,50
NaCl	0,10
Ekstrakt drożdżowy	0,40
MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	0,20

#### 4.7. Badania biologiczne

Do analizy właściwości biologicznych zostały wykorzystane suche ekstrakty z korzeni oraz pędów transformowanych *S. bulleyana*. 1,0 g zliofilizowanego materiału roślinnego poddano 3-krotnej ekstrakcji mieszaniną 30 ml metanolu z wodą (4:1 v/v) przy użyciu łaźni ultradźwiękowej UD-20, w temperaturze 40°C przez 15 min. Otrzymane ekstrakty łączono i odparowano do sucha na wyparce rotacyjnej w warunkach zmniejszonego ciśnienia. Do czasu przeprowadzenia analiz, suche ekstrakty przechowywano w lodówce (4°C). W przypadku pędów transformowanych, przeprowadzono wstępne „oczyszczanie” materiału przy pomocy 30 ml chloroformu sonifikując przez 15 min w temperaturze pokojowej w celu usunięcia substancji balastowych (chlorofilu, związków tłuszczowych). Po przesączeniu, materiał roślinny ekstrahowano mieszaniną metanolu z wodą, jak opisano powyżej.

Dla ekstraktów z wybranego materiału roślinnego wykonywano analizy z zakresu aktywności antyoksydacyjnej, cytotoksycznej oraz przeciwdrobnoustrojowej.

##### 4.7.1. Aktywność antyoksydacyjna

W celu określenia aktywności antyoksydacyjnej surowców wykorzystywano testy aktywności przeciwrodnikowej: DPPH, ABTS oraz NBT, test redukcji jonów żelaza: FRAP oraz test zahamowania peroksydacji lipidów: TBARS. Kontrolę w tych badaniach stanowił syntetyczny antyoksydant BHT (Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy).

Odczynniki stosowane w testach aktywności przeciwutleniającej zostały zakupione w firmie Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Do rozpuszczenia przygotowanych wcześniej suchych ekstraktów wykorzystano mieszaninę metanolu z wodą (4:1, v/v).

Materiał do badań stanowiły:

- ❖ cztery klony korzeni transformowanych *S. bulleyana* (C1-C4) hodowanych przez 5 tygodni w płynnym podłożu WP zawierającym 3% sacharozy w ciemności
- ❖ korzenie transformowane *S. bulleyana* klonu C4 o zoptymalizowanym wzroście i produkcji hodowane w podłożu ½SH ½V z 3% sacharozą pochodzące z 3 dnia elicytacji 100 µM jasmonianu metylu
- ❖ pędy transformowane *S. bulleyana* hodowane w podłożu stałym MS zawierającym 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l m-Top.

#### 4.7.1.1. Metoda „zmiatania” wolnych rodników DPPH

Zdolność do „zmiatania” wolnych rodników została oceniona przy pomocy testu DPPH zgodnie z protokołem opisanym przez Grzegorzycy-Karolak i Kiss (Grzegorzycy-Karolak i Kiss, 2018). 2 ml ekstraktu przygotowanego w różnych stężeniach (2, 20, 50, 100, 200 i 500 µg/ml) zostało dodane do 2 ml 0,2 mM świeżo przygotowanego metanolowego roztworu rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylowego (absorbancja tego roztworu po zmieszaniu w proporcjach 1:1 z metanolem powinna wynosić  $0,9 \pm 0,1$ ). Reakcja została przeprowadzona w temperaturze pokojowej w ciemności. Absorbancję otrzymanych roztworów mierzono po 30 minutach przy długości fali 517 nm wykorzystując jako odnośnik roztwór metanolu z wodą (4:1 v/v). Zdolność neutralizacji rodnika DPPH obliczono ze wzoru:

$$\% \text{ inhibicji} = 100 - (A_{\text{próbki}} - A_{\text{ślepa}} / A_{\text{kontrolna}}) \times 100\%$$

gdzie, A – absorbancja. Tymczasem próbę ślepa stanowiła próba zawierająca metanol zamiast DPPH. Z kolei do próby kontrolnej dodawano metanol zamiast ekstraktu.

Aktywność przeciwrodnikową wyrażono jako IC<sub>50</sub> (µg/ml), czyli stężenie potrzebne do zredukowania 50% początkowej ilości rodników.

#### 4.7.1.2. Metoda „zmiatania” rodnika ABTS

W przypadku testu „zmiatania” rodnika ABTS wykorzystano metodę opisaną przez Grzegorzycy-Karolak i wsp. (Grzegorzycy-Karolak i in., 2015). Dzień przed wykonaniem oznaczeń, 1 ml 7 mM ABTS zmieszano z 1 ml 2,45 mM nadsiarczanu potasu. Tak przygotowany roztwór był przechowywany przed użyciem przez 12-16 h w temperaturze pokojowej w ciemności. Następnie był on uzupełniony metanolem do objętości 100 ml, tak , aby jego absorbancja przy długości fali 734 nm po zmieszaniu z równą objętością metanolu wynosiła  $0,7 \pm 0,05$ . Przygotowano następujące stężenia badanego ekstraktu: 2, 5, 10, 20, 50, 100 oraz 200  $\mu\text{g/ml}$ , do których dodano równe objętości roztworu ABTS (2 ml do 2 ml). Absorbancję mierzono po 10 min przy długości fali 734 nm względem roztworu metanolu z wodą (4:1 v/v) używając spektrofotometru UV-1800 UV/VIS (Rayleigh, Pekin, Chiny). Stopień odbarwienia roztworu kationorodnika ABTS świadczy o aktywności przeciwrodnikowej zastosowanych ekstraktów. Procent inhibicji rodnika ABTS wyliczono ze wzoru:

$$\% \text{ inhibicji} = 100 - (A_{\text{próbki}} - A_{\text{ślepa}}/A_{\text{kontrolna}}) \times 100\%$$

gdzie A to absorbancja. Próbę ślepa stanowiła próba, do której dodawano metanol zamiast ABTS. Z kolei próba kontrolna nie zawierała ekstraktu.

Aktywność przeciwrodnikową wyrażono jako  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ), czyli stężenie potrzebne do zredukowania 50% początkowej ilości rodników.

#### 4.7.1.3. Ocena aktywności wobec anionorodnika ponadtlenkowego

Aktywność wobec anionorodnika ponadtlenkowego ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) została oceniona przy użyciu testu polegającego na redukcji błękitu nitrotetrazolinowego (NBT) zgodnie z metodyką opisaną wcześniej (Grzegorzycy-Karolak i Kiss, 2018). 1 ml roztworu NBT (156  $\mu\text{M}$  NBT w buforze fosforanowym o  $\text{pH} = 7,4$ ) połączono z 1 ml roztworu NADH (468  $\mu\text{M}$  dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego w 0,1 M buforze fosforanowym o  $\text{pH} = 7,4$ ) i 1 ml wodno-metanolowego ekstraktu z korzeni w różnych wcześniej przygotowanych stężeniach (2, 10, 50, 100, 200 oraz 500  $\mu\text{g/ml}$ ). Reakcję rozpoczęto poprzez dodanie 0,1 ml roztworu PMS (metasiarczanu fenazy; 60  $\mu\text{M}$  w 0,1 M buforze fosforanowym o  $\text{pH} = 7,4$ ). Po 5 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej, zmierzono absorbancję mieszaniny względem roztworu metanolu z wodą (4:1 v/v) przy długości fali 560 nm. % wiązania przez ekstrakt obecny w roztworze rodnika



obliczono ze wzoru:

$$\% \text{ inhibicji} = 100 - (A_{\text{próbki}} - A_{\text{ślepa}}/A_{\text{kontrolna}}) \times 100\%$$

gdzie, A – absorbancja. Próbę ślepa stanowiła próba, w której roztwór ABTS zastąpiono metanolem, a próba kontrolna zawierała metanol zamiast ekstraktu.

Aktywność przeciwrodnikową wyrażono jako IC<sub>50</sub> (μg/ml), czyli stężenie potrzebne do zredukowania 50% początkowej ilości rodników.

#### **4.7.1.4. Test oznaczania zdolności redukowania jonów żelaza – FRAP**

Odczynnik FRAP użyty w analizie składał się z 2,5 ml 10 mM roztworu TPTZ (2,4,6-tris(2-pirydylo)-s-triazyna) w 40 mM HCl, 2,5 ml 20 mM wodnego roztworu FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O oraz 45 ml 0,3 M buforu octowego o pH 3,6. 3 ml świeżo przygotowanego odczynnika FRAP połączono z 300 μl wody destylowanej i 100 μl rozpuszczonego w 80% metanolu ekstraktu. Mieszanina reakcyjna była inkubowana w 37°C przez 15 min. Po tym czasie zmierzono absorbancję mieszaniny przy długości fali 595 nm względem próby ślepej, w której ekstrakt zastępowano metanolem. Wyniki wyrażano w μM Fe(II)/g suchego ekstraktu. Krzywa kalibracyjna dla siarczanu żelaza (II) została wykonana w zakresie stężeń 0-2000 μM.

Wyniki obliczono ze wzoru:

$$C = c \cdot V/m$$

C – aktywność redukcyjna [μM Fe(II)/g SM]

c – zawartość jonów żelaza [μM] według krzywej kalibracji

V – objętość ekstraktu [l]

m – masa suchego ekstraktu w gramach [g]

#### **4.7.1.5. Inhibicja peroksydacji kwasu linolowego – metoda TBARS**

Jest to metoda oceniająca zdolność badanego ekstraktu do zahamowania peroksydacji kwasu linolowego. Została ona wykonana zgodnie z protokołem opisanym przez Grzegorzycy-Karolak i wsp. (Grzegorzycy-Karolak i Kiss, 2018). 0,3 ml ekstraktu roślinnego (o stężeniu 50 i 100 μg/ml) połączono z mieszaniną reakcyjną składającą się

z: 0,7 ml wody, 1,4 ml buforu fosforowego (200  $\mu$ M, pH = 7,4) oraz 1,4 ml kwasu linolowego (44M). Reakcja peroksydacji została zainicjowana poprzez dodanie 0,2 ml AAPH (dihydrochlorek 2,2'-azobis(amidynopropanu); 53,3 M). Następnie, mieszaninę inkubowano przez 3 godziny w 50°C. Po tym czasie, do 1 ml roztworu dodano 1 ml 0,05 M zamrożonego HCL, aby przerwać reakcje, a następnie, 2 ml Tween 40 oraz 2 ml 0,67% (w/w) kwasu tiobarbiturowego w celu ilościowego oznaczenie powstałego dialdehydu malonowego. Całość ogrzewano w temp. 95°C przez 30 min. Po schłodzeniu, zmierzono absorbancję próbek przy długości fali 535 nm. Procent zahamowania peroksydacji kwasu linolowego obliczono ze wzoru:

$$\% \text{ inhibicji} = (A_{\text{kontroli}} - A_{\text{próbki}} - A_{\text{ekstraktu}}) \times 100 / (A_{\text{kontroli}} - A_{\text{ekstraktu}})$$

Kontrolę stanowiła próbka, w której ekstrakt zastąpiono metanolem, a absorbancje ekstraktu mierzono dla próbki do której dodano metanol zamiast kwasu linolowego.

#### 4.7.2. Aktywność cytotoksyczna

Doświadczenie dotyczące cytotoksyczności *in vitro* metanolowo-wodnego ekstraktu z korzeni włośnikowatych (C4) hodowanych w podłożu 1/2SH 1/2V z 3% sacharozą pochodzących z 3 dnia elicytacji 100  $\mu$ M jasmonianu metylu zostało przeprowadzone przy użyciu: linii ludzkich komórek nowotworowych szyjki macicy – HeLa (CCL-2, ATCC (ang. *American Type Culture Collection*), Rockville, MD, USA), linii ludzkich komórek nowotworowych żołądka – AGS (CRL-1739; ATCC, Rockville, MD, USA), linii ludzkich komórek gruczołakoraka okrężnicy – LoVo (CCL-229<sup>TM</sup>, ATCC, Rockville, MD, USA) oraz linii mysich fibroblastów – L929 (LGC Standards, Middlesex, UK), która jest wymagana wg norm ISO 109935.

Przeżywalność komórek oceniono przy pomocy testu opierającego się na wybarwianiu komórek martwych błękitem tryptanu. Wszystkie linie komórkowe były hodowane w butelkach hodowlanych o pojemności 25 cm<sup>2</sup> w podłożu RPMI-1640 uzupełnionym o 10% inaktywowaną ciepłem płodową surowicę bydlęcą (FBS), penicylinę (100 U/ml) oraz streptomycynę (100  $\mu$ g/ml) (Biowest, Minneapolis, MN, USA) w standardowych warunkach (37°C; 5% CO<sub>2</sub>). Podłoże wzrostowe wymieniano 2 lub 3 krotnie w ciągu tygodnia w celu utrzymania komórek w logarytmicznej fazie wzrostu. Przy pasażowaniu, monowarstwa z kofluentnymi komórkami była traktowana 0,25% roztworem trypsyny.

W celu oceny aktywności metabolicznej zastosowano metodykę opisaną przez Weremczuk-Jeżyńską i wsp. (Weremczuk-Jeżyńska i in., 2020). Komórki linii L929, HeLa, AGS oraz LoVo wraz z podłożem zostały przeniesione na 96-dołkową płytkę ( $2 \times 10^5$  komórek na dołek) i inkubowane przez 24 h w  $36^\circ\text{C}$  i 5%  $\text{CO}_2$ . Badany ekstrakt został rozpuszczony w podłożu RPMI-1640 w następujących stężeniach: 0,25; 0,5; 1,25; 2,5 i 5,0 mg/l. Następnie, otrzymane rozcieńczenia dodano do komórek (100  $\mu\text{l}$ /dołek) i inkubowano w standardowych warunkach. Po tym czasie monowarstwy zostały przestudiowane przy użyciu mikroskopu świetlnego w celu oceny morfologii komórek, zgodnie z normą ISO o numerze 10993-5. Metabolizm komórek został oceniony przy użyciu testu redukcji MTT (bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowego) do formazanu, zgodnie z opisaną wcześniej procedurą (Kamizela i in., 2019). Roztwór MTT (5 mg/ml) dodano do każdego dołka, a płytki inkubowano przez 4 h w  $37^\circ\text{C}$ . Kryształy formazanu rozpuszczono w kwaśnym izopropanolu (0,1 M kwasu chlorowodorowego w stężonym izopropanolu) i płytki zanalizowano przy użyciu czytnika Victor 2 (Wallac Oy, Turku, Finlandia) przy długości fali 570 nm. Procent redukcji MTT został obliczony poprzez porównanie absorbancji testowanych komórek do absorbancji komórek kontrolnych. Wyniki przedstawiono jako średnią wartość procentową komórek, które przeżyły  $\pm$  błąd standardowy, obliczone na podstawie 4 niezależnych powtórzeń.

#### 4.7.3. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa

Aktywność przeciwbakteryjna i przeciwgrzybicza ekstraktu z korzeni włośnikowatych *S. bulleyana* hodowanych w podłożu  $\frac{1}{2}\text{SH}$   $\frac{1}{2}\text{V}$  z 3% sacharozą po 3 dniach ekspozycji na 100  $\mu\text{M}$  jasmonianu metylu została oceniona przy użyciu metody mikrorozcieńczeń, rekomendowanej przez EUCAST (Europejski Komitet ds. Testów Wrażliwości Przeciwdrobnoustrojowej). Suchy ekstrakt rozpuszczono w 0,5% DMSO (Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy) rozcieńczonym podłożem hodowlanym dla drobnoustrojów. Działanie przeciwdrobnoustrojowe wyrażono jako minimalne stężenie hamujące – MIC, minimalne stężenie bakteriobójcze – MBC lub minimalne stężenie grzybobójcze – MFC. W badaniu użyto referencyjnych szczepów bakterii Gram-dodatnich: *Staphylococcus aureus* ATCC 29,213 i *S. epidermidis* ATCC 12,228 oraz Gram-ujemnych: *Escherichia coli* ATCC 29,212 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27,853, a także grzybów *Candida albicans* ATCC 10,231 i *Candida glabrata* ATCC

2001. Bakterie hodowano na podłożu płynnym MH (Mueller-Hinton o pH ~ 7,2), a podłoże płynne niezawierające czerwieni fenolowej – RPMI-1640 (pH ~ 7,2) było użyte dla szczepów grzybów. Inokulat przygotowany zgodnie ze skalą McFarland, zawierający  $1 \times 10^8$  jednostek tworzących kolonię (CFU/ml) został dodany w objętości 10  $\mu$ l do roztworu ekstraktu z korzeni, a następnie inkubowany przez 24 h w 37°C w przypadku bakterii, a w przypadku grzybów przez 48 h w 37°C. Jako referencyjny środek przeciwbakteryjny zastosowano gentamycynę, a amfoterycynę B wykorzystano jako środek przeciwgrzybiczy.

#### 4.8. Analiza statystyczna

Wszystkie doświadczenia, jeśli nie podano inaczej, powtarzano trzykrotnie, a wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  błąd standardowy (SE). Wpływ różnych traktowań na akumulację biomasy, zawartość związków polifenolowych, aktywność antyoksydacyjna były analizowane przy pomocy testu analizy wariancji (ANOVA), której następstwem był test post-hoc opracowany przez Johna Tukey'a. Aktywność cytotoksyczna ekstraktu z korzeni, zawartości barwników asymilacyjnych, a także aktywność enzymów antyoksydacyjnych: SOD, POD i CAT w pędach transformowanych została porównana za pomocą testu Kruskala-Wallisa. Wyniki zostały uznane za statystycznie istotne na poziomie istotności  $p < 0,05$ . Obliczenia zostały przeprowadzone przy użyciu programu STATISTICA 10 PL (Statsoft, Kraków, Polska).

W przypadku optymalizacji wzrostu i produkcji korzeni i pędów transformowanych wykonano także analizę TOPSIS zgodnie z metodyką opisaną przez Ataei (Ataei, 2013). Pierwotna macierz decyzyjna (X) została skonstruowana z wykorzystaniem wybranych parametrów wzrostu i produktywności kultury, tj. indeksu wzrostu suchej masy (GI SM) lub wartości suchej masy (SM), całkowitej zawartości polifenoli (TPC) oraz zawartości kwasu rozmarynowego (RA) i salwianolowego K (SAK), a w przypadku pędów również współczynnika mnożenia (WM) Następnie X został znormalizowany ( $\bar{x}$ ) z wykorzystaniem następującej formuły:

$$\bar{x} = \frac{X_{ij}}{\sqrt{\sum_{ij} x_{ij}}}$$

gdzie  $i$  oznacza rząd macierzy (wariant podłoża), a  $j$  kolumnę macierzy (konkretny parametr wzrostu i produktywności kultury). Znormalizowana ważona macierz

decyzyjna ( $v$ ) została otrzymana z  $\bar{x}$  z użyciem następującej formuły:

$$v_{ij} = x_{ij} \times \omega_j$$

gdzie  $\omega_j$  oznacza względną wagę pojedynczego parametru wskazując jego istotność w skali od 0 do 1 tak, że

$$\sum_j \omega_j = 1$$

Wartości rozwiązań idealnego ( $V^+$ ) i antyidealnego ( $V^-$ ) dla każdego z użytych parametrów  $j$  zostały otrzymane w następujący sposób:

$$V_j^+ = \max(v_j)$$

$$V_j^- = \min(v_j)$$

Odległość Euklidesowa od idealnego i antyidealnego rozwiązania dla każdego z wariantów podłoży  $i$  zostały obliczone następująco

$$S_i^+ = \sqrt{\sum_i (v_{ij} - V_j^+)^2}$$

$$S_i^- = \sqrt{\sum_i (v_{ij} - V_j^-)^2}$$

Na koniec, obliczono wydajność dla każdego z analizowanych wariantów podłoża  $i$  z wykorzystaniem następującego równania

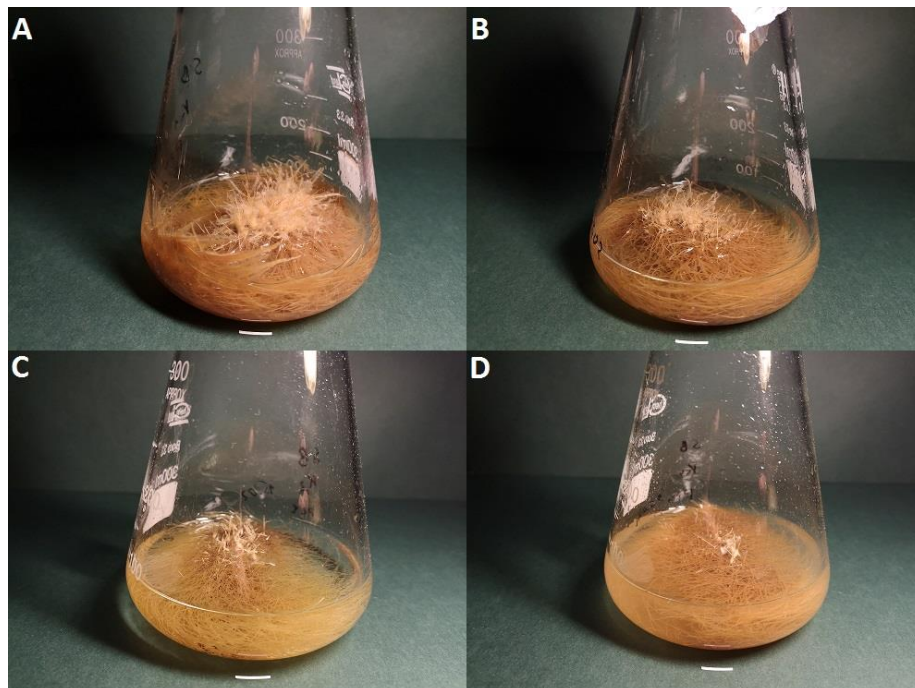
$$P_i = \frac{S_i^-}{S_i^+ + S_i^-}$$

Traktowania, dla których otrzymano najwyższą wydajność uznawano za optymalne.

## 5. Wyniki

### 5.1. Potwierdzenie transformacji

Wyselekcjonowane wstępnie na podstawie tempa wzrostu, cztery klon korzeni *S. bulleyana* (C1-C4) (fotografia 4), otrzymane w wyniku transformacji genetycznej *R. rhizogenes* szczepu A4, hodowano w podłożu płynnym WP i pasażowano co 5 tygodni. Po uzyskaniu stabilnego wzrostu (około 10 pasaży po wyeliminowaniu antybiotyku) z korzeni wszystkich klonów wyizolowano DNA w celu potwierdzenia transformacji genetycznej.

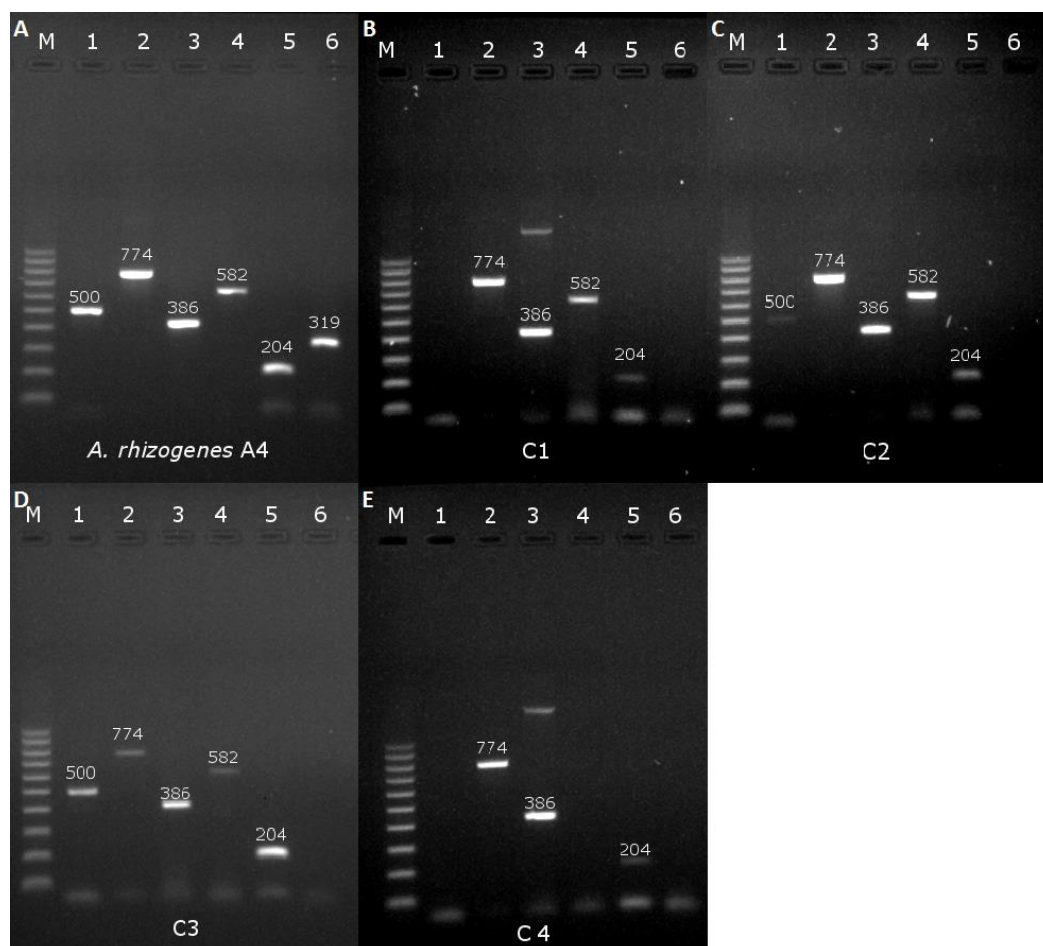


Fotografia 4. Korzenie transformowane *S. bulleyana* otrzymane w wyniku transformacji *R. rhizogenes* szczepu A4 po 5 tygodniach wzrostu w podłożu płynnym WP (pasaż 21). A – klon C1; B – klon C2; C – klon C3; D – klon C4. Skala 1 cm.

DNA korzeni analizowano pod kątem obecności w nim fragmentów pochodzenia bakteryjnego (*aux1*, *aux2*, *rolB*, *rolC*, *rolD*, *virG*). We wszystkich liniach korzeni włóśnikowatych wykryto fragmenty odpowiadające genom *aux2* (774 bp), *rolB* (386 bp) oraz *rolD* (204 bp). W przypadku klonów C2 oraz C3 zanotowano także obecność *aux1* (500 bp), a w genomie klonów C1, C2 oraz C3 – *rolC* (582 bp). Ponadto, w żadnej z badanych linii korzeni nie zidentyfikowano charakterystycznego dla bakterii genu *virG* (319 bp), co potwierdza, że otrzymane korzenie transformowane są wolne od bakterii, a stwierdzone powyżej geny zostały włączone do DNA rośliny.



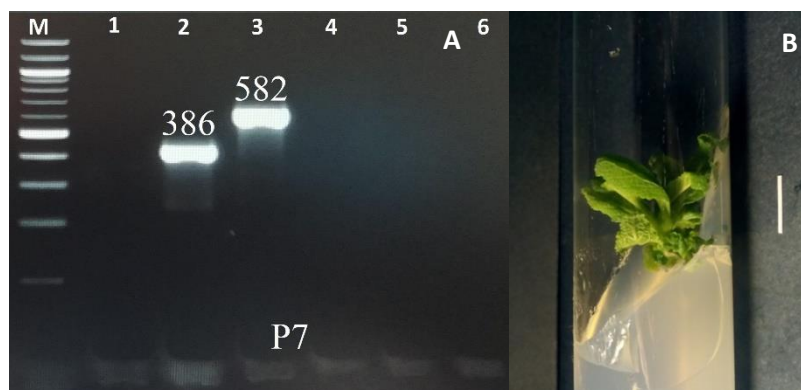
Żadnego z wyżej wymienionych fragmentów nie wykryto w korzeniach niezmienionych genetycznie roślin macierzystych *S. bulleyana* hodowanych w glebie. Wyniki reakcji PCR wykonanej dla korzeni włóśnikowatych zostały przedstawione na fotografii 5.



Fotografia 5. Produkty reakcji PCR wyizolowane z plazmidowego DNA *R. rhizogenes* (A) oraz genomowego DNA pochodzącego z korzeni transformowanych klonów C1-C4 (B-E). Pasma: M – matrycowy DNA 100-1000 bp; 1 – *aux1* (500 bp); 2 – *aux2* (774 bp); 3 – *rolB* (386 bp); 4 – *rolC* (582 bp); 5 – *rolD* (204 bp); 6 – *virG* (319 bp).

Metodę PCR wykorzystano także do analizy spontanicznie zregenerowanych na korzeniach włóśnikowatych pędów *S. bulleyana* (klony P7, P9). Okazało się, że jedynie w pędach klonu P7 zidentyfikowano fragmenty odpowiadające genom *rolB* (386 bp) oraz *rolC* (582 bp) oraz nie zanotowano obecności genu *virG* (fotografia 6). Ponadto, nie wykryto żadnego z amplifikowanych genów w materiale pochodzącym z kultury kontrolnej, którą stanowiły wyhodowane z nasion w warunkach *in vitro* pędy *S. bulleyana*. Wyniki przedstawiono na fotografii 6. Należy również zwrócić uwagę na fakt, że otrzymane pędy transformowane wykazywały cechę charakterystyczną dla

syndromu korzeni włósnikowatych, tj. skrócone międzywęzła w porównaniu do roślin nietransformowanych. Ponadto, zaobserwowano, że miały one krótsze pędy oraz charakteryzowały się dużym zagęszczeniem wytwarzanych liści.



Fotografia 6. Produkty reakcji PCR wyizolowane z genomowego DNA pochodzącego z pędów transformowanych *S. bulleyana* klonu P7 (A). Pasma: M – matrycowy DNA 100-1000 bp; 1 – *virG* (319 bp); 2 – *rolB* (386 bp); 3 – *rolC* (582 bp); 4 – *rolD* (204 bp); 5 – *aux1* (500 bp); 6 – *aux2* (774 bp). Pędy transformowane *S. bulleyana* klon P7 hodowane przez 5 tygodni na podłożu stałym MS z dodatkiem 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l m-Top (pasaż 4). Skala 1 cm (B).

## 5.2. Korzenie transformowane

### 5.2.1. Analiza jakościowa metanolowo-wodnych ekstraktów z korzeni transformowanych *S. bulleyana*

Analizę jakościową metanolowo-wodnego ekstraktu z korzeni transformowanych *S. bulleyana* wykonano z wykorzystaniem metody UPLC-PDA-ESI-MS/MS. Profil polifenolowy określono przy długości fali 325 nm. W badanych ekstraktach z korzeni włósnikowatych zidentyfikowano 10 związków (tabela 2).

Pik 1, dla którego zarejestrowano jon macierzysty [M-H]<sup>-</sup> przy *m/z* 179<sup>-</sup> został zidentyfikowany jako kwas kawowy (CA), co zostało potwierdzone poprzez porównanie ze związkiem wzorcowym.

Pik 4 zidentyfikowano jako kwas rozmarynowy (RA). Podczas analizy zaobserwowano jon pseudomolekularny [M-H]<sup>-</sup> przy *m/z* 359 oraz charakterystyczne jony fragmentacyjne przy *m/z* 197, 179 oraz 161. Tożsamość związku potwierdzono porównując otrzymane dane z tymi, które uzyskano dla związku wzorcowego.

Pik 2 dawał jon macierzysty [M-H]<sup>-</sup> przy *m/z* 521, rozpadający się na jon



fragmentacyjny przy  $m/z$  359  $[M-162]^-$  (ugrupowanie heksozydowe), a także jony charakterystyczne dla pików 4. Dzięki tym danym zidentyfikowano ten związek jako heksozę kwasu rozmarynowego (RAH).

Dla pików 7, jon macierzysty  $[M-H]^-$  występował przy  $m/z$  373, jony fragmentacyjne zaobserwowano przy  $m/z$  179 i  $m/z$  135. Związek ten zidentyfikowano jako rozmarynian metylu (MR).

Pik 3 charakteryzował jon pseudomolekularny  $[M-H]^-$  przy  $m/z$  717, jak również rozpad ukazujący sukcesywną utratę cząsteczek danszenu (-198 u) oraz cząsteczek kwasu kawowego (-180 u). Podobne widma masowe otrzymano dla cząsteczek kwasów salwianolowych: B (SAB), E oraz L, a także kwasu izosalwianolowego B. Jednakże, porównując otrzymane dane z tymi, które uzyskano dla ogólnie dostępnego wzorca – SAB i biorąc pod uwagę czas retencji związku, wykluczono, że w badanym ekstrakcie znajduje się SAB. Na podstawie dostępnej literatury i czasu retencji (36,4 min.) stwierdzono, że jest to kwas salwianolowy E (SAE).

Dla pików 5 zarejestrowano jon pseudomolekularny  $[M-H]^-$  przy  $m/z$  555 oraz jony fragmentacyjne przy  $m/z$  537  $[M-H-H_2O]^-$ , 493  $[M-H-H_2O-CO_2]^-$  oraz 359  $[M-H-danszenu]^-$ . Związek ten zidentyfikowano jako kwas salwianolowy K (SAK).

W widmie MS pików 8 i 9 zaobserwowano jon  $[M-H]^-$  przy  $m/z$  313, którego główne jony fragmentacyjne zarejestrowano przy  $m/z$  269 i 161. Rozpad ten jest spójny z danymi opisanymi dla kwasu salwianolowego F, jednakże otrzymano wyższe czasy retencji niż dla związku wzorcowego. W związku z tym, zidentyfikowano te struktury jako izomery SAF – SAF I oraz SAF II.

Pik 6, którego jon pseudomolekularny  $[M-H]^-$  zarejestrowano przy  $m/z$  343, prezentował rozpad i widmo UV-Vis sugerujące, że jest to związek polifenolowy, najprawdopodobniej zawierający w swojej cząsteczce CA. Uzyskane dane nie pozwoliły jednak na bliższą jego identyfikację, dlatego ograniczono się do oznaczenia tego związku jako pochodnej kwasu kawowego – CAD.

Pik 10 został sklasyfikowany jako pochodna fenyletanoidu. W analizie zanotowano jon pseudomolekularny  $[M-H]^-$  przy  $m/z$  735 oraz jony fragmentacyjne przy  $m/z$  693 i  $m/z$  505. Co więcej, za podstawie strat neutralnych (-42 u) potwierdzono obecność dwóch grup acetylowych. Dlatego też związek ten oznaczono jako

diacetylmartynozyd – DAM.

Tabela 2. Dane uzyskane w wyniku analizy UPLC-PDA-ESI-MS metanolowo-wodnego ekstraktu z korzeni transformowanych *S. bulleyana*.

Pik	Prawdopodobny związek	Czas retencji (min)	UV (nm)	Tryb jonów ujemnych	
				[M-H] <sup>-</sup>	Piki odpowiadające jonom fragmentacyjnym
1	Kwas kawowy	18,9	291(sh), 322	179	135
2	Heksoza kwasu rozmarynowego	32,1	285(sh), 325	521	359, 161
3	Kwas salwianolowy E	36,4	284, 335	717	537, 519, 339
4	Kwas rozmarynowy	37,2	287(sh), 324	359	197, 179, 161
5	Kwas salwianolowy K	37,8	287, 324	555	537, 493, 359
6	Pochodna kwasu kawowego	42,6	291(sh), 327	343	299, 181, 161
7	Rozmarynian metylu	43,5	287 (sh), 327	373	179, 135
8	Izomer kwasu salwianolowego F I	50,8	336	313	269, 161
9	Izomer kwasu salwianolowego F II	53,6	302(sh), 335	313	269, 203, 161
10	Diacetylmartynozyd	55,8	287(sh), 327	735	693, 505

Analizy ilościowe otrzymanych w toku badań ekstraktów analizowano metodą HPLC i zostały one opisane wraz z odpowiadającymi im eksperymentami. Przykładowy chromatogram otrzymany w wyniku analizy przedstawiono na rycinie 6.

### 5.2.2. Selekcja klonu

Cztery klonu korzeni (C1-C4), których transformacja została potwierdzona metodą PCR, hodowano przez 5 tygodni w płynnym podłożu WP w ciemności. Wykazały one cechy charakterystyczne dla korzeni włośnikowatych, tj. brak geotropizmu, wzmożone tworzenie się korzeni bocznych oraz szybki wzrost bez dodatku regulatorów wzrostu. Otrzymane kultury korzeni nie różniły się od siebie w dużym stopniu pod względem morfologicznym (fotografia 7). Oprócz widocznej pod koniec pasażu pewnej różnicy we wzroście, korzenie klonów C2 oraz C3 miały jaśniejszą barwę od pozostałych

dwóch linii. Co więcej, korzenie klonu C3 charakteryzowały się największą liczbą wytwarzanych korzeni bocznych.

Na etapie pasażu 29-31, po 5 tygodniach wzrostu dokonano pomiaru świeżej i suchej masy kultur, które wahały się w granicach 54,1-84,4 g/l (ŚM) oraz 7,78-8,76 g/l (SM), co odpowiadało 4,33-6,52 g oraz 0,622-0,700 g na kolbę. Najwyższe wartości przyrostu świeżej biomasy (6,76 g), jak również indeksy wzrostu, 13,95 dla ŚM oraz 15,61 dla SM (tabela 3), otrzymano dla klonu C1. Wysokim przyrostem biomasy charakteryzował się także klon C4, dla którego uzyskano najwyższą suchą masę – 0,700 g/kolbę, chociaż nieco niższą świeżą - 5,19 g. Najślabszym wzrostem charakteryzowały się korzenie klonu C3, którego indeksy wzrostu wynosiły zaledwie 7,73 (ŚM) oraz 8,87 (SM) i były ok. 2-krotnie niższe niż te, otrzymane dla C1.

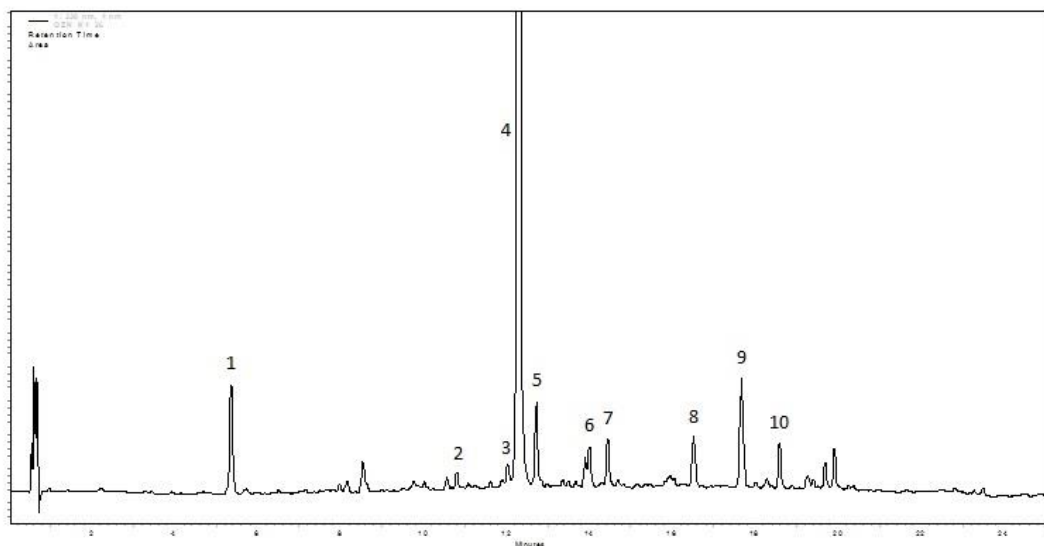


Fotografia 7. Korzenie transformowane *S. bulleyana* klon: C1 (A), C2 (B), C3 (C), C4 (D) hodowane przez 5 tygodni, w ciemności w podłożu płynnym WP. Skala 1 cm.

Tabela 3. Indeksy wzrostu oraz wartości świeżej oraz suchej masy klonów C1-C4 korzeni transformowanych *S. bulleyana* po 5 tygodniach wzrostu w ciemności w podłożu płynnym WP. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

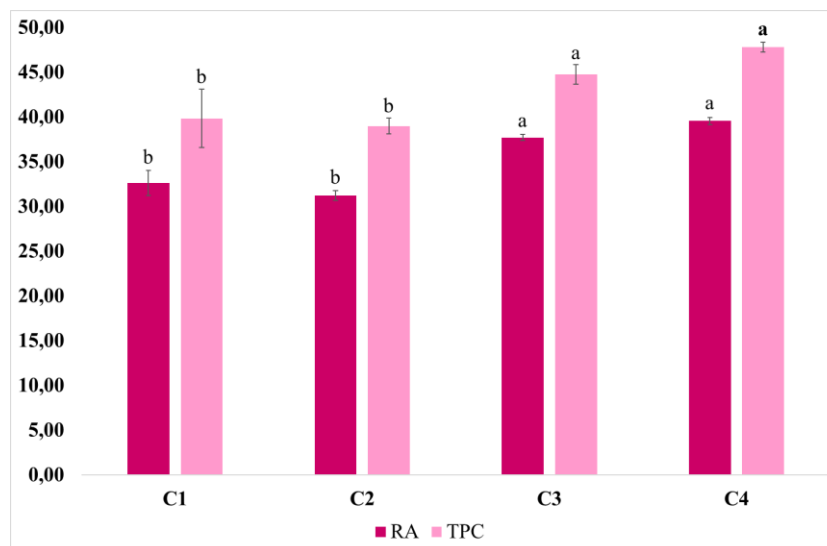
Klon	Świeża masa (g/kolbę)	Sucha masa (g/kolbę)	Indeks wzrostu ŚM	Indeks wzrostu SM
C1	6,76±0,292a	0,681±0,021a	13,9±0,645a	15,6±0,510a
C2	4,97±0,320b	0,649±0,044a	9,84±0,698bc	11,2±0,828b
C3	4,33±0,225b	0,622±0,031a	7,73±0,454c	8,87±0,496c
C4	5,19±0,291b	0,700±0,090a	10,8±0,682b	10,9±0,529b

W selekcji odpowiedniego do dalszych badań klonu korzeni transformowanych *S. bulleyana* wzięto również pod uwagę produktywność czterech badanych linii korzeni (rycina 6). Analizowane ekstrakty pozyskane z poszczególnych linii korzeni transformowanych nie różniły się jakościowo, ale wykazywały wyraźne zróżnicowanie pod względem zawartości poszczególnych metabolitów wtórnych.



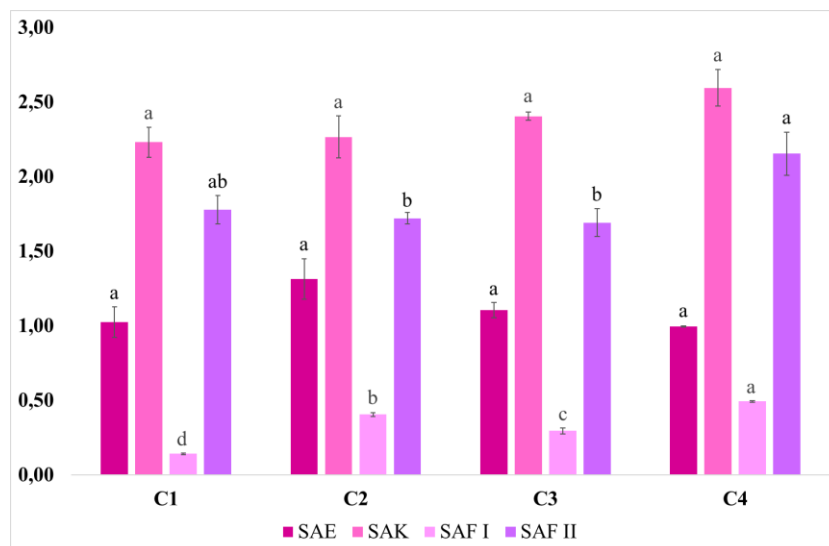
Rycina 6. Wybrany chromatogram uzyskany w wyniku analizy HPLC-UV metanolowo-wodnego ekstraktu z korzeni *S. bulleyana*. 1 – kwas kawowy (CA); 2 – heksoza kwasu rozmarynowego (RAH); 3 – kwas salwianolowy E (SAE); 4 – kwas rozmarynowy (RA); 5 – kwas salwianolowy K (SAK); 6 – pochodna kwasu kawowego (CAD); 7 – rozmarynian metylu (MR); 8 – I izomer kwasu salwianolowego F (SAF I); 9 – II izomer kwasu salwianolowego F (SAF II); 10 – diacetylmartynozyd (DAM).

Najwyższą zawartością związków polifenolowych charakteryzował się klon C4 (wykres 1). TPC wynosiła w tym przypadku 47,8 mg/g SM i była o 23% wyższa od otrzymanej dla klonu C2, w którym oznaczono najniższą zawartość polifenoli. Związkiem dominującym we wszystkich kulturach okazał się być kwas rozmarynowy, który stanowił 80-83% całkowitej zawartości oznaczonych związków polifenolowych. Jego najwyższy poziom stwierdzono w klonie C4 i wynosił on 39,6 mg/g SM (wykres 1). Wartość ta była 1,3-krotnie wyższa od tej uzyskanej dla klonu C2, który charakteryzował się najniższą produkcją RA (31,3 mg/g SM).



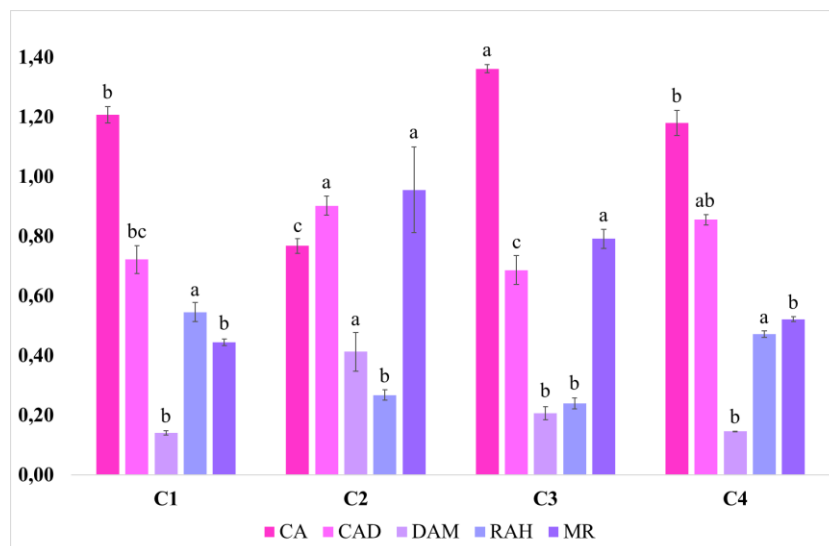
Wykres 1. Zawartość (mg/g SM) kwasu rozmarynowego – RA oraz całkowita zawartość polifenoli – TPC (mg/g SM) oznaczona w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* (C1-C4) po 5 tygodniach wzrostu w płynnym podłożu WP w ciemności. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Kwas salwianolowy K był drugim, biorąc pod uwagę zawartość, związkiem w opisywanych kulturach korzeni włośnikowatych. Jego ilość w badanych klonach była na podobnym poziomie (2,23-2,60 mg/g SM) (brak różnic statystycznych), przy czym najwyższą zawartość zanotowano w korzeniach linii C4 (wykres 2). Podobnie, we wszystkich czterech klonach korzeni włośnikowatych stwierdzono zbliżoną akumulację kwasu salwianolowego E, 1,03-1,31 mg/g SM, z najwyższą zawartością odnotowaną dla linii C4. Klon ten charakteryzował się też najwyższym poziomem jednego z izomerów kwasu salwianolowego F, SAFII – 2,15 mg/g SM (wykres 2). Była to zawartość o 27% wyższa od najniższej, oznaczonej w korzeniach klonu C3. Drugi izomer, SAF I był wytwarzany w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* w znacznie niższych ilościach, oscylujących w granicach 0,143-0,493 mg/g SM, a jego maksymalne poziomy stwierdzono w klonach C2 i C4.

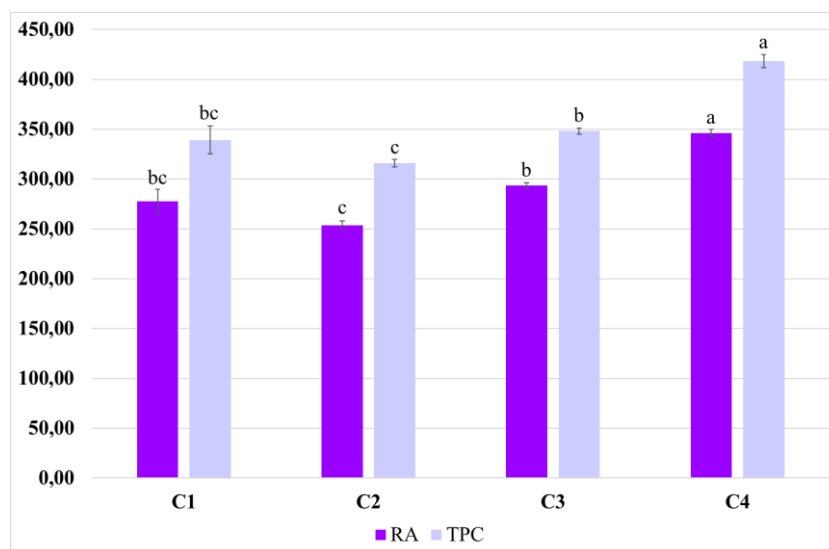


Wykres 2. Zawartość (mg/g SM) kwasów salwianolowych E – SAE, K – SAK oraz izomerów kwasu salwianolowego F – SAF I i SAF II oznaczona w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* (C1-C4) po 5 tygodniach wzrostu w ciemności, w podłożu płynnym WP. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Kwas kawowy będący prekursorem dla większości pozostałych związków występujących w ekstraktach z korzeni stanowił, zależnie od klonu, 2-3% całkowitej zawartości związków polifenolowych, co odpowiadało 0,768-1,21 mg/g SM (wykres 3). Najwyższy poziom CA odnotowano dla klonu C3. Zawartość pozostałych metabolitów wtórnych opisanych w badanych ekstraktach nie przekraczała poziomu 1 mg/g SM. Najwyższą zawartością CAD (0,903 mg/g SM) oraz rozmarynianu metylu charakteryzowała się linia C2 (0,956 mg/g SM). Tymczasem, najwyższą zawartość heksozy RA stwierdzono w liniach C1 oraz C4 (odpowiednio, 0,546 i 0,473 mg/g SM). Zawartość zidentyfikowanego w korzeniach włósnikowatych fenyletanoidu, diacetylmartynozydu, wahała się w poszczególnych klonach między 0,130-0,305 mg/g SM osiągając najwyższy poziom w korzeniach klonu C2 (wykres 3).



Wykres 3. Zawartość (mg/g SM) pozostałych związków fenolowych: kwasu kawowego – CA i jego pochodnej – CAD, diacetylmartynozydu – DAM, heksozy kwasu rozmarynowego – RAH oraz rozmarynianu metylu – MR oznaczona w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* (C1-C4) po 5 tygodniach hodowli w ciemności, w podłożu płynnym WP. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .



Wykres 4. Produktywność (mg/l podłoża) kwasu rozmarynowego – RA oraz całkowita zawartość polifenoli – TPC (mg/g SM) obliczona dla korzeni transformowanych *S. bulleyana* (C1-C4) po 5 tygodniach wzrostu w płynnym podłożu WP w ciemności. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Ostatecznie, w wyborze klonu do dalszych badań wzięto pod uwagę zarówno wzrost jak i produkcję badanych linii korzeni włósnikowatych. Na podstawie tych danych, przeliczając wartości suchej masy otrzymane dla każdego z traktowań podczas cyklu wzrostu na g/l podłoża i mnożąc je przez wartości uzyskane podczas analizy

ilościowej obliczono produktywność klonów (wykres 4, tabela 4). Ustalono, że najbardziej produktywny okazał się być klon C4. Całkowita zawartość polifenoli w tej kulturze wynosiła 418 mg/l, z czego 346 mg/l stanowił RA, a 23 mg/l SAK. Z kolei najmniej produktywną kulturą okazała się być kultura klonu C2, dla której TPC wynosiła 316 mg/l, RA 254 mg/l, a SAK 18 mg/l. Na podstawie powyższych wyników klon C4 został wybrany do dalszych badań.

Tabela 4. Produktywność (mg/l podłoża) kwasu kawowego – CA, heksozy kwasu rozmarynowego – RAH, kwasu salwianolowego E – SAE, kwasu salwianolowego K – SAK, pochodnej kwasu kawowego – CAD, rozmaryniwanu metylu – MR, izomerów kwasu salwianolowego F – SAF I i II, diacetylmartynozylu – DAM obliczona dla klonów C1-C4 korzeni transformowanych *S. bulleyana* po 5 tygodniach wzrostu w ciemności w podłożu płynnym WP. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

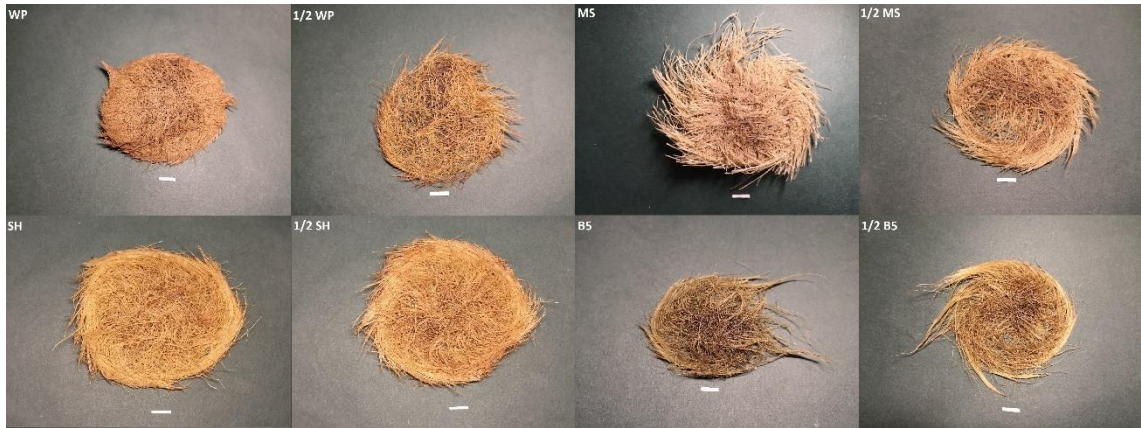
	C1	C2	C3	C4
CA	10,3±0,228a	6,23±0,204b	10,6±0,111a	10,3±0,370a
RAH	4,65±0,273a	2,17±0,139b	1,87±0,137b	4,14±0,099a
SAE	8,72±0,847a	10,7±1,11a	8,60±0,406a	8,71±0,047a
SAK	19,0±0,860b	18,4±1,15b	18,7±0,120b	22,7±1,07a
CAD	6,15±0,402bc	7,33±0,258ab	5,34±0,387c	7,49±0,152a
MR	3,79±0,096c	7,76±1,16a	6,16±0,247ab	4,57±0,067bc
SAF I	1,13±0,045d	3,29±0,112b	2,30±0,159c	4,32±0,066a
SAF II	15,1±0,809b	14,0±0,316b	13,2±0,728b	18,8±1,270a
DAM	1,20±0,067b	3,35±0,529a	1,61±0,175b	1,28±0,012b

### 5.2.3. Optymalizacja warunków hodowli korzeni transformowanych klonu C4 *S. bulleyana*

#### 5.2.3.1. Wpływ podłoża hodowlanego na wzrost i produkcję związków polifenolowych

Pierwszym etapem w procesie optymalizacji przyrostu biomasy jak i produkcji metabolitów wtórnych w korzeniach *S. bulleyana* klonu C4 była analiza tych parametrów w odniesieniu do różnych podłoży wzrostowych. W badaniu wykorzystano cztery różne podłoża (MS, WP, B5, SH), z czego każde zostało użyte w dwóch wariantach, które zawierały pełną lub obniżoną do połowy zawartość mikro- i makroelementów ( $\frac{1}{2}$ MS,  $\frac{1}{2}$ WP,  $\frac{1}{2}$ B5,  $\frac{1}{2}$ SH).





Fotografia 8. Korzenie transformowane *S. bulleyana* (C4) hodowane przez 5 tygodni w różnych podłożach płynnych. Skala 1 cm.

W zależności od użytego podłoża płynnego, widoczne były różnice w morfologii korzeni włosnikowatych (fotografia 8). Korzenie rosnące na podłożu SH oraz  $\frac{1}{2}$ SH charakteryzowały się jasnobrązowym kolorem oraz były silnie rozgałęzione (fotografia 9). Duża liczba rozgałęzień cechowała również korzenie hodowane w podłożach WP, jednakże w tym przypadku, były one krótsze, a same korzenie – cieńsze. Najgrubsze, a zarazem najjaśniejsze były korzenie kultywowane w pełnym podłożu MS. Jednakże w tym wypadku rzadko obserwowano tworzenie się korzeni bocznych, a te, które powstały były bardzo krótkie (fotografia 9). Obniżenie do połowy zawartości mikro- oraz makroelementów w tym wariantcie podłoża skutkowało powstaniem cieńszych korzeni, w ciemniejszym kolorze, tworzących więcej rozgałęzień. W przypadku korzeni rosnących w podłożu B5, zaobserwowano ich brązowoszare zabarwienie oraz umiarkowane tworzenie się korzeni bocznych, które były średniej długości (fotografia 8, 9). Obniżenie do połowy ilości soli w tym podłożu skutkowało jaśniejszym zabarwieniem i nielicznymi rozgałęzieniami.



Fotografia 9. Pojedyncze korzenie transformowane *S. bulleyana* (C4) hodowane przez 5 tygodni w różnych podłożach płynnych. Skala 1 cm.

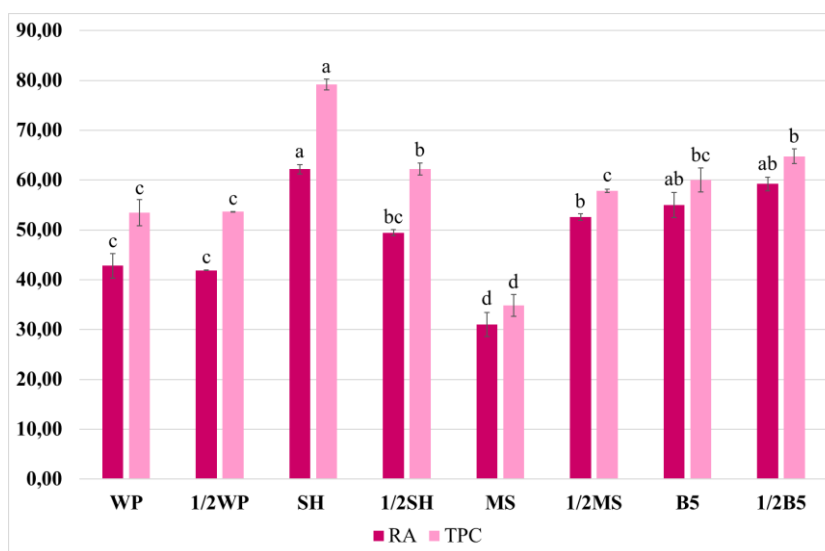
Różnice w składach jakościowych oraz ilościowych zastosowanych podłoży wpływały istotnie na akumulację biomasy korzeni włósnikowatych. Okazało się, że najwyższy przyrost odnotowano dla korzeni hodowanych w podłożach SH (5,60 g – ŚM, 0,927 g – SM) oraz ½SH (5,55 g – ŚM, 0,890 g – SM), dla których stwierdzono 13-krotny przyrost świeżej masy w stosunku do użytego inokulum w ciągu 5 tygodni oraz 16-krotny w odniesieniu do suchej masy (tabela 5). Indeksy wzrostu dla tych wariantów wynosiły 12,0-12,2 dla ŚM oraz 14,7-15,3 dla SM i były 3-4 razy wyższe od tych, otrzymanych dla traktowania, które skutkowało najniższym wzrostem kultury, czyli podłoża ½WP. Ponadto, wyłączając podłoże WP oraz ½WP, nie zaobserwowano istotnych różnic w przyroście biomasy, między kulturą hodowaną na wariantach tego samego podłoża z pełną oraz zredukowaną ilością soli mineralnych (tabela 5).

Tabela 5. Indeksy wzrostu oraz wartości świeżej oraz suchej masy korzeni transformowanych *S. bulleyana* (C4) po 5 tygodniach wzrostu w ciemności, w różnych podłożach. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Podłoże	Świeża masa (g)	Sucha masa (g)	Indeks wzrostu ŚM	Indeks wzrostu SM
<b>WP</b>	5,07±0,355a	0,728±0,033b	10,9±0,834a	11,8±0,590b
<b>½WP</b>	1,73±0,150b	0,375±0,015d	3,06±0,353b	5,62±0,261c
<b>SH</b>	5,60±0,095a	0,927±0,014a	12,2±0,224a	15,3±0,239a
<b>½SH</b>	5,55±0,145a	0,890±0,017a	12,0±0,340a	14,7±0,304a
<b>MS</b>	4,80±0,359a	0,729±0,040b	10,3±0,844a	11,8±0,704b
<b>½MS</b>	4,26±0,159a	0,637±0,015b	9,00±0,375a	10,9±0,266b
<b>B5</b>	2,59±0,178b	0,490±0,021c	5,09±0,418b	7,65±0,363c
<b>½B5</b>	2,51±0,086b	0,451±0,013cd	4,90±0,203b	6,95±0,234c

Rodzaj użytego w doświadczeniu podłoża nie miał wpływu na skład jakościowy ekstraktów z badanych traktowań. W każdym przypadku stwierdzono obecność 10 zidentyfikowanych wcześniej związków.

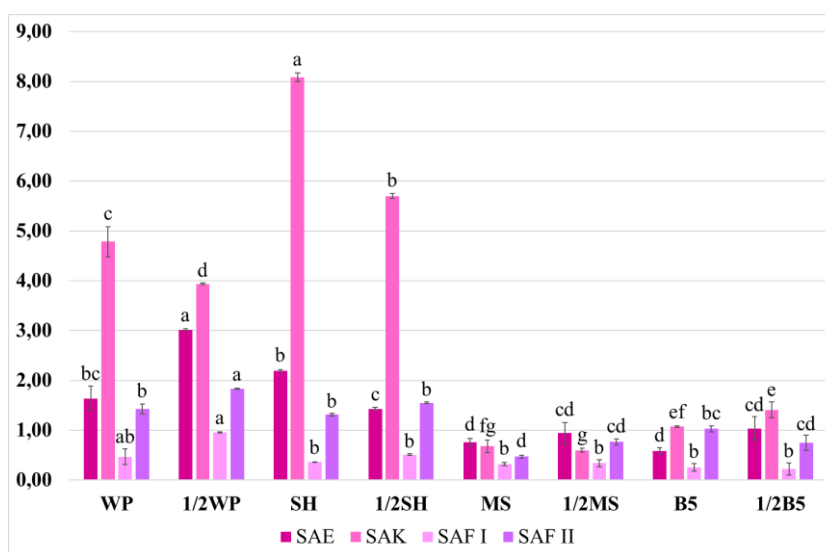
Całkowita zawartość związków polifenolowych wahała się od 34,76 mg/g SM dla korzeni hodowanych w podłożu MS do 79,18 mg/g SM dla podłoża SH (wykres 5). Związkiem dominującym we wszystkich próbkach był kwas rozmarynowy. Jego zawartość, w zależności od warunków hodowli, stanowiła 80-90% całkowitej zawartości związków polifenolowych. Najwyższą zawartość RA stwierdzono w materiale hodowanym w podłożu SH: 62,2 mg/g SM. Wartość ta była dwukrotnie wyższa niż otrzymana przy wzroście w najmniej korzystnym dla produkcji wtórnych metabolitów podłożu MS. Jednocześnie okazało się, że oba warianty podłoża B5 istotnie stymulowały wytwarzanie kwasu rozmarynowego w korzeniach włośnikowatych (55,0-59,2 mg/g SM). Zależnie od rodzaju podłoża obniżenie zawartości makro- i mikroelementów miało różny wpływ na zawartość RA w korzeniach. W przypadku podłoży WP oraz B5 nie zaobserwowano istotnych zmian w produkcji tego związku, ale dla podłoża SH redukcja ilości soli istotnie obniżyła poziom RA. W przeciwieństwie do tego, obniżenie stężenia makro- i mikropierwiastków bardzo istotnie pobudziło syntezę RA w odniesieniu do podłoża MS (wykres 5).



Wykres 5. Zawartość (mg/g SM) kwasu rozmarynowego – RA oraz całkowita zawartość polifenoli – TPC (mg/g SM) oznaczona w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* po 5 tygodniach wzrostu w ciemności, w różnych podłożach płynnych. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Jeszcze wrażliwszy na zmianę rodzaju podłoża okazał się SAK (wykres 6). W optymalnych warunkach (gdy korzenie kulturowano w podłożu SH) jego zawartość wynosiła ponad 8 mg/g SM. Była to zawartość prawie dwukrotnie wyższa niż w korzeniach na wstępnie hodowanych w podłożu WP. Najmniej korzystne dla produkcji tego związku okazało się podłoże MS pozwalające uzyskać zawartość SAK kilkunastokrotnie niższą niż w warunkach optymalnych – 0,60 mg/g SM (wykres 6). W tym przypadku obniżenie zawartości makro- i mikroelementów w podłożu nie stymulowało produkcji tego związku, ale także jej nie obniżało.

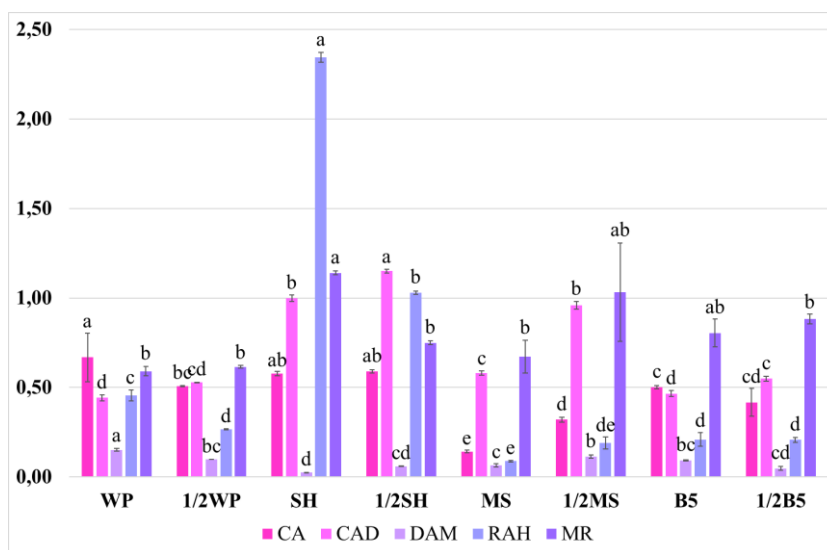
W przypadku produkcji SAE, wyjątkowo korzystna okazała się hodowla korzeni w podłożu WP o obniżonej zawartości mikro- i makroelementów (wykres 6). Osiągnięta w tych warunkach zawartość tego związku (3,02 mg/g SM) była niemal 2-krotnie wyższa od tej, otrzymanej dla korzeni hodowanych w zawierającej standardowe stężenia soli pożywce WP i aż 5-krotnie wyższa od tej stwierdzonej dla materiału pochodzącego z podłoża B5. Drugim metabolitem, który preferował najuboższą z zastosowanych pożywek (½WP) był SAF II. Jego zawartość w korzeniach rosnących w podłożu ½WP dochodziła do 2 mg/g SM (wykres 6).



Wykres 6. Zawartość (mg/g SM) kwasów salwianolowych E – SAE, K – SAK oraz izomerów kwasu salwianolowego F – SAF I i SAF II oznaczona w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* po 5 tygodniach wzrostu w ciemności, w różnych podłożach płynnych. Wartości oznaczone tą samą literką nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Podłoże SH stanowiło dobre warunki produkcji nie tylko samego kwasu rozmarynowego, ale również jego pochodnych (wykres 7). Akumulacja RAH w korzeniach kulturowanych w podłożu SH (2,34 mg/g SM) była 25-krotnie wyższa niż

oznaczona w materiale pochodzącym z podłoża MS, które okazało się najmniej korzystne dla produkcji tego związku. Również MR (1,14 mg/g SM) osiągnął swoje maksimum zawartości w korzeniach rosnących w podłożu SH (wykres 7). Podłoża z grupy SH (szczególnie to o obniżonej zawartości pierwiastków) były również korzystne dla biosyntezy CAD. Tymczasem kwas kawowy wykazywał najmniejszą zmienność w zawartości związanej z rodzajem pożywki i tylko podłoża typu MS drastycznie obniżały jego poziom w kulturze (wykres 7).



Wykres 7. Zawartość (mg/g SM) pozostałych polifenoli: kwasu kawowego – CA i jego pochodnej – CAD, diacetylmartynozydu – DAM, heksozy kwasu rozmarynowego – RAH oraz rozmarynianu metylu – MR oznaczona w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* po 5 tygodniach hodowli w ciemności, w różnych podłożach płynnych. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Ostatecznie po analizie parametrów wzrostu i produkcji, do dalszych badań optymalizacji podłoża wzrostowego, postanowiono ograniczyć się do dwóch rodzajów podłoża SH – tego z całkowitą i zredukowaną do połowy zawartością makro- i mikroelementów.

### 5.2.3.2. Wpływ stężenia witamin na wzrost i produkcję związków polifenolowych

Do oceny wpływu stężenia witamin zawartych w podłożu wybrano kultury korzeni włośnikowatych, które hodowano w podłożach SH oraz ½SH charakteryzujące się najlepszym wzrostem oraz produkcją polifenoli.

Obniżenie poziomu witamin oraz inozytolu do połowy i jednej czwartej nie wpłynęło istotnie na parametry świeżej (7,14-7,37 g) i suchej masy (0,846-0,933 g) korzeni kultywowanych w podłożu SH (tabela 6). Z kolei w przypadku ½SH okazało się, że obniżenie zawartości witamin i inozytolu do połowy zwiększało przyrost zarówno świeżej jak i suchej masy (6,37 g ŚM; 0,927 g SM) o odpowiednio 19% i 12% w porównaniu z tymi otrzymanymi dla ich pełnych stężeń (5,35 g ŚM; 0,828 g SM). Dalszy spadek zawartości witamin w podłożu ½SH w widoczny sposób zaczynał hamować wzrost kultury. Jednocześnie, całkowity brak tych składników w podłożu skutkował istotną redukcją zarówno świeżej jak i suchej masy w odniesieniu do obu zastosowanych podłoży SH.

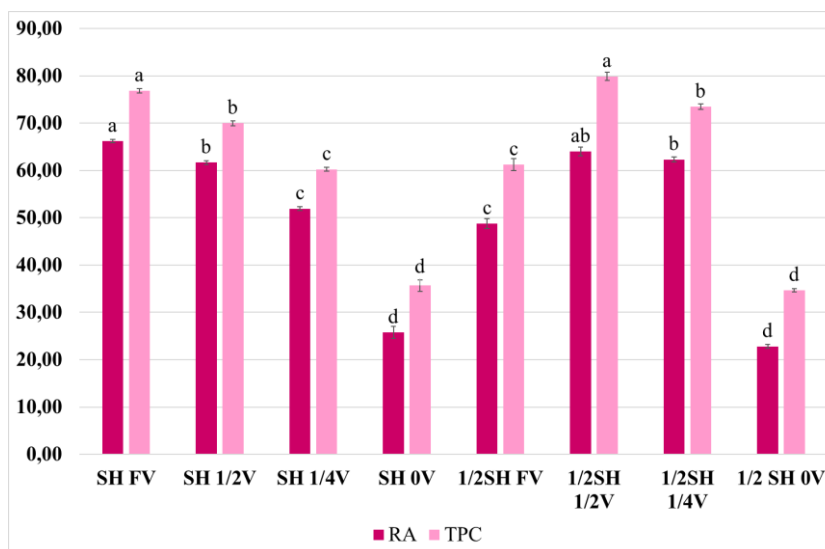
Tabela 6. Indeksy wzrostu oraz wartości świeżej oraz suchej masy korzeni transformowanych *S. bulleyana* (C4) po 5 tygodniach wzrostu w ciemności, w podłożu SH oraz ½ SH zawierającym różne stężenie witamin. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

	Świeża masa (g)	Sucha masa (g)	Indeks wzrostu ŚM	Indeks wzrostu SM
<b>SH FV</b>	7,14±0,413a	0,933±0,015a	15,8±0,971a	15,4±0,271a
<b>SH 1/2V</b>	7,37±0,353a	0,869±0,041ab	16,3±0,828a	14,±0,724ab
<b>SH 1/4V</b>	7,15±0,106a	0,846±0,013ab	15,8±0,250a	13,8±0,235ab
<b>SH 0V</b>	1,25±0,191d	0,28±0,033c	1,94±0,449c	3,92±0,577c
<b>½SH FV</b>	5,34±0,129bc	0,828±0,027ab	11,5±0,302b	13,5±0,482ab
<b>½SH 1/2V</b>	6,37±0,389ab	0,927±0,040a	13,9±0,914ab	15,3±0,702a
<b>½SH 1/4V</b>	4,95±0,153c	0,761±0,012b	10,6±0,359b	12,4±0,213b
<b>½SH 0V</b>	1,26±0,091d	0,303±0,011c	1,96±0,215c	4,31±0,202c

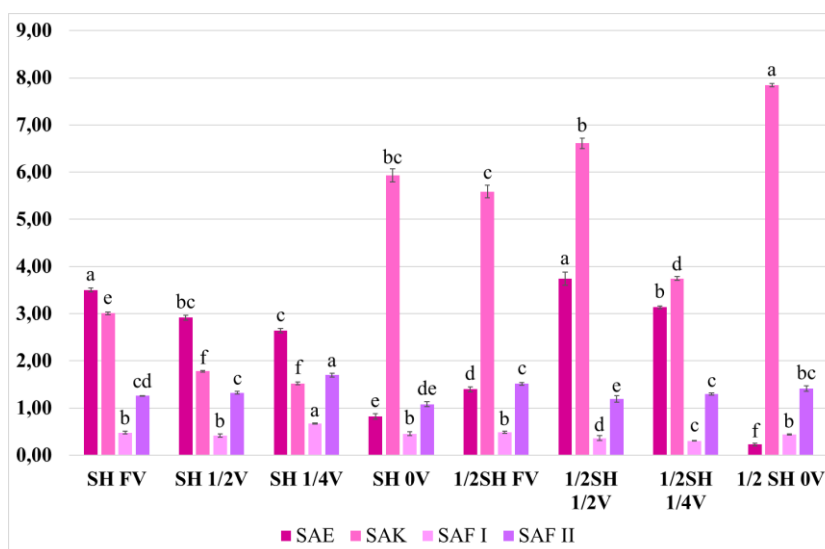
Obniżanie stężenia witamin w podłożu SH nie było korzystne dla biosyntezy większości oznaczanych związków polifenolowych i zazwyczaj skutkowało stopniowym zmniejszeniem ich zawartości (wykres 8, 9, 10). Tendencję tą zaobserwowano zarówno w przypadku całkowitej zawartości polifenoli, jak i dominujących w kulturze metabolitów: RA, SAK oraz SAE (wykres 8 i 9). Wyjątkiem okazał się SAK, którego poziom w podłożu SH pozbawionym witamin i inozytolu był około 2-krotnie wyższy



(5,94 mg/g SM) niż w przypadku podłoża o pełnej ich zawartości (3,01 mg/g SM) (wykres 9).



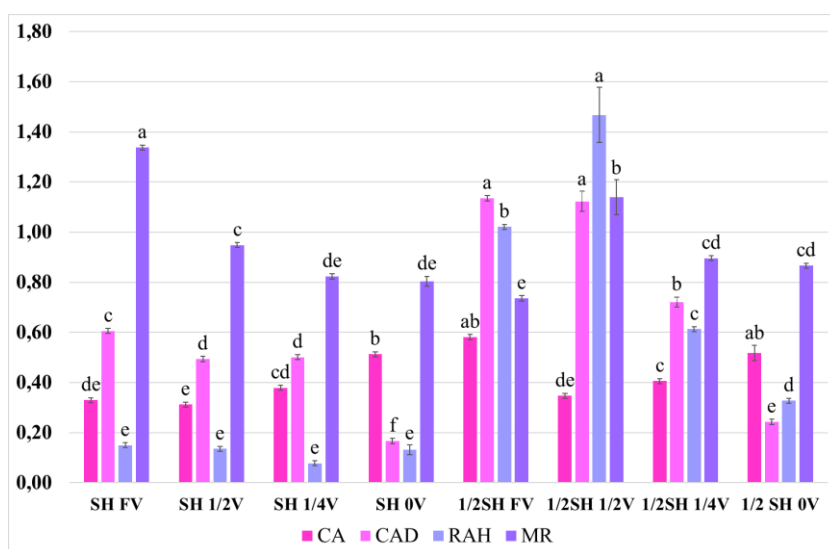
Wykres 8. Zawartość (mg/g SM) kwasu rozmarynowego – RA oraz całkowita zawartość polifenoli - TPC oznaczona w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* po 5 tygodniach hodowli w ciemności, w podłożu SH oraz 1/2SH zawierającym różne stężenie witamin. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .



Wykres 9. Zawartość (mg/g SM) kwasów salwianolowych E – SAE, K – SAK oraz izomerów kwasu salwianolowego F – SAF I i SAF II oznaczona w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* po 5 tygodniach wzrostu w ciemności, w podłożu SH oraz 1/2SH zawierającym różne stężenie witamin. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Nieco inną tendencję zaobserwowano w przypadku korzeni hodowanych w różnych wariantach podłoża 1/2SH (wykres 8, 9, 10). W przypadku tego podłoża z 1/2V zanotowano istotny wzrost zawartości RA, jego pochodnych: RAH i MR oraz SAK i SAE

w porównaniu do wariantu z pełną zawartością witamin, co skutkowało osiągnięciem w tych warunkach maksymalnej TPC (wykres 8, 9, 10). Ostatecznie w tym wypadku w korzeniach odnotowano zwiększenie TPC o 30%, z czego zawartość MR wzrosła o 55%, RAH o 44%, RA o 30%, SAK o 20%, a SAE nawet o 170% w porównaniu do podłoża ½SH o pełnej zawartości witamin. Dalsze obniżenie ilości witamin do ¼ wiązało się ze wzrostem produkcji polifenoli o ok. 17% w porównaniu do podłoża ½SH FV, ale TPC spadała już istotnie względem traktowania ½SH ½V (wykres 8). Całkowity brak witamin oraz inozytolu w podłożu ½SH skutkowało znacznym obniżeniem zawartości większości oznaczanych ilościowo polifenoli. Jednakże w tym wypadku, tak jak i dla podłoża SH, wyjątek stanowił SAK osiągający poziom 7,84 mg/g SM, czyli najwyższy spośród wszystkich rozważanych traktowań (SH oraz ½SH) (wykres 9).



Wykres 10. Zawartość (mg/g SM) pozostałych polifenoli: kwasu kawowego – CA i jego pochodnej – CAD, heksozy kwasu rozmarynowego – RAH oraz rozmarynianu metylu – MR oznaczona w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* po 5 tygodniach hodowli w ciemności, w podłożu SH oraz ½SH zawierającym różne stężenie witamin. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Na tym etapie doświadczeń, zawartość diacetylmartynozydu spadła do ilości śladowych, które nie miały istotnego znaczenia dla wartości całkowitej produkcji związków polifenolowych w korzeniach transformowanych *S. bulleyana*. Dlatego też, zaprzestano odczytów zawartości tego związku podczas analizy ilościowej materiału roślinnego.

Analiza poszczególnych parametrów doświadczenia nie dała jednoznacznej odpowiedzi, który wariant podłoża jest optymalny. Miała na to wpływ duża liczba danych



oraz niejednoznaczność oddziaływania poszczególnych traktowań na badane parametry: wzrost wartości pewnych parametrów dla określonego wariantu podłoża wiązał się z obniżeniem wartości innych. W celu zobiektywizowania decyzji o wyborze najkorzystniejszego wariantu podłoża, sięgnięto po narzędzie statystyczno-matematyczne jakim jest analiza TOPSIS. Do jej przeprowadzenia wybrano 4 istotne czynniki decyzyjne: indeks wzrostu SM, TPC oraz zawartości dominujących metabolitów: RA i SAK. W celu uniknięcia zbędnych komplikacji, wszystkie cztery parametry zostały uznane za jednakowo istotne i waga każdego z nich została określona jako 0,25. Obliczeń dokonano na podstawie metody opisanej w podrozdziale 4.8., a obliczone wydajności (P) zaprezentowano w tabeli 7. Za optymalne traktowanie uznaje się to o najwyższej wartości wydajności.

Tabela 7. Końcowa waga znormalizowanych macierzy decyzyjnych i obliczona wydajność dla podłoża SH zawierającego pełną oraz obniżoną do połowy zawartość mikro- i makroelementów oraz różne stężenie witamin.

Podłoże	Znormalizowane ważone parametry kultury				Parametry TOPSIS		
	GI ŚM	TPC	RA	SAK	S <sup>+</sup>	S <sup>-</sup>	P
<b>SH FV</b>	0,1093	0,1067	0,1105	0,0532	0,0854	0,1264	0,5967
<b>SH ½V</b>	0,1014	0,0972	0,1030	0,0314	0,1085	0,1096	0,5026
<b>SH ¼V</b>	0,0986	0,0836	0,0867	0,0269	0,1178	0,0927	0,4404
<b>SH 0V</b>	0,0280	0,0495	0,0430	0,1049	0,1267	0,0783	0,3819
½SH FV	0,0962	0,0850	0,0814	0,0988	0,0571	0,1143	0,6670
½SH ½V	0,1087	0,1108	0,1069	0,1168	0,0220	0,1525	<b>0,8737</b>
½SH ¼V	0,0880	0,1020	0,1041	0,0661	0,0763	0,1113	0,5933
½SH 0V	0,0307	0,0481	0,0381	0,1385	0,1239	0,1117	0,4741

S<sup>+</sup> - odległość Euklidesowa wariantu decyzyjnego od idealnego rozwiązania; S<sup>-</sup> - odległość Euklidesowa wariantu idealnego od rozwiązania antyidealnego; P – wydajność.

Najwyższą wydajność osiągnięto w przypadku korzeni kultywowanych w podłożu ½SH z ½V (tabela 7). Kultura hodowana w tych warunkach charakteryzowała się najwyższym TPC oraz indeksem wzrostu SM i ilością RA, które nie różniły się statystycznie od najlepszych wyników otrzymanych w badaniach. Co więcej, zawierała wystarczająco wysoki poziom SAK (6,61 mg/g), w porównaniu do najwyższego (7,08 mg/g) oraz najniższego (1,52 mg/g). Dodatkową zaletą tego wariantu podłoża jest niższy koszt prowadzenia hodowli w porównaniu do opcji zawierającej pełną zawartość makro- oraz mikroelementów jak również witamin i inozytolu.

Podsumowując, w wybranym do dalszych eksperymentów wariancie podłoża w ciągu 5 tygodni hodowli z litra pożywki uzyskiwano 924,4 mg związków polifenolowych, przy czym 741,8 mg stanowił RA, 76,6 mg – SAK, a 43,4 mg/l – SAE.

### 5.2.3.3. *Wpływ stężenia sacharozy na wzrost i produkcję związków polifenolowych*

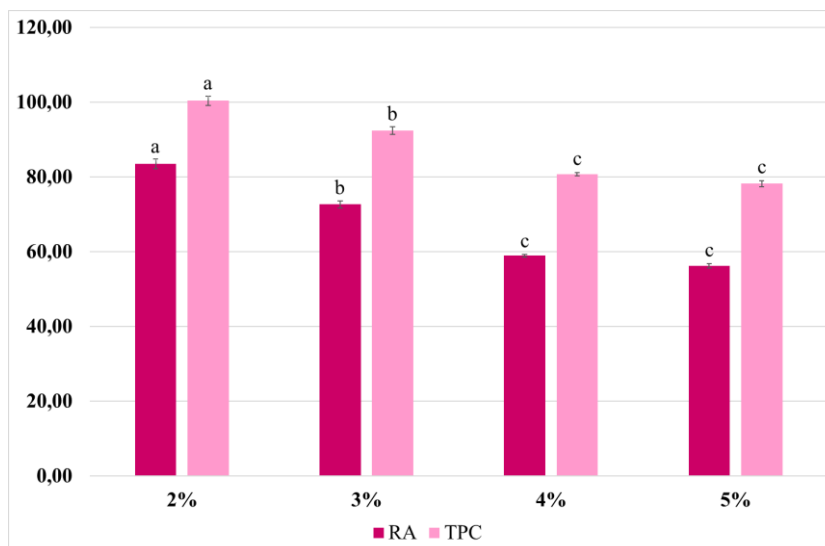
Kolejnym etapem procesu optymalizacji warunków hodowli korzeni włośnikowatych klonu C4 *S. bulleyana*, był dobór odpowiedniego stężenia sacharozy. W badaniu do podłoża ½SH ½V dodawano sacharozę w czterech stężeniach: 2%, 3%, 4% oraz 5%.

Jak przedstawiono w tabeli 8, wartości świeżej masy kultury obniżały się wraz ze wzrostem stężenia cukru w podłożu osiągając maksimum przy stężeniu 2%: 7,34 g (GI ŚM = 16,2) (tabela 8). Odwrotną tendencję zaobserwowano w przypadku suchej masy, której optimum osiągnięto dla kultury z podłoża zawierającego 5% sacharozy – 1,06 g SM. Jednakże wartości tego parametru nie różniły się istotnie dla traktowań z 3- i 4%-owym stężeniem cukru. Indeks wzrostu SM korzeni rosnących w pożywce z najwyższym stężeniem sacharozy był o 62% wyższy w porównaniu z tym uzyskanym dla kultury rosnącej w obecności cukru w stężeniu 2%.

Tabela 8. Indeksy wzrostu oraz wartości świeżej oraz suchej masy korzeni transformowanych *S. bulleyana* (C4) po 5 tygodniach wzrostu w ciemności, w podłożu ½SH ½V zawierającym różne stężenie cukru. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Stężenie sacharozy	Świeża masa (g)	Sucha masa (g)	Indeks wzrostu ŚM	Indeks wzrostu SM
2%	7,34±0,274a	0,676±0,026b	16,2±0,643a	10,9±0,448b
3%	7,01±0,274ab	0,996±0,028a	15,4±0,644ab	16,5±0,484a
4%	6,16±0,228bc	1,05±0,035a	13,5±0,534bc	17,4±0,615a
5%	5,49±0,155c	1,06±0,029a	11,9±0,365c	17,7±0,505a

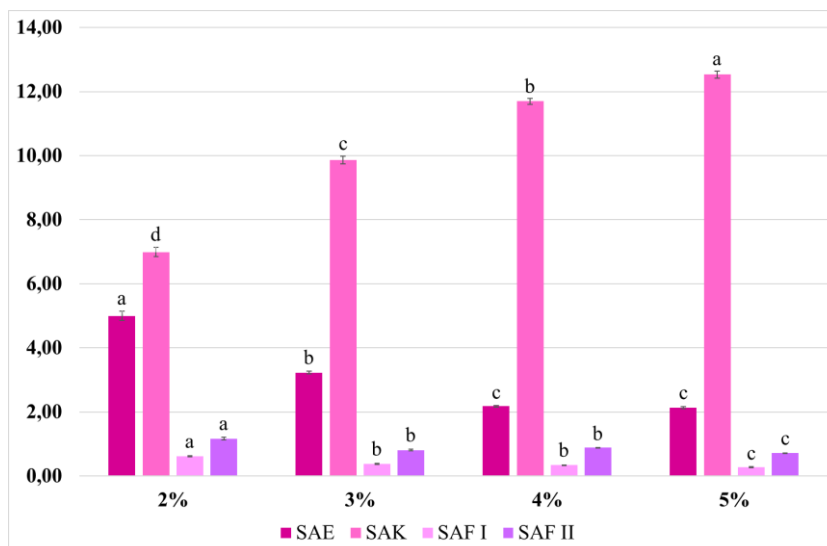
Najwyższą zawartość związków polifenolowych wykryto w korzeniach włośnikowatych kultywowanych w podłożu suplementowanym 2% cukru (100,4 mg/g SM) (wykres 11). Zwiększenie stężenia sacharozy do 3% skutkowało niewielkim spadkiem TPC (92,5 mg/g SM), ale dalszy wzrost poziomu źródła węgla w pożywce powodował dalsze obniżenie TPC.



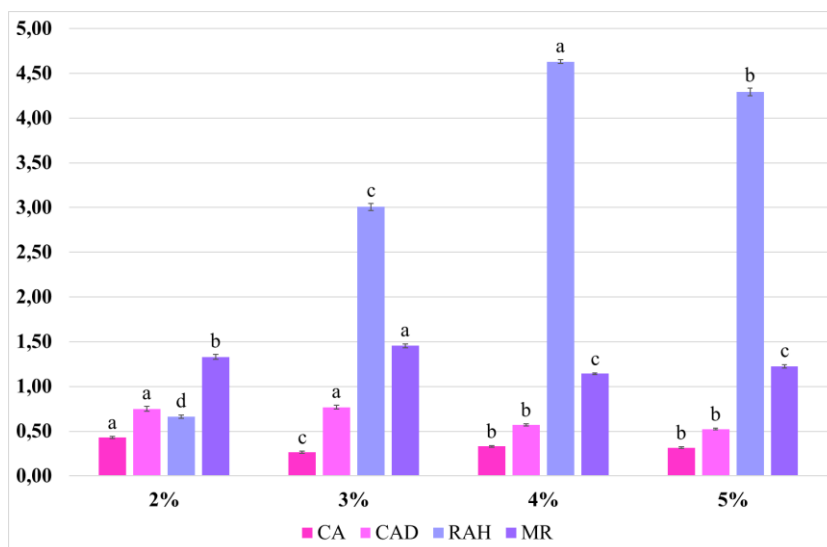
Wykres 11. Zawartość (mg/g SM) kwasu rozmarynowego – RA oraz całkowita zawartość polifenoli - TPC oznaczona w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* po 5 tygodniach hodowli w ciemności, w podłożu ½SH ½V zawierającym różne stężenie cukru. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Taki sam profil produkcji raportowano w odniesieniu do produkcji RA. Wzrost stężenia cukru do 3% obniżył zawartość RA w korzeniach włósnikowatych *S. bulleyana* z 83,5 do 72,7 mg/g SM. Dalszy wzrost zawartości sacharozy w pożywce (do 4%) skutkował dalszym obniżeniem zawartości RA do wartości około 30% niższej od maksymalnej (wykres 11).

Podobną tendencję obserwowano w przypadku większości oznaczanych w eksperymencie związków bioaktywnych (wykres 12 i 13). Aczkolwiek w przypadku dwóch metabolitów: SAK i RAH wzrost sacharozy w podłożu stymulował ich produkcję. Najwyższy poziom SAK zanotowano w obecności 5% cukru (12,53 mg/g) i był on niemalże 2-krotnie wyższy niż ten oznaczony w korzeniach rosnących przy 2% oraz o 30% wyższy niż przy 3% sacharozy (wykres 12). Akumulacja RAH w korzeniach włósnikowatych zachodziła najefektywniej przy 4% stężeniu cukru (wykres 13). Uzyskana w tych warunkach zawartość RAH była 7-krotnie wyższa od tej otrzymanej przy traktowaniu 2%-owym i ok. 50% wyższa od tej dla 3% cukru w pożywce.



Wykres 12. Zawartość (mg/g SM) kwasów salwianolowych E – SAE, K – SAK oraz izomerów kwasu salwianolowego F – SAF I i SAF II oznaczona w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* po 5 tygodniach wzrostu w ciemności, w podłożu ½SH ½V zawierającym różne stężenie cukru. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .



Wykres 13. Zawartość (mg/g SM) pozostałych polifenoli: kwasu kawowego – CA i jego pochodnej – CAD, heksozy kwasu rozmarynowego – RAH oraz rozmarynianu metylu – MR oznaczona w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* po 5 tygodniach hodowli w ciemności, w podłożu ½ SH ½V zawierającym różne stężenie cukru. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Tymczasem dla akumulacji metylowej pochodnej RA, najkorzystniejsze okazało się pośrednie stężenie sacharozy (3%), kiedy to zawartość tego związku osiągnęła poziom ok. 1,5 mg/g SM (wykres 13).

Tak jak w przypadku eksperymentu dotyczącego zawartości witamin w podłożu, żadne z wykorzystanych w badaniu stężeń cukru nie pozwalało osiągnąć jednoznacznie optymalnych wyników dla kryteriów produkcji i wzrostu, a niejednokrotnie uzyskane dla poszczególnych parametrów rezultaty były względem siebie w opozycji. Dlatego dla finalnej optymalizacji ponownie wykorzystano analizę TOPSIS (tabela 9).

Tabela 9. Końcowa waga znormalizowanych macierzy decyzyjnych i obliczona wydajność dla podłoża ½SH ½V zawierającym różne stężenia sacharozy.

Zawartość sacharozy	Znormalizowane ważone parametry kultury				Parametry TOPSIS		
	GI SM	TPC	RA	SAK	S <sup>+</sup>	S <sup>-</sup>	P
2%	0,0858	0,1420	0,1519	0,0833	0,0850	0,0587	0,4085
3%	0,1300	0,1307	0,1322	0,1175	0,0402	0,0665	<b>0,6232</b>
4%	0,1372	0,1141	0,1072	0,1394	0,0537	0,0763	0,5869
5%	0,1393	0,1106	0,1023	0,1493	0,0587	0,0850	0,5915

S<sup>+</sup> - odległość Euklidesowa wariantu decyzyjnego od idealnego rozwiązania; S<sup>-</sup> - odległość Euklidesowa wariantu idealnego od rozwiązania antyidealnego; P – wydajność.

Otrzymane wartości wydajności wykazały, że podłoże wzbogacone 3%-ową sacharozą jest optymalne dla produkcji polifenoli w kulturze korzeni *S. bulleyana*. W tym przypadku, wyższy poziom akumulacji suchej masy zrównoważył niewiele niższą produkcję kwasów fenolowych w porównaniu z tymi parametrami uzyskanymi w odniesieniu do podłoża z najniższym stężeniem cukru. Podczas gdy optymalna produkcja RA i części innych metabolitów przekładające się na TPC przewyższyły nad dodatkowym przyrostem suchej masy i wyższą zawartością takich związków jak SAK czy RAH, które obserwowano w przypadku zastosowania wyższych niż 3%-owe stężeń cukru (tabela 9).

Przeliczając otrzymane wyniki na produktywność, dla wybranego wariantu stężenia sacharozy w ciągu cyklu wzrostu uzyskano 1151,1 mg TPC, a w tym 904,9 mg RA w przeliczeniu na litr podłoża. Wartości te były odpowiednio o 9-36% oraz 17-28% wyższe od tych otrzymanych dla pozostałych traktowań. Z kolei produktywności SAK i SAE w tym wariantcie wyniosły 122,8 mg/l i 40,2 mg/l.

#### 5.2.3.4. Wpływ warunków oświetlenia na wzrost i produkcję związków polifenolowych

W kolejnym eksperymencie, w pasażach 40-42 oceniano wpływ warunków oświetlenia na akumulację biomasy oraz produkcję związków polifenolowych podczas 5 tygodniowej hodowli korzeni w podłożu ½SH ½V wzbogaconym 3% sacharozą.

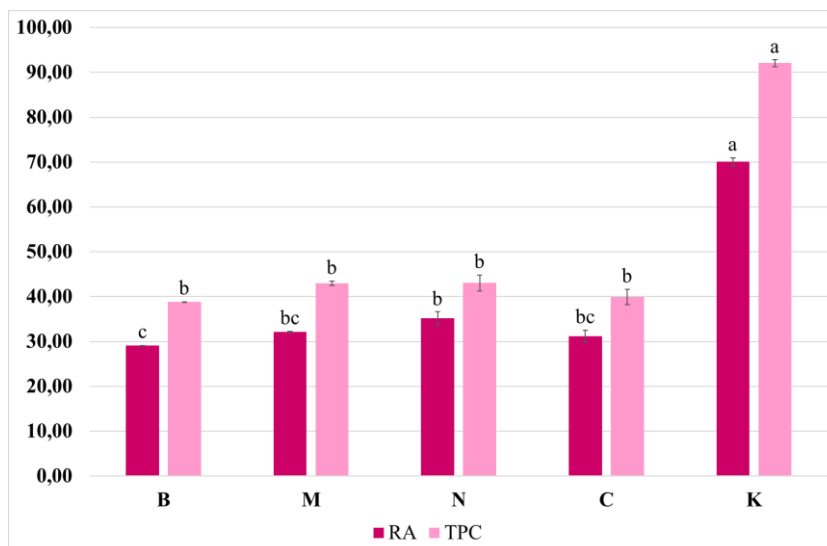
Kultura korzeni *S. bulleyana* wystawiona na działanie światła LED, bez względu na długości zastosowanej fali, wykazała niższą akumulację świeżej i suchej biomasy, a co za tym idzie niższe indeksy wzrostu w porównaniu do korzeni rosnących w ciemności (tabela 10). Korzenie hodowane w ciemności charakteryzowały się indeksami wzrostu na poziomie 12,89 dla ŚM i 14,60 dla SM, co odpowiadało 4,92 g ŚM i 0,889 g SM na kolbę.

Wśród wyników otrzymanych dla materiału rosnącego w warunkach różnego oświetlenia najwyższe przyrosty osiągnięto dla czerwonego światła LED (tabela 10). W tych warunkach ŚM wynosiła 4,41 g i była niemal 1,5 razy wyższa od tej dla najgorszego traktowania: światła mieszanego. W przypadku SM wartości dla tych dwóch traktowań wynosiły odpowiednio, 0,778 g i 0,612 g.

Tabela 10. Indeksy wzrostu oraz wartości świeżej oraz suchej masy korzeni transformowanych *S. bulleyana* (C4) po 5 tygodniach ekspozycji na różne warunki oświetlenia. Kontrolę stanowiły korzenie hodowane w ciemności. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

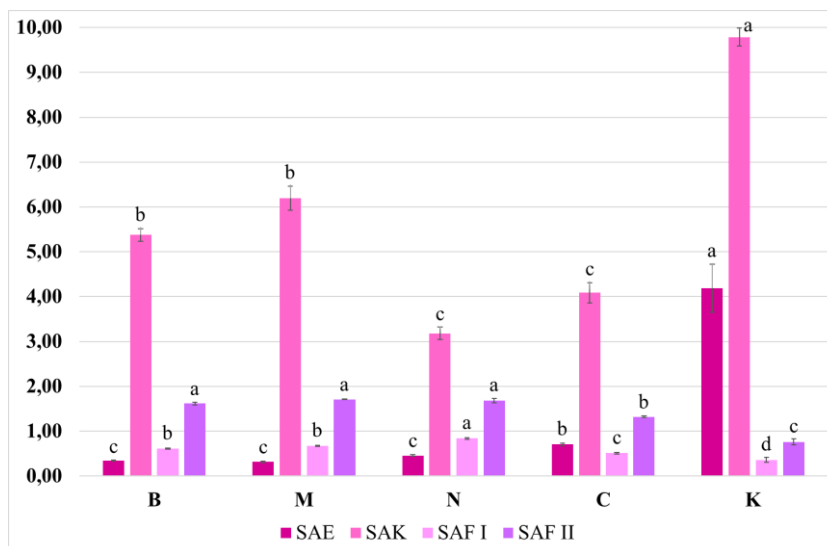
Warunki oświetlenia	Świeża masa (g)	Sucha masa (g)	Indeks wzrostu ŚM	Indeks wzrostu SM
<b>LED</b>				
<b>Białe</b>	3,25±0,291cd	0,658±0,036c	6,64±0,683cd	10,5±0,633c
<b>Mieszane</b>	2,86±0,167d	0,612±0,019c	5,71±0,392d	9,73±0,336c
<b>Niebieskie</b>	3,82±0,163bc	0,668±0,028c	7,97±0,382bc	10,7±0,487c
<b>Czerwone</b>	4,41±0,103b	0,778±0,012b	9,34±0,241b	12,7±0,210b
<b>Kontrola</b>	4,92±0,175a	0,889±0,020a	12,9±0,410a	14,6±0,350a

Hodowla korzeni transformowanych *S. bulleyana* na świetle, niezależnie od długości fali świetlnej, miała niekorzystny wpływ nie tylko na akumulację biomasy, ale również na produkcję metabolitów wtórnych. Korzenie włósnikowate kultywowane w warunkach ciemności charakteryzowały się dwukrotnie wyższą akumulacją związków polifenolowych, wyrażonych jako TPC, w porównaniu do kultur hodowanych przy różnych rodzajach LED (wykres 14).



Wykres 14. Zawartość (mg/g SM) kwasu rozmarynowego – RA oraz całkowita zawartość polifenoli - TPC oznaczona w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* po 5 tygodniach hodowli w  $\frac{1}{2}$ SH  $\frac{1}{2}$ V zawierającym 3% sacharozy w różnych warunkach oświetlenia LED: B – światło białe; M – mieszane; N – niebieskie; C – czerwone; K - ciemność. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Korzenie transformowane inkubowane na świetle niezależnie od długości jego fali charakteryzowały się TPC na podobnym poziomie (ok. 40 mg/g SM). Jednakże niektóre analizowane polifenole wykazywały różną akumulację w zależności od ekspozycji kultury na różne barwy światła. Zawartość RA w korzeniach hodowanych w ciemności była ponad 2-razy wyższa od tej, uzyskanej w kulturze rosnącej na świetle. Aczkolwiek akumulacja RA w kulturze pod niebieskimi LED była istotnie wyższa niż pod białymi (wykres 14). Szczególnie widoczny wpływ długości fali odnotowano w przypadku SAK, którego poziom raportowany podczas ekspozycji na światło mieszane był dwukrotnie wyższy niż ten na niebieskim i o 50% wyższy od tego, który zanotowano w warunkach czerwonego LED (wykres 15).

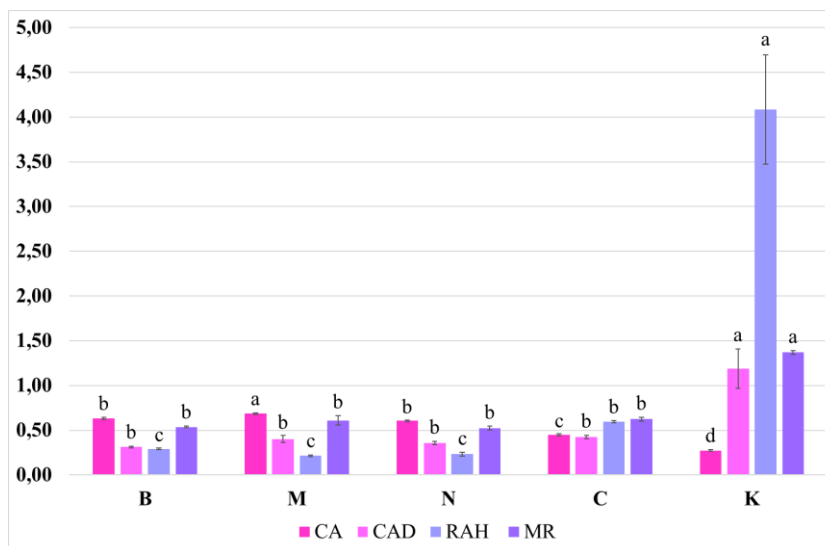


Wykres 15. Zawartość (mg/g SM) kwasów salwianolowych E – SAE, K – SAK oraz izomerów kwasu salwianolowego F – SAF I i SAF II oznaczona w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* po 5 tygodniach hodowli w podłożu 1/2SH 1/2V zawierającym 3% sacharozy w różnych warunkach oświetlenia LED: B – światło białe; M – mieszane; N – niebieskie; C – czerwone; K - ciemność. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Z kolei, czerwone LED było efektywniejsze dla produkcji SAE i RAH niż pozostałe traktowania światłem (wykres 15 i 16), chociaż osiągnięte w tych warunkach poziomy były kilkukrotnie niższe niż w kulturze prowadzonej w ciemności.

Jedynymi metabolitami, których zawartość była stymulowana przez światło były CA oraz oba izomery SAF. Pierwszy z tych związków osiągnął najwyższy poziom w kulturze pod mieszanymi LED (wykres 16), SAF I – pod niebieskimi, a SAF II oznaczono w podobnej ilości w korzeniach na świetle niebieskim, mieszanym oraz białym (wykres 15). Metabolity te stanowiły jednak tak niski odsetek całkowitej zawartości polifenoli w kulturze, że nie miało to wpływu na ostateczną decyzję, że zarówno ze względu na wzrost kultury, jak i akumulację większości związków bioaktywnych, kultywacja korzeni włośnikowatych *S. bulleyana* powinna być prowadzona w ciemności.



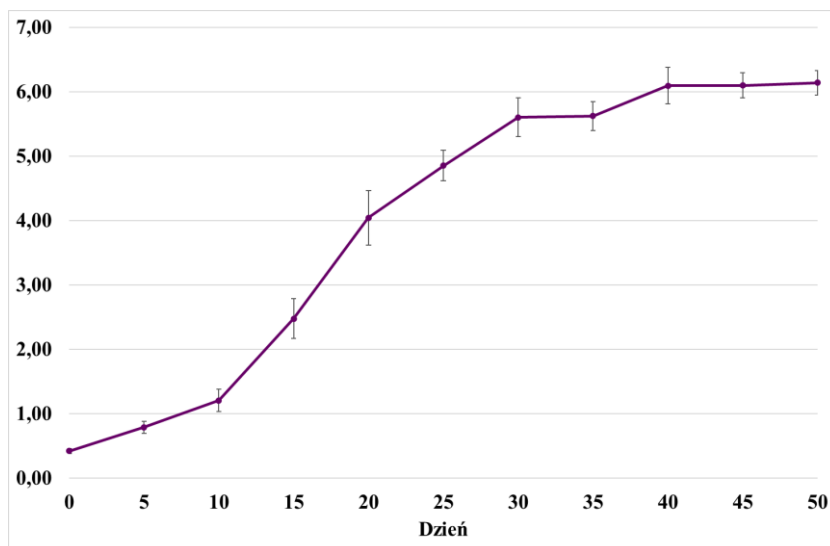


Wykres 16. Zawartość (mg/g SM) pozostałych polifenoli: kwasu kawowego – CA i jego pochodnej – CAD, heksozy kwasu rozmarynowego – RAH oraz rozmarynianu metylu – MR oznaczona w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* po 5 tygodniach hodowli w podłożu ½SH ½V zawierającym 3% sacharozy w różnych warunkach oświetlenia LED: B – światło białe; M – mieszane; N – niebieskie; C – czerwone; K – ciemność. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

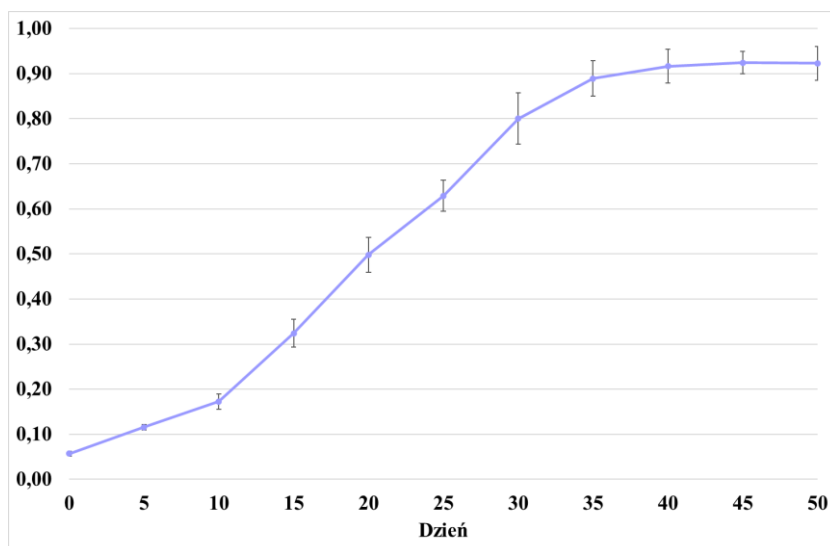
#### 5.2.3.5. *Krzywa wzrostu korzeni transformowanych oraz produkcja związków polifenolowych*

Aby oszacować optymalny czas zbioru materiału roślinnego, korzenie włośnikowate rosnące w ciemności w podłożu ½SH ½V zawierającym 3% sacharozy analizowano co 5 dni w odniesieniu do ich przyrostu biomasy oraz akumulacji metabolitów wtórnych. Na tej podstawie w trakcie 50-dniowego cyklu wykonano krzywą wzrostu i produkcji kultury.

Po upływie fazy początkowej, która trwała pięć dni, rozpoczynał się okres wzrostu wykładniczego trwający do 20 dnia hodowli (wykres 17, 18). Czas potrzebny do podwojenia biomasy (dt) wynosił 6,4 dni dla ŚM oraz 7,1 dni dla SM, a tempo wzrostu kultury ( $\mu$ ) – 0,109 (ŚM) i 0,097 (SM) (wykres 17 i 18).

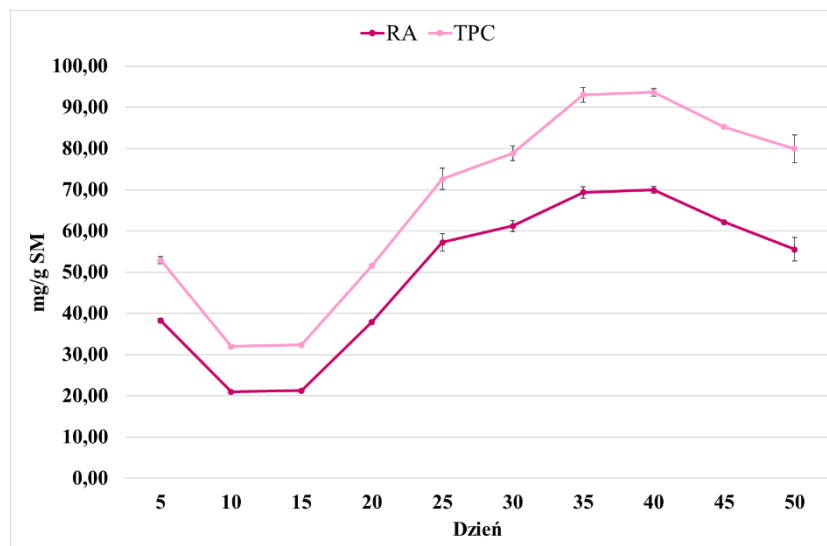


Wykres 17. Krzywa przyrostu świeżej masy (g) korzeni transformowanych *S. bulleyana* hodowanych przez 50 dni w podłożu ½SH ½V z 3% sacharozą w ciemności.



Wykres 18. Krzywa przyrostu suchej masy (g) korzeni transformowanych *S. bulleyana* hodowanych przez 50 dni w podłożu ½SH ½V z 3% sacharozą w ciemności.

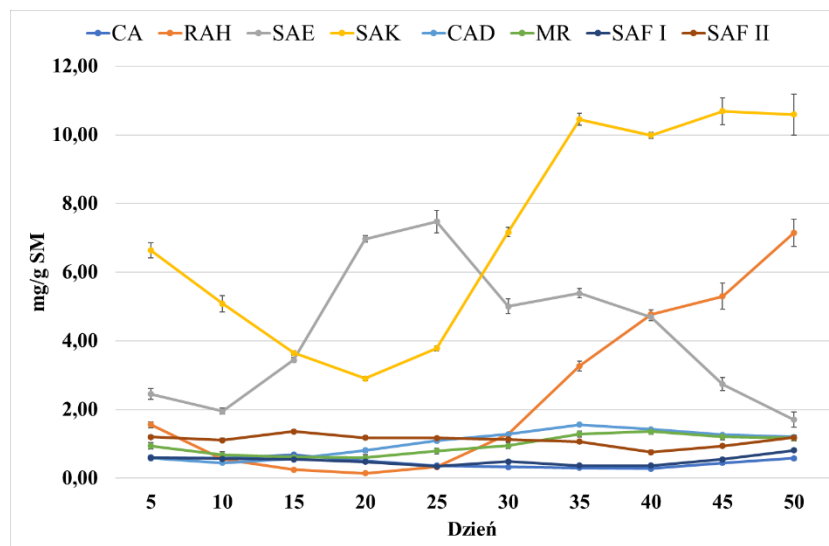
Po 20 dniach inkubacji rozpoczęła się w kulturze faza wzrostu liniowego, a po kolejnych 10 (ŚM) i 15 (SM) – faza stacjonarna, co odpowiadało 30 oraz 35 dniu hodowli (wykres 17 i 18). Następnie wzrost kultury spowolnił osiągając maksymalne wartości biomasy, odpowiednio, 45 oraz 50 dnia. Najwyższa ŚM wynosiła 6,14 g na kolbę, a SM – 0,924 g. W tym czasie, zaobserwowano odpowiednio 14- oraz 16-krotny wzrost biomasy w porównaniu do użytego inokulatu, co odpowiadało następującym indeksom wzrostu: 13,4 i 15,2.



Wykres 19. Krzywa zawartości (mg/g SM) kwasu rozmarynowego – RA oraz całkowita zawartość polifenoli – TPC w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* hodowanych przez 50 dni w podłożu ½SH ½V z 3% sacharozą, w ciemności.

Zawartość polifenoli zmieniała się w trakcie trwania hodowli, jednakże większość analizowanych związków osiągnęła maksimum akumulacji w fazie wzrostu stacjonarnego. W przypadku RA, jego poziom malał między 5 a 10 dniem wzrostu, a następnie zaczął intensywnie wzrastać od dnia 15 osiągając maksimum, 69,4-70,0 mg/g SM, w 35 i 40 dniu hodowli (wykres 19). Począwszy od 40 dnia, zawartość RA sukcesywnie spadała.

35 dzień wzrostu okazał się być optymalny dla akumulacji CAD, a 40 dla MR. Podczas gdy najwyższy poziom SAK zanotowano w 45 dniu (10,7 mg/g) (wykres 20). Również SAF I i RAH osiągnęły maksimum w fazie stacjonarnej, jednakże dopiero w 50 dniu hodowli. Tylko dla trzech związków szczyt produkcji odnotowano znacznie wcześniej: dla SAE był to dzień 25, czyli przed rozpoczęciem fazy stacjonarnej, a dla CA oraz SAF II dzień 15, który przypadał na fazę wzrostu wykładniczego (wykres 20).



Wykres 20. Krzywa zawartości (mg/g SM) kwasu kawowego – CA, heksozy kwasu rozmarynowego – RAH, kwasu salwianolowego E – SAE, kwasu salwianolowego K – SAK, pochodnej kwasu rozmarynowego – CAD oraz izomerów kwasu salwianolowego F – SAF I i II w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* hodowanych przez 50 dni w podłożu ½SH ½V z 3% sacharozą w ciemności.

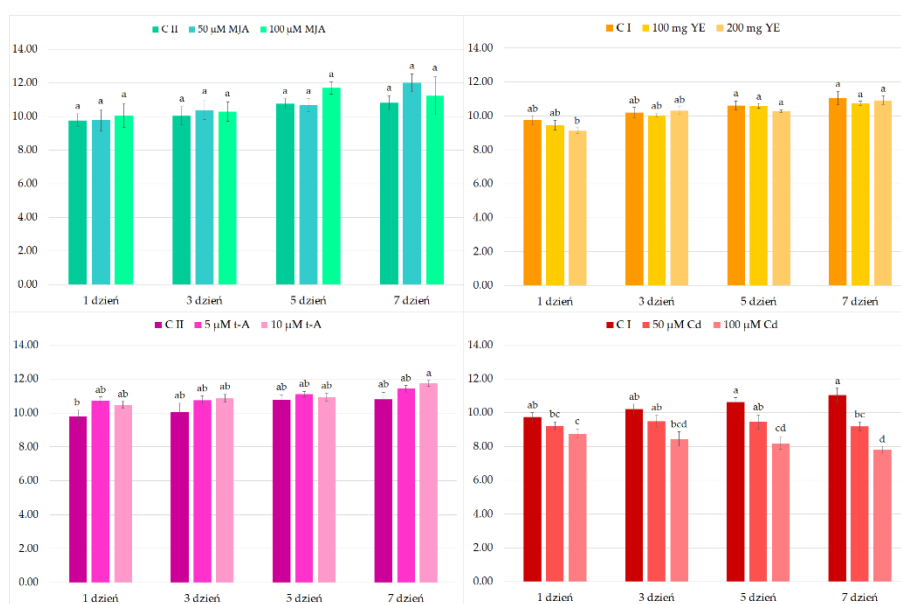
Biorąc pod uwagę produktywność kultury, dzień 40 hodowli został uznany za optymalny dla zbioru materiału. Pomimo wyższej akumulacji biomasy w kolejnych dniach eksperymentu, spadek akumulacji części związków bioaktywnych przekładał się na niższą produktywność kultury. W dniu 40 uzyskiwano 1072,7 mg TPC z litra podłoża, z czego RA stanowił 801,7 mg. Były to maksymalne wartości tych parametrów w ciągu 50 dniowego cyklu wzrostu i produkcji korzeni włósnikowatych. Produktywność SAK w 40 dniu hodowli wynosiła 114,4 mg/l, a SAE – 53,8 mg/l.

#### 5.2.4. Elicytacja

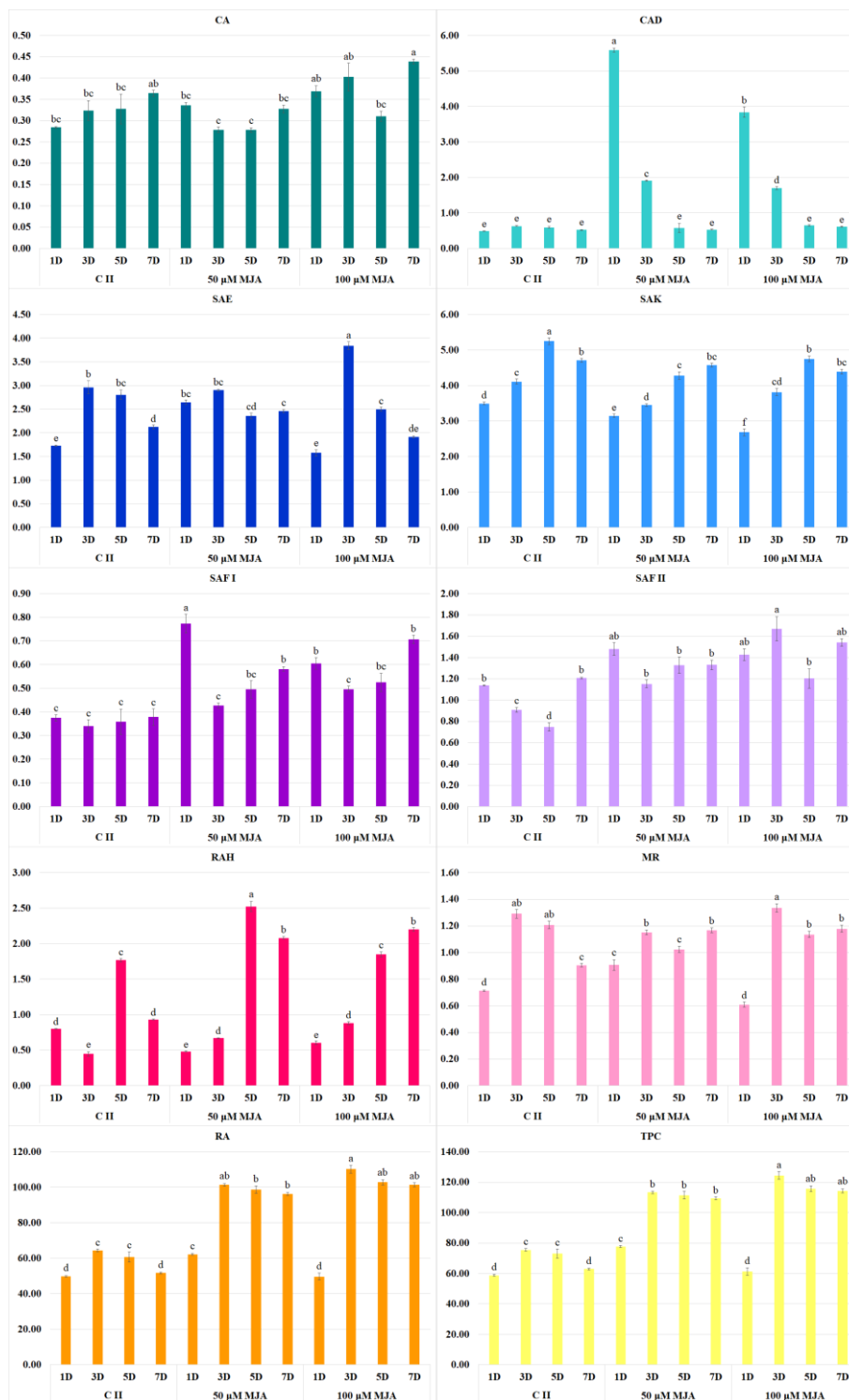
Po przeprowadzeniu optymalizacji warunków wzrostu i produkcji podjęto dalszą próbę stymulacji biosyntezy metabolitów wtórnych w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* bazując na elicytacji. W badaniu wykorzystano zarówno elicytory biotyczne (ekstrakt drożdżowy – YE, *trans*-anetol – *t*-A, jasmonian metylu – MJA), jak i abiotyczne (chlorek kadmu – Cd). Każdy z elicytorów został zastosowany w dwóch stężeniach (100 i 200 mg YE, 50 i 100 µM MJA, 5 i 10 µM *t*-A, 50 i 100 µM Cd), które wybrano na podstawie danych literaturowych (Al-Khayri i Naik, 2020; Grzegorzczuk i Wysokińska, 2009; Kochan i in., 2018; Yan i in., 2006). Elicytory dodawano do podłoża w 33 dniu hodowli, czyli na początku fazy stacjonarnej. Akumulację biomasy oraz poziom

metabolitów wtórnych oceniano po 1, 3, 5 oraz 7 dniach od dodaniu elicytora. Materiał kontrolny stanowiły kultury, hodowane w takich samych warunkach do których dodawano 10 µl wody (CI) lub z dodatkiem 10 µl etanolu, który był rozpuszczalnikiem dla MJA i *t*-A (CII).

W doświadczeniu oceniano wpływ dodawanych związków na wartości suchej masy kultury korzeni włośnikowatych wyrażone w g na litr podłoża. W przypadku trzech z czterech użytych elicytorów (YE, *t*-A, MJA), efekt oddziaływań na ten parametr był niewielki (wykres 21). Wyjątek stanowiły jony Cd. Po ich dodaniu do podłoża zaobserwowano istotny statystycznie spadek biomasy notowany od 3 dnia elicytacji w przypadku stężenia 100 µM oraz 7 dnia dla 50 µM. Po siedmiu dniach ekspozycji na 50 µM Cd sucha masa kultury wynosiła 9,18 g, co stanowiło 79% wartości osiągniętej tego samego dnia przez korzenie w traktowaniu kontrolnym. Z kolei po trzech dniach narażenia na 100 µM Cd zanotowano spadek SM o 24%, a po 7 – o 33%, w odniesieniu do kontroli (wykres 21).



Wykres 21. Akumulacja suchej biomasy (g/l) korzeni transformowanych *S. bulleyana*, wyrażona w g suchej masy na litr podłoża, po elicytacji MJA, YE, *t*-A oraz Cd. CI – traktowanie kontrolne; CII – traktowanie kontrolne z dodatkiem 10 µl 96% etanolu. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$



Wykres 22. Zawartość (mg/g SM) polifenoli: kwasu kawowego – CA i jego pochodnej – CAD, heksozy kwasu rozmarynowego – RAH, rozmarynianu metylu – MR, kwasu salwianolowego E – SAE, kwasu salwianolowego K – SAK, izomerów kwasu salwianolowego F – SAF I i SAF II, kwasu rozmarynowego – RA oraz całkowita zawartość polifenoli – TPC oznaczona 1, 3, 5, 7 dni po elicytacji 50 i 100 µM MJA. CII - traktowanie kontrolne, do którego dodano 10 µl 96% etanolu. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Zmiany w akumulacji związków bioaktywnych w korzeniach włósnikowatych *S. bulleyana* były uzależnione od rodzaju elicytora, jego stężenia oraz czasu ekspozycji.

Stwierdzono, że największe działanie stymulujące na produkcję polifenoli w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* miał MJA (wykres 22). Dodatek 100  $\mu\text{M}$  tego związku skutkował niemal dwukrotnym zwiększeniem TPC w porównaniu z kontrolą CII już od trzeciego dnia ekspozycji na elicytor. To właśnie w tym dniu zanotowano najwyższą akumulację polifenoli w kulturze (124,4 mg/g SM).

W odniesieniu do poszczególnych metabolitów 3-dniowy czas ekspozycji na MJA oraz stężenie 100  $\mu\text{M}$  okazało się optymalne dla syntezy RA, SAE oraz SAF II (wykres 22). Osiągnięty w tych warunkach poziom RA wynosił 110,2 mg/g SM i był 1,7-razy wyższy od tego stwierdzonego w traktowaniu kontrolnym CII. Tymczasem w przypadku SAE było to o 30% więcej niż w kontroli, a dla SAF II prawie dwa razy tyle.

Niższe stężenie MJA (50  $\mu\text{M}$ ) również stymulowało biosyntezę RA i kilku innych oznaczanych związków polifenolowych przez co zwiększało całkowity poziom polifenoli względem kontroli dla wszystkich dni ekspozycji. Był to jednak efekt nieco słabszy w porównaniu z wyższym stężeniem tego elicytora. Z drugiej strony, w obecności niższego stężenia MJA odnotowano najwyższy poziom CAD oraz RAH, chociaż po innym czasie ekspozycji: dla CAD w dniu pierwszym (5,59 mg/g SM), a dla RAH w piątym (2,52 mg/g SM) (wykres 22).

W przypadku ekstraktu drożdżowego nie zaobserwowano istotnego pozytywnego wpływu na biosyntezę związków bioaktywnych (wykres 23). Tylko nieliczne z analizowanych polifenoli w niewielkim stopniu odpowiedziały na ekspozycję na ten elicytor. 100 mg YE zwiększało poziom SAF I już od pierwszego dnia elicytacji (wykres 23). Tymczasem w przypadku 200 mg YE wyższe zawartości SAF I w porównaniu do kontroli odnotowano dopiero w materiale zebrany 5 dni po dodaniu elicytora. Jednocześnie oba stężenia YE pozwoliły uzyskać istotnie wyższe zawartości SAF II po pięciu dniach ekspozycji w porównaniu z kontrolą, a 100 mg YE również w siódmym dniu elicytacji.



Wykres 23. Zawartość (mg/g SM) polifenoli: kwasu kawowego – CA i jego pochodnej – CAD, heksozy kwasu rozmarynowego – RAH, rozmarynianu metylu – MR, kwasu salwianolowego E – SAE, kwasu salwianolowego K – SAK, izomerów kwasu salwianolowego F – SAF I i SAF II, kwasu rozmarynowego – RA oraz całkowita zawartość polifenoli – TPC oznaczona 1, 3, 5, 7 dni po elicytacji 100 i 200 mg YE. CI - traktowanie kontrolne. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

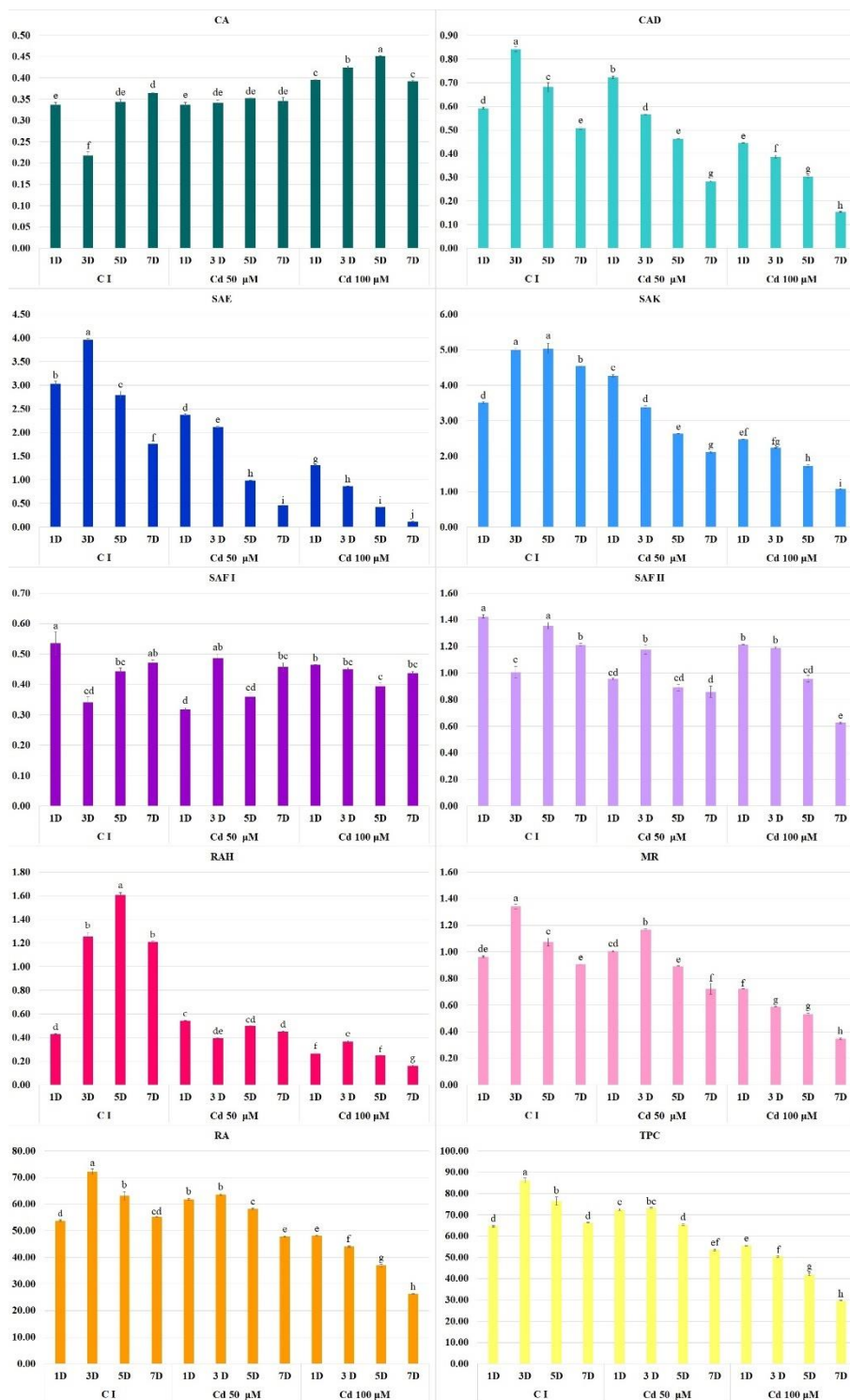




Wykres 24. Zawartość (mg/g SM) polifenoli: kwasu kawowego – CA i jego pochodnej – CAD, heksozy kwasu rozmarynowego – RAH, rozmarynianu metylu – MR, kwasu salwianolowego E – SAE, kwasu salwianolowego K – SAK, izomerów kwasu salwianolowego F – SAF I i SAF II, kwasu rozmarynowego – RA oraz całkowita zawartość polifenoli – TPC oznaczona 1, 3, 5, 7 dni po elicytacji 5 i 10 μM t-A. CII - traktowanie kontrolne, do którego dodano 10 μl 96% etanolu. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

*t*-A okazał się mieć nieco silniejszy wpływ na produkcję związków polifenolowych niż YE (wykres 24). Zawartość RAH (2,55 mg/g SM) w 7 dniu po elicytacji 5  $\mu$ M *t*-A była ponad dwukrotnie wyższa w porównaniu do tej raportowanej dla CII. Suplementacja *t*-A miała również korzystny wpływ na produkcję SAK, którego poziom w kontroli obniżał się około 38 dnia kultury spadając poniżej 5 mg/g SM. Tymczasem elicytacja *t*-A nie tylko hamowała ten spadek, ale jeszcze skutkowała niewielkim wzrostem zawartości SAK w kulturze w 7 dniu elicytacji (40 dzień kultury) (ok. 6 mg/g SM). Podobny efekt odnotowano w odniesieniu do RA. Dodatek *t*-A nie stymulował produkcji tego kwasu polifenolowego, ale przeciwdziałał spadkowi jego zawartości występującemu naturalnie podczas wzrostu od dnia 40 (w tym doświadczeniu jest to 7 dzień po ekspozycji). W tym czasie nie obserwowano więc spadku poziomu RA w kulturze poddanej działaniu obu stężeń *t*-A, co odnotowano dla kontroli (wykres 24). Pewien korzystny efekt oddziaływania obu stężeń *t*-A zanotowano także dla izomerów SAF. W odniesieniu do SAF I, efekt był natychmiastowy i krótkotrwały, bo istotny wzrost produkcji (o 50%) zaobserwowano dla 5  $\mu$ M *t*-A tylko w pierwszym dniu ekspozycji, a dla 10  $\mu$ M *t*-A w dniu trzecim. W przypadku SAF II efekt był podobny, chociaż *t*-A w stężeniu 5  $\mu$ M stymulował biosyntezę nieco dłużej, zarówno w pierwszym jak i trzecim dniu ekspozycji (wykres 24).

Wykorzystanie chlorku kadmu jako elicytora miało negatywny wpływ nie tylko na wzrost kultury, ale także na produkcję związków bioaktywnych w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* (wykres 25). Efekt ten był widoczny już w pierwszym dniu od suplementacji 100  $\mu$ M Cd i od 3 dnia w przypadku stężenia 50  $\mu$ M. Zastosowanie 100  $\mu$ M Cd wraz z upływem kolejnych dni obniżało stopniowo całkowitą zawartość polifenoli o od 14 do 55%, skutkując ostatecznym TPC na poziomie 29,6 mg/g SM. Z kolei 50  $\mu$ M Cd finalnie zredukowało TPC o ok. 20%, co odpowiadało zawartości 53,6 mg/g SM. Jedynym związkiem, którego zawartość utrzymywała się na podobnym poziomie niezależnie od użytego stężenia Cd był SAF I (0,318-0,486 mg/g SM). Biorąc pod uwagę jednoczesny istotny spadek biomasy, Cd miał zdecydowanie negatywny wpływ na produktywność korzeni włósnikowatych *S. bulleyana*.



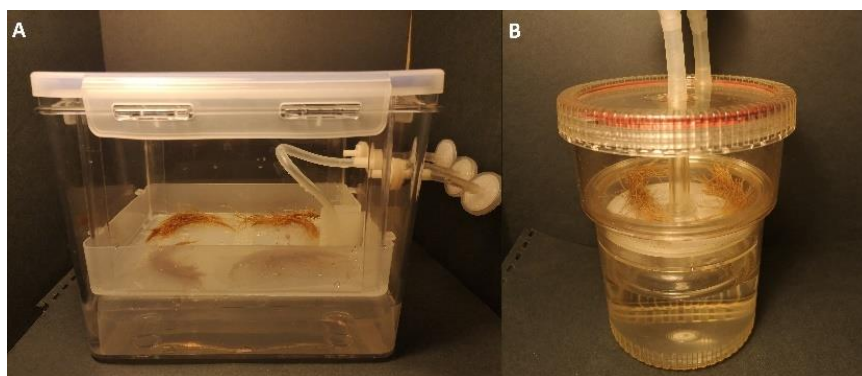
Wykres 25. Zawartość (mg/g SM) polifenoli: kwasu kawowego – CA i jego pochodnej – CAD, heksozy kwasu rozmarynowego – RAH, rozmarynianu metylu – MR, kwasu salwianolowego E – SAE, kwasu salwianolowego K – SAK, izomerów kwasu sławianolowego F – SAF I i SAF II, kwasu rozmarynowego – RA oraz całkowita zawartość polifenoli – TPC oznaczona 1, 3, 5, 7 dni po elicytacji 50 i 100 µM Cd. CI – traktowanie kontrolne. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Podsumowując, zastosowanie elicytorów miało wpływ na produkcję związków polifenolowych w korzeniach transformowanych *S. bulleyana*. Najkorzystniejsza okazała się 3-dniowa ekspozycja na 100  $\mu\text{M}$  MJA. Produktywność polifenoli wynosiła w tym przypadku 1279,6 mg/l podłoża, przy czym 1134,1 mg/l stanowił RA, 39,3 mg/l SAK, a 39,5 mg/l SAE. Z kolei najniższą produktywność stwierdzono po elicytacji 100  $\mu\text{M}$  Cd; w przypadku TPC oraz RA była ona 6-krotnie niższa (odpowiednio 231,4 i 205,4 mg/l) niż w optymalnych warunkach.

Co więcej, podczas ostatnich serii doświadczeń, zaobserwowano pewien spadek produkcji niektórych metabolitów wtórnych w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* wraz z upływem czasu. Wartości otrzymane dla kontroli, które zostały oznaczone podczas elicytacji były niższe niż te, które uzyskano dla korzeni po optymalizacji warunków hodowli korzeni włósnikowatych (wcześniejsze pasażę). Zjawisko to było widoczne zwłaszcza w przypadku zawartości SAE, SAK czy RAH i może mieć związek z wiekiem kultury, która w toku ostatniego doświadczenia miała już ponad 5 lat.

### 5.2.5. Zwiększenie skali hodowli

Kolejny eksperyment obejmował próbę zwiększenia skali hodowli korzeni transformowanych *S. bulleyana*. W tym celu wykorzystano dwa typy bioreaktorów: PlantForm oraz Rita. W obu przypadkach zastosowano podłoże płynne  $\frac{1}{2}\text{SH}$  uzupełnione połową zawartości witamin i 3% sacharozy. Hodowla była prowadzona w ciemności i trwała 40 dni.



Fotografia 10. Fragmenty korzeni transformowane *S. bulleyana* wykorzystane do inokulacji systemów A – PlantForm, B – Rita.

W zależności od użytego bioreaktora jako inokulat wykorzystano 4 (PlantForm) lub 2 fragmenty korzeni (Rita) o łącznej świeżej masie wynoszącej odpowiednio 2,28 g i 1,48 g (fotografia 10). Do tych wstępnych doświadczeń, zastosowano 2 warianty czasu zalewania materiału roślinnego podłożem: 10 minut co 3 godziny oraz 3 minuty co 1,5 godziny.



Fotografia 11. Korzenie transformowane *S. bulleyana* hodowane w bioreaktorze typu PlantForm w podłożu  $\frac{1}{2}$ SH  $\frac{1}{2}$ V z 3% sacharozy przez okres 40 dni, w ciemności. A-B – czas zalewania 10 min co 3 h; C-D – czas zalewania 3 min co 1,5 h. Skala 1 cm.



Fotografia 12. Korzenie transformowane *S. bulleyana* hodowane w bioreaktorze typu Rita w podłożu  $\frac{1}{2}$ SH  $\frac{1}{2}$ V z 3% sacharozy przez okres 40 dni, w ciemności. A-B – czas zalewania 10 min co 3 h; C-D – czas zalewania 3 min co 1,5 h. Skala 1 cm.

Tabela 11. Indeksy wzrostu oraz wartości świeżej oraz suchej masy korzeni transformowanych *S. bulleyana* (C4) po 40 dniach hodowli w podłożu ½SH ½V z 3% sacharozy w ciemności w bioreaktorach typu PlantForm i Rita w odniesieniu do różnych czasów i częstości zalewania. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

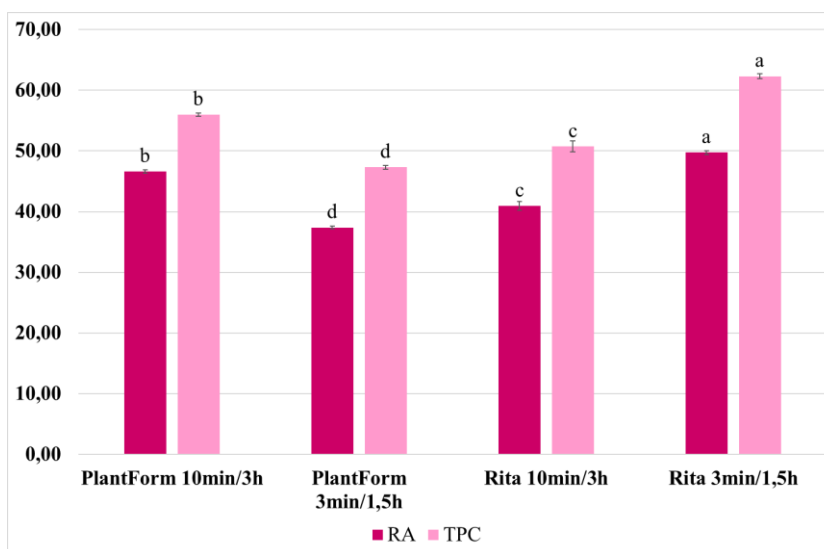
Typ naczynia hodowlanego	Świeża masa (g)	Świeża masa (g/l)	Sucha masa (g)	Sucha masa (g/l)	Indeks wzrostu ŚM	Indeks wzrostu SM
<b>PlantForm 10min/3h</b>	28,3±1,35a	56,7±2,69a	4,60±0,174a	9,19±0,349a	11,4±0,591a	13,5±0,552a
<b>PlantForm 3min/1,5h</b>	25,2±1,17a	50,4±2,35a	4,55±0,255a	9,10±0,510a	10,1±0,516a	13,4±0,807a
<b>Rita 10min/3h</b>	16,4±1,66b	65,7±6,64a	2,61±0,140b	10,4±0,560a	10,1±1,12a	11,9±0,690a
<b>Rita 3min/1,5h</b>	16,8±1,48b	67,0±5,90a	2,62±0,151b	10,5±0,605a	10,3±0,999a	11,9±0,746a

Czas zalewania materiału i długość przerwy między zalewaniami nie miały istotnego wpływu na akumulację biomasy w obrębie tego samego rodzaju bioreaktora (tabela 11). Stwierdzono jednak, że wartości świeżych i suchych mas wyrażone w gramach na naczynie hodowlane wykazywały istotne statystycznie różnice w zależności od jego typu. Było to przede wszystkim spowodowane różnicami w masach inokulatów w związku z czym różnic statystycznych już nie odnotowano, kiedy wyniki wyrażono jako indeksy wzrostu. Najwyższe wartości indeksów wzrostu stwierdzono dla korzeni hodowanych w bioreaktorze typu PlantForm przy dłuższym, ale rzadszym czasie zalewania; 11,4 dla ŚM i 13,5 dla SM (tabela 11).

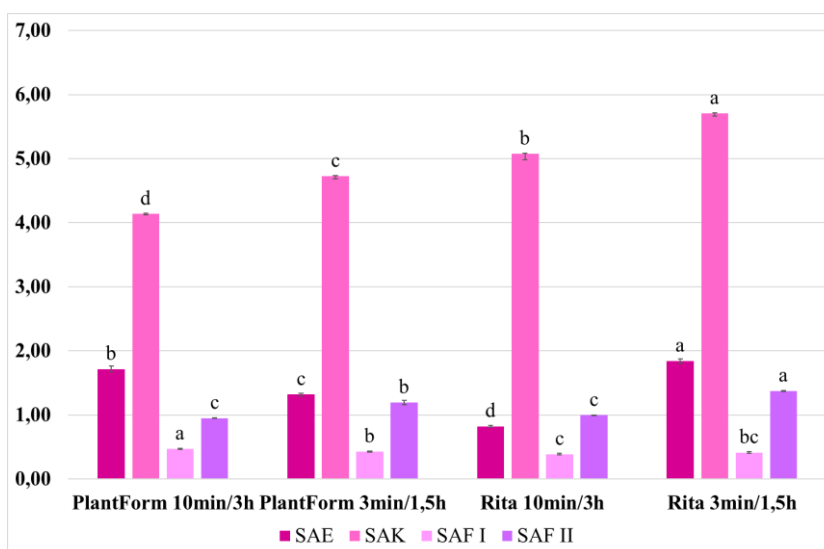
Po 40 dniach hodowli wykonano analizę ilościową związków polifenolowych zawartych w korzeniach włósnikowatych pochodzących z każdego wariantu doświadczenia. W tym wypadku zarówno czas zalewania materiału roślinnego, jak i rodzaj naczynia hodowlanego miały wpływ na produkcję polifenoli w korzeniach transformowanych *S. bulleyana*.

W przypadku bioreaktorów typu Rita, krótsze i częstsze zalewanie materiału roślinnego podłożem wpływało korzystnie na akumulację związków polifenolowych. TPC wynosiła w tym przypadku 62,3 mg/g SM, a zawartość RA - 49,8 mg/g SM. Były to wartości o ponad 20% wyższe niż w przypadku dłuższej, a rzadszej ekspozycji korzeni

na składniki podłoża (wykres 26).



Wykres 26. Zawartość (mg/g SM) kwasu rozmarynowego – RA i całkowita zawartość polifenoli – TPC, oznaczona w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* po 40 dniach hodowli w podłożu ½ SH ½ V z 3% sacharozy w bioreaktorach typu PlantForm i Rita w odniesieniu do różnych czasów i częstości zalewania: 10min/3h lub 3min/1,5h. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

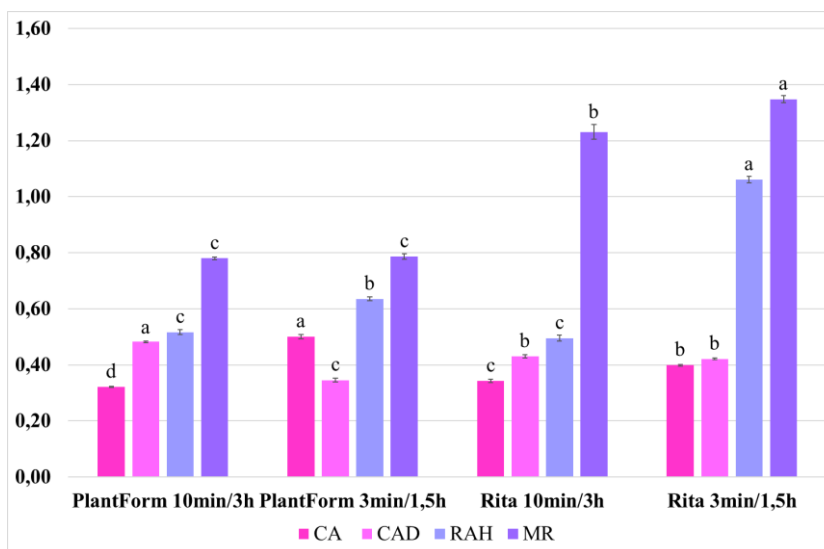


Wykres 27. Zawartość (mg/g SM) kwasów salwianolowych: E – SAE, K – SAK oraz izomerów kwasu salwianolowego F – SAF I i SAF II oznaczona w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* po 40 dniach hodowli w podłożu ½ SH ½ V z 3% sacharozy w bioreaktorach typu PlantForm i Rita w odniesieniu do różnych czasów i częstości zalewania: 10min/3h lub 3min/1,5h. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Krótszy czas zalewania sprzyjał akumulacji większości pozostałych oznaczanych związków polifenolowych, a w szczególności RAH i SAE, których zawartości były



ponad 2-krotnie wyższe w porównaniu z tymi stwierdzonymi w kulturze przy drugim stosowanym wariacie zalewania. Istotnie statystycznie, chociaż nie tak spektakularne, różnice w zawartościach między traktowaniami zanotowano także w przypadku CA, MR, SAK, SAF I i SAF II. W przypadku bioreaktora Rita, skrócenie czasu zalewania nie miało wpływu jedynie na zawartość CAD (ok. 0,425 mg/g SM) (wykresy 27 i 28).



Wykres 28. Zawartość (mg/g SM) kwasu kawowego – CA oraz jego pochodnej – CAD; heksozy kwasu rozmarynowego – RAH oraz rozmarynianu metylu - MR oznaczona w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* po 40 dniach hodowli w podłożu ½SH ½V z 3% sacharozy w bioreaktorach typu PlantForm i Rita w odniesieniu do różnych czasów i częstości zalewania: 10min/3h lub 3min/1,5h. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

W przypadku bioreaktorów typu PlantForm korzystniejszy okazał się 10 minutowy kontakt z podłożem co 3 h. Całkowita zawartość polifenoli w tym wariacie wynosiła 56,0 mg/g SM i była o 18% wyższa w porównaniu z traktowaniem z częstszym, ale krótszym czasem zalewania (3 min co 1,5 h) (wykres 26). Zawartości RA w kulturze hodowanej w systemie PlantForm wynosiły odpowiednio, 46,6 i 37,4 mg/g SM. Wydłużony kontakt korzeni z podłożem był również korzystny dla akumulacji CAD, SAE oraz SAF I, a zawartości tych związków były wyższe o, odpowiednio, 40%, 30% i 10% w porównaniu z tymi, które otrzymano dla korzeni zalewanych podłożem częściej. W przeciwieństwie do tego krótszy, a częstszy kontakt z pożywką podczas hodowli w bioreaktorze PlantForm skutkował wzrostem zawartości CA o 56%, RAH o 23%, SAK o 14% i SAF II o 26%. Jedynym związkiem, na który nie wpłynęły różnice w częstotliwości i długości zalewania podczas hodowli w tym systemie był rozmarynian metylu (ok. 0,78 mg/g SM dla obu wariantów) (wykresy 27 i 28).



Tabela 12. Produktywność korzeni transformowanych *S. bulleyana* hodowanych w bioreaktorach typu PlantForm i Rita w odniesieniu do różnych czasów i częstości zalewania, wyrażona w mg/naczynie oraz mg/l podłoża hodowlanego. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

		<b>PlantForm</b> <b>10min/3h</b>	<b>PlantForm</b> <b>3min/1,5h</b>	<b>Rita</b> <b>10min/3h</b>	<b>Rita</b> <b>3min/1,5h</b>
<b>CA</b>	<b>mg/naczynie</b> <b>hodowlane</b>	1,48±0,017b	2,28±0,064a	0,894±0,030c	1,05±0,017c
	<b>mg/l podłoża</b>	2,95±0,034c	4,56±0,127a	3,56±0,118b	4,19±0,067a
<b>RAH</b>	<b>mg/naczynie</b> <b>hodowlane</b>	2,38±0,038b	2,89±0,059a	1,29±0,058c	2,78±0,055a
	<b>mg/l podłoża</b>	4,75±0,077c	5,78±0,118b	5,15±0,230bc	11,14±0,220a
<b>SAE</b>	<b>mg/naczynie</b> <b>hodowlane</b>	7,89±0,391a	6,01±0,053b	2,15±0,060c	4,83±0,148d
	<b>mg/l podłoża</b>	15,8±0,781b	12,01±0,105c	8,56±0,238d	19,3±0,594a
<b>RA</b>	<b>mg/naczynie</b> <b>hodowlane</b>	216,2±2,24a	171,7±1,63b	107,4±3,92d	131,7±1,62c
	<b>mg/l podłoża</b>	432,0±4,49b	343,4±3,27c	428,0±15,6b	527,7±6,51a
<b>SAK</b>	<b>mg/naczynie</b> <b>hodowlane</b>	19,0±0,058b	21,5±0,290a	13,2±0,499d	14,9±0,194c
	<b>mg/l podłoża</b>	38,0±0,116c	43,0±0,579c	52,8±1,99b	59,9±0,778a
<b>CAD</b>	<b>mg/naczynie</b> <b>hodowlane</b>	2,22±0,014a	1,57±0,035b	1,12±0,033c	1,10±0,009c
	<b>mg/l podłoża</b>	4,43±0,029a	3,15±0,070b	4,47±0,133a	4,42±0,034a
<b>MR</b>	<b>mg/naczynie</b> <b>hodowlane</b>	3,59±0,022a	3,58±0,037a	3,21±0,132b	3,53±0,036ab
	<b>mg/l podłoża</b>	7,17±0,044c	7,16±0,0073c	12,8±0,527b	14,16±0,145a
<b>SAF I</b>	<b>mg/naczynie</b> <b>hodowlane</b>	2,16±0,043a	1,94±0,001b	1,01±0,036c	1,08±0,042c
	<b>mg/l podłoża</b>	4,32±0,085a	3,89±0,003a	4,03±0,143a	4,35±0,170a
<b>SAF II</b>	<b>mg/naczynie</b> <b>hodowlane</b>	4,37±0,051b	5,43±0,274a	2,59±0,038d	3,60±0,024c
	<b>mg/l podłoża</b>	8,73±0,102c	10,9±0,548b	10,3±0,153b	14,4±0,098a
<b>TPC</b>	<b>mg/naczynie</b> <b>hodowlane</b>	259,4±2,69a	216,9±1,80b	132,9±4,66d	164,6±1,92c
	<b>mg/l podłoża</b>	518,2±5,37b	433,8±3,61c	529,7±18,6b	659,7±7,70a

Porównując produkcję w obu typach naczyń hodowlanych i uwzględniając zastosowane warianty zalewania podłożem materiału roślinnego, najkorzystniejsza okazała się być hodowla w bioreaktorze typu Rita przy czasie zalewania 3 min co 1,5 h. Kultura ta wytwarzała od 34% do 67% więcej TPC niż pozostałe warianty hodowli. Na wysoką TPC przekładała się nie tylko zawartość RA, która przewyższała pozostałe warianty o 7-33%, ale także SAK – wyższa o 12-38%, SAE – o 7-124%, RAH – o 67-114%, MR – o 10-73% oraz SAF II – o 15-45%. W związku z powyższymi wynikami, hodowla prowadzona w bioreaktorze typu Rita o czasie zalewania 3 min co 1,5 h charakteryzowała się najwyższą produktywnością. Całkowita zawartość związków polifenolowych wynosiła w tym wypadku 659,7 mg/l podłoża, przy czym 527,7 mg/l RA, 59,9 mg/l SAK, i 19,3 mg/l SAE (tabela 12).

### 5.3. Pędy transformowane

#### 5.3.1. Analiza jakościowa metanolowo-wodnych ekstraktów z pędów transformowanych *S. bulleyana*

Analizę jakościową metanolowo-wodnego ekstraktu z pędów transformowanych *S. bulleyana* przeprowadzono z wykorzystaniem metody UHPLC-PDA-ESI-MS. Profil polifenolowy określono przy długości fali 325 nm. W badanym ekstrakcie zidentyfikowano 11 związków (tabela 13).

Dla pik 1 zarejestrowano jon macierzysty  $[M-H]^-$  przy  $m/z$  297, a także jony fragmentacyjne przy  $m/z$  179 (reszta kwasu kawowego) oraz przy  $m/z$  135 (reszta kwasu kawowego- $CO_2$ ). Na podstawie danych literaturowych zidentyfikowano ten związek jako izomer kwasu kawoilo-treonowego (CTA).

Pik 2 charakteryzował jon macierzysty  $[M-H]^-$  przy  $m/z$  179. Został on zidentyfikowany jako kwas kawowy (CA), co potwierdzono poprzez porównanie ze związkiem wzorcowym.

Dla pik 3 zaobserwowano jon molekularny  $[M-H]^-$  przy  $m/z$  357 oraz jony fragmentacyjne przy  $m/z$  313, wskazujący na utratę  $CO_2$  oraz przy  $m/z$  203, który powiązано z utratą fragmentu odpowiadającego 3,4-dihydroksyfenylowi (-110 amu). Na podstawie danych literaturowych został on oznaczony jako izomer kwasu protolitospermowego (PLS).

Pik 5 zidentyfikowano jako kwas rozmarynowy (RA) na podstawie jego rozpadu do jonu pseudomolekularnego  $[M-H]^-$  przy  $m/z$  359 i obecności charakterystycznych jonów fragmentacyjnych przy  $m/z$  197, 179 oraz 161. Ponadto, tożsamość tego związku potwierdzono porównując otrzymane dane do tych, uzyskanych dla związku wzorcowego.

Pik 4 dawał jon fragmentacyjny przy  $m/z$  359  $[M-162]$  (ugrupowanie heksozydowe). Ponadto, zanotowano jony charakterystyczne dla kwasu rozmarynowego. Na podstawie tych danych oraz literatury zidentyfikowano ten związek jako heksozę kwasu rozmarynowego (RAH).

Dla pik 6 zarejestrowano jon pseudomolekularny  $[M-H]^-$  przy  $m/z$  555 oraz jony fragmentacyjne przy  $m/z$  537  $[M-H-H_2O]^-$ , 493  $[M-H-H_2O-CO_2]^-$  oraz 359  $[M-H-dansensu]^-$ . Związek ten oznaczono jako kwas salwianolowy K (SAK).

W przypadku pik 7 otrzymano jon molekularny przy  $m/z$  537, a także jon fragmentacyjny przy  $m/z$  493  $[M-H-CO_2]^-$ , które są typowe dla kwasu litospermowego. Jednakże widmo  $MS^2$  zarejestrowało także stosunkowo duży jon przy  $m/z$  359, który nie jest spójny z danymi literaturowymi dotyczącymi rozpadu tego związku. Dlatego też pik 7 został oznaczony jako izomer kwasu litospermowego (LS).

Piki 8 i 9 zostały oznaczone na podstawie danych literaturowych oraz charakterystycznego rozpadu fragmentacyjnego jako odpowiednio kwas dehydrorozmarynowy (DRA) oraz rozmarynian metylu (MR).

W przypadku pików 10 i 11 zanotowano obecność jonu pseudomolekularnego  $[M-H]^-$  przy  $m/z$  313 i rozpad podobny do kwasu salwianolowego F. Rozbieżność pojawiała się jedynie w czasach retencji. Dlatego też zidentyfikowano te związki jako izomery kwasu salwianolowego F (SAF I i SAF II).

Tabela 13. Dane uzyskane w wyniku analizy UPLC-PDA-ESI-MS metanolowo-wodnego ekstraktu z pędów transformowanych *S. bulleyana*.

Pik	Prawdopodobny związek	Czas retencji (min)	UV (nm)	Tryb jonów ujemnych	
				$[M-H]^-$	Piki odpowiadające jonom fragmentacyjnym
1	Izomer kwasu kawoilo-treonowego	14,5	297sh, 321	297	179, 161, 135
2	Kwas kawowy	18,6	292sh, 321	179	135
3	Izomer kwasu protolitospermowego	24,8	326	357	313, 269, 203
4	Heksoza kwasu rozmarynowego	31,5	287sh, 319	521	359, 161
5	Kwas rozmarynowy	36,5	289sh, 325	359	223, 197, 179, 161
6	Kwas salwianolowy K	37,5	286, 321	555	537, 493, 449, 359, 313, 269
7	Izomer kwasu litospermowego	40,2	289sh, 324	537	493, 359
8	Kwas dehydrorozmarynowy	41,4	282, 318	343	325, 223, 197, 179, 135
9	Rozmarynian metylu	43,5	286sh, 327	373	179, 135
10	Izomer kwasu salwianolowego F I	50,8	336	313	269, 161
11	Izomer kwasu salwianolowego F II	53,6	302sh, 335	313	269, 203, 161

### 5.3.2. Wybór odpowiednich warunków oświetlenia

Kultura pędów *S. bulleyana* otrzymana spontanicznie na jednym z klonów korzeni włośnikowatych, której transformacja została potwierdzona obecnością genów *rolC* oraz *rolD*, była początkowo prowadzona na podłożu MS z 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l m-Top. W pierwszym etapie cyklu eksperymentów mających na celu optymalizację wzrostu i produkcji związków polifenolowych pędy rosły przez 5 tygodni w różnych warunkach oświetlenia LED: białego, mieszanego (niebieskie/czerwone), niebieskiego oraz czerwonego. Kontrolę stanowiły pędy transgeniczne hodowane na świetle emitowanym przez lampy fluorescencyjne.



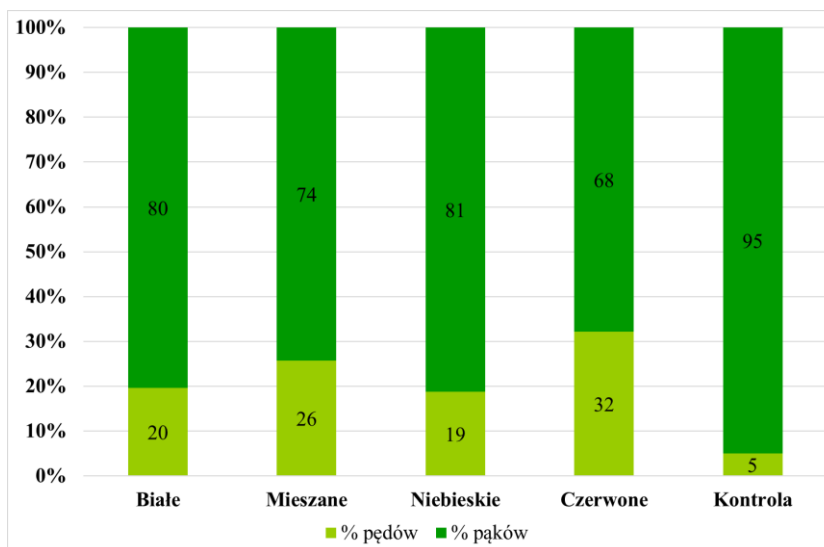
Fotografia 13. Pędy transformowane *S. bulleyana* po 5 tygodniach wzrostu na stałym podłożu MS z dodatkiem 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l m-Top w różnych warunkach oświetlenia LED: A – światło białe, B – światło mieszane, C – światło niebieskie, D – światło czerwone, E – światło fluorescencyjne. Skala 1 cm.

Otrzymane wyniki wskazują, że długość fali świetlnej i rodzaj zastosowanego oświetlenia mają wpływ na wzrost, morfologię oraz proliferację pędów, którą określano jako współczynnik mnożenia, tj. liczbę nowopowstałych pędów i pąków na jednym eksplantacie (fotografia 13, tabela 14).

Najwyższą wartość współczynnika mnożenia (3,04) osiągnięto podczas ekspozycji pędów transformowanych na światło białe (tabela 14). Podobny poziom proliferacji odnotowano dla pędów kontrolnych oraz dla kultury hodowanej pod oświetleniem mieszanym. Jednakże w przypadku hodowli pod LED-ami istotnie więcej nowopowstałych struktur stanowiły pędy (20-26%), kiedy to dla kultury oświetlanej lampami fluorescencyjnymi stanowiły one tylko 5% (wykres 29).

Tabela 14. Wartości świeżej oraz suchej masy, indeksy wzrostu oraz współczynnik mnożenia otrzymany dla pędów transformowanych *S. bulleyana* po 5 tygodniach hodowli na podłożu MS z dodatkiem 0,1 mg/l IAA i 1 mg/l m-Top w różnych warunkach oświetlenia. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Warunki oświetlenia	Świeża masa (g)	Sucha masa (g)	Indeks wzrostu ŚM	Indeks wzrostu SM	Współczynnik mnożenia
<b>Białe</b>	1,22±0,104a	0,145±0,010a	38,5±3,36a	36,0±2,50a	3,04±0,272a
<b>Mieszane</b>	1,09±0,107ab	0,134±0,011ab	34,3±3,47ab	33,1±2,80ab	2,72±0,257ab
<b>Niebieskie</b>	0,545±0,093c	0,070±0,010c	16,6±3,00c	16,7±2,57c	1,88±0,254b
<b>Czerwone</b>	0,796±0,105bc	0,100±0,012bc	24,7±3,41bc	24,4±2,96bc	2,00±0,267ab
<b>Kontrola</b>	0,895±0,048b	0,109±0,006b	28,0±1,52b	26,8±1,51b	2,91±0,228a

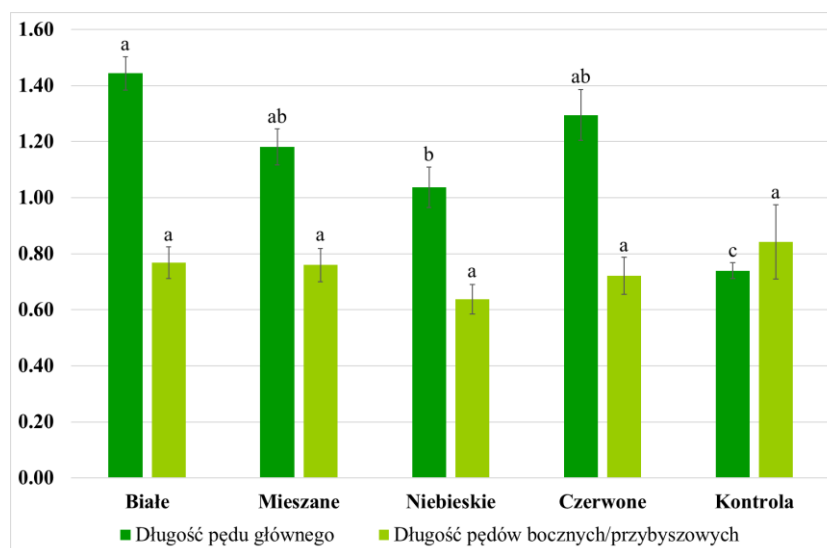


Wykres 29. Stosunek procentowy nowopowstałych pędów bocznych/przybyszowych do pędów po 5 tygodniach hodowli na stałym podłożu MS uzupełnionym 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l m-Top w różnych warunkach oświetlenia.

Oświetlenie wpłynęło także na wygląd kultury. Pędy hodowane w warunkach światła białego miały intensywną, ciemnozieloną barwę oraz liczne krótkoogonkowe liście. U podstawy pędu głównego tworzył się dość duży, różnicujący się kalus. Średnia długość pędu głównego wynosiła 1,44 cm i była najwyższa spośród wszystkich traktowań (fotografia 13, wykres 30).

Wysoki współczynnik namnażania i intensywny wzrost osiągnięty dla pędów eksponowanych na białe światło LED przekładały się na najwyższe osiągnięte w tych warunkach wartości świeżej oraz suchej masy, odpowiednio, 1,22g ŚM i 0,145 g SM, co odpowiadało prawie 40-krotnemu przyrostowi masy inokulatu. Były to wartości tylko

około 25% wyższe niż te odnotowane dla kontroli, ale ponad dwukrotnie wyższe niż opisane w przypadku kultury prowadzonej na świetle niebieskim, która wykazywała najslabsze parametry wzrostu (tabela 14, wykres 30).



Wykres 30. Średnie długości (cm) pędów głównych oraz pędów bocznych/przybyszowych po 5 tygodniach hodowli na stałym podłożu MS uzupełnionym 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l m-Top w różnych warunkach oświetlenia. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Korzystne dla wzrostu pędów transformowanych *S. bulleyana* były także warunki światła mieszanego. Wartości parametrów wzrostu kultury w tych warunkach były tylko nieznacznie niższe w porównaniu do tych odnotowanych przy białych LED-ach i nie różniły się od nich statystycznie (tabela 14, wykres 30). Barwa hodowanych w świetle mieszanym pędów była jasnozielona. Ich liście były długie i wąskie. U podstawy pędu głównego tworzył się kalus, ale mniej intensywnie niż w warunkach światła białego.

Selektywne warunki oświetlenia (tylko czerwone lub niebieskie LED) okazały się ograniczać wzrost kultury pędów. Powyższe warunki wpływały również na morfologię uzyskanych kultur. Ekspozycja na światło czerwone skutkowałą powstawaniem długoogonkowych, wąskich liści, których blaszka miała podwinięte brzegi. Jednakże pęd główny jak i te nowo powstałe nie różniły się istotnie długością od tych opisanych w warunkach światła białego (wykres 30). Z drugiej strony, choć ekspozycja na światło czerwone skutkowałą obniżeniem współczynnika proliferacji, w tym przypadku

zanotowano największy udział zregenerowanych pędów w stosunku do pąków (32:68) (wykres 29).

Pędy ekspozowane na światło niebieskie charakteryzowały się najslabszym przyrostem biomasy (tabela 14). Były one też najkrótsze spośród badanych traktowań (1,04 cm) (wykres 30). Posiadały także najmniejszą liczbę liści, których blaszka liściowa była szersza niż przy pozostałych traktowaniach. Ponadto, w tych warunkach nie obserwowano tworzenia się kalusa, za to na eksplantatach czasem spontanicznie tworzyły się korzenie.

Po 5 tygodniach hodowli w różnych warunkach oświetlenia, w kulturze oznaczano zawartość barwników fotosyntetycznych, tj. chlorofilu a, b oraz karotenoidów. Kontrolę stanowiły pędy transgeniczne hodowane w warunkach światła emitowanego przez lampy fluorescencyjne.

Tabela 15. Wpływ warunków oświetlenia na zawartość barwników fotosyntetycznych (mg/g SM) w pędach transformowanych *S. bulleyana*. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Warunki oświetlenia	Chlorofil a	Chlorofil b	Chlorofil całkowity	Karotenoidy
<b>Białe</b>	0,473±0,002b	0,253±0,003b	0,723±0,006c	0,132±0,002b
<b>Mieszane</b>	0,413±0,004c	0,211±0,004c	0,624±0,005d	0,093±0,002c
<b>Niebieskie</b>	0,551±0,005a	0,250±0,007b	0,807±0,010b	0,232±0,005a
<b>Czerwone</b>	0,526±0,004a	0,604±0,001a	1,13±0,010a	0,231±0,040a
<b>Kontrola</b>	0,422±0,010c	0,109±0,002d	0,531±0,002e	0,108±0,001c

Zanotowano, że długość fali świetlnej miała istotny wpływ na wytwarzanie barwników fotosyntetycznych w pędach transgenicznych *S. bulleyana*. Najwyższym poziomem pigmentów fotosyntetycznych (1,36 mg/g SM) charakteryzowały się pędy kultywowane w warunkach światła czerwonego (tabela 15). Całkowita ilość chlorofilu wynosiła w tym przypadku 1,13 mg/g SM, a karotenoidów – 0,231 mg/g SM. Były to wartości dwukrotnie wyższe niż te, które otrzymano dla kontroli. Zanotowano szczególnie silny wpływ czerwonych LED-ów na wytwarzanie chlorofilu b (0,604 mg/g SM), którego poziom dla tego traktowania wzrósł od 2,5 do 5,5-krotnie w porównaniu z pozostałymi traktowaniami. Produkcję barwników fotosyntetycznych stymulowało też w widoczny sposób światło o barwie niebieskiej, podczas gdy najniższą ich zawartość



odnotowano dla pędów kultywowanych w warunkach światła mieszanego i w kontroli. Zawartość chlorofilu a i b wynosiła w tym przypadku, odpowiednio, 0,624 i 0,531 mg/g SM, a karotenoidów 0,093 i 0,108 mg/g SM (tabela 15).

Po 5 tygodniach hodowli w różnych warunkach oświetlenia w pędach transformowanych *S. bulleyana* oceniono także aktywność enzymów antyoksydacyjnych – peroksydazy, dysmutazy ponadtlenkowej oraz katalazy. Kontrolę stanowiły pędy kultywowane w świetle lamp fluorescencyjnych.

Okazało się, że wykorzystanie w hodowli źródeł światła LED o różnej długości fali pobudza aktywność wszystkich badanych enzymów w porównaniu do kontroli. Prowadzenie kultury pędów transformowanych *S. bulleyana* w warunkach światła niebieskiego skutkowało najwyższymi aktywnościami enzymów antyoksydacyjnych. Aktywność POD zanotowana dla pędów rosnących w tych warunkach (28,56 U/mg białka) stanowiła ponad dwukrotność wartości otrzymanej w przypadku materiału pochodzącego z kultur prowadzonych w warunkach światła mieszanego oraz czerwonego (odpowiednio 12,7 oraz 14,7 U/mg białka) (tabela 16). Hodowla eksponowana na światło niebieskie charakteryzowała się także najwyższymi aktywnościami enzymów SOD oraz CAT, które wynosiły, odpowiednio, 7,15 oraz 8,60 U/mg białka. Tymczasem najniższą aktywność SOD wykazywały pędy rosnące przy długości fal odpowiadających światłu mieszanemu (3,02 U/mg białka). Z drugiej strony, te ostatnie warunki oświetlenia okazały się pobudzać aktywność CAT (7,80 U/mg białka), która była niewiele niższa niż ta dla traktowania światłem niebieskim. Ponadto, przewyższała ona 3-krotnie traktowania wykorzystujące światło białe i czerwone.

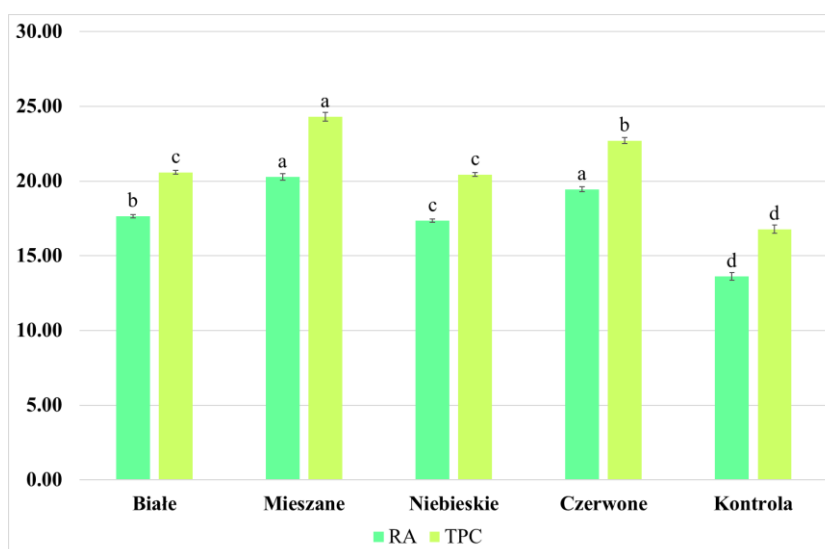
Tabela 16. Wpływ różnych warunków oświetlenia na aktywność enzymów antyoksydacyjnych POD, SOD oraz CAT w pędach transformowanych *S. bulleyana*. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Warunki oświetlenia	Aktywność enzymów (U mg <sup>-1</sup> białka)		
	POD	SOD	CAT
<b>Białe</b>	22,26±0,410b	3,13±0,440c	2,44±0,030c
<b>Mieszane</b>	12,72±0,270d	3,02±0,400c	7,80±0,040b
<b>Niebieskie</b>	28,56±0,680a	7,15±0,400a	8,60±0,020a
<b>Czerwone</b>	14,68±0,340c	4,94±0,350b	2,34±0,010d
<b>Kontrola</b>	1,49±0,010e	0,688±0,230d	0,224±0,010e

Tymczasem najniższe aktywności wszystkich enzymów antyoksydacyjnych odnotowano dla kultury prowadzonej w warunkach oświetlenia fluorescencyjnego (tabela 16), przy czym uzyskane w tych warunkach wartości były 10-krotnie niższe w przypadku SOD, 20-krotnie niższe dla POD i prawie 40-krotnie niższe dla CAT w porównaniu do tych odnotowanych dla pędów eksponowanych na światło niebieskie.

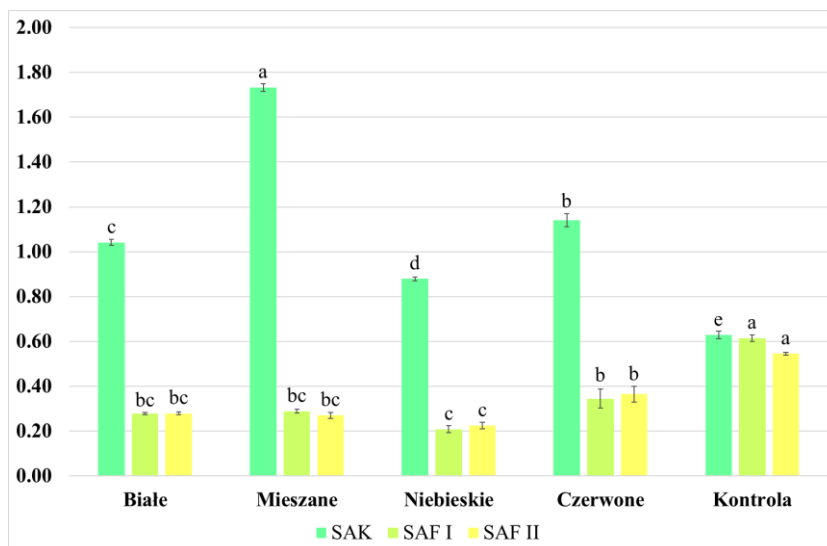
W porównaniu do istotnych różnic w morfologii, wzroście i fizjologii, różnice pomiędzy pędami traktowanymi różnymi długościami fal świetlnych w odniesieniu do zawartości wtórnych metabolitów były znacznie mniejsze. We wszystkich badanych ekstraktach zidentyfikowano i oznaczano ilościowo 11 związków.

Raportowane sumy związków polifenolowych w ekstraktach w zależności od traktowania wahały się w granicach 20,4-24,3 mg/g SM (wykres 31). Były one 22-45% wyższe niż te otrzymane dla pędów hodowanych w warunkach kontrolnych. Jednakże w odniesieniu do poszczególnych związków różnice te niejednokrotnie okazały się istotne statystycznie.

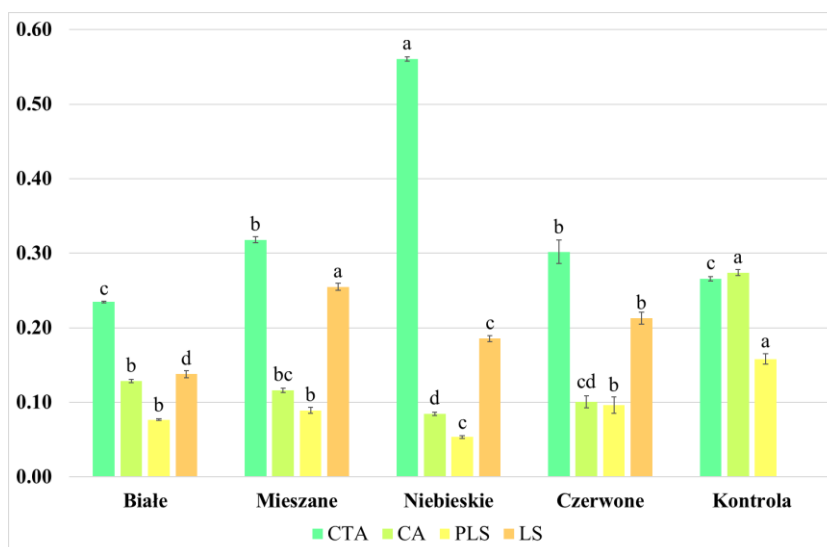


Wykres 31. Zawartość (mg/g SM) RA – kwasu rozmarynowego i TPC – całkowita zawartość związków polifenolowych w pędach transformowanych *S. bulleyana* hodowanych przez 5 tygodni na podłożu stałym MS zawierającym 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l m-Top, w różnych warunkach oświetlenia. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Najwyższy poziom RA odnotowano dla pędów eksponowanych na światło mieszane oraz czerwone (ok. 20 mg/g SM), które były ok. 15% wyższe niż otrzymane dla pozostałych warunków oświetlenia oraz ok. 50% wyższe niż dla kontroli (wykres 31).



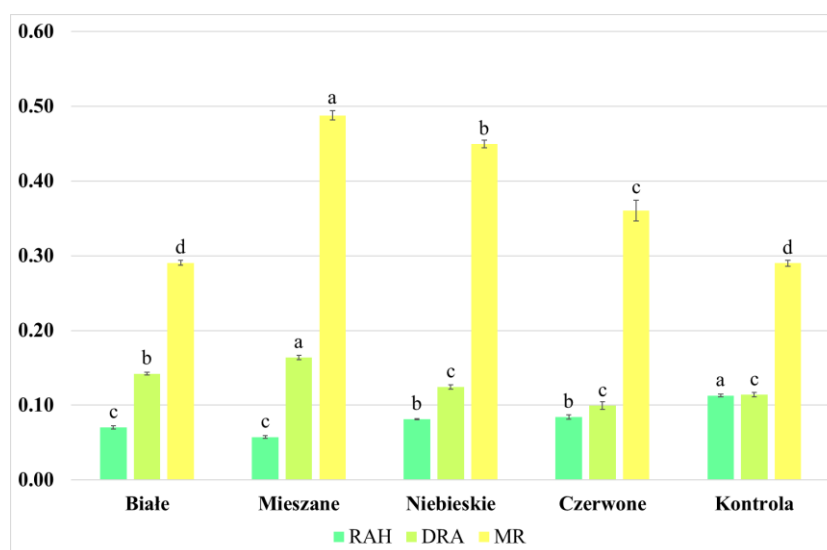
Wykres 32. Zawartość (mg/g SM) kwasu salwianolowego K – SAK oraz izomerów kwasu salwianolowego F – SAF I i SAF II w pędach transformowanych *S. bulleyana* hodowanych przez 5 tygodni na podłożu stałym MS zawierającym 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l m-Top, w różnych warunkach oświetlenia. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .



Wykres 33. Zawartość (mg/g SM) pochodnej kwasu kawoilo-treonowego – CTA, kwasu kawowego – CA, izomeru kwasu protolitospermylowego – PLS oraz izomeru kwasu litospermylowego - LS w pędach transformowanych *S. bulleyana* hodowanych przez 5 tygodni na podłożu stałym MS zawierającym 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l m-Top, w różnych warunkach oświetlenia. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

W warunkach światła mieszanego zanotowano również istotny wzrost akumulacji SAK (1,73 mg/g SM) w porównaniu do pozostałych traktowań. Zawartość tego związku niemal 3-krotnie przewyższała tę, oznaczoną w materiale kontrolnym (wykres 32).

Mieszanina światła czerwonego i niebieskiego stymulowała także produkcję kwasu dehydrorozmarynowego (0,164 mg/g SM), rozmarynianu metylu (0,488 mg/g SM) oraz izomeru kwasu litospermowego (0,255 mg/g SM) (wykres 33 i 34).



Wykres 34. Zawartość (mg/g SM) heksozy kwasu rozmarynowego – RAH, kwasu dehydrorozmarynowego – DRA oraz rozmarynianu metylu – MR w pędach transformowanych *S. bulleyana* hodowanych przez 5 tygodni na podłożu stałym MS zawierającym 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l m-Top, w różnych warunkach oświetlenia. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Ekspozycja na światło fluorescencyjne była najkorzystniejsza dla akumulacji kwasu kawowego (0,274 mg/g SM), którego zawartość w traktowaniu kontrolnym stanowiła 2-krotność wartości otrzymanej dla najlepszego traktowania LED, czyli światła białego. W warunkach kontrolnych zanotowano także najwyższą ilość spośród wszystkich traktowań izomeru kwasu protolitospermowego (0,158 mg/g SM) (wykres 33), heksozy kwasu rozmarynowego (0,113 mg/g SM) oraz izomerów kwasu salwianolowego F (odpowiednio, 0,615 i 0,545 mg/g SM) (wykres 32).

Najniższą produkcją związków bioaktywnych charakteryzowało się w większości przypadków światło niebieskie. Jednakże, ekspozycja kultury na te warunki oświetlenia okazała się korzystna dla akumulacji pochodnej kwasu kawoilo-treonowego, której zawartość w tym traktowaniu była nawet 2-krotnie wyższa niż w pozostałych wariantach hodowli (wykres 33). Kultura pędów transformowanych ekspozycja na niebieskie światło LED wykazywała się też stosunkowo wysoką zawartością rozmarynianu metylu (wykres 34).

W wyborze optymalnych warunków oświetlenia dla hodowli pędów transformowanych *S. bulleyana* wzięto pod uwagę akumulację biomasy, współczynnik mnożenia, a także produkcję związków polifenolowych, aczkolwiek ta ostatnia różniła się dość istotnie dla poszczególnych związków, wykazując niewielkie zmiany w odniesieniu do całkowitej zawartości polifenoli w kulturze. Warunki białego światła LED okazały się najkorzystniejsze dla wzrostu kultury, w tym dla przyrostu biomasy oraz współczynnika mnożenia. Z kolei nieco gorsze parametry wzrostu transformowanych pędów *S. bulleyana* eksponowanych na światło mieszane były równoważone optymalną produkcją związków bioaktywnych, podczas gdy akumulacja polifenoli była w warunkach oświetlenia białymi LED nieco niższa. W związku z tym dla wysoko produktywnej hodowli pędów transformowanych *S. bulleyana* równie korzystne wydaje się zastosowanie oświetlenia białego LED jak i światła mieszanego (70% światła czerwonego i 30% światła niebieskiego).

### **5.3.3. Wybór odpowiedniej cytokininy i jej stężenia**

Następnym etapem badań było określenie wpływu kilku wybranych cytokinin na wzrost, akumulację biomasy oraz produkcję związków bioaktywnych w pędach transformowanych *S. bulleyana*. W doświadczeniu wykorzystano podłoże stałe MS wzbogacone 0,1 mg/l IAA oraz N-benzylo-9-(tetrahydropiranylo)-adeniną (BPA), metatopolinem (m-Top) lub rybozydem 6-benzyloaminopuryny (BAPR) w trzech stężeniach 0,5, 1 oraz 2 mg/l. Kultury prowadzono przez 5 tygodni pod oświetleniem białym LED.

Większość eksplantatów niezależnie od rodzaju i stężenia cytokininy w podłożu charakteryzowała się zbliżonym procentem odpowiedzi w postaci regeneracji pędów/pąków (63-83%). Jedynie w przypadku kultury hodowanej na podłożu zawierającym 0,5 mg/l BAPR zanotowano znaczny spadek zdolności do regeneracji (38%) (tabela 17).

Rodzaj i stężenie cytokininy w podłożu wzrostowym okazało się mieć istotny wpływ na większość parametrów związanych ze wzrostem i namnażaniem transformowanych pędów *S. bulleyana* (fotografia 14).

Tabela 17. Wartości świeżej oraz suchej masy, indeksy wzrostu oraz współczynnik mnożenia otrzymany dla pędów transformowanych *S. bulleyana* po 5 tygodniach hodowli na podłożu MS z dodatkiem 0,1 mg/l IAA i cytokinin w różnych stężeniach. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

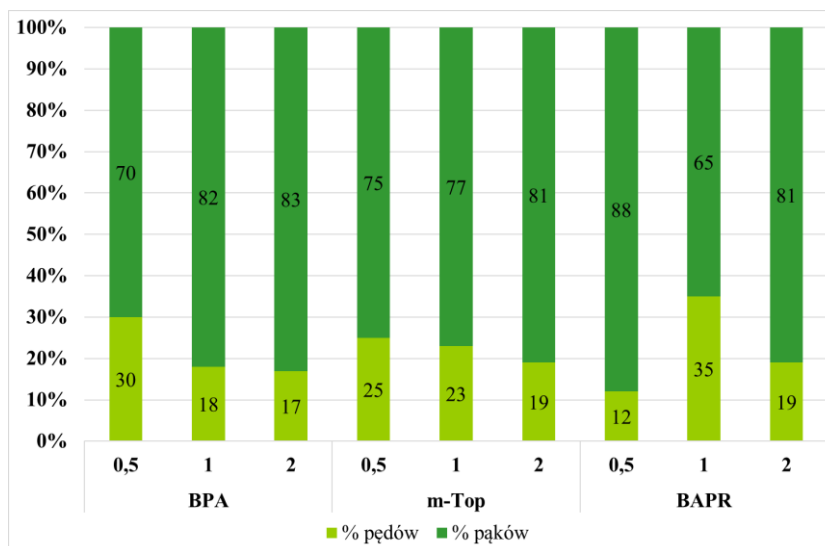
Cytokolina i jej stężenie (mg/l)	Świeża masa (g)	Sucha masa (g)	Indeks wzrostu ŚM	Indeks wzrostu SM	Współczynnik mnożenia	% odpowiedzi
<b>0,5 BPA</b>	1,15±0,101ab	0,139±0,013ab	36,3±3,28ab	34,4±3,33ab	2,22±0,286ab	64
<b>1 BPA</b>	1,10±0,131ab	0,126±0,018ab	34,7±4,24ab	31,1±4,66ab	3,95±0,525ab	74
<b>2 BPA</b>	0,894±0,077b	0,096±0,007b	27,9±2,50b	23,5±1,69b	3,60±0,505ab	83
<b>0,5 m-Top</b>	0,959±0,080b	0,129±0,015ab	30,0±2,58b	31,9±3,85ab	1,60±0,235b	63
<b>1 m-Top</b>	0,887±0,041b	0,096±0,004b	27,7±1,34b	23,3±1,02b	2,80±0,445ab	71
<b>2 m-Top</b>	1,31±0,188a	0,124±0,007ab	41,3±6,10ab	30,4±1,80ab	4,65±0,844ab	65
<b>0,5 BAPR</b>	0,892±0,181b	0,108±0,018ab	27,9±5,87b	26,5±4,62ab	2,50±0,493ab	38
<b>1 BAPR</b>	1,66±0,141a	0,162±0,004a	52,9±4,57a	40,1±1,08a	4,61±1,25a	67
<b>2 BAPR</b>	1,43±0,152ab	0,137±0,011ab	45,4±4,93ab	33,7±2,76ab	3,95±0,461ab	74

Wysoki współczynnik namnażania uzyskano dla kultury prowadzonej w obecności 1 mg/l BAPR (4,61) (tabela 17). Jednocześnie w tym wariancie doświadczenia zanotowano najwyższą akumulację biomasy. ŚM wynosiła 1,66 g, a SM – 0,162 g, co odpowiadało 54 i 41-krotnemu przyrostowi względem średnich mas użytych inokulatów. To traktowanie sprzyjało także wzrostowi zregenerowanych pąków, ponieważ wśród opisanych nowopowstałych struktur pędy stanowiły aż 35%, co było najwyższym z uzyskanych w tym zakresie wyników (wykres 35). Ponadto ich średnia długość (1,10 cm) była najwyższa wśród zanotowanych (wykres 36). Przy wyższych oraz niższych stężeniach BAPR, parametry proliferacji oraz większość parametrów wzrostu kultury, obniżały się (tabela 17, wykres 35 i 36).

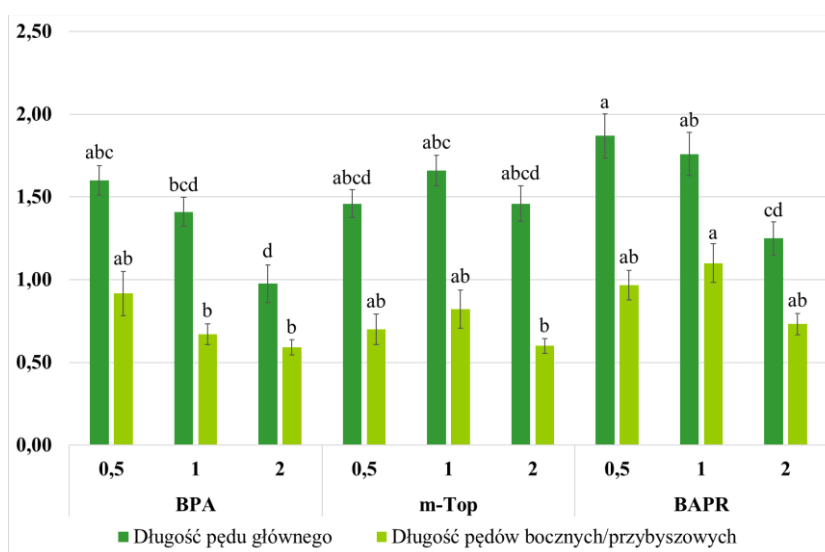


Fotografia 14. Pędy transformowane *S. bulleyana* hodowane w warunkach światła białego LED, na podłożu stałym MS z dodatkiem 0,1 mg/l IAA oraz: A – 0,5 mg/l BPA; B – 1 mg/l BPA; C – 2 mg/l BPA; D – 0,5 mg/l m-Top; E – 1 mg/l m-Top; F – 2 mg/l m-Top; G – 0,5 mg/l BAPR; H – 1 mg/l BAPR; I – 2 mg/l BAPR. Skala 1 cm.

Równie wysoki współczynnik mnożenia, jak ten opisany w obecności 1 mg/l BAPR zanotowano dla pędów kultywowanych na podłożu zawierającym 2 mg/l m-Top, 4,65 (tabela 17). Wysoki WM przekładał się też na wysokie wartości świeżej oraz suchej masy kultury, które w tym wypadku wynosiły 1,31 g ŚM i 0,124g SM, co odpowiadało 43- i 32-krotnemu przyrostowi w stosunku do masy inokulatu. Obniżenie stężenia m-Top do 0,5 i 1 mg/l skutkowało znaczącym spadkiem proliferacji, a współczynniki mnożenia wynosiły odpowiednio 1,60 i 2,80. W obu przypadkach, zanotowano też spadek biomasy, o ok. 30% (tabela 17).



Wykres 35. Stosunek procentowy nowopowstałych pędów bocznych/przybyszowych i pędów po 5 tygodniach hodowli na stałym podłożu MS uzupełnionym 0,1 mg/l IAA oraz wybraną cytokininą w różnych stężeniach.

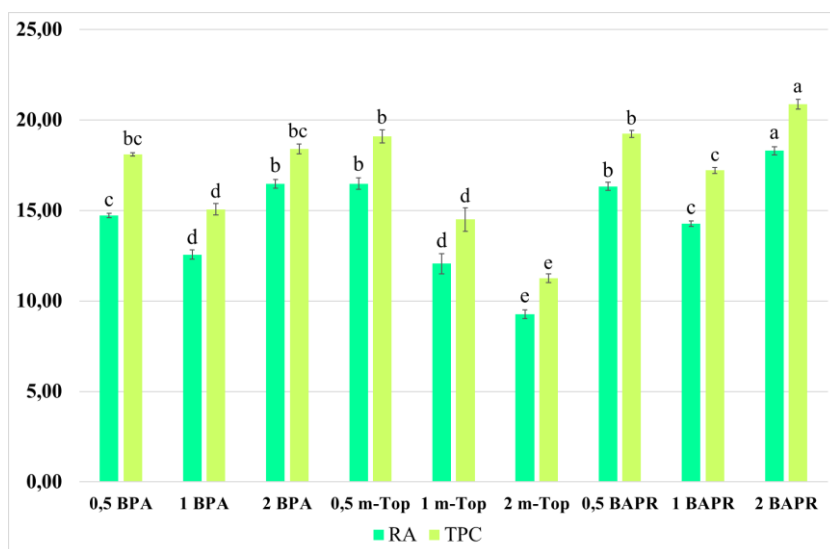


Wykres 36. Średnie długości (cm) pędów głównych oraz zregenerowanych pędów bocznych/przybyszowych po 5 tygodniach hodowli w stałym podłożu MS zawierającym 0,1 mg/l IAA oraz wybraną cytokininą w różnych stężeniach. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Tymczasem dla trzeciej z zastosowanych w doświadczeniu cytokinin, BPA, najkorzystniejsze okazało się jej pośrednie stężenie, 1 mg/l (tabela 17, wykres 36). Pędy rosnące w obecności 2 mg/l BPA charakteryzowały się jednym z najniższych przyrostów biomasy, a te przy 0,5 mg/l niskim współczynnikiem proliferacji (2,22).



Przeprowadzona analiza ilościowa wykazała, że pędy hodowane na podłożu MS zawierającym 2 mg/l BAPR charakteryzowały się najwyższą zawartością związków polifenolowych równą 20,9 mg/g SM, co było związane z wysoką akumulacją RA dla tego traktowania – 18,3 mg/g SM (wykres 37). Z kolei najmniej korzystna okazała się suplementacja m-Top w stężeniu 2 mg/l, przy której TPC i poziom RA spadał, odpowiednio, o 30% i 50%.

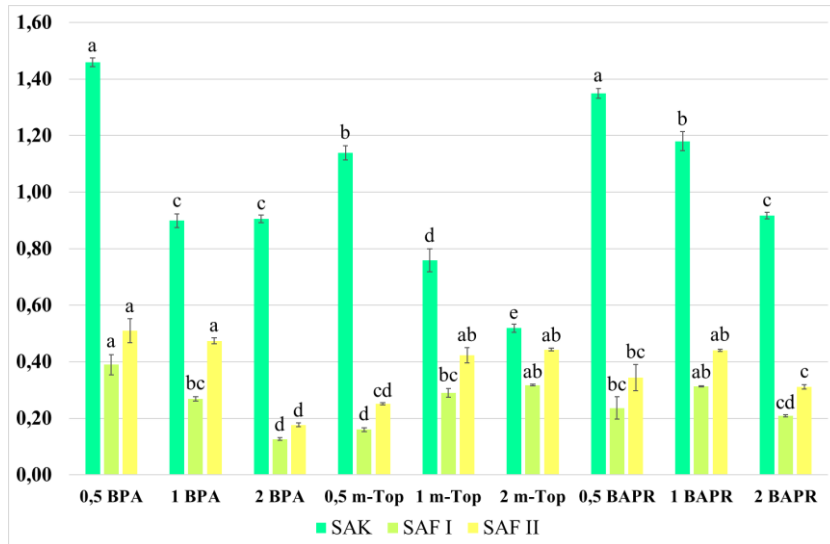


Wykres 37. Zawartość (mg/g SM) RA – kwasu rozmarynowego i TPC – całkowita zawartość związków polifenolowych w pędach transformowanych *S. bulleyana* hodowanych przez 5 tygodni w podłożu stałym MS zawierającym 0,1 mg/l IAA oraz wybraną cytokininę w różnych stężeniach. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

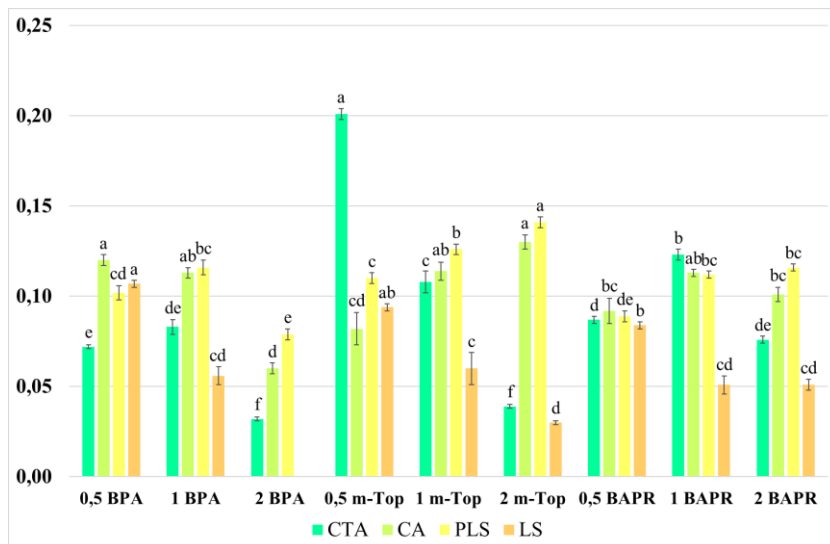
Podłoże zawierające wysokie stężenie BAPR okazało się również korzystne dla produkcji kwasu dehydrorozmarynowego (0,290 mg/g SM), która była w tych warunkach od 1,4- do 3-krotnie wyższa niż oznaczona w pozostałych wariantach hodowli. Ponadto, w materiale pochodzącym z tego traktowania zanotowano jedną z wyższych zawartości rozmarynianu metylu (0,326 mg/g SM) (wykres 40).

W przypadku SAK, który po RA miał największy udział w całkowitej zawartości związków polifenolowych, najwyższa produkcja została zanotowana dla pędów hodowanych w podłożu z 0,5 mg/l BPA oraz 0,5 mg/l BAPR (brak różnic statystycznych); był to poziom niemal 3-krotnie wyższy od tego stwierdzonego dla najmniej korzystnego traktowania – podłoża suplementowanego 2 mg/l m-Top (wykres 38). Podłoże z 0,5 mg/l BPA okazało się mieć również stymulujący wpływ na produkcję obu izomerów kwasów salwianolowych F (0,390 mg/g SM dla SAF I oraz 0,510 mg/g SM dla SAF II). Co więcej, w tym przypadku oznaczono również wysoką zawartość MR

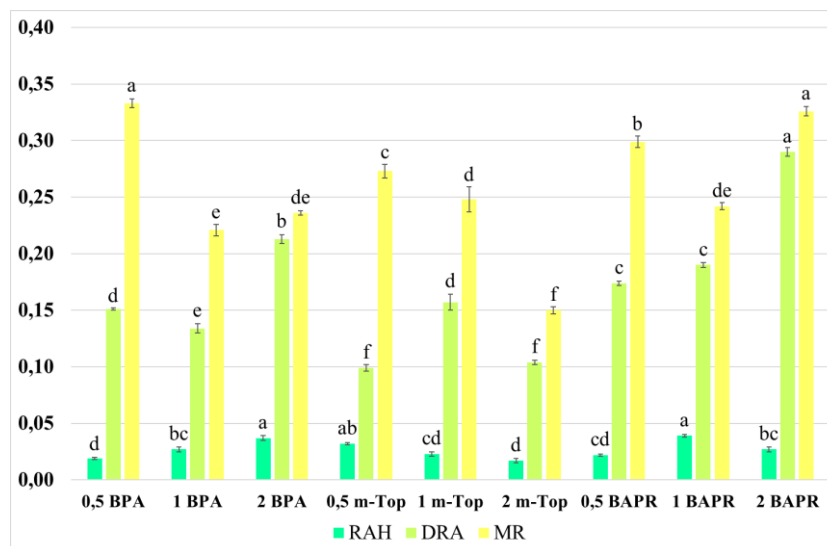
(0,333 mg/g SM) oraz izomeru kwasu litospermowego (0,107 mg/g SM). Przy czym zawartość tego ostatniego związku obniżała się drastycznie wraz ze wzrostem stężenia BPA w podłożu osiągając poziom poniżej oznaczalności przy stężeniu 2 mg/l (wykres 38, 39 i 40).



Wykres 38. Zawartość (mg/g SM) kwasu salwianolowego K – SAK oraz izomerów kwasu salwianolowego F – SAF I i SAF II w pędach transformowanych *S. bulleyana* hodowanych przez 5 tygodni na podłożu stałym MS zawierającym 0,1 mg/l IAA oraz wybraną cytokininą w różnych stężeniach. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .



Wykres 39. Zawartość (mg/g SM) pochodnej kwasu kawoilo-treonowego – CTA, kwasu kawowego – CA, izomeru kwasu protolitospermowego – PLS oraz kwasu litospermowego - LS w pędach transformowanych *S. bulleyana* hodowanych przez 5 tygodni na podłożu stałym MS zawierającym 0,1 mg/l IAA oraz wybraną cytokininą w różnych stężeniach. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .



Wykres 40. Zawartość (mg/g SM) heksozy kwasu rozmarynowego – RAH, kwasu dehydrorozmarynowego – DRA oraz rozmarynianu metylu – MR w pędach transformowanych *S. bulleyana* hodowanych przez 5 tygodni na podłożu stałym MS zawierającym 0,1 mg/l IAA oraz wybraną cytokininą w różnych stężeniach. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Spośród zastosowanych cytokinin m-Top okazał się najmniej korzystny dla biosyntezy związków polifenolowych w transformowanych pędach *S. bulleyana*. Jednakże w obecności tej cytokininy w stężeniu 0,5 mg/l odnotowano najwyższą akumulację CTA (0,201 mg/g SM), a przy stężeniu 2 mg/l najwyższy poziom CA (0,130 mg/g SM) i PLS (0,141 mg/g SM) (wykres 39 i 40).

Ostateczny wybór odpowiedniej cytokininy i jej stężenia, w którym brano pod uwagę namnażanie oraz produkcję zarówno biomasy jak i metabolitów wtórnych w badanej kulturze, okazał się niejednoznaczny. Miała na to wpływ duża liczba traktowań oraz rozbieżne wyniki przy danym traktowaniu dla poszczególnych parametrów. Dlatego też do podjęcia ostatecznej decyzji wyboru cytokininy i jej stężenia ponownie wykorzystano analizę TOPSIS, dodając do niej dodatkowy parametr, którego nie uwzględniano w przypadku korzeni – współczynnik namnażania (tabela 18).

Tabela 18. Końcowa waga znormalizowanych macierzy decyzyjnych i obliczona wydajność dla podłoża MS zawierającego różne cytokininy w różnych stężeniach.

Cytokininina	Znormalizowane ważne parametry kultury					Parametry TOPSIS		
	SM	TPC	RA	SAK	WM	S <sup>+</sup>	S <sup>-</sup>	P
<b>0,5 BPA</b>	0,074	0,070	0,067	0,093	0,043	0,052	0,074	0,588
<b>1 BPA</b>	0,067	0,058	0,057	0,057	0,076	0,055	0,057	0,513
<b>2 BPA</b>	0,051	0,071	0,075	0,057	0,069	0,055	0,062	0,532
<b>0,5 m-Top</b>	0,068	0,074	0,075	0,072	0,031	0,065	0,062	0,487
<b>1 m-Top</b>	0,051	0,056	0,055	0,048	0,054	0,077	0,033	0,300
<b>2 m-Top</b>	0,066	0,043	0,042	0,033	0,089	0,084	0,060	0,419
<b>0,5 BAPR</b>	0,057	0,074	0,074	0,086	0,048	0,052	0,071	0,579
<b>1 BAPR</b>	0,086	0,066	0,065	0,075	0,088	0,029	0,086	<b>0,747</b>
<b>2 BAPR</b>	0,073	0,080	0,083	0,058	0,076	0,039	0,079	0,667

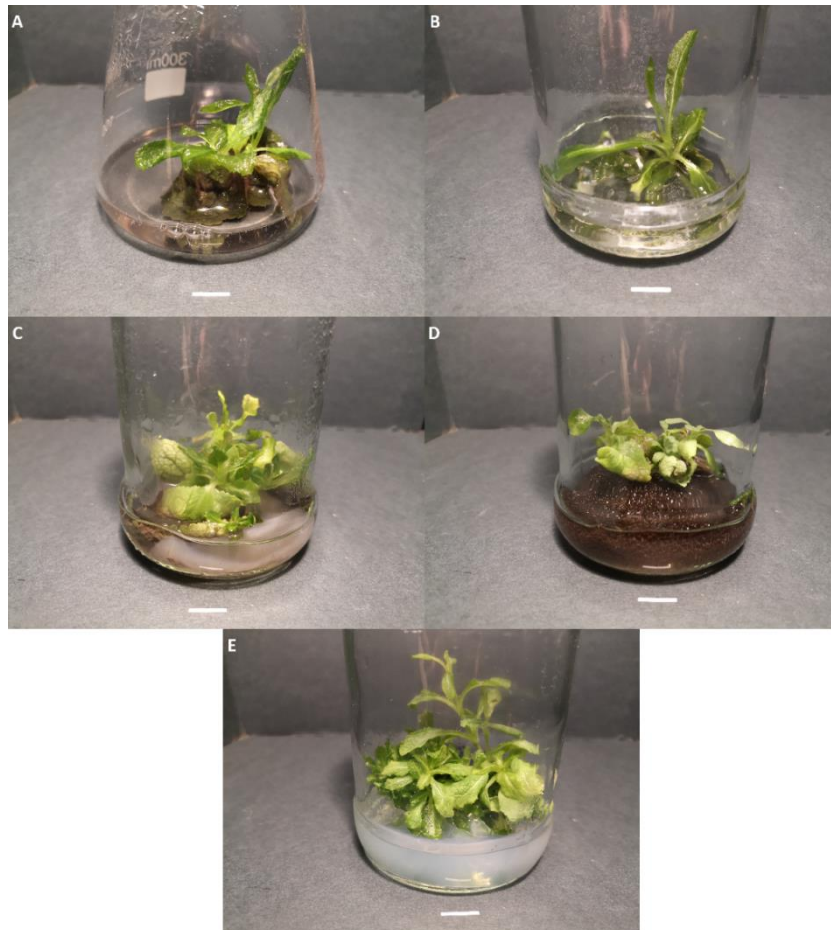
S<sup>+</sup> - odległość Euklidesowa wariantu decyzyjnego od idealnego rozwiązania; S<sup>-</sup> - odległość Euklidesowa wariantu idealnego od rozwiązania antyidealnego; P – wydajność.

Otrzymane wartości wydajności wykazały, że dla produkcji polifenoli w kulturze transformowanych pędów *S. bulleyana* najkorzystniejsza okazała się suplementacja BAPR w stężeniu 1 mg/l (P=0.747). Hodowla prowadzona w tych warunkach charakteryzowała się najwyższą akumulacją świeżej i suchej masy. Co więcej, to traktowanie cechowało się dobrymi parametrami namnażania. Równoważyło to nieco niższą akumulację polifenoli, która prawie nigdy nie była przy tym traktowaniu najwyższa, ale za to często nie odbiegała drastycznie od traktowań optymalnych, niezależnie od tego jakie one były i niezależnie od metabolitu, którego dotyczyły. Ostatecznie w tych warunkach otrzymano 111,4 mg/l TPC, w tym 92,4 mg/l RA oraz 7,61 mg/l SAK, co stanowiło odpowiednio 3%, 8% i 6% mniej niż dla warunków optymalnych. Dlatego też wariant podłoża z 1 mg/l BAPR został wybrany do dalszej kultywacji transformowanych pędów *S. bulleyana*.

#### 5.3.4. Hodowla pędów transformowanych w warunkach podłoża płynnych

W kolejnym etapie badań podjęto się oceny wzrostu pędów transformowanych *S. bulleyana* oraz akumulacji w nich związków bioaktywnych podczas hodowli w podłożu o konsystencji płynnej. Do doświadczenia poza typową hodowlą płynną stacjonarną i wytrząsaną, włączono opcje dwóch rodzajów materiałów podporowych,

które miały zapobiegać całkowitemu zanurzeniu eksplantatów w pożywce płynnej stacjonarnej. W doświadczeniu wykorzystano podłoże MS o zoptymalizowanym wcześniej składzie z 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l BAPR. Jako kontrolę zastosowano podłoże zestalone agarem.



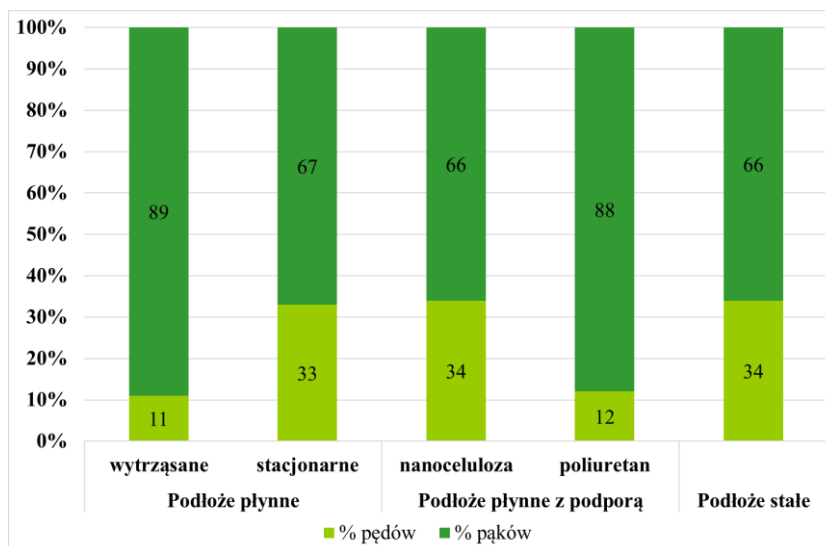
Fotografia 15. Pędy transformowane *S. bulleyana* hodowane w podłożu płynnym MS z dodatkiem 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l BAPR z wykorzystaniem różnych systemów podłoży płynnych: A – podłoże wytrząsane, B – podłoże stacjonarne, C – podłoże wykorzystujące nanocelulozę jako materiał podporowy, D – podłoże wykorzystujące piankę poliuretanową jako podporę. Kontrolę stanowiły pędy transformowane *S. bulleyana* hodowane w podłożu agarowym - E. Skala 1 cm.

Po 5 tygodniach hodowli zauważono, że wariant zastosowanego podłoża płynnego miał wpływ na namnażanie pędów oraz akumulację biomasy transformowanej kultury *S. bulleyana* (tabela 19). Ponadto, pędy pochodzące z różnych traktowań różniły się od siebie pod względem morfologicznym (fotografia 15).

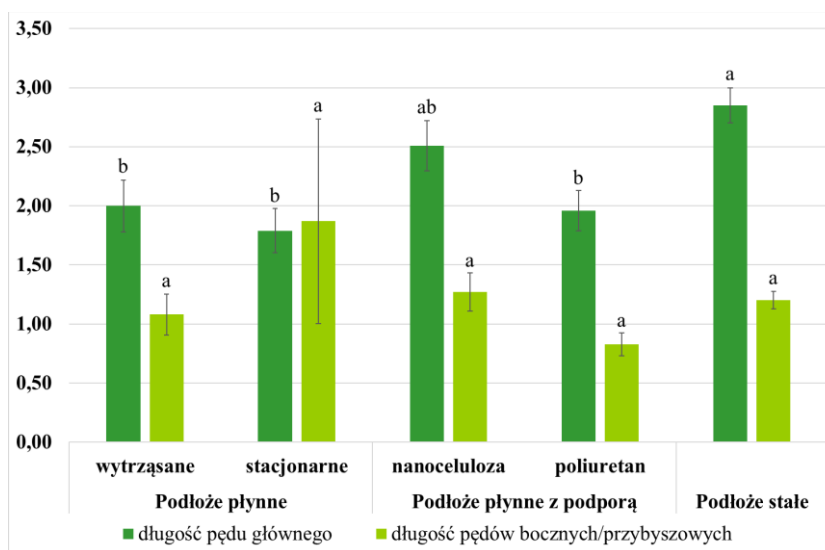
Tabela 19. Wartości świeżej oraz suchej masy, indeksy wzrostu oraz współczynniki mnożenia otrzymane dla pędów transformowanych *S. bulleyana* po 5 tygodniach hodowli w płynnym podłożu MS uzupełnionym 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l BAPR. Kontrolę stanowiły pędy kultywowane w analogicznym podłożu zestalonym agarem. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Podłoże	Świeża masa (g)	Sucha masa (g)	Indeks wzrostu ŚM	Indeks wzrostu SM	Współczynnik mnożenia	% odpowiedzi
<b>Płynne wytrząsane</b>	2,87±0,344a	0,294±0,037a	91,9±11,12a	73,7±9,51a	4,05±0,449a	86
<b>Płynne stacjonarne</b>	0,478±0,157d	0,061±0,019c	14,48±5,07c	14,6±4,78c	2,40±0,927b	18
<b>Płynne z nanocelulozą</b>	1,50±0,198b	0,141±0,016b	47,6±6,40b	34,8±4,14b	4,48±0,487a	94
<b>Płynne z poliureatanem</b>	0,911±0,140c	0,097±0,011c	28,5±4,52c	23,5±2,82c	4,33±0,511a	55
<b>Podłoże stałe</b>	2,15±0,464ab	0,216±0,047ab	68,7±15,0ab	53,9±11,9ab	4,89±0,428a	100

Spośród dwóch tradycyjnych systemów płynnych, hodowla wytrząsana charakteryzowała się znacznie lepszymi parametrami wzrostu niż stacjonarna. W tych warunkach współczynnik mnożenia (4,05) był prawie dwukrotnie wyższy niż ten dla kultury stacjonarnej. Ponadto pędy hodowane w warunkach wytrząsanych charakteryzowały się najwyższymi wartościami świeżej (2,87 g) i suchej masy (0,294 g) spośród wszystkich zastosowanych traktowań; były o 35% wyższe niż te, które otrzymano dla kontroli (tabela 19). Jednakże warunki podłoża płynnego miały znaczący wpływ na morfologię prowadzonych kultur (fotografia 15). Pędy z hodowli wytrząsanej wykazywały cechy charakterystyczne dla zjawiska szklistości. Ich liście były przerośnięte, pomarszczone oraz niezwykle kruche. Blaszka liściowa była często pozwijana i półprzezroczysta. Wygląd ten dotyczył większości liści, a w szczególności tych, które były zanurzone w podłożu. Ponadto, w ostatnim tygodniu pasażu dolna część kultury, a zwłaszcza dolne liście, ciemniała i obumierała. Długość pędów głównych w tym traktowaniu była równa 2,0 cm, a powstających pędów około 1,0 cm, z tym, że pędy stanowiły tylko 10% nowopowstałych struktur, bo w większości przypadków na eksplantatach odnotowano tylko tworzenie się niewielkich pąków (wykres 41, 42).



Wykres 41. Stosunek procentowy nowopowstałych pędów bocznych/przybyszowych i pąków po 5 tygodniach hodowli w podłożu MS uzupełnionym 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l BAPR w różnych systemach podłoży płynnych. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .



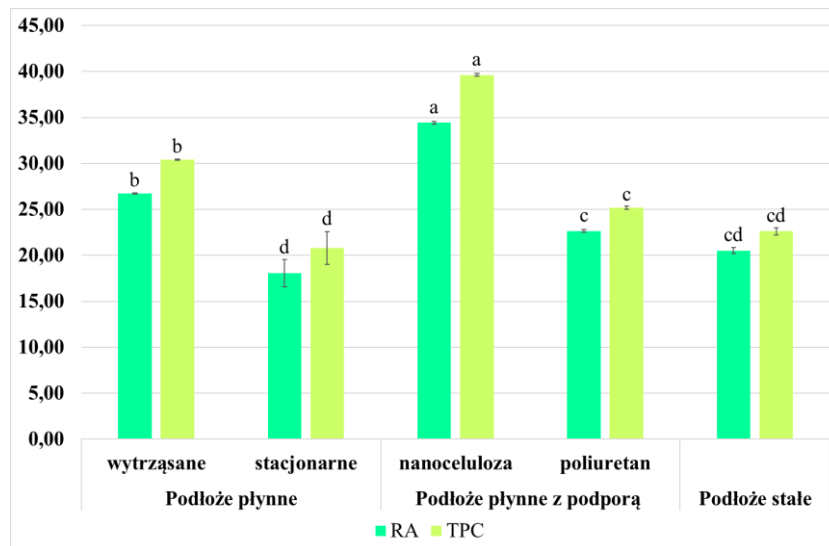
Wykres 42. Średnie długości (cm) pędów głównych oraz pędów bocznych/przybyszowych po 5 tygodniach hodowli w podłożu MS uzupełnionym 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l BAPR w różnych systemach podłoży płynnych. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Hodowla transformowanych pędów w warunkach podłoża płynnego stacjonarnego okazała się być nieefektywna (tabela 19). Tylko niespełna 20% pędów podejmowało w tych warunkach wzrost i regenerowało nowe pąki. Wszystkie oceniane parametry wzrostu: współczynnik proliferacji, biomasa kultury, długość pędów, były dla

tego traktowania mniej korzystne niż dla systemu wytrząsanego. Ponadto uzyskane wyniki charakteryzowała duża zmienność (wysokie wartości błędów standardowych), co wskazuje na niestabilność i nieprzewidywalność hodowanej w powyższych warunkach kultury. Pędy kultywowane w podłożu stacjonarnym miały niewiele liści, których blaszka liściowa była wydłużona i półprzezroczysta (fotografia 15).

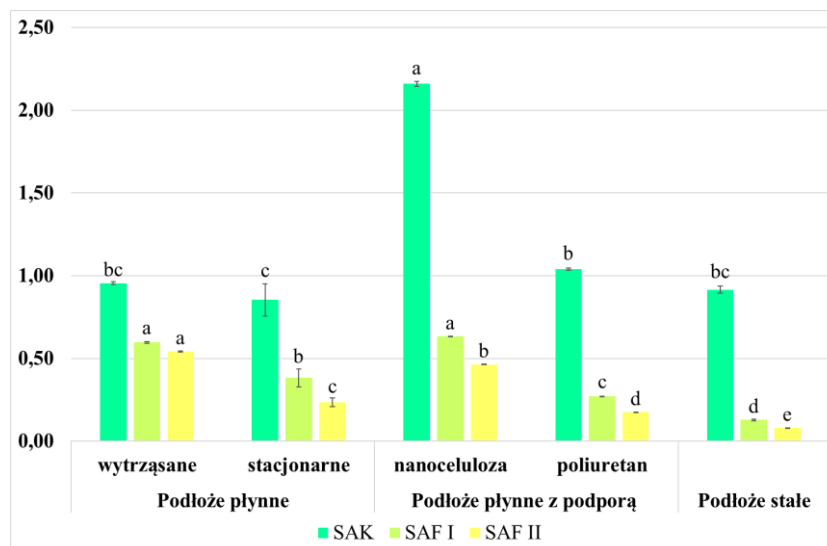
Sytuacja jednakże istotnie się zmieniała, kiedy w hodowli w podłożu płynnym stacjonarnym zastosowano materiały podporowe. Odsetek pędów dających odpowiedź w systemie wspomaganym materiałem podporowym w przypadku zastosowania poliuretanu wzrósł 3-krotnie, a dla celulozy – 5 – krotnie. Oba traktowania znacznie poprawiły współczynnik namnażania osiągając wartości podobne do tej, którą osiągnięto dla traktowania kontrolnego. Jednakże zastosowanie celulozy okazało się bardziej efektywne od poliuretanu w odniesieniu do pozostałych analizowanych parametrów (wykres 41 i 42, tabela 19). Kultura prowadzona na celulozie dostarczała ok. 50% więcej świeżej i suchej masy w porównaniu z tą na podporze poliuretanowej (tabela 19). Wykorzystanie materiałów podporowych miało również wpływ na wygląd i kondycję kultur (fotografia 15); w obu przypadkach jakość otrzymanego materiału roślinnego była lepsza niż w przypadku kultur prowadzonych w warunkach wytrząsanych i stacjonarnych bez podpory. Tylko pojedyncze całkowicie zanurzone liście pędów hodowanych w podłożu płynnym z wykorzystaniem nanocelulozy jako podpory były powiększone, kruche i wykazywały cechy szklistości. Pozostała część kultury, w tym nowopowstałe pędy, wyglądały prawidłowo, choć były nawodnione w nieco większym stopniu niż te z hodowli na podłożu stałym. W przypadku kultur prowadzonych z wykorzystaniem pianki poliuretanowej ich górna część nie wykazywała zmian morfologicznych, ale już wszystkie liście, które miały kontakt z podłożem lub z materiałem podporowym były większych rozmiarów oraz wykazywały cechy szklistości. Ponadto, przy tym traktowaniu u podstawy pędów głównych powstawał kalus (wykres 42).



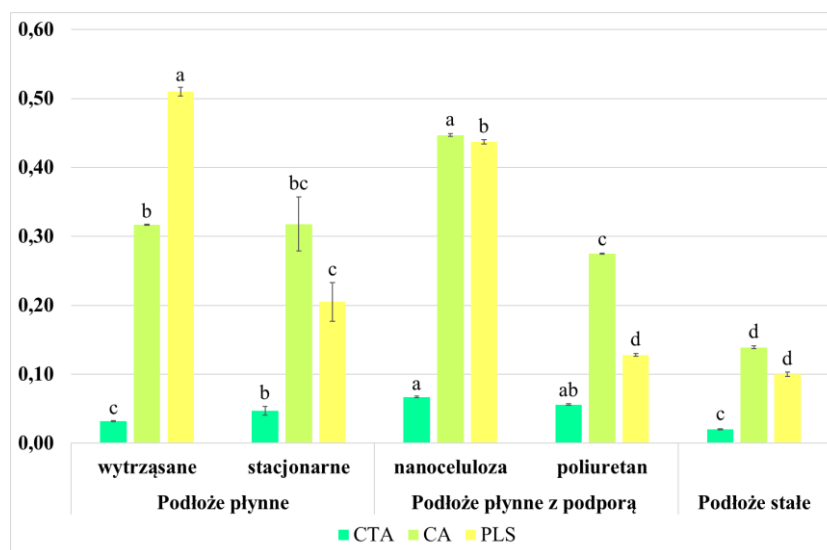


Wykres 43. Zawartość (mg/g SM) RA – kwasu rozmarynowego i TPC – całkowita zawartość związków polifenolowych w pędach transformowanych *S. bulleyana* hodowanych przez 5 tygodni w podłożu MS zawierającym 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l BAPR w różnych systemach podłoża płynnych. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Analiza ilościowa metanolowo-wodnych ekstraktów wykazała, że sposób prowadzenia hodowli płynnych oraz wykorzystanie materiałów podporowych wpływały na zawartość związków polifenolowych w pędach transformowanych *S. bulleyana*. Najwyższą całkowitą zawartością polifenoli charakteryzowała się kultura wykorzystująca nanocelulozę jako podporę. TPC wynosiła 39,6 mg/g SM i była o 30% wyższa od tej, otrzymanej w ekstrakcie z pędów pochodzących z podłoża płynnego wytrząsanego i o ok. 60% od tej z pędów z systemu wykorzystującego poliuretan jako podporę (wykres 43). Co więcej, były to zawartości prawie dwukrotnie wyższe od tych oznaczonych w materiale kontrolnym, czyli pędach hodowanych na podłożu stałym (22,6 mg/g SM). Niezależnie od rodzaju zastosowanego systemu płynnego, podobnie jak w przypadku kultury rosnącej na podłożu stałym, związkiem dominującym był kwas rozmarynowy. Jego zawartość w pędach hodowanych w wariancie, który wykorzystywał celulozę jako materiał podporowy wynosiła 34,4 mg/g SM. Najmniej RA akumulowały pędy hodowane w podłożu płynnym stacjonarnym (18,1 mg/g SM), a tylko niewiele wyższą zawartość RA zanotowano w pędach z pożywki kontrolnej zestawionej agarom (20,5 mg/g SM) (wykres 43).

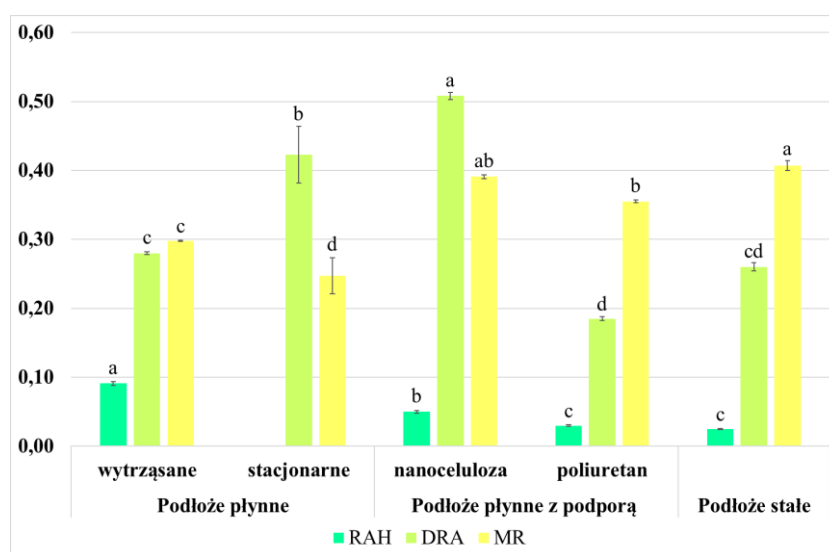


Wykres 44. Zawartość (mg/g SM) kwasu salwianolowego K – SAK oraz izomerów kwasu salwianolowego F – SAF I i SAF II w pędach transformowanych *S. bulleyana* hodowanych przez 5 tygodni w podłożu MS zawierającym 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l BAPR w różnych systemach podłoży płynnych. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .



Wykres 45. Zawartość (mg/g SM) pochodnych kwasu kawoilo-treonowego – CTA; kwasu kawowego – CA oraz izomeru kwasu protolitosperowego – PLS w pędach transformowanych *S. bulleyana* hodowanych przez 5 tygodni w podłożu MS zawierającym 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l BAPR w różnych systemach podłoży płynnych. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Traktowanie wykorzystujące celulozę jako materiał podporowy okazało się być również najkorzystniejsze dla produkcji kwasu salwianolowego K. Zawartość SAK uzyskana w tych warunkach (2,16 mg/g SM) stanowiła ponad 2-krotność zawartości stwierdzonych dla wszystkich innych traktowań (wykres 44). Co więcej, to traktowanie charakteryzowało się najwyższą akumulacją DRA (0,508 mg/g SM), która była od 1,2- do 2,7-razy wyższa niż w pozostałych wariantach hodowli. Ponadto, były to warunki, w których oznaczono wysoki poziom MR (0,391 mg/g SM), CA (0,447 mg/g SM) oraz CTA (0,067 mg/g SM) i SAF I (0,633 mg/g SM) (wykres 44, 45, 46).



Wykres 46. Zawartość (mg/g SM) heksozy kwasu rozmarynowego – RAH, kwasu dehydrorozmarynowego – DRA oraz rozmarynianu metylu – MR w pędach transformowanych *S. bulleyana* hodowanych przez 5 tygodni w podłożu MS zawierającym 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l BAPR w różnych systemach podłoży płynnych. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0.05$ .

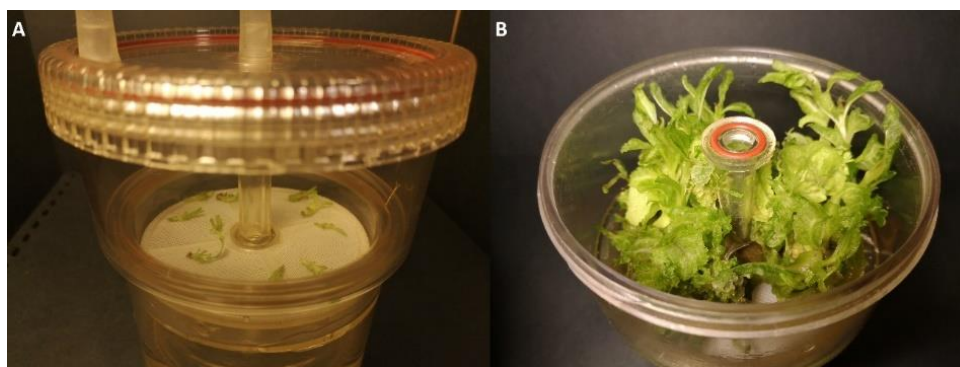
Korzystnym dla produkcji SAF I, ale także SAF II okazało się traktowanie wyrzęcane (0,543 mg/g SM) pozwalające podnieść poziom tego ostatniego związku w pędach transformowanych 7-krotnie w stosunku do zawartości odnotowanej w materiale kontrolnym, z podłoża agarowego (wykres 44). Warunki wyrzęcane sprzyjały również akumulacji RAH (0,091 mg/g SM), która była dla tego traktowania 2-3 razy wyższa niż dla pozostałych; podczas gdy w materiale pochodzącym z podłoża płynnego stacjonarnego nie zidentyfikowano tego związku w ogóle (wykres 46). Kultura wyrzęcana stymulowała także biosyntezę PLS (0,510 mg/g SM) (wykres 45). Za to w pędach hodowanych w podłożu płynnym, niezależnie od systemu hodowlanego

stwierdzono, co najwyżej śladowe ilości kwasu litospermowego.

Biorąc pod uwagę produktywność metabolitów wtórnych w kulturze pędów, najwyższe wartości uzyskano w przypadku kultury wytrząsanej – 357,4 mg TPC na litr podłoża, z czego 314,2 mg stanowił kwas rozmarynowy. Wynik ten jest związany przede wszystkim z istotnie najwyższą wartością suchej masy kultury dla tego traktowania. Jednakże, należy mieć na uwadze, że ze względu na szklistość, duże zmiany morfologiczne, przedwczesne obumieranie oraz powstające na eksplantatach w większości tylko drobne pąki (ok. 90%), struktury pochodzące z tego systemu nie nadawały się do przenoszenia na świeże podłoże i utrzymania ciągłości hodowli. Korzystniejszym wyborem wydaje się system stacjonarny z celulozą jako materiałem podporowym. Pędy z tego traktowania charakteryzują się wprawdzie niższą biomasa, która skutkuje niższą produktywnością, ale wykazują one mniej anomalii morfologicznych i istotnie wyższą produkcję większości metabolitów wtórnych w tym dominujących, kwasu rozmarynowego i salwianolowego K. Hodowla pędów wykorzystująca nanocelulozę bakteryjną jako podporę okazała się znacznie bardziej efektywna w porównaniu z kulturą kontrolną prowadzoną na stałym podłożu agarowym.

### **5.3.5. Hodowla pędów transformowanych w bioreaktorach typu PlantForm i Rita**

Ostatni etap doświadczeń będących częścią optymalizacji warunków wzrostu pędów obejmował próbę zwiększenia skali hodowli. Kulturę pędów prowadzono w dwóch systemach czasowego zalewania: w bioreaktorach typu PlantForm oraz Rita. W obu przypadkach materiał roślinny był zalewany podłożem płynnym MS suplementowanym 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l BAPR przez 3 minuty co 1,5 godziny. Inokulat stanowiło 20 (PlantForm) lub 10 (Rita) wierzchołków pędów o łącznych świeżych masach, odpowiednio, 0,618 g i 0,309 g, co odpowiadało 0,079 g i 0,039 g suchej masy. Po 5 tygodniach hodowli oceniono przyrost biomasy, morfologię oraz produkcję związków polifenolowych w badanych kulturach.



Fotografia 16. A – inokulat oraz B – pędy transformowane *S. bulleyana* hodowane w bioreaktorze typu Rita przez 5 tygodni, zalewane płynnym podłożem MS wzbogaconym o 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l BAPR przez 3 min co 1,5 h.

Pędy otrzymane po 5 tygodniach hodowli w bioreaktorach typu Rita (fotografia 16) wykazywały pewne cech szklistości, tj. przerośnięcie oraz kruchość wytworzonych struktur, a także półprzezroczystość. Dotyczyło to zwłaszcza dolnych części kultury, które były zalewane podłożem (fotografia 16). Niemniej jednak kultura ta charakteryzowała się wysokim współczynnikiem mnożenia, który wynosił 7,32 (tabela 20). Wśród nowopowstałych struktur przeważały pąki (93%) (wykres 47), które tworzyły się nie tylko w obrębie wytworzonego u podstawy pędów organogennego kalusa, ale częściej bezpośrednio na liściach zwłaszcza tych „rozrośniętych” i szklistych (54%). Pędy stanowiły jedynie 7% powstających struktur i osiągały średnią długość 1,25 cm. Ponadto, sporadycznie na eksplantatach zaobserwowano tworzenie się korzeni, których średnia długość wynosiła 0,885 cm (tabela 21). Ten wariant doświadczenia charakteryzował się wyjątkowo długimi pędami głównymi (4,08 cm) (wykres 48).

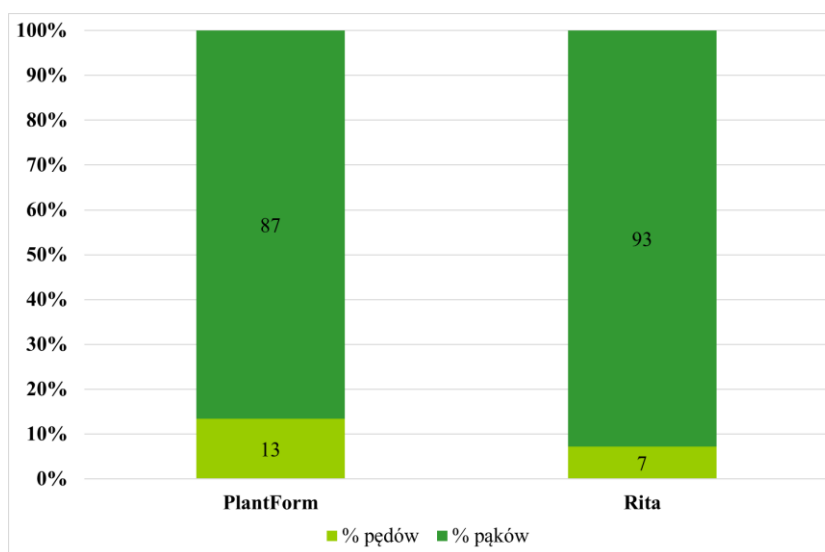
Tabela 20. Wartości świeżej oraz suchej masy, indeksy wzrostu oraz współczynnik mnożenia otrzymany dla pędów transformowanych *S. bulleyana* po 5 tygodniach hodowli w podłożu MS z dodatkiem 0,1 mg/l IAA i 1 mg/l BAPR w bioreaktorach typu PlantForm i Rita z wykorzystaniem schematu zalewania: 3 min/1,5 h. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Typ naczynia hodowlanego		Świeża masa	Sucha masa	Indeks wzrostu ŚM	Indeks wzrostu SM	Współczynnik mnożenia
PlantForm	g	69,2±3,71a	6,67±0,125a	110,9±6,00b	83,4±1,58b	5,26±0,523b
	g/l	138,3±7,41b	13,3±0,250b			
Rita	g	47,6±0,609b	3,95±0,055b	153,1±1,97a	100,2±1,41a	7,32±0,911a
	g/l	190,5±2,43a	15,8±0,221a			

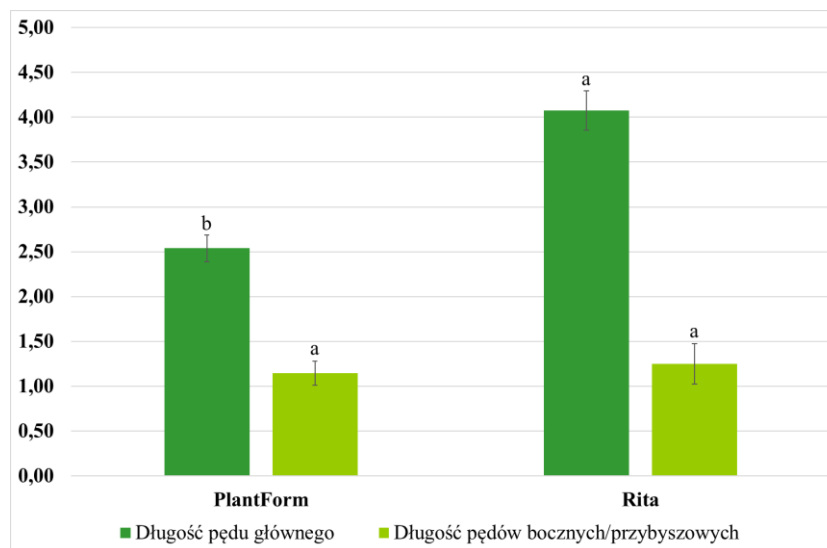
Tabela 21. Dane otrzymane po 5 tygodniach wzrostu w podłożu MS z dodatkiem 0,1 mg/l IAA i 1 mg/l BAPR w bioreaktorach typu PlantForm i Rita z wykorzystaniem schematu zalewania: 3 min/1,5 h dla jednego cyklu hodowlanego pędów transformowanych *S. bulleyana*. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Typ naczynia hodowlanego	Liczba korzeni	Średnia długość korzeni
<b>PlantForm 3min/1,5h</b>	12,0±12,0a	0,947±0,120a
<b>Rita 3min/1,5h</b>	6,50±4,50a	0,885±0,140a

Świeża masa otrzymana podczas hodowli w bioreaktorze typu Rita wynosiła średnio 47,6 g, co odpowiadało 153-krotnemu przyrostowi biomasy względem inokulatu. W przypadku suchej masy zanotowano 100-krotny przyrost względem masy inokulatu (tabela 20).



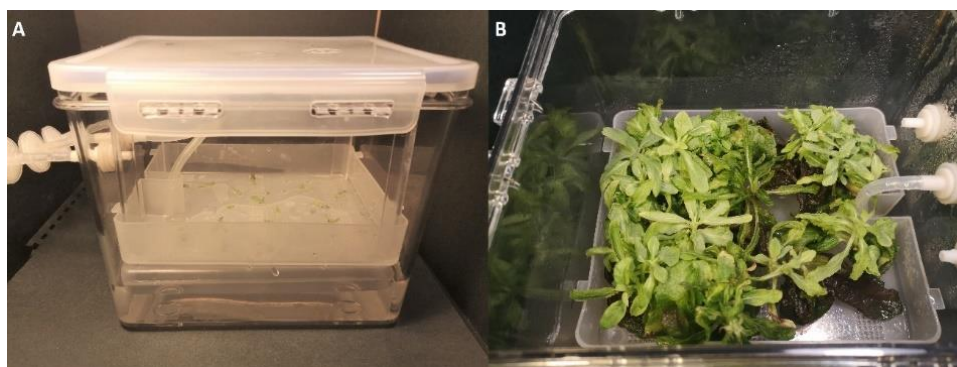
Wykres 47. Stosunek procentowy nowopowstałych pędów bocznych/przybyszowych i pąków po 5 tygodniach hodowli w podłożu MS uzupełnionym 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l BAPR w bioreaktorach typu PlantForm i Rita z wykorzystaniem schematu zalewania: 3 min/1,5 h.



Wykres 48. Średnie długości (cm) pędów głównych oraz pędów bocznych/przybyszowych po 5 tygodniach hodowli w podłożu MS uzupełnionym 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l BAPR w bioreaktorach typu PlantForm i Rita z wykorzystaniem schematu zalewania: 3 min/1,5 h. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

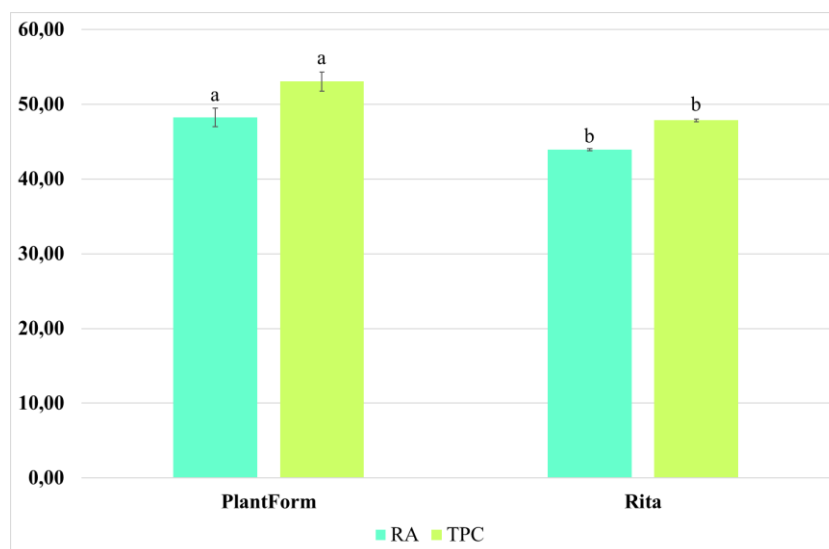
Kultura pędów transformowanych prowadzona w bioreaktorze typu PlantForm chociaż nie charakteryzowała się tak spektakularnym wzrostem w porównaniu z tą z systemu Rita, była również znacznie efektywniejsza od wcześniej opisanych traktowań. W bioreaktorze PlantForm większa część pędów wykazywała prawidłową morfologię. Tylko dolne części pędów, które ulegały bezpośredniemu zanurzeniu w podłożu podczas zalewania, wraz z upływem czasu trwania kultury stawały się coraz bardziej nawodnione i przerośnięte, a w ostatnim tygodniu ciemniały (fotografia 17). Współczynnik mnożenia (5,26) był o 28% niższy niż ten, otrzymany dla pędów transformowanych hodowanych w bioreaktorach Rita (tabela 20). Niemniej jednak przewyższał ten, uzyskany dla pędów hodowanych w warunkach podłoża stałego we wcześniej opisanym doświadczeniu (podrozdział 5.3.4.). Średnia długość pędów uzyskanych podczas wzrostu w systemach PlantForm wynosiła 1,15 cm, jednakże również w tym przypadku większość zregenerowanych struktur stanowiły pąki (wykres 47 i 48). Z kolei średnia długość pędów głównych wynosiła 2,55 cm i była niemal o połowę niższa niż ta otrzymana w bioreaktorach typu Rita (wykres 48). W tym przypadku również zanotowano tworzenie się korzeni na niektórych eksplantatach. Ich średnia długość wynosiła 0,947 cm (tabela 21). To traktowanie skutkowało 111- oraz 83-krotnym przyrostem odpowiednio świeżej (69,2 g) i suchej (6,67 g) masy (tabela 20).





Fotografia 17. A – inokulat oraz B – pędy transformowane *S. bulleyana* hodowane w bioreaktorze typu PlantForm przez 5 tygodni, zalewane płynnym podłożem MS wzbogaconym o 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l BAPR przez 3 min co 1,5 h.

Hodowla transformowanych pędów w obu systemach zalewowych wyraźnie stymulowała biosyntezę metabolitów wtórnych. Przy czym kultura prowadzona w bioreaktorze PlantForm charakteryzowała się nieco wyższą całkowitą zawartością polifenoli (53,0 mg/g SM) oraz kwasu rozmarynowego (48,3 mg/g SM) niż ta w systemie Rita; były to wartości ok. 10% wyższe (odpowiednio 47,9 i 43,9 mg/g SM) (wykres 49).

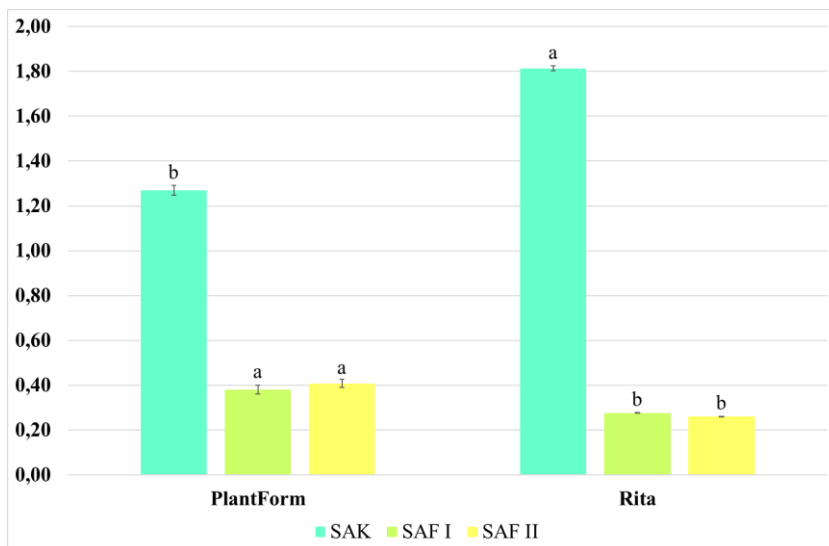


Wykres 49. Zawartość (mg/g SM) RA – kwasu rozmarynowego i TPC – całkowita zawartość związków polifenolowych w pędach transformowanych *S. bulleyana* hodowanych przez 5 tygodni w podłożu MS z dodatkiem 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l BAPR w bioreaktorach typu PlantForm oraz Rita przy schemacie zalewania 3 min/1,5 h. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

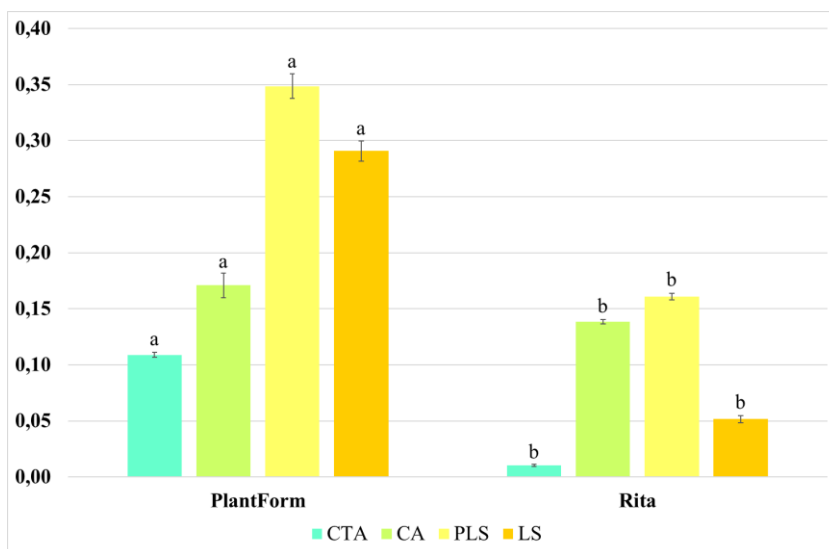
Kultywacja w systemie PlantForm okazała się szczególnie korzystna dla akumulacji CTA, LS oraz PLS, których zawartości były, odpowiednio, 11-, 6- oraz 2-razy wyższe niż te odnotowane w kulturze z systemu Rita (wykresy 51-53). Również



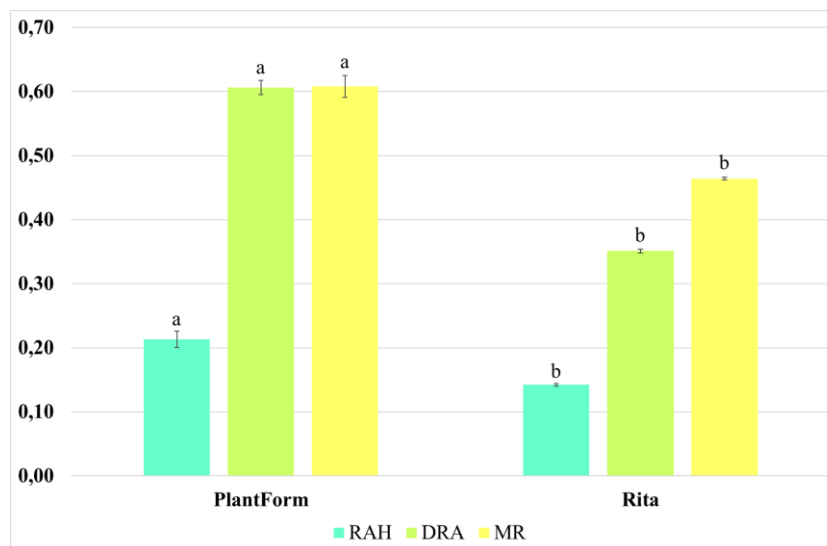
zawartości pochodnych kwasu rozmarynowego, tj. RAH, DRA i MR oraz CA i oba izomery SAF charakteryzowały się wyższą akumulacją w systemie PlantForm.



Wykres 50. Zawartość (mg/g SM) kwasu salwianolowego K – SAK oraz izomerów kwasu salwianolowego F – SAF I i SAF II w pędach transformowanych *S. bulleyana* hodowanych przez 5 tygodni w podłożu MS z dodatkiem 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l BAPR w bioreaktorach typu PlantForm oraz Rita przy schemacie zalewania 3 min/1,5 h. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .



Wykres 51. Zawartość (mg/g SM) pochodnych kwasu kawoilo-treonowego – CTA, kwasu kawowego – CA, izomeru kwasu protolitospermowego – PLS oraz izomeru kwasu litospermowego - LS w pędach transformowanych *S. bulleyana* hodowanych przez 5 tygodni w podłożu MS z dodatkiem 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l BAPR w bioreaktorach typu PlantForm oraz Rita przy schemacie zalewania 3 min/1,5 h. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .



Wykres 52. Zawartość (mg/g SM) heksozy kwasu rozmarynowego – RAH, kwasu dehydrometylrozmarnowego – DRA oraz rozmarynianu metylu – MR w pędach transformowanych *S. bulleyana* hodowanych przez 5 tygodni w podłożu MS z dodatkiem 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l BAPR w bioreaktorach typu PlantForm oraz Rita przy schemacie zalewania 3 min/1,5 h. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Jedynym metabolitem wtórnym, którego wyższą akumulację odnotowano dla pędów kultywowanych w bioreaktorze Rita był kwas salwianolowy K (1,81 mg/g SM). Była to zawartość ok 1,5-razy wyższa niż ta osiągnięta dla drugiego typu bioreaktora (1,27 mg/g SM) (wykres 50).

Ostatecznie jednak, porównując produktywność obu kultur stwierdzono, że jest ona w odniesieniu do TPC, a także dwóch dominujących metabolitów RA i SAK nieco wyższa w przypadku hodowli prowadzonej w systemie Rita (tabela 22). Całkowita zawartość związków polifenolowych uzyskanych w ciągu 5 tygodni w tym wariancie hodowli wynosiła 751,4 mg/l podłoża, z czego 693,5 mg/l stanowił RA, a 28,6 mg/l – SAK. Były to wartości odpowiednio 8%, 7% i 70% wyższe niż te otrzymane w przypadku pędów kultywowanych w bioreaktorze typu PlantForm.

Tabela 22. Produktywność pędów transformowanych *S. bulleyana* hodowanych w bioreaktorach typu PlantForm i Rita wyrażona w mg/naczynie oraz mg/l podłoża hodowlanego. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

		<b>PlantForm 3min/1,5h</b>	<b>Rita 3min/1,5h</b>
<b>CTA</b>	<b>mg/naczynie hodowlane</b>	0,727±0,021a	0,041±0,001b
	<b>mg/l podłoża</b>	1,45±0,041a	0,162±0,005b
<b>CA</b>	<b>mg/naczynie hodowlane</b>	1,14±0,148a	0,546±0,007b
	<b>mg/l podłoża</b>	2,28±0,296a	2,18±0,026a
<b>PLS</b>	<b>mg/naczynie hodowlane</b>	2,32±0,151a	0,635±0,020b
	<b>mg/l podłoża</b>	4,65±0,303a	2,54±0,079b
<b>RAH</b>	<b>mg/naczynie hodowlane</b>	1,42±0,150a	0,561±0,004b
	<b>mg/l podłoża</b>	2,84±0,301a	2,25±0,018a
<b>RA</b>	<b>mg/naczynie hodowlane</b>	321,8±16,4a	173,4±0,809b
	<b>mg/l podłoża</b>	643,6±32,8a	693,5±3,24a
<b>SAK</b>	<b>mg/naczynie hodowlane</b>	8,46±0,193a	7,16±0,042b
	<b>mg/l podłoża</b>	16,9±0,387b	28,6±0,167a
<b>LS</b>	<b>mg/naczynie hodowlane</b>	1,94±0,038a	0,203±0,007b
	<b>mg/l podłoża</b>	3,88±0,076a	0,813±0,030b
<b>DRA</b>	<b>mg/naczynie hodowlane</b>	4,04±0,121a	1,39±0,011b
	<b>mg/l podłoża</b>	8,08±0,241a	5,54±0,044b
<b>MR</b>	<b>mg/naczynie hodowlane</b>	4,05±0,193a	1,83±0,009b
	<b>mg/l podłoża</b>	8,11±0,386a	7,33±0,036a
<b>SAF I</b>	<b>mg/naczynie hodowlane</b>	2,54±0,269a	1,09±0,014b
	<b>mg/l podłoża</b>	5,07±0,539a	4,37±0,056a
<b>SAF II</b>	<b>mg/naczynie hodowlane</b>	2,72±0,256a	1,03±0,009b
	<b>mg/l podłoża</b>	5,45±0,512a	4,12±0,037a
<b>TPC</b>	<b>mg/naczynie hodowlane</b>	351,2±17,2a	187,9±0,858b
	<b>mg/l podłoża</b>	702,4±34,4a	751,4±3,43a

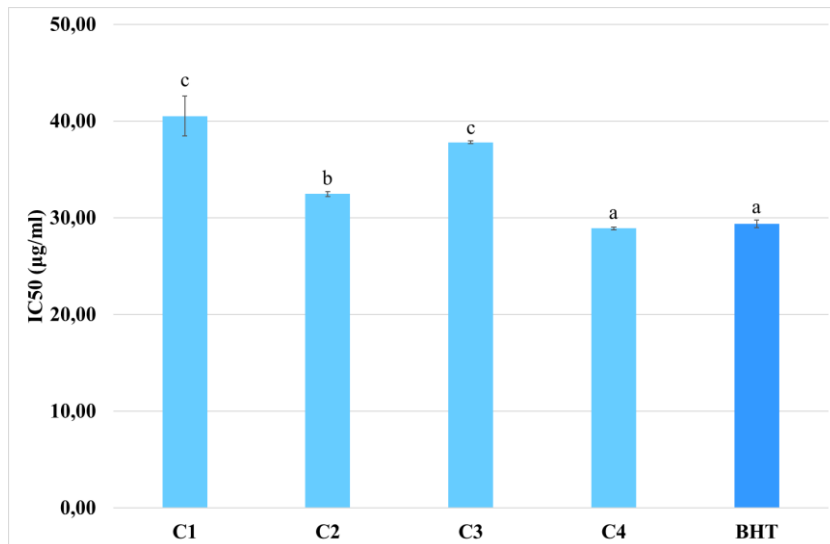
## 5.4. Aktywność biologiczna

### 5.4.1. Aktywność antyoksydacyjna

#### 5.4.1.1. Korzeni włośnikowatych *S. bulleyana*

Pierwszym doświadczeniem była wstępna ocena aktywności antyoksydacyjnej korzeni transformowanych *S. bulleyana* dokonana jeszcze na etapie wyboru klonu do dalszych badań. Oceniono właściwości przeciwutleniające metanolowo-wodnych ekstraktów z czterech klonów korzeni włośnikowatych C1-C4. W tym celu analizowano zdolność badanych ekstraktów do „zmiatania” wolnych rodników – DPPH, ABTS oraz  $O_2^-$ , do redukcji jonów żelaza (FRAP), a także do zahamowania peroksydacji lipidów (metoda TBARS).

Test DPPH wykonano zgodnie z metodą opisaną przez Grzegorzycy-Karolak i Kiss (Grzegorzycy-Karolak i Kiss, 2018). Podczas reakcji wiązania wolnych rodników DPPH dochodzi do zmiany barwy roztworu, którą można monitorować spektrofotometrycznie. Pomiaru dokonano po 30 min od zapoczątkowania reakcji. Następnie obliczono wartość  $IC_{50}$  potrzebną do zobojętnienia 50% wolnych rodników DPPH.

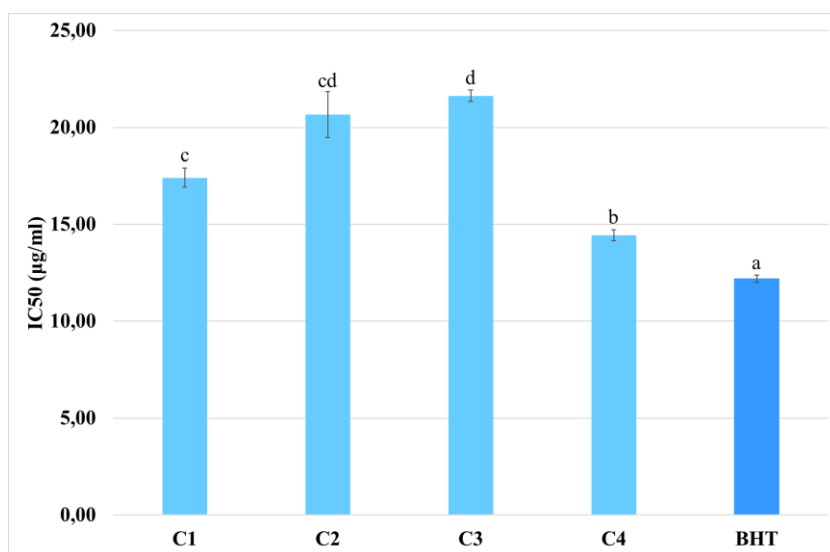


Wykres 53. Wartości  $IC_{50}$  uzyskane dla metanolowo-wodnych ekstraktów z korzeni transformowanych *S. bulleyana* klonów C1-C4 oraz BHT w teście zobojętniania rodnika DPPH. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Ekstrakty z wszystkich klonów korzeni silnie zobojętniały rodnik DPPH, najsilniejsze działanie stwierdzono dla tego pozyskanego z korzeni klonu C4 (wykres 53). Wartość  $IC_{50}$  wynosiła w tym przypadku 28,9  $\mu\text{g/ml}$  i była porównywalna z tą

stwierdzoną w przypadku kontroli jaką stanowił syntetyczny przeciwutleniacz – BHT (29,4 µg/ml) (brak różnicy istotnej statystycznie).

Test redukcji rodnika ABTS został przeprowadzony zgodnie z metodyką opisaną przez Grzegorzycy-Karolak i wsp. (Grzegorzycy-Karolak i in., 2015). Jest to metoda polegająca na redukcji kationorodnika, co skutkuje zmianą barwy mieszaniny, a co za tym idzie – absorbancji. Pomiar spektrofotometryczny był wykonany po 10 min (734 nm). Aktywność przeciworodnikową wyrażono jako IC<sub>50</sub>.

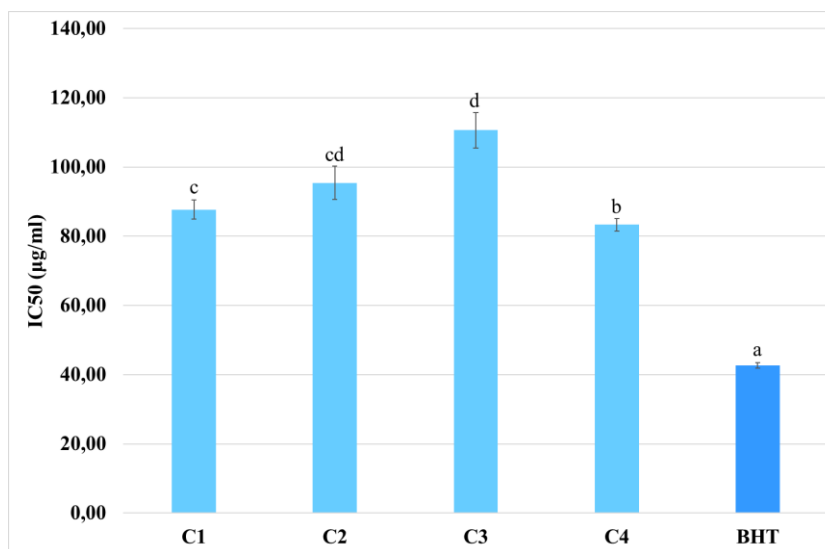


Wykres 54. Wartości IC<sub>50</sub> uzyskane dla metanolowo-wodnych ekstraktów z korzeni transformowanych *S. bulleyana* klonów C1-C4 oraz BHT w teście zobojętniania rodnika ABTS. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Ekstrakt pochodzący z korzeni klonu C4 wykazywał też najsilniejszą aktywność „zmiatania” rodnika ABTS. Wyznaczone dla niego IC<sub>50</sub> wynosiło 14,4 µg/ml i było istotnie niższe od tych uzyskanych w przypadku pozostałych klonów (wykres 54). Niemniej jednak ekstrakt ten miał mniejsze powinowactwo do wiązania rodnika ABTS niż BHT, użytego jako kontrola. Stężenie potrzebne do zobojętnienia 50% rodnika ABTS wynosiło w tym przypadku 12,2 µg/ml i było o ok. 20% niższe od tego uzyskanego dla ekstraktu z korzeni włośnikowatych klonu C4.

Ocena zdolności badanych ekstraktów do unieczynniania anionorodnika ponadtlenkowego (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) metodą redukcji NBT została wykonana zgodnie z metodyką opisaną przez Grzegorzycy-Karolak i Kiss (Grzegorzycy-Karolak i Kiss, 2018). Polega ona na określeniu stopnia redukcji błękitu nitrotetrazolinowego do barwnych formazanów przez O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Pomiaru spektrofotometrycznego (560 nm) dokonano po 5 min

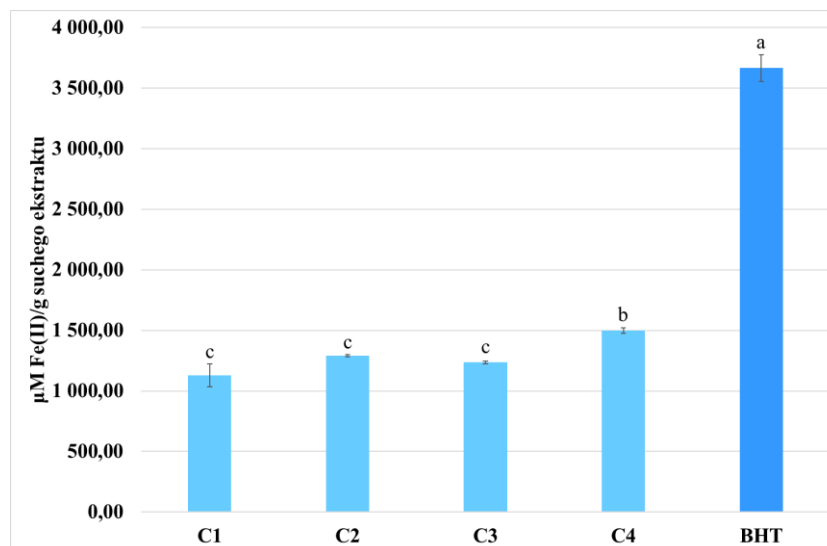
od zmieszania odczynników. Zdolność do neutralizacji anionorodnika ponadtlenkowego wyrażono jako IC<sub>50</sub>.



Wykres 55. Wartości IC<sub>50</sub> uzyskane dla metanolowo-wodnych ekstraktów z korzeni transformowanych *S. bulleyana* klonów C1-C4 oraz BHT w teście oceniającym zdolność do neutralizacji rodnika O<sub>2</sub><sup>-</sup> (NBT). Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Wszystkie badane ekstrakty wykazywały zdolność do zobojętniania rodnika ponadtlenkowego, chociaż korzenie klonu C3 wykazywały w tym wypadku słabszą aktywność niż pozostałe (wykres 55). Spośród badanych ekstraktów, najniższą wartość IC<sub>50</sub> wyznaczono dla ekstraktu z korzeni klonu C4, 83,3 µg/ml, ale była ona 2-krotnie wyższa od tej uzyskanej przez syntetyczny przeciwutleniacz – BHT (42,7 µg/ml).

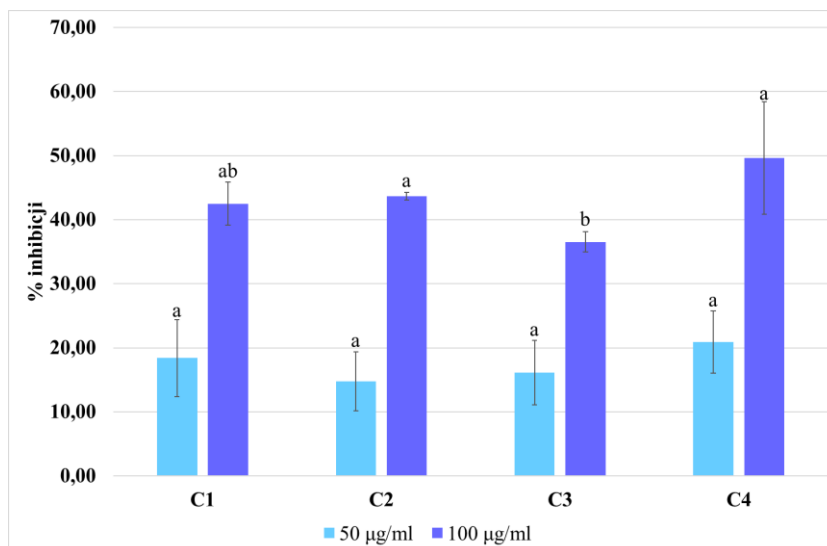
Metoda FRAP pozwala na ocenę zdolności redukowania jonów żelaza Fe<sup>3+</sup> do Fe<sup>2+</sup> pod wpływem działania antyoksydantu. W wyniku reakcji następuje zmiana barwy substratu z bezbarwnej na niebieską. Po 15 min inkubacji odczynnika FRAP oraz badanego ekstraktu, mierzono absorbancję otrzymanej mieszaniny (595 nm). Wyniki wyrażono w µM Fe (II) na gram suchego ekstraktu.



Wykres 56. Wartości IC<sub>50</sub> uzyskane dla metanolowo-wodnych ekstraktów z korzeni transformowanych *S. bulleyana* klonów C1-C4 oraz BHT w teście oceniającym zdolność do redukcji jonów żelaza (FRAP). Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Spośród zastosowanych metanolowo-wodnych ekstraktów z korzeni najsilniejsze właściwości redukcyjne wykazywał ekstrakt z klonu C4. Jego potencjał redukcyjny wynosił 1489,8 µM Fe(II)/g suchego ekstraktu i był o 33% wyższy niż otrzymany dla najmniej korzystnego traktowania – ekstraktu z klonu C1 (wykres 56). Syntetyczny antyoksydant, BHT, redukował jony żelaza znacznie silniej niż materiał pozyskany z korzeni transformowanych *S. bulleyana*.

Zdolność do inhibicji utleniania kwasu linolowego została oceniona przy pomocy metody TBARS zgodnie z protokołem opisanym przez Grzegorzycy-Karolak i Kiss (Grzegorzycy-Karolak i Kiss, 2018). Polega ona na oznaczeniu spektrofotometrycznym (532 nm) barwnych połączeń produktów reakcji utleniania lipidów z kwasem tiobarbiturowym. Pozwala to na ocenę aktywności przeciwutleniającej badanych próbek. W badaniu wykorzystano ekstrakty w dwóch stężeniach: 50 oraz 100 µg/ml.



Wykres 57. Wartości  $IC_{50}$  uzyskane dla metanolowo-wodnych ekstraktów z korzeni transformowanych *S. bulleyana* klonów C1-C4 w teście oceniającym zdolność do inhibicji peroksydacji lipidów (TBARS). Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

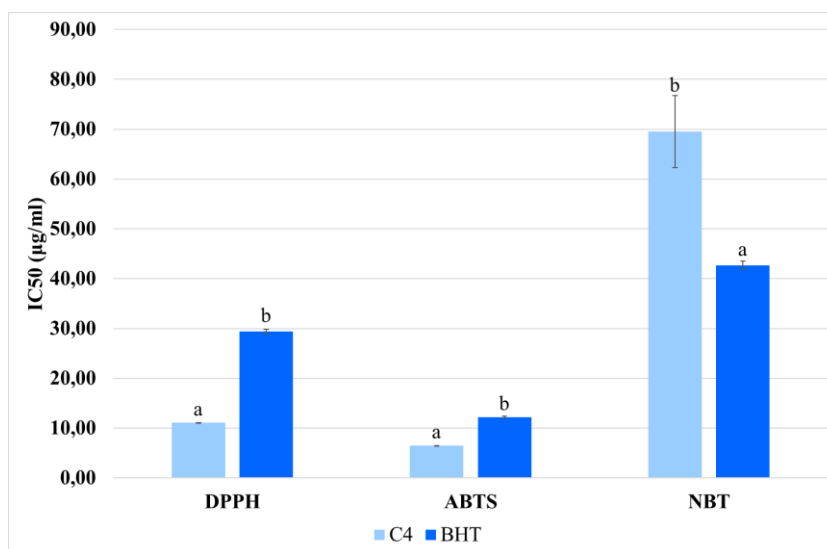
Ekstrakty z korzeni transformowanych klonów C1-C4 w stężeniu 50 µg/ml hamowały utlenianie lipidów w niewielkim stopniu (poniżej 20%) i bez istotnych różnic pomiędzy zastosowanym materiałem roślinnym. Użycie ekstraktów w stężeniu 100 µg/ml skutkowało istotnym wzrostem inhibicji utleniania kwasu linolowego oraz wystąpieniem różnic w sile działania pomiędzy poszczególnymi ekstraktami. W przypadku klonu C4 użytego w stężeniu 100 µg/ml proces utleniania kwasu linolowego został zahamowany w prawie 50%.

Reasumując, ekstrakty ze wszystkich klonów korzeni transformowanych *S. bulleyana* wykazywały istotny potencjał antyoksydacyjny. Najsilniejszym działaniem przeciwutleniającym charakteryzowała się linia C4, chociaż nie zawsze różnice w sile działania pomiędzy poszczególnymi klonami były istotne statystycznie. Jest to zgodne z niewielkimi różnicami w zawartości związków bioaktywnych opisanymi w podrozdziale 5.2.2. Ostatecznie klon C4, charakteryzujący się najwyższym potencjałem antyoksydacyjnym oraz zawartością metabolitów wtórnych, był tym, który został wybrany do dalszych badań.

Ponowną ocenę działania przeciwutleniającego ekstraktu z korzeni C4 przeprowadzono po optymalizacji warunków wzrostu, która skutkowała istotnym podniesieniem produkcji polifenoli w kulturze. W tym doświadczeniu analizie poddano korzenie rosnące w podłożu ½SH ½V z 3% sacharozy po 3-dniowej ekspozycji na



100  $\mu\text{M}$  jasmonian metylu. Zawartość związków polifenolowych w badanym materiale roślinnym była 3-krotnie wyższa od tej, którą odnotowano dla tej samej linii podczas selekcji klonów. W opisanym eksperymencie zastosowano trzy testy neutralizacji wolnych rodników: ABTS, DPPH i  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .



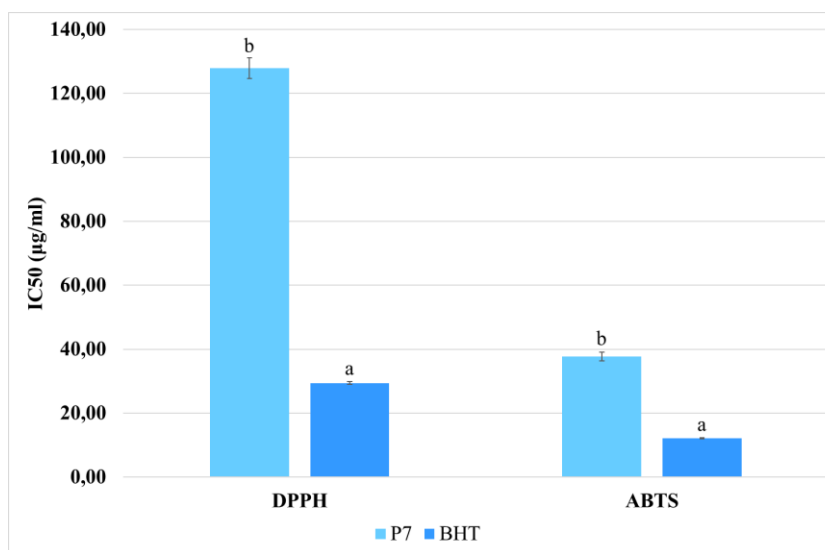
Wykres 58. Wartości  $\text{IC}_{50}$  uzyskane dla metanolowo-wodnych ekstraktów z korzeni transformowanych *S. bulleyana* klonu C4 hodowanego w zoptymalizowanych warunkach i poddanego 3-dniowej elicytacji 100  $\mu\text{M}$  jasmonianu metylu oraz BHT w testach DPPH, ABTS oraz NBT. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Kultura korzeni transformowanych *S. bulleyana* po optymalizacji wzrostu i produkcji wykazywała istotnie wyższą zdolność wiązania wszystkich wykorzystywanych w badaniach wolnych rodników w porównaniu z wynikami uzyskanymi przed jej optymalizacją (wyniki istotne statystycznie). W teście DPPH i ABTS badany ekstrakt okazał się mieć silniejsze działanie wymiatające wolne rodniki ( $\text{IC}_{50}$  było równe odpowiednio, 11,1  $\mu\text{g/ml}$  i 6,5  $\mu\text{g/ml}$ ) niż kontrola (wykres 58). Poddane elicytacji korzenie włóśnikowate *S. bulleyana* silnie eliminowały również anionorodnik ponadtlenkowy ( $\text{IC}_{50} = 69,5 \mu\text{g/ml}$ ), chociaż w tym wypadku efekt był nieco słabszy niż ten opisany dla BHT (wykres 58).

Podsumowując, wraz ze wzrostem produkcji związków bioaktywnych w korzeniach włóśnikowatych kultywowanych w zoptymalizowanych warunkach i poddanych elicytacji, zaobserwowano istotny wzrost ich aktywności antyoksydacyjnej.

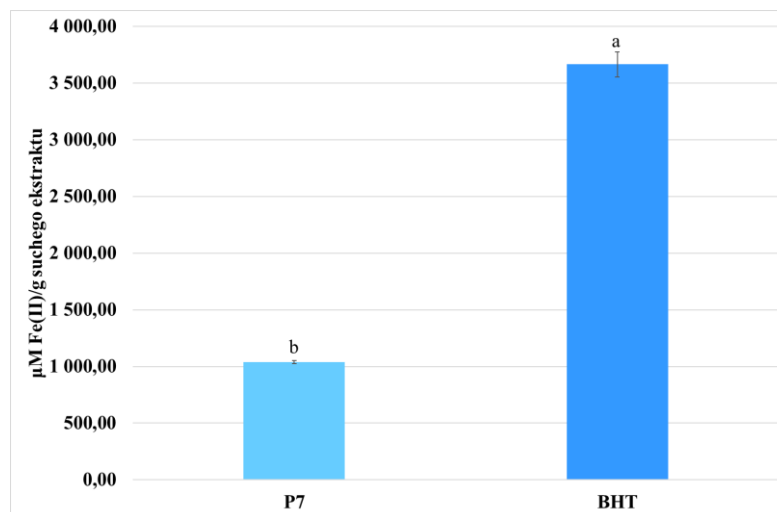
#### 5.4.1.2. Pędów transformowanych *S. bulleyana*

Podjęto się także wstępnej oceny aktywności przeciwutleniającej metanolowo-wodnego ekstraktu z pędów transformowanych *S. bulleyana*, które hodowano w stałym podłożu MS z dodatkiem 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l m-Top w warunkach światła fluorescencyjnego. W tym celu, wykorzystano testy „zmiatania” wolnych rodników, tj. DPPH oraz ABTS, test zdolności redukcji jonów żelaza (FRAP) oraz metodę oceniającą zdolność do hamowania peroksydacji lipidów (test TBARS).



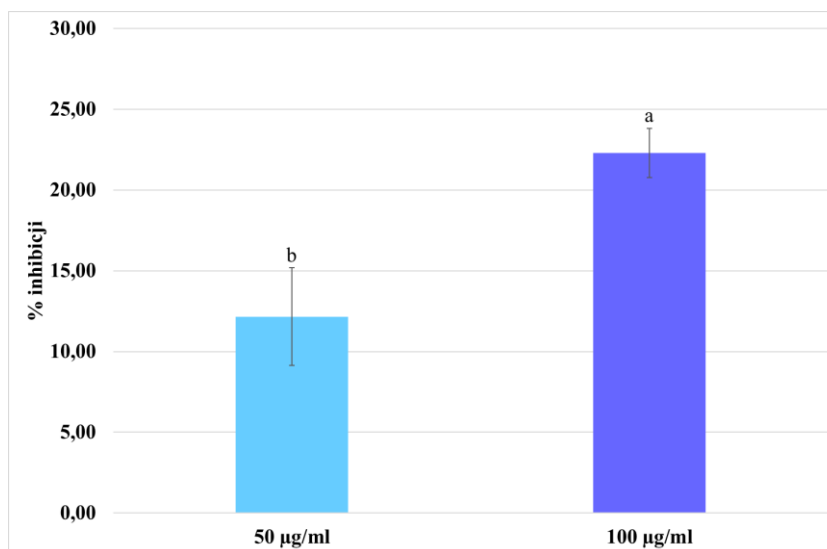
Wykres 59. Wartości  $IC_{50}$  uzyskane dla metanolowo-wodnego ekstraktu z pędów transformowanych *S. bulleyana* oraz BHT w testach DPPH oraz ABTS. Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Badany ekstrakt z pędów transformowanych wykazywał aktywność przeciwutleniającą, chociaż była ona znacznie słabsza niż ta opisana wcześniej dla kultury korzeni (podrozdział 5.4.1.1.) czy zastosowanego jako kontrola syntetycznego przeciwutleniacza – BHT. W teście „zmiatania” rodnika DPPH stężenie ekstraktu powodujące spadek początkowego stężenia rodnika o 50% wynosiło 127,9 µg/ml, a w teście z rodnikiem ABS – 37,67 µg/ml (wykres 59). Tymczasem zdolność ekstraktu do redukcji  $Fe^{3+}$  do  $Fe^{2+}$  była na poziomie 1039,7 µM Fe(II)/g suchego ekstraktu, czyli 3,5-razy niższa niż dla kontroli (wykres 60).



Wykres 60. Wartości IC<sub>50</sub> uzyskane dla metanolowo-wodnego ekstraktu z pędów transformowanych *S. bulleyana* oraz BHT w teście oceniającym zdolność do redukcji jonów żelaza (FRAP). Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

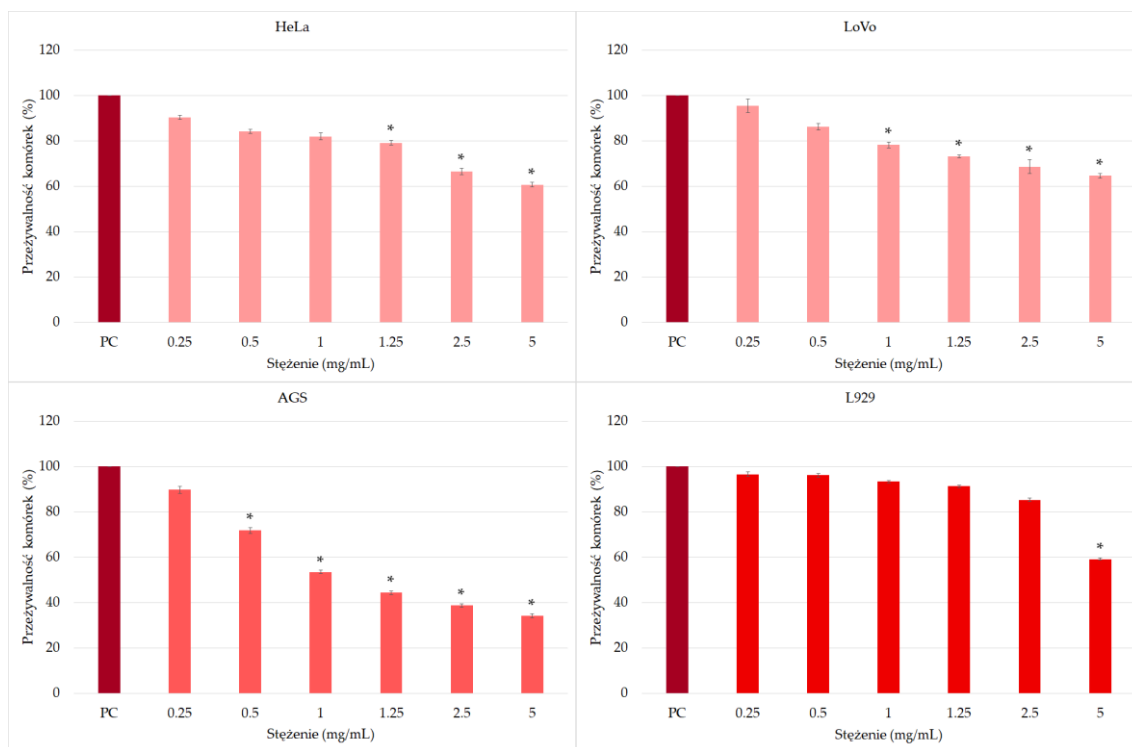
Oceniono także zdolność ekstraktu z pędów do zahamowania utleniania kwasu linolowego. W tym przypadku procent inhibicji po zastosowaniu ekstraktu w stężeniu 50 μg/ml wynosił jedynie 12,2%, a po zwiększeniu stężenia do 100 μg/ml przekroczył nieco 20% (wykres 61).



Wykres 61. Wartości IC<sub>50</sub> uzyskane dla metanolowo-wodnego ekstraktu z pędów transformowanych *S. bulleyana* w teście oceniającym zdolność do inhibicji peroksydacji lipidów (TBARS). Wartości oznaczone tą samą literą nie wykazują różnic statystycznych na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

### 5.4.2. Aktywność cytotoksyczna

Ekstrakt z korzeni włośnikowatych *S. bulleyana* rosnących w optymalnych warunkach po elicytacji został również przebadany pod kątem potencjalnej cytotoksyczności wobec trzech linii komórkowych ludzkich nowotworów: HeLa, AGS i LoVo, a także referencyjnej linii mysich fibroblastów – L929.



Wykres 62. Aktywność cytotoksyczna ekstraktu z korzeni transformowanych *S. bulleyana* wobec linii komórkowych HeLa, LoVo, AGS oraz L929. Przeżywalność komórek została obliczona na podstawie wyników z czterech prób, dla których wykonano po 3 powtórzenia. Kontrolę pozytywną stanowiło kompletne podłoże RMPI-1640 (cRMPI), dla którego osiągnięto 100% przeżywalność komórek. Kontrolę negatywną stanowił 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dla której zanotowano przeżywalność komórkową na poziomie 3,2% dla HeLa, 5% dla LoVo, 2,2% dla AGS oraz 3,3% dla L929. Symbolem „\*” oznaczono różnice statystyczne komórek hodowanych w warunkach kontrolnych oraz traktowanych określonymi stężeniami badanego ekstraktu ( $p < 0,05$ ).

Zaobserwowano działanie cytotoksyczne badanego ekstraktu względem wszystkich wykorzystanych w doświadczeniu linii komórkowych, ale siła tego działania była zależna od stężenia ekstraktu i użytej linii. Najwrażliwsza na działanie badanego ekstraktu okazała się linia AGS. W zakresie stężeń 0,5-5 mg/ml zanotowano odpowiednio od 29 do 66% martwych komórek tej linii, przy czym wartość otrzymana dla ekstraktu w stężeniu 0,5 mg/ml była już istotna statystycznie (wykres 62). W przypadku linii LoVo, istotne różnice zaobserwowano dopiero po zastosowaniu ekstraktu w stężeniu 1 mg/ml

i wyższych. Przeżywalność komórek nowotworowych w tym wariantcie doświadczenia wynosiła 53,5-78%. Najmniej podatną na działanie ekstraktu była linia HeLa, dla której istotna statystycznie aktywność cytotoksyczna pojawiała się przy stężeniu ekstraktu 1,25 mg/ml. Procent martwych komórek wynosił w tym przypadku 21-39%.

Istotnym elementem badań nad cytotoksycznością wodno-metanolowego ekstraktu z korzeni *S. bulleyana* była ocena jego wpływu na linię normalnych mysich fibroblastów linii L929. Okazało się, że zastosowanie badanego ekstraktu w stężeniach do 5 mg/ml nie powoduje istotnego spadku żywotności komórek linii L929 w porównaniu z kontrolą. Wskazuje to na bezpieczeństwo ekstraktu w tym zakresie stężeń.

### **5.4.3. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa**

Metanolowo-wodny ekstrakt z korzeni włośnikowatych poddanych 3-dniowej elicytacji 100  $\mu$ M MJA został również przebadany pod kątem potencjalnego działania na drobnoustroje. W doświadczeniu wykorzystano bakterie Gram+: *Staphylococcus aureus* oraz *S. epidermidis*, Gram-: *Escherichia coli* oraz *Pseudomonas aeruginosa*, a także grzyby: *Candida albicans* i *C. glabrata*.

Ekstrakt z korzeni *S. bulleyana* wykazywał umiarkowane działanie przeciwdrobnoustrojowe. Najsilniejszą aktywność przeciwbakteryjną zanotowano wobec *S. epidermidis*. Wartość MIC wynosiła w tym przypadku 1,25 mg/ml i była dwukrotnie niższa niż dla *S. aureus*. Dla obu gatunków gronkowca minimalne stężenie bakteriobójcze było równe 10 mg/ml (tabela 23). Badany ekstrakt wykazał nieco słabsze działanie bakteriostatyczne wobec bakterii Gram-, przy jednocześnie niższych wartościach MBC, które dla *P. aeruginosa* i *E. coli* wynosiły, odpowiednio, 5 i 2,5 mg/ml.

Jeszcze słabsze działanie odnotowano w przypadku grzybów: *C. albicans* i *C. glabrata*, dla których wartości MIC i MBC były równe 10 mg/ml (tabela 23).

Tabela 23. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa ekstraktu z korzeni transformowanych *S. bulleyana* wyrażona jako minimalne stężenie hamujące (MIC) oraz minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) lub grzybobójcze (MFC).

Drobnoustrój	Ekstrakt <i>S. bulleyana</i>		Gentamycyna	Amfoterycyna B
	MIC (mg/ml)	MBC/MFC (mg/ml)	MIC=MBC/MFC (µg/ml)	
<b>Bakterie Gram-ujemne</b>				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	2,5	5	<8	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	2,5	2,5	<4	-
<b>Bakterie Gram-dodatnie</b>				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	2,5	10	<2	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	1,25	10	<2	-
<b>Grzyby</b>				
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	10	10	-	<1
<i>Candida albicans</i> ATCC 2001	10	10	-	<1

Podsumowując, metanolowo-wodny ekstrakt z korzeni włośnikowatych *S. bulleyana* wykazywał umiarkowane działanie przeciwbakteryjne oraz stosunkowo niewielką aktywność przeciwgrzybiczą.

## 6. Dyskusja

*Salvia bulleyana* jest rośliną stosowaną w chińskiej medycynie ludowej jako zamiennik farmakopealnego *Danshen*. Surowcem wykorzystywanym w lecznictwie są korzenie tego gatunku, w których jako główne metabolity zidentyfikowano analizowane w niniejszej pracy związki polifenolowe. Transformacja genetyczna roślin daje możliwość zwiększenia produkcji cennych metabolitów wtórnych, które wykazują udokumentowany korzystny wpływ na organizm człowieka. Dlatego też celem mojej pracy była optymalizacja warunków hodowli kultury korzeni oraz pędów transformowanych *S. bulleyana* służąca stymulacji ich wzrostu oraz produkcji metabolitów wtórnych. Ponadto, podjęto wstępną próbę zwiększenia skali hodowli obu kultur stosując bioreaktory wykorzystujące systemy czasowego zalewania. Ostatnim etapem badań była wstępna ocena aktywności biologicznych wybranego materiału roślinnego.

### 6.1. Korzenie transformowane

Skuteczna transformacja genetyczna skutkuje wbudowaniem fragmentów bakteryjnego T-DNA do genomu rośliny i powstaniem organów transformowanych. Kultury korzeni włośnikowatych niosą ze sobą wiele zalet, ponieważ charakteryzują się stabilnością genetyczną, dobrą akumulacją biomasy oraz wydajną produkcją związków bioaktywnych, która utrzymuje się przez długi czas na tym samym poziomie (Gutierrez-Valdes i in., 2020). Okazało się, że wszystkie otrzymane w wyniku transformacji genetycznej przy użyciu *Rhizobium rhizogenes* klony korzeni transformowanych *S. bulleyana* (C1-C4) zawierały fragmenty bakteryjnego DNA. Fragmenty odpowiadające genom *aux2*, *rolB* oraz *rolD* zostały zidentyfikowane w każdej z otrzymanych linii korzeni włośnikowatych, *rolC* w korzeniach klonów C1-C3, a *aux1* w C2 i C3.

Cztery klony korzeni transformowanych *S. bulleyana*, których transformację potwierdzono metodą PCR, hodowano w płynnym podłożu WP bez dodatku regulatorów wzrostu przez 5 tygodni. Po tym czasie, dokonano pomiaru wartości świeżej oraz suchej masy. Okazało się, że najwyższym przyrostem biomasy charakteryzował się klon C1, z kolei najgorszym – klon C3. Różnice we wzroście klonów korzeni włośnikowatych *S. bulleyana* mogą być związane z ekspresją genów *rol* w genomie roślinnym. Geny *rol*

pełnią ważną funkcję w indukcji korzeni transformowanych uwrażliwiając komórki roślinne na działanie endogennych auksyn, co skutkuje tworzeniem się korzeni transgenicznych. Liczne badania wskazują, że wśród nich to gen *rolB* może mieć szczególnie istotne znaczenie zwłaszcza w procesie różnicowania komórek (Pal i in., 2013). We wszystkich wstępnie wyselekcjonowanych klonach korzeni *S. bulleyana* zidentyfikowano fragment odpowiadający genowi *rolB*, co może tłumaczyć ich zadowalający wzrost. Najlepiej przyrastający klon C1 *S. bulleyana* zawierał również geny *aux2*, *rolD* i *rolC*, ale wykazujący analogiczną suchą i nieco tylko niższą świeżą masę - klon C4 nie posiadał ostatniego z nich. Z drugiej strony charakteryzujące się niższą świeżą masą korzenie linii C2 i C3 miały włączone w genom wszystkie spośród pięciu analizowanych fragmentów bakteryjnego DNA, w tym także stwierdzony tylko w ich przypadku gen *aux1*. Informacja ta nie jest jednak wystarczająca, aby wyciągnąć wniosek, że to ten fragment może wywierać hamujący wpływ na wzrost poszczególnych klonów. Różnice, które dla nich opisano mogą się bowiem wiązać nie tylko z obecnością poszczególnych fragmentów genomu bakteryjnego, a także z innymi czynnikami, takimi jak miejsce ich implementacji oraz liczbą włączonych fragmentów danego rodzaju (Dilshad i in., 2021). Potwierdzają to dane literaturowe dotyczące innych gatunków. Najlepszy wzrost korzeni transformowanych *Salvia viridis* zanotowano w przypadku klonu z wbudowanymi genami *rolB*, *rolC* oraz *aux1*, podczas gdy najniższą biomasą charakteryzowały się te korzenie, w których zidentyfikowano jedynie gen *aux2* (Grzegorzczak-Karolak i in., 2018). W przypadku korzeni włośnikowatych *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, autorzy zaobserwowali, że włączenie do genomu rośliny jednocześnie genów *rolC* i *rolB* wpływało korzystnie na indukcję korzeni włośnikowatych, jednakże to obecność samego genu *rolC* istotnie stymulowała przyrost biomasy (Verma i in., 2012). Z kolei klon korzeni włośnikowatych *Atropa belladonna* zawierający jednocześnie geny *rolA*, *rolB* i *rolC* przyrastał znacznie intensywniej niż ten, w którym stwierdzono tylko obecność genu *rolC* (Bonhomme i in., 2000).

Podczas selekcji optymalnego do dalszych badań klonu korzeni *S. bulleyana* oprócz wzrostu brano również pod uwagę akumulację metabolitów wtórnych. W badanych ekstraktach z korzeni włośnikowatych zidentyfikowano 10 związków, które zostały wcześniej opisane w innych gatunkach z rodzaju *Salvia* (Chen i in., 2011; Cvetkovikj i in., 2013; Grzegorzczak-Karolak i in., 2018; Kasimu i in., 1998; Modarres i in., 2014; Ogata i in., 2004; Ożarowski i in., 2017; Toplan i in., 2017; Zengin i in., 2019, 2018).



Część z tych metabolitów została stwierdzona w *S. bulleyana* po raz pierwszy.

Dominującym związkiem aktywnym we wszystkich liniach był kwas rozmarynowy, którego zawartość wahała się między 30-40 mg/g SM, przy czym najwyższą zawartością RA charakteryzował się klon C4. Stwierdzone w uzyskanych korzeniach włośnikowatych ilości RA okazały się 4-5-krotnie wyższe od tych, które zanotowano w korzeniach kilkuletnich roślin rosnących w glebie w dwóch niezależnych doświadczeniach (Grzegorzczak-Karolak i in., 2020b; Li i in., 2008b).

Znane są również kultury korzeni włośnikowatych innych gatunków z rodzaju szalwia, które charakteryzowały się zwiększoną akumulacją kwasu rozmarynowego w porównaniu do korzeni roślin macierzystych. W kulturach korzeni włośnikowatych *S. officinalis* zanotowano nawet do 30 mg/g SM kwasu rozmarynowego (Grzegorzczak i in., 2006). Podobną zawartość RA (ok. 33-35 mg/g SM) opisano dla kultur korzeni transformowanych *S. viridis*; była to zawartość około 7 razy wyższa od tej stwierdzonej w korzeniach roślin macierzystych (Grzegorzczak-Karolak i in., 2018). Z kolei korzenie transgeniczne *S. miltiorrhiza* wytwarzały prawie 6-razy więcej kwasu rozmarynowego w porównaniu z korzeniami roślin hodowanych w warunkach naturalnych (Yuan i in., 1998). Niemniej jednak warto nadmienić, że stwierdzony w tym ostatnim badaniu poziom RA (9,9 mg/g SM) był 4-krotnie niższy niż w najproduktywniejszej linii korzeni *S. bulleyana*.

Ponadto, zwraca uwagę fakt, że w otrzymanych kulturach korzeni *S. bulleyana* nie zaobserwowano dużych różnic w zawartości RA między klonami, a takowe zanotowano w przypadku *S. viridis* (15-35 mg/g DW) czy *S. officinalis* (17-30 mg/g DW) (Grzegorzczak-Karolak i in., 2018; Grzegorzczak i in., 2006). Zawartość RA w 15 klonach korzeni transformowanych *S. virgata* również istotnie się wahała; między 0,21-0,45 mg/g SM (Abrishamchi i in., 2022), chociaż poziom RA w kulturach tego ostatniego gatunku był istotnie niższy od tego w kulturach *S. bulleyana*.

Z drugiej strony również kultury transformowane innych gatunków zwłaszcza należących do rodziny *Lamiaceae* okazywały się być dobrym źródłem kwasu rozmarynowego. Bardzo wysoką produkcję tego związku zanotowano w korzeniach włośnikowatych *Dracocephalum moldavica* L. i *Ocimum basilicum* L.; ponad 70 mg/g SM (Srivastava i in., 2016; Weremczuk-Jeżyna i in., 2013). Nieco niższą zawartość RA wykryto w najbardziej produktywnym klonie korzeni włośnikowatych *Coleus blumei* (L.)

R. Br., który akumulował go na poziomie 50 mg/g SM, czyli 13-razy wyższym niż w korzeniach rośliny nietransformowanej (Bauer i in., 2009). Z kolei kultura *Dracocephalum forrestii* zawierała ok. 20 mg tego związku na g SM (Weremczuk-Jeżyna i in., 2016), a *Nepeta cataria* L. – 14 mg/g SM (Lee i in., 2010).

Innym związkiem, który zidentyfikowano w stosunkowo dużej ilości w korzeniach włóśnikowatych *S. bulleyana* był kwas salwianolowy K, polifenol stosunkowo rzadko opisywany w literaturze. Zhao i wsp. (2011) sugerują, że SAK powstaje w wyniku przemian RA i może być metabolitem pośrednim w biosyntezie kwasu salwianolowego B oraz jego metylowych pochodnych czy litospermianu etylu B (Zhao i in., 2011b), jednakże w kulturze korzeni *S. bulleyana* dalsze przemiany SAK do SAB nie zachodziły i nie stwierdzono obecności tego związku.

W przypadku wszystkich klonów korzeni transformowanych *S. bulleyana* akumulacja SAK była zbliżona i wynosiła ok. 2,5 mg/g SM. Były to wartości ok. 7-krotnie wyższe od opisanej w korzeniach roślin gruntowych *S. bulleyana* przez Kasimu i wsp. (Kasimu i in., 1998). Z kolei w korzeniach nietransformowanych *Salvia cadmica* Boiss. oznaczono 1,8 mg tego związku na g SM (Piątczak i in., 2021).

W korzeniach włóśnikowatych *S. bulleyana* zanotowano także znaczne ilości izomerów kwasu salwianolowego F, których najwyższe ilości zanotowano w klonie C4 (odpowiednio 0,493 mg/g SM dla SAF I oraz 2,15 mg/g SM dla SAF II). W przypadku SAF II różnice w zawartości między klonami były niewielkie, za to niemalże 14-krotnie wyższe niż w korzeniach rośliny macierzystej rosnącej w glebie (Grzegorzczak-Karolak i in., 2020b). Z drugiej strony 2-krotnie wyższą zawartość SAF I i o ok. 50% wyższą SAF II raportowano w korzeniach transgenicznych *S. viridis* (Grzegorzczak-Karolak i in., 2018).

Wśród kwasów salwianolowych w ekstraktach z korzeni włóśnikowatych *S. bulleyana* odnotowano również obecność SAE, którego poziom w zależności od analizowanego klonu wahał się w granicach 0,996-1,31 mg/g SM, przy czym był najwyższy dla klonu C2. Związek ten oznaczono również w korzeniach włóśnikowatych *S. viridis*, w których jego poziom, zależnie od klonu oraz warunków oświetlenia, wynosił między 0,4 i 2,5 mg/g SM (Grzegorzczak-Karolak i in., 2018).

Pewne różnice zanotowano w ilościach kwasu kawowego akumulowanego w poszczególnych liniach kulturach korzeni *S. bulleyana* (0,768-1,36 mg/g SM) i były to

wartości niższe niż te raportowane dla korzeni rośliny macierzystej (Grzegorzczak-Karolak i in., 2020b). Odwrotną tendencję wykazały kultury transgeniczne *S. viridis*, w których Grzegorzczak-Karolak i wsp. (2018) zanotowali wyższe zawartości CA (ok. 0,3-0,5 mg/g SM) niż w korzeniach rośliny matecznej (Grzegorzczak-Karolak i in., 2018). Z kolei w korzeniach włósnikowatych *S. miliorrhiza* poziom CA wynosił niespełna 0,4 mg/g SM (Xing i in., 2018a).

Pomimo różnic w produkcji poszczególnych związków polifenolowych między badanymi klonami korzeni transformowanych, klon C4 okazał się mieć największy potencjał produkcyjny. Całkowita zawartość polifenoli oznaczonych w tym materiale wynosiła prawie 50 mg/g SM i była około ¼ wyższa niż dla klonu C2, który charakteryzował się najniższą ich zawartością. Należy jednak mieć na uwadze, że poziom polifenoli we wszystkich badanych klonach był znacznie wyższy niż oznaczony w korzeniach 2 letnich roślin matecznych (23,1 mg/g SM) (Grzegorzczak-Karolak i in., 2020b).

Aspektem mającym istotny wpływ na produktywność kultur transformowanych jest włączenie do genomu rośliny fragmentów DNA pochodzenia bakteryjnego. Liczne raporty opisują pobudzenie szlaków metabolizmu wtórnego w zmienionych genetycznie kulturach przez geny bakteryjne, a w szczególności geny *rol* (Shkryl i in., 2008). Najszerszej zbadanym genem w odniesieniu do metabolizmu wtórnego jest gen *rolC*, który zwiększał produkcję saponin w kulturach *Bacopa monnari* (L.) Wettst. (Majumdar i in., 2011) oraz kwasu chlorogenowego i kwasów dikawoilochinowych w transformowanych korzeniach *Cynara cardunculus* L. (Vereshchagina i in., 2014). Z drugiej strony, Bulgakov i wsp. (2005) stwierdzili, że kultury transformowanych komórek oraz korzeni *Eritrichium sericeum* Benth. oraz *Lithospermum erythrorhizon* Siebold & Zucc., które zawierały gen *rolC*, wytwarzały mniej kwasu rozmarynowego i rabidozyny w porównaniu do kultur nie zawierających tego fragmentu (Bulgakov i in., 2005). Podczas gdy biosyntezę poliamin w korzeniach włósnikowatych *Nicotiana tabacum* L. pobudzał gen *rolA*, a obecność fragmentów *rolB* i *rolC* wpływała hamująco lub wcale na metabolizm tej grupy związków (Altabella i in., 1995). W innym badaniu zaobserwowano, że zarówno obecność pojedynczych genów *rol* (A, B i C) jak i ich kombinacja zwiększała poziom antrachinonów w kalusie *Rubia cordifolia* L. Jednakże najwyższą zawartość tych metabolitów stwierdzono w klonach zawierających tylko gen *rolB* (Shkryl i in., 2008). *RoIB* aktywował również biosyntezę izoflawonoidów

w kulturze transgenicznych komórek *Maackia amurensis* Rupr. (Grishchenko i in., 2016) i resweratrolu w kulturze *Vitis amurensis* Rupr. (Dubrovina i in., 2009).

Podobną obserwację poczyniono w przypadku korzeni włośnikowatych *S. bulleyana*. W korzeniach linii C4, które charakteryzowały się najwyższą produkcją związków polifenolowych nie stwierdzono obecności genu *rolC*. Z kolei klony, które miały wbudowany ten fragment bakteryjnego DNA wytwarzały niższy całkowity poziom polifenoli, w tym kwasu rozmarynowego chociaż nie były to bardzo znaczne różnice. Dodatkowo należy mieć na uwadze, że pewne raporty wskazują na udział także innych dotychczas słabo scharakteryzowanych genów np. orf, które również mogą mieć wpływ na fenotyp, w tym produktywność transformowanych kultur (Veena i Taylor, 2007). Wynika z tego, że konieczna by była bardziej szczegółowa analiza, aby móc ocenić zależność pomiędzy produkcją związków bioaktywnych i wzrostem, a obecnością poszczególnych genów bakteryjnych w genomie roślinnym.

Biorąc pod uwagę zarówno produkcję biomasy jak i metabolitów wtórnych, za najbardziej obiecujący uznano klon C4 i tę linię korzeni wykorzystano w dalszych badaniach mających na celu optymalizację warunków wzrostu i akumulacji związków polifenolowych. Czynniki, które brano pod uwagę to rodzaj podłoża, zawartości w nim witamin oraz cukru, warunki oświetlenia oraz czas zbioru materiału.

Pierwszym etapem procesu optymalizacji był dobór podłoża wzrostowego i w tym celu wykorzystano pożywki ze zdefiniowanym składem w dwóch wariantach: pełnym WP, SH, MS, B5 oraz z obniżoną do połowy zawartością mikro- i makroelementów ( $\frac{1}{2}$ WP,  $\frac{1}{2}$ SH,  $\frac{1}{2}$ MS,  $\frac{1}{2}$ B5). Okazało się, że najlepsze wyniki otrzymano hodując korzenie transformowane *S. bulleyana* w podłożu SH oraz  $\frac{1}{2}$ SH. Były to warunki, w których uzyskano najwyższą akumulację zarówno biomasy jak i związków polifenolowych. Podłoże to było również korzystne dla kultury korzeni transgenicznych *Levisticum officinale* W. D. J. Koch oraz *Pimpinella anisum* L. (Santos i in., 2005, 1998). Spośród zastosowanych podłoży, SH zarówno w wersji pełnej jak i z obniżoną do połowy zawartością makro- i mikroelementów charakteryzuje się niskim poziomem jonów wapnia, który jest pierwiastkiem niezbędnym w procesach metabolicznych roślin. Jednakże według doniesień, wysoki poziom jonów  $Ca^{2+}$  może zakłócać aktywność jonów  $Mg^{2+}$  czy powodować wytrącanie się fosforanów skutkujące zaburzeniem szlaków metabolicznych (George i De Klerk, 2008). Podłoża SH w porównaniu z innymi

pożywkami zawierają wyższe stężenie takich mikroelementów jak kobalt i jod, a niższe molibdenu i cynku. Prawdopodobnie, to właśnie powyższe parametry mogły mieć wpływ na produktywność korzeni włósnikowatych *S. bulleyana* hodowanych w podłożach SH i ½SH.

Dane literaturowe sugerują, że na wzrost korzeni transformowanych wpływ może mieć także zawartość związków azotowych w podłożu. Tak było w przypadku kultur *Salvia viridis* oraz *Anisodus acutangulus* C. Y. Wu & C. Chen (Grzegorzczak-Karolak, 2020; Li i in., 2008c). Jednakże całkowita zawartość azotu wydaje się nie mieć istotnego znaczenia w przypadku korzeni włósnikowatych *S. bulleyana*, bo podłoża SH zawierają pośrednią jego ilość w porównaniu z innymi stosowanymi pożywkami. Natomiast znaczący wpływ wydaje się mieć stosunek azotanów do jonów amonowych w podłożach SH; te pożywki dostarczają kulturze azot, przede wszystkim w postaci jonów azotanowych, a jony amonowe stanowią źródło jedynie 10% tego pierwiastka, podczas gdy w innych użytych podłożach jest to 30-40%. George i in. (George i De Klerk, 2008) sugeruje, że kultura korzeniowa może preferować pożywki nie zawierające  $\text{NH}_4^+$  lub zawierające ich niskie zawartości, bo często hamują one jej wzrost w przeciwieństwie do promujących wzrost korzeni jonów azotanowych. Równowaga  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  znacząco wpływa również na pH pożywki: znaczna ilość jonów amonowych i ich użycie przed azotanami zakwasza pożywkę, co będzie skutkowało hamowaniem wzrost kultury. Ponadto wysoki poziom jonów amonowych w podłożu może utrudniać pobór z niego niektórych jonów metali, takich jak wapń, magnez i potas, co z kolei może ograniczać przepływ składników odżywczych do tkanki roślinnej i zmniejszać akumulację biomasy (Prasad i in., 2012). Inne badania wykazały jednak, że jony amonowe są niezbędne do wzrostu kultury, jednakże do optymalnego wzrostu korzeni transformowanych są potrzebne jedynie w niewielkiej ilości (Nussbaumer i in., 1998).

Dodatkowo, podłoża SH oraz ½SH charakteryzują się wysokim poziomem witamin; zawierają 5-10 razy więcej kwasu nikotynowego oraz 10 razy więcej inozytolu w porównaniu do pozostałych. Inozytol w kulturach pełni funkcję witamino podobnego czynnika wzrostu. Sprzyja on podziałom komórkowym, uczestniczy w odpowiedzi na warunki stresowe, a także uważa się, że ma udział w poborze, magazynowaniu oraz usuwaniu jonów (Kiviharju i in., 2005). Wprawdzie inozytol nie jest zaliczany do hormonów roślinnych, ale najprawdopodobniej bierze udział w przechowywaniu i transporcie auksyn przez co może kontrolować funkcjonalność fitohormonów

(Kowalczyk i Bandurski, 1991).

W związku z faktem, że zawartość witamin w podłożu hodowlanym okazała się istotnie oddziaływać na akumulację biomasy oraz związków polifenolowych *S. bulleyana*, w dalszych badaniach dokonano oceny wpływu stężenia tej grupy związków na parametry wzrostu oraz produkcji. W doświadczeniu wykorzystano oba najbardziej obiecujące podłoża SH i ½SH, które poza standardowym składem witaminowym, uzupełniono połową oraz jedną czwartą wyjściowej zawartości witamin. Zastosowano także warianty pożywek, które nie zawierały witamin. Nawet po obniżeniu zawartości witamin do połowy lub jednej czwartej, stężenia kwasu nikotynowego i inozytolu w podłożach SH były wyższe niż w innych pożywkach użytych w doświadczeniu, a zmiana ta nie wpłynęła niekorzystnie na wzrost kultury. Jednocześnie zaobserwowano, że zmniejszenie zawartości witamin w podłożu SH z pełną zawartością pierwiastków powodowało stopniowy spadek zawartości związków bioaktywnych w korzeniach *S. bulleyana*. Podczas gdy obniżanie stężenia witamin w pożywce ½SH stymulowało produkcję większości kwasów fenolowych i dopiero ich całkowity brak drastycznie obniżał poziom metabolitów wtórnych. Tym samym podłoże ½SH z połową zawartości witamin charakteryzowało się najwyższą produktywnością; 924,4 mg TPC, a w tym 741,8 mg RA, 76,6 mg SAK i 43,3 mg SAE na litr podłoża.

Kolejnym istotnym składnikiem roślinnych podłoży wzrostowych jest źródło węgla i jego stężenie (Shinde i in., 2010). Odpowiednio dobrane stężenie cukru może pobudzać biosyntezę związków aktywnych w kulturze poprzez wywołanie stresu osmotycznego przy jednocześnie wysokiej akumulacji biomasy (Cui i in., 2010). W przypadku kultury korzeni włósnikowatych *Dracocephalum forrestii* najkorzystniejsze parametry wzrostu i produkcji kwasu rozmarynowego uzyskano przy 3% zawartości cukru w podłożu (Weremczuk-Jeżyna i in., 2016). Nie jest to jednak regułą i inne badania wskazują zarówno na niższe jak i na wyższe stężenia cukru jako te optymalne. Korzenie transformowane *Trigonella foenum-graecum* L. wykazały najwyższą produkcję diosgeniny podczas traktowania wykorzystującego 1% sacharozy w pożywce WP (Merikli i in., 1997). Z kolei 4% zawartość cukru okazała się najodpowiedniejsza dla przyrostu biomasy i biosyntezy piranokumaryn w korzeniach transgenicznych *Angelica gigas* Nakai (Xu i in., 2009). W niniejszej pracy podjęto się również oceny wpływu stężenia cukru (2%, 3%, 4%, 5%) na wzrost i produkcję metabolitów wtórnych w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* wykorzystując najpowszechniej stosowane

w kulturach *in vitro* źródło węgla jakim jest sacharoza.

Zanotowano, że wraz ze wzrostem zawartości sacharozy w podłożu wzrastała akumulacja suchej masy korzeni włósnikowatych *S. bulleyana*. Tymczasem dla większości związków polifenolowych akumulowanych w materiale roślinnym, wraz ze wzrostem sacharozy odnotowano stopniowy spadek ich zawartości. Wyjątek stanowiły SAK oraz RAH, których zawartość rosła wraz ze wzrostem zawartości sacharozy w podłożu. W przypadku heksozy kwasu rozmarynowego może to być związane z większą wydajnością procesu glikozytacji przy większych stężeniach cukru w pożywce. Podobną sytuację raportowano dla biosyntezy antocyjanów w kulturach *Panax sikkimensis* Ban (Mathur i in., 2010). Ostatecznie biorąc pod uwagę zarówno akumulację biomasy jak i całkowity poziom polifenoli, najwyższą produktywność korzeni transformowanych *S. bulleyana* osiągnięto przy 3% stężeniu cukru.

Innym czynnikiem mającym wpływ na wzrost i biosyntezę związków aktywnych w kulturach roślinnych jest źródło i rodzaj światła. Coraz bardziej popularnym systemem oświetlenia wykorzystywanym w hodowli roślin są diody LED umożliwiające dobór długości fali odpowiedniej dla danego gatunku oraz organu rośliny (Cioć i in., 2018). Stwierdzono, że traktowanie kultur pewnymi długościami światła LED może regulować ekspresję genów odpowiedzialnych za biosyntezę enzymów biorących udział w syntezie polifenoli (Gam i in., 2020; Xu i in., 2014). Według Xu i in. (2014) światło niebieskie istotnie zwiększało aktywność PAL, enzymu początkowego etapu szlaku polifenolowego, w owocach truskawek, a także innych enzymów, w tym dehydrogenazy szikimianowej, amoniakolizazy tyrozynowej, 4-hydroksylazy cynamonowej, ligazy 4-kumaranu-CoA, syntazy chalkonu, 4-reduktazy dihydroflawonolu i 3- $\beta$ -hydroksylazy flawanonu mających znaczenie w syntezie antocjanów (Xu i in., 2014). Niebieskie LED stymulowały również produkcję kwasów polifenolowych u niektórych gatunków z rodziny *Lamiaceae*, takich jak *Ocimum basilicum* czy *Agastache rugosa* (Fisch. & C. A. Mey.) Kuntze (Lobiuc i in., 2017; Park i in., 2020).

Jednakże w przypadku korzeni transformowanych *S. bulleyana* każdy rodzaj oświetlenia hamował zarówno przyrost biomasy jak i akumulację polifenoli w kulturze. Prawdopodobnie jest to związane z faktem, że w warunkach fizjologicznych korzenie rosną bez udziału światła. Jednakże w wielu przypadkach ekspozycja kultur korzeni na światło nie powodowała istotnych zmian w akumulacji biomasy i metabolitów wtórnych.

Tak było w przypadku korzeni *Dracocephalum moldavica* czy *Salvia officinalis* (Grzegorzczuk i in., 2006; Weremczuk-Jeżyna i in., 2013). Oświetlenie LED nie modyfikowało także biomasy korzeni transformowanych *S. miltiorrhiza*, aczkolwiek miało pewien wpływ na produkcję niektórych związków bioaktywnych powodując spadek zawartości tanszinonu IIA i niewielki wzrost poziomu kwasu rozmarynowego (Chen i in., 2018). Raportowano także o kulturach, dla których tak jak w przypadku korzeni włośnikowych *S. bulleyana*, światło było czynnikiem hamującym ich wzrost (Santos i in., 1998).

Kolejnym etapem optymalizacji warunków wzrostu i biosyntezy związków polifenolowych kultury korzeni *S. bulleyana* było wykonanie krzywej wzrostu i produkcji w celu wyboru odpowiedniego dnia zbioru materiału roślinnego. W ciągu 50-dniowej hodowli osiągnięto 14- i 16-krotny przyrost, odpowiednio, świeżej i suchej masy, których optimum przypadało na 40-50 dzień. Najwyższą całkowitą zawartość polifenoli oraz samego kwasu rozmarynowego odnotowano podczas stacjonarnej fazy wzrostu w 40 dniu hodowli. Maksimum produkcji metabolitów wtórnych w fazie stacjonarnej raportowano w odniesieniu do wielu kultur i produkowanych w nich związków bioaktywnych. Przykładem mogą być korzenie transformowane *Conodopsis pilosula* (Franch.) Nannf., *Dracocephalum forrestii* czy *Salvia viridis* (Grzegorzczuk-Karolak, 2020; Weremczuk-Jeżyna i in., 2016; Yang i in., 2020).

Korzenie transformowane *S. bulleyana* hodowane w zoptymalizowanych warunkach akumulowały 93,6 mg/g SM związków polifenolowych, co stanowiło wartość ponad dwukrotnie wyższą niż ta raportowana przed optymalizacją. Co więcej, była to ilość 4-razy wyższa od tej, którą odnotowano dla korzeni 2 letnich roślin macierzystych rosnących w glebie. W odniesieniu do zawartości RA (70,0 mg/g SM), w 40 dniu hodowli w zoptymalizowanych warunkach uzyskano 2 razy więcej tego związku niż w kulturze przed optymalizacją i aż 8-krotnie więcej w porównaniu z korzeniami dwuletniej rośliny matecznej (Grzegorzczuk-Karolak i in., 2020b). Ponadto, kultura *S. bulleyana* charakteryzowała się istotnie wyższą akumulacją RA niż korzenie innych gatunków szalwii występujących na terenie Chin (0,59-34,44 mg/g) (Li i in., 2008a).

Dobór odpowiednich warunków wzrostu miał także korzystny wpływ na biosyntezę innych metabolitów obecnych w korzeniach *S. bulleyana*. Optymalizacja zaowocowała siedmiokrotnym wzrostem produkcji SAE, osiemnastokrotnym wzrostem - RAH



i dwukrotnym wzrostem - MR w porównaniu z pierwotnymi niezmodyfikowanymi korzeniami klonu C4, chociaż maksima dla poszczególnych metabolitów często nie były osiągnęte w tym samym dniu hodowli. Z kolei SAK był jedynym związkiem, którego poziom nawet po optymalizacji był nieco niższy niż w korzeniach rośliny matecznej (Grzegorzczak-Karolak i in., 2020b). Jednak również w przypadku tego związku dobór odpowiednich warunków uprawy i terminu zbioru kilkakrotnie zwiększył jego pierwotną zawartość w badanej kulturze.

Uzyskane wyniki i podatność szlaków metabolicznych na warunki hodowli były tak obiecujące, że skłoniły do wykorzystania jeszcze jednej strategii mającej znaczenie dla modyfikacji produkcji – elicytacji. Elicytory są związkami lub mieszaninami związków, które poprzez wywołanie stresu komórkowego mogą pobudzać procesy produkcji w kulturach roślinnych (Angelova i in., 2006). Wyróżniamy elicytory biotyczne i abiotyczne. Zalicza się do nich także związki sygnałowe szlaków metabolicznych. Do oceny wpływu na produkcję polifenoli w korzeniach włośnikowatych *S. bulleyana* wybrano: jasmonian metylu zaliczający się do związków sygnałowych, ekstrakt drożdżowy – elicytor biotyczny pochodzenia grzybowego o złożonym składzie, trans-anetol będący głównym składnikiem olejku z kopru oraz anyżu, a także chlorek kadmu – sól metalu ciężkiego będąca elicytorem abiotycznym.

Początkowo oceniano wpływ elicytorów na przyrost biomasy traktowanej nimi kultury. Wiele przeprowadzonych badań sugeruje, że elicytacja może mieć negatywny wpływ na wzrost, czego przykładem mogą być kultury *Abutilon indicum* L. oraz *Burmangsia candida* Pers. (Pitta-Alvarez i in., 2000; Rao i in., 2021). Akumulacja biomasy jest niezwykle istotnym aspektem w biosyntezie metabolitów, ponieważ produktywność kultury jest związana nie tylko z zawartością związków w materiale roślinnym, ale i jego ilością. Okazało się, że jedynie jony kadmu znacząco obniżały akumulację suchej masy korzeni włośnikowatych *S. bulleyana* począwszy od 3 dnia elicytacji dla stężenia 100  $\mu\text{M}$  i 7 dnia dla 50  $\mu\text{M}$  Cd. Pozostałe elicytory miały znikomy wpływ na ten parametr. Niemniej jednak należy zwrócić uwagę na fakt, że znając szczegółowo przebieg wzrostu i produkcji kultury, elicytację wdrożono 33 dnia hodowli, kiedy to wzrost korzeni osiągał już fazę stacjonarną. Jeśli więc dany elicytor nie działał toksycznie na kulturę, to miał co najwyżej potencjał ograniczający jej wzrost, a efekt ten w fazie stacjonarnej nie miał okazji się ujawnić.

Dalsza analiza wykazała stymulujący efekt MJA w odniesieniu do produkcji związków polifenolowych w kulturze korzeni *S. bulleyana*. Szczególnie korzystna okazała się 3-dniowa ekspozycja na ten związek zastosowany w stężeniu 100  $\mu$ M. Otrzymana w tych warunkach TPC oraz zawartość RA były odpowiednio 5- i 13-krotnie wyższe od tych stwierdzonych w korzeniach roślin macecznych po 2 latach ich wzrostu w glebie (Grzegorzczak-Karolak i in., 2020b). Co więcej, poziom RA w tym wariantcie hodowli dwukrotnie przewyższał ilość otrzymaną dla materiału kontrolnego. Podwojenie zawartości RA (67 mg/g SM) w porównaniu do kontroli zanotowano także dla korzeni transformowanych *S. przewalskii* po 3 dniach elicytacji MJA (Li i in., 2020b). Jednakże tylko kilka prac donosiło o podobnie wysokiej zawartości RA w transformowanych kulturach korzeni jak ta uzyskana w analizowanym klonie *S. bulleyana*. Jako przykład można tu wymienić kultury *Hyssopus officinalis* L. oraz *Ocimum basilicum* (Murakami i in., 1998; Tada i in., 1996).

Nieliczne do tej pory badania poszukują związku MJA i innych elicytorów z indukcją genów i czynników transkrypcyjnych w szlaku metabolicznym związków polifenolowych. Podczas elicytacji *S. miltiorrhiza* odnotowano stymulację aktywności enzymów biorących udział zarówno w szlaku przemian fenyloalaniny (PAL, C4H, 4CL1, 4CL2) jak i tyrozyny (TAT, HPPR) prowadzącą do zwiększonej biosyntezy kwasu rozmarynowego (Zhang i in., 2014). Również w przypadku korzeni włośnikowatych *S. przewalskii*, Li i wsp. (2020) opisali wpływ MJA na ekspresję niektórych genów tego szlaku, w tym PAL, 4CL, RAS, HPPR, TAT oraz CYP98A14 (Li i in., 2020b).

Anetol i ekstrakt drożdżowy okazał się nie mieć istotnego wpływu na akumulację większości związków polifenolowych w korzeniach transformowanych *S. bulleyana*. Jednak wiele badań wskazuje, że YE może wpływać na metabolizm wtórny u szalwii (Attaran Dowom i in., 2017; Chen i in., 2001). Przykładowo, w kulturze korzeni włośnikowatych *S. miltiorrhiza* zawartość RA po ekspozycji na drożdże wzrastała dwukrotnie w porównaniu do kontroli (Chen i in., 2001). Z kolei w badaniach Bauera i wsp. (2009) wykorzystujących 11 linii korzeni transgenicznych *Coleus blumei* stwierdzono, że odpowiedź na zastosowany elicytor zależała od badanego klonu i była bardzo różna; w przypadku 5 klonów zanotowano spadek akumulacji RA w porównaniu z kontrolą, w dwóch – drożdże stymulowały produkcję tego związku, a dla 4 nie odnotowano żadnych zmian (Bauer i in., 2009). Ponadto w innych badaniach wskazano, że ten sam elicytor może mieć różny wpływ na produkcję tego samego metabolitu

u różnych gatunków; co zostało potwierdzone przez różnice w ekspresji kluczowych genów w szlaku biosyntezy kwasów fenolowych u *S. officinalis* i *S. verticillata* (Pesaraklu i in., 2021). Przy tym należy pamiętać, że ekstrakt drożdżowy będąc mieszaniną aminokwasów, witamin, minerałów oraz różnych nieznanymi związków ma zmienny skład, co utrudnia określenie ogólnych zależności i sposobu jego działania (Ertola i Hours, 1998).

Z kolei chlorek kadmu miał negatywny wpływ nie tylko na akumulację biomasy, ale też na zawartość polifenoli w kulturze *S. bulleyana* począwszy już od 1 dnia dla stężenia 100  $\mu\text{M}$  i od 3 dnia dla 50  $\mu\text{M}$ . I tak przykładowo, 7-dniowa ekspozycja na wyższe stężenie Cd skutkowało 55% spadkiem TPC. Metale ciężkie mogą być używane jako czynniki stresowe w celu zwiększania produkcji wtórnych metabolitów. Efekt taki opisano w przypadku elicytacji kadmem w stężeniu 25  $\mu\text{M}$  kultury komórkowej *S. miltiorrhiza* osiągając wzrost zawartości tanszynonów, chociaż przy jednoczesnym zahamowaniu przyrostu biomasy kultury (Zhao i in., 2010). Jednakże w krytycznych dla danej kultury dawkach metale ciężkie mogą być toksyczne i powodować śmierć komórek roślinnych (Chodisetti i in., 2012). Mechanizm tego procesu jest najprawdopodobniej związany z wypieraniem przez metale ciężkie jonów żelaza oraz innych dwuwartościowych kationów z białek. Następnie jony te mogą inicjować uszkodzenia komórek w wyniku zachodzenia reakcji Fentona (Stohs i in., 2001). Kultura korzeni transformowanych *S. bulleyana* okazała się być szczególnie wrażliwa na kadm, proporcjonalnie do zastosowanej dawki, co jest szczególnie widoczne przy wydłużającym się czasie ekspozycji. Podobny efekt zanotowano w przypadku kultury *Gymnema sylvestre* R. Br. W doświadczeniu dodatek 2  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  powodował wprawdzie krótkotrwały wzrost akumulacji metabolitów wtórnych, ale już po 24 h dochodziło do nagłego i gwałtownego spadku biomasy kultury oraz poziomu kwasu gymnemowego (Chodisetti i in., 2012).

Podsumowując tą część badań, można podkreślić wysoki potencjał wzrostowy oraz produkcyjny wyselekcjonowanej i zoptymalizowanej pod względem warunków hodowlanych kultury korzeni transgenicznych *S. bulleyana*. Ponadto, warto zauważyć, że korzenie uprawiane *in vitro* wymagały znacznie krótszego czasu do zbioru (40 dni vs. 2 lata), były wolne od zanieczyszczeń mikrobiologicznych i środowiskowych, które są często spotykane w uprawach polowych, a ich zbiór nie wymagał degradacji uprawy. Jest to zdecydowana zaleta kultury korzeni włośnikowatych w porównaniu do hodowli rośliny

macierzystej. Ponadto, kultywacja w warunkach *in vitro* umożliwia szerszy dostęp do surowca, którego dostępność jest ograniczona i który do tej pory był wykorzystywany jedynie lokalnie, w miejscu występowania.

## 6.2. Pędy transformowane

W tradycyjnej medycynie chińskiej jako zamiennik *Danshen* wykorzystywane są jedynie korzenie *Salvia bulleyana*. W literaturze nie ma doniesień na temat stosowania w leczeniu części nadziemnych tego gatunku, a także informacji o uzyskaniu dla niego pędów zmienionych genetycznie. Jednakże w leczeniu stosuje się nadziemne części wielu innych gatunków szalwii (Li i in., 2013b; Nikolova i Aneva, 2018). Wykorzystana w badaniach kultura pędów transformowanych *S. bulleyana* powstała w procesie spontanicznej regeneracji z korzeni włóśnikowatych otrzymanych przy udziale *Rhizobium rhizogenes* szczepu A4. W dziedzinie biotechnologii roślin nie jest to odosobniony przypadek, ponieważ ten sposób inicjacji kultur pędów transgenicznych zanotowano także dla innych roślin takich jak *Rehmania glutinosa* Libosch., *Rhaponticum carthamoides*, *Tylophora indica* (Burm. F.) Merr., *Hypericum perforatum* L., *Solidago nemoralis* Aiton czy *Dracocephalum forrestii* (Chaudhuri i in., 2006; Gunjan i in., 2013; Piątczak i in., 2015; Skała i in., 2019; Tusevski i in., 2017; Weremczuk-Jeżyna i in., 2019).

Pędy transformowane charakteryzują się specyficznymi cechami morfologicznymi. Wśród obserwowanych zmian można wyróżnić marszczenie liści, skrócone międzywęzła czy silną tendencję do rozgałęziania. Takie zmiany zanotowano w przypadku pędów transformowanych *S. bulleyana*. Charakteryzowały się one niskim wzrostem związanym ze znacznym skróceniem międzywęzła. Co więcej, wykazywały one większą zdolność do ukorzeniania się w porównaniu do pędów niezmienionych genetycznie. Mehrotra i wsp. (2013) łączą zmiany morfologiczne z niezależną segregacją genów obecnych w plazmidowym T-DNA *R. rhizogenes* (Mehrotra i in., 2013). Casanova i wsp. (2003) sugerują, że za spontaniczne tworzenie się pędów przybyszowych odpowiedzialna jest nadekspresja genu *rolC* włączonego do genomu rośliny. Ekspresja tego genu skutkuje zmianami podobnymi do tych, które można obserwować pod wpływem zarówno auksyn jak i cytokinin (Casanova i in., 2003). Potwierdzenie transformacji pędów transgenicznych *S. bulleyana* metodą PCR wykazało, że w ich genomie są obecne

fragmenty odpowiadające genom *rolB* i *C*. Te same geny wykryto w przypadku pędów transformowanych *Dracocephalum forrestii* oraz *Rehmania glutinosa* Libosch. (Piątczak i in., 2015; Weremczuk-Jeżyna i in., 2019).

W niniejszej pracy podjęto próbę zoptymalizowania warunków wzrostu pędów transformowanych *S. bulleyana* w celu otrzymania wysokiej akumulacji biomasy i produkcji związków bioaktywnych. Pierwszym etapem tego procesu był dobór odpowiednich warunków oświetlenia.

Światło jest jednym z najistotniejszych czynników abiotycznych wpływających na wzrost i morfogenezę roślin. U roślin hodowanych *in vitro* wpływa ono na funkcjonowanie genów kontrolujących metabolizm związany z pobudzeniem wzrostu i rozwoju niezależnego od fotosyntezy (Weremczuk-Jeżyna i in., 2021). Dotychczasowe ustalenia wskazują, że można modyfikować wzrost roślin wykorzystując podczas ich uprawy światło o określonej barwie. Stosowanie w biotechnologii roślin diod elektroluminescencyjnych umożliwia precyzyjny dobór odpowiedniej długości fal świetlnych w celu otrzymania roślin o pożądanym cechach (Cioć i in., 2018). Technologia LED ma wiele zalet; zapewnia niższą emisję ciepła, umożliwia regulację intensywności światła i długości jego fali, a wykorzystywane lampy mają dłuższą żywotność i zajmują mniejszą powierzchnię niż konwencjonalne światło fluorescencyjne o białej barwie (Morrow, 2008). Badania sugerują, że diody LED mają ogromny potencjał dla namnażania roślin *in vitro* i można stosować wybrane długości fali, aby uzyskać optymalne efekty regeneracji roślin i akumulacji biomasy.

Istotnym elementem odpowiedzi na warunki świetlne jest zawartość barwników fotosyntetycznych, w tym chlorofilu. Okazuje się, że jakość dostarczanego światła może znacząco wpływać na proces fotosyntezy poprzez regulację zawartości chlorofilu w komórkach roślinnych (Ye i in., 2017). Jednakże należy przy tym mieć na uwadze fakt, że w warunkach *in vitro* odpowiedź może różnić się od tej uzyskanej w uprawie szklarniowej ze względu na małe znaczenie procesu fotosyntezy dla kultur, które cukier pozyskują z podłoża. Zasadniczo chlorofil posiada dwa piki absorpcji, przy długościach fali 430-450 nm oraz 640-660 nm. Dlatego też badacze podejrzewają, że zarówno niebieskie (420-500 nm) jak i czerwone (640-700 nm) światło może mieć wpływ na powstawanie i metabolizm chlorofilu w roślinie (Long i in., 2018). Liczne raporty donoszą też o znaczącym wpływie LED na akumulację metabolitów w roślinach (Bian

i in., 2015). Analizując doniesienia dotyczące wpływu światła na wzrost i produkcję roślin, zauważamy różnice, co do reakcji konkretnych gatunków na dany rodzaj warunków oświetlenia.

Stosunkowo liczne badania donoszą o dużym potencjale światła niebieskiego w odniesieniu do parametrów wzrostu i produkcji gatunków hodowlanych. Przykładowo, diody niebieskie okazały się najskuteczniejszymi źródłami światła dla hodowli pędów *Dracocephalum forrestii* (Weremczuk-Jeżyna i in., 2021), *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. (Ye i in., 2017) czy *Rehmania glutinosa* (Manivannan i in., 2015). Stosowanie monochromatycznych źródeł światła może być ekonomicznie uzasadnione, biorąc po uwagę fakt, że podczas emisji światła białego obejmującego szeroki zakres długości fali część promieniowania obejmuje fale o długościach nieistotnych dla rozwoju rośliny i jej produkcji (Kim i in., 2004). Jednakże opisywano gatunki, dla których maksymalną akumulację biomasy odnotowywano w przypadku hodowli na świetle białym, co może wynikać z wyższego zapotrzebowania na energię tych roślin niż można uzyskać w przypadku innej barwy światła. Taki wzmacniający wzrost wpływ światła białego w porównaniu z innymi rodzajami światła obserwowano w hodowli *Artemisa absinthium* L. i *Lepidium sativum* L. (Tariq i in., 2014; Ullah i in., 2019). W tym drugim przypadku przy białym oświetleniu raportowano również maksymalny poziom akumulacji związków polifenolowych. Traktowanie wykorzystujące światło białe okazało się również najkorzystniejsze dla regeneracji dwóch gatunków z rodzaju *Lachenalia* (Bach i in., 2018).

Podobnie było w przypadku transformowanych pędów *S. bulleyana*, dla których namnażania najkorzystniejsze okazały się diody emitujące światło o barwie białej. W tym przypadku uzyskano najwyższy współczynnik mnożenia oraz najwyższą akumulację biomasy, podczas gdy użycie wąskich zakresów światła, zarówno o barwie niebieskiej jak i czerwonej, istotnie ograniczało wzrost kultury. Z drugiej strony podobne efekty uzyskano podczas hodowli na świetle będącym mieszaniną światła czerwonego i niebieskiego, co wskazuje, że badana kultura potrzebuje fali o długości obejmującej, co najmniej dwa zakresy, zarówno światła czerwonego jak i niebieskiego. Podobnie w przypadku *Carpesium triste* Maxim. przyrost biomasy pod mieszanymi LED był wyższy niż dla samego niebieskiego i czerwonego światła (Zhao i in., 2020). Ekspozycja na mieszane światło czerwone i niebieskie była również szczególnie korzystna dla akumulacji biomasy *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. (Kim i in., 2004),

choć w tym wypadku doświadczenie bazowało na nieco innym stosunku światła czerwonego do niebieskiego (50:50) niż w hodowli *S. bulleyana* (70:30).

Jednocześnie badania wykazały, że białe światło LED było bardziej odpowiednie dla wzrostu roślin niż białe światło fluorescencyjne. Podobnie jak w przypadku naszych wyników, korzystny wpływ źródeł światła LED odnotowano w przypadku kultury *Peucedanum japonicum* Thunb. czy *Dracocephalum forrestii* (Chen i in., 2016; Weremczuk-Jeżyna i in., 2021). Przyczyną tego zjawiska może być mniejsza energia światła emitowanego przez świetlówki w związku z jego rozpraszaniem w postaci energii cieplnej.

Jeśli jednak chodzi o produkcję barwników fotosyntetycznych, to najwyższą ich zawartość odnotowano w pędach transformowanych *S. bulleyana* hodowanych na świetle czerwonym; zarówno poziom chlorofilu jak i karotenoidów w pędach był dwukrotnie wyższy podczas hodowli w warunkach czerwonych LED niż w warunkach kontrolnych. Ekspozycja na światło czerwone stymulowała również produkcję chlorofilu w pędach *Rehmania glutinosa* (Manivannan i in., 2015). Z kolei w przypadku pędów *Dracocephalum forrestii* najkorzystniejszymi traktowaniami okazały się te wykorzystujące światło niebieskie i mieszane, choć otrzymana w nich zawartość całkowitego chlorofilu była niższa niż oznaczona dla *S. bulleyana* (Weremczuk-Jeżyna i in., 2021).

Warunki oświetlenia miały również wpływ na akumulację związków polifenolowych w pędach transformowanych *S. bulleyana*. Każde z traktowań LED charakteryzowało się wyższą całkowitą zawartością polifenoli (20,4-24,3 mg/g SM) oraz zawartością kwasu rozmarynowego (17,3-20,3 mg/g SM) w porównaniu do pędów hodowanych w warunkach kontrolnych (odpowiednio 16,8 i 13,6 mg/g SM). Maksimum produkcji dla TPC, kwasu rozmarynowego, SAK i kilku innych polifenoli osiągnięto podczas hodowli na świetle mieszanym. Kombinacja światła niebieskiego i czerwonego poprawiła też znacząco ogólną zawartość flawonoidów w kulturze *A. roxburghii* (Gam i in., 2020). Wśród traktowań LED, najmniej korzystne dla produkcji metabolitów w pędach *S. bulleyana* okazało się światło o barwie niebieskiej. Tymczasem można znaleźć liczne doniesienia, kiedy to właśnie traktowanie światłem niebieskim skutkowało najwyższą produkcją związków polifenolowych. Przykładem może być kultura *Rehmania glutinosa*, *Aronia melanocarpa* (Michx.) Robertson & Phipps, *A. arbutifolia* (L.) Pers, *A. prunifolia*

(Marshall) Rehder czy *Prunella vulgaris* L. (Fazal i in., 2016; Manivannan i in., 2015; Szopa i in., 2018). Należy jednak pamiętać, że światło niebieskie jest promieniowaniem wysokoenergetycznym i jako silny czynnik stresogenny może pobudzać metabolizm wtórny, ale też w przypadku gatunków wrażliwych może mieć negatywny wpływ na ich wzrost (Ouzounis i in., 2015).

Analiza stresogennego działania poszczególnych rodzajów oświetlenia może ujawniać się w postaci zmian aktywności podstawowych enzymów antyoksydacyjnych komórek roślinnych (POD, SOD, CAT), co wiąże się z ich funkcjami obronnymi. SOD zobojętnia rodniki ponadtlenkowe chroniąc komórki przed uszkodzeniami związanymi ze stresem oksydacyjnym (Dewir i in., 2006). POD redukuje wolne rodniki powstałe w chloroplastach i mitochondriach, a CAT redukuje nadtlenek wodoru powstały w peroksysomach (Foyer i Noctor, 2016; Ye i in., 2017). W przypadku kultury pędów transformowanych *S. bulleyana* warunki światła niebieskiego najsilniej stymulowały wszystkie analizowane w doświadczeniu enzymy antyoksydacyjne, co potwierdza wcześniej sformułowany wniosek o silnym stresie oksydacyjnym powodowanym przez monochromatyczne światło o tej długości fali na transformowane pędy badanego gatunku. Z drugiej strony, okazało się, że źródła światła LED o wszystkich wykorzystanych w eksperymencie długościach fali pobudzały aktywność badanych enzymów antyoksydacyjnych w porównaniu z kontrolą. Podobną reakcję zaobserwowano w przypadku innych gatunków (Manivannan i in., 2015; Weremczuk-Jeżyna i in., 2021).

Ostatecznie, uwzględniając przyrost biomasy i produkcję związków bioaktywnych, do dalszych badań, które obejmowały optymalizację w zakresie doboru odpowiednich regulatorów wzrostu wybrano białe światło LED.

Cytokininy należą do regulatorów wzrostu, które są niezwykle istotnym czynnikiem hamującym starzenie się komórek, a także znoszącym dominację wierzchołkową, co stymuluje rozwój pędów bocznych. Dotychczas opisano przypadki skutecznej propagacji kilku gatunków z rodzaju *Salvia* bazującej na różnych cytokininach (Cuenca i Amo-Marco, 2000; Grzegorzczak-Karolak i in., 2020a; Miśiń i in., 2006; Petrova i in., 2015; Wysokińska i in., 2004). W przeprowadzonym doświadczeniu zastosowano związki będące pochodnymi puryny, ponieważ zgodnie z danymi literaturowymi, cytokininy z tej grupy bywały zwykle efektywniejsze w namnażaniu



gatunków z rodzaju szałwia w porównaniu z wykorzystywanymi również jako cytokininy pochodnymi mocznika (Grzegorzczak-Karolak i in., 2021b; Petrova i in., 2015). Ze względu na dość słaby potencjał do namnażania transformowanych pędów *S. bulleyana* i ograniczoną ilość materiału roślinnego, którą można było wykorzystać w tym eksperymencie, w doświadczeniu sięgnięto tylko po 3 wybrane cytokininy będące pochodnymi 6-benzyloaminopuryny (BAP): BAPR, BPA i m-Top, które według najnowszych raportów charakteryzują się wyższą skutecznością niż tradycyjne cytokininy (Aremu i in., 2012; Grzegorzczak-Karolak i in., 2023; Kucharska i in., 2020).

Podczas optymalizacji warunków wzrostu pędów transformowanych *S. bulleyana* postanowiono ocenić wpływ tych trzech cytokinin oraz ich stężenia na wzrost, namnażanie oraz produkcję związków polifenolowych, w celu wybrania tej najefektywniej działającej. Wcześniejsze wstępne obserwacje wykazały, że brak cytokininy w podłożu praktycznie uniemożliwiał namnażanie pędów transformowanych tego gatunku. Eksplantaty hodowane na podłożu MS z samą auksyną (0,1 mg/l IAA) tylko sporadycznie regenerowały pojedyncze pąki boczne lub przybyszowe. Za to 50% z nich ukorzeniło się, przy czym średnia liczba korzeni wynosiła 2,8 na eksplantat, a ich średnia długość 1,46 cm. Zjawisko to jest najprawdopodobniej związane z transgenicznym charakterem kultury, bo jedną z cech transformowanych pędów jest ich skłonność do ukorzenia się zwłaszcza, że podłoże wzbogacono auksyną mogącą tę tendencję nasilać (Piątczak i in., 2015).

Dodatek wybranych cytokinin do podłoża wzrostowego w każdej zastosowanej kombinacji skutkowało proliferacją pędów. Jednak jej rodzaj i stężenie miały istotny wpływ na wzrost i morfologię kultury oraz na biosyntezę związków polifenolowych w pędach transformowanych *S. bulleyana*. W optymalnych warunkach możliwe było uzyskanie z jednego eksplantatu nawet ponad 4,5 nowych pędów/pąków. Przy tym warto zaznaczyć, że większość nowopowstałych struktur stanowiły pąki/pędy przybyszowe, które tworzyły się w wyniku zachodzenia organogenezy bezpośredniej – z tkanek lub pośredniej – z kalusa. Jest to dość szczególne zjawisko w rodzaju szałwia, gdzie w większości przypadków podczas procedury proliferacji z wykorzystaniem wierzchołków lub węzłów dominowało namnażanie klonalne z merystemów bocznych (Cuenca i Amo-Marco, 2000; Echeverrigaray i in., 2010; Mederos Molina i in., 1997; Wysokińska i in., 2004).

Spośród zastosowanych cytokinin najkorzystniejszy dla wzrostu i proliferacji pędów *S. bulleyana* okazał się rybozyd BAP-u w stężeniu 1 mg/l. Korzystne działanie BAPR w stężeniach 1 i 2 mg/l zanotowano także dla pędów nietransformowanych tego gatunku ze współczynnikiem proliferacji na poziomie 5,1-5,3 (Grzegorzczuk-Karolak i in., 2023). Jednakże w przypadku kultury niemodyfikowanej genetycznie suplementacja BAPR w wyższych stężeniach skutkowałą zahamowaniem wzrostu pędów i znacznym obniżeniem akumulacji biomasy, czego nie obserwowano w tak istotnym zakresie w kulturze transformowanej. Ograniczone wydłużanie pędów pod wpływem BAPR stwierdzono także dla pędów *S. viridis* (Grzegorzczuk-Karolak i in., 2020a). Silny wpływ BAPR na proliferację może wynikać z jego znacznie wolniejszego metabolizmu w roślinie w porównaniu z BAP. Jak stwierdzono we wcześniejszych badaniach działanie tej cytokininy było długotrwałe i widoczne jeszcze w kolejnym pasażu w postaci opóźnionego i słabego ukorzenia pędów uzyskanych w wyniku namnażania na podłożu uzupełnionym w BAPR (Grzegorzczuk-Karolak i in., 2020a).

Drugim najkorzystniejszym pod względem proliferacji i wzrostu traktowaniem było podłoże z 2 mg/l m-Top. W ostatnim czasie jest wiele doniesień o korzystnym wpływie tej hydroksylowej pochodnej BAP nie tylko na namnażanie i wzrost, ale także na jakość otrzymywanych pędów. Przykładem może być kultura pędów *D. forrestii*, kultury *Musa* sp. czy *Pelargonium x hortorum* L. (Aremu i in., 2012; Weremczuk-Jeżyna i in., 2019; Wojtania, 2010). W większości badań m-Top zwiększał przeżywalność pędów, a w niektórych również sprzyjał ich późniejszemu ukorzeniu. Jednakże w przypadku pędów *S. bulleyana*, chociaż suplementacja m-Top w wyższych stężeniach była korzystna dla wzrostu kultury, nie sprzyjała akumulacji w kulturze związków polifenolowych.

Najwyższy poziom sumy wszystkich analizowanych w materiale roślinnym polifenoli oraz dominującego wśród nich kwasu rozmarynowego stwierdzono w pędach hodowanych na pożywce z dodatkiem 2 mg/l BAPR. Uzyskana w tych warunkach zawartość RA była 3 razy wyższa od tej odnotowanej w nadziemnych częściach 2-letnich roślin macierzystych, a całkowity poziom polifenoli – dwukrotnie wyższy (Grzegorzczuk-Karolak i in., 2020b). Podłoże z dodatkiem BAPR w stężeniu 2 mg/l było też najefektywniejsze dla produkcji kwasów fenolowych w nietransformowanych pędach tego gatunku. Ponadto zawartość RA uzyskana w kulturze niezmienionej genetycznie była dwukrotnie wyższa (33,7 mg/g SM) niż w opisywanych w niniejszej pracy pędach

transformowanych (Grzegorzczuk-Karolak i in., 2023).

Z drugiej strony, w odniesieniu do poszczególnych metabolitów, niejednokrotnie suplementacja innymi cytokininami okazała się bardziej efektywna. I tak najwyższą akumulację kwasów salwianolowych w kulturze pędów transgenicznych *S. bulleyana* stwierdzono w obecności 0,5 mg/l BPA. Uzyskana w tych warunkach zawartość SAK (1,46 mg/g SM) była dwukrotnie wyższa od tej odnotowanej w pędach rośliny gruntowej (Grzegorzczuk-Karolak i in., 2020b). BPA był też cytokininą optymalną dla akumulacji RA w transformowanych pędach *D. forrestii* (24,8 mg/g SM) (Weremczuk-Jeżyna i in., 2019).

W związku z faktem, że wszystkie wybrane do badania cytokininy były efektywne w przypadku namnażania i akumulacji polifenoli w pędach *S. bulleyana*, a wyniki, które obejmowały szereg danych, nie wskazywały jednoznacznie na konkretny wariant doświadczenia jako ten optymalny, w jego wyborze posłużono się analizą TOPSIS. Według ustalonych kryteriów rozwiązaniem najbliższym idealnemu okazało się zastosowanie podłoża zawierającego 1 mg/l BAPR, dla którego wysoki przyrost biomasy oraz współczynnik mnożenia równoważyły nieco niższą akumulację związków polifenolowych.

W ramach optymalizacji warunków wzrostu i produkcji, podjęto również próbę modyfikacji konsystencji podłoża hodowlanego dla pędów transformowanych *S. bulleyana*. W doświadczeniu tym zastosowano kilka wariantów podłoży płynnych: wytrząsane, stacjonarne oraz stacjonarne wykorzystujące materiały podporowe takie jak nanoceluloza bakteryjna oraz pianka poliuretanowa. Prowadzenie kultury w systemach płynnych niesie ze sobą wiele zalet. Jedną z nich jest możliwość zredukowania kosztów hodowli generowanych przez stosowanie środka żelującego oraz przez brak możliwości mechanizacji hodowli w warunkach podłoża stałego (Dandin i Murthy, 2012; Grzegorzczuk-Karolak i in., 2017; Pati i in., 2011).

Dla hodowli transformowanych pędów *S. bulleyana* optymalne okazało się podłoże płynne wykorzystujące jako podporę nanocelulozę. Materiały podporowe zapobiegają pełnemu zanurzeniu eksplantatu w podłożu i zapewniają odpowiednią wymianę gazową. W przypadku badanego gatunku było to konieczne, aby hodowla w systemie płynnym stacjonarnym była efektywna. Kultura prowadzona w podłożu płynnym z podporą celulozową uzyskała współczynnik mnożenia analogiczny do tego

odnotowanego na podłożu stałym. I chociaż sucha masa w tym systemie była o ok. 35% niższa niż pędów na podłożu agarowym, to poziom związków polifenolowych wzrastał dwukrotnie (39,6 mg/g SM), co istotnie zwiększało produktywność i obniżało koszt prowadzenia kultury. Ponadto, materiał podporowy ograniczał występowanie zjawiska szklistości pędów. Zastosowanie filtra wykonanego z celulozy miało również korzystny wpływ na jakość otrzymywanych pędów *Scutellaria laterifolia* L. i generowało optymalne przyrosty ich biomasy (Tascan i in., 2010), a w innym doświadczeniu podpora celulozowa stymulowała proliferację pędów *Scutellaria alpina* L. pozwalając uzyskać najwyższy współczynnik namnażania wśród wszystkich analizowanych w tym doświadczeniu traktowań (Grzegorzczak-Karolak i in., 2017).

Ponadto, tak jak w przypadku *S. bulleyana*, wielokrotnie zaobserwowano pozytywny wpływ zoptymalizowanych systemów płynnych na produkcję związków bioaktywnych. Podłoże płynne z materiałem podporowym w postaci mostka celulozowego okazało się korzystne dla akumulacji polifenoli w kulturze pędów *Hypericum perforatum*, których całkowita zawartość po 40 dniach kultury była dwukrotnie wyższa niż ta uzyskana dla pozostałych wariantów doświadczenia (Savio i in., 2012). Wykorzystanie materiałów podporowych stymulowało także syntezę flawonoidów w pędach *S. alpina* (Grzegorzczak-Karolak i in., 2017) oraz walepatriatów w kulturze *Valeriana glechomifolia* Meyer (Russowski i in., 2006). Wyniki te nie są zaskakujące; poprawa parametrów wzrostu i stymulacja produkcji metabolitów wtórnych w systemach płynnych związana jest z optymalnym dostępem do składników odżywczych i ich ułatwionym poborem przez tkanki roślinne.

Próby hodowli transformowanych pędów *S. bulleyana* w podłożu wytrząsanym, mimo uzyskania dwukrotnie wyższych przyrostów biomasy, nie były korzystne, ponieważ pędy rosnące w tych warunkach charakteryzowały się licznymi anomaliami w morfologii. Mimo odpowiedniego napowietrzenia kultywowanych pędów, wytrząsanie kultury generowało silny stres związany z występującymi podczas rotacji siłami ścinającymi lub/i całkowitym zanurzeniem w podłożu. Skutkowało to szklistością i silną deformacją pędów, które nie nadawały się do kontynuacji hodowli w kolejnych pasażach. Mogły więc tylko służyć jako źródło związków bioaktywnych podczas pojedynczego cyklu hodowlanego. Jednakże akumulacja większości związków polifenolowych w pędach *S. bulleyana* z systemu wytrząsanego była istotnie niższa niż w podłożu stacjonarnym wykorzystującym podporę celulozową.

Jeszcze bardziej wrażliwe na wytrząsanie okazały się pędy *Salvia officinalis*, które wykazywały anomalie morfologiczne prowadzące w ciągu 3 tygodni do ich nekrozy i obumierania (Grzegorzczak i Wysokińska, 2008) oraz *Scutellaria alpina*, które w tych warunkach w ogóle nie podejmowały wzrostu (Grzegorzczak-Karolak i in., 2017). Z drugiej strony kultura *Centaurium erythraea*, pomimo widocznego silnego nawodnienia podczas hodowli wytrząsanej, charakteryzowała się intensywną proliferacją, a namnożone pędy nie były zmienione morfologicznie (Piątczak i in., 2005). Podobnie było w przypadku kultury pędów *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill., która w ciągu 60-dniowego cyklu wzrostu wykazywała prawie dwukrotnie wyższy przyrost biomasy w porównaniu z hodowlą agarową przy zbliżonej produkcji lignanów (Szopa, Kokotkiewicz, Marzec-Wróblewska, i in., 2016). System płynny wytrząsany okazał się też wyjątkowo korzystny dla produkcji bakozydu A w pędach *Bacopa monnieri* (Praveen i in., 2009).

Ostatecznie, opracowanie efektywnego płynnego systemu dla proliferacji pędów *S. bulleyana* charakteryzującego się wysoką produktywnością wykazało, że kultura ta ma w odpowiednich warunkach potencjał do hodowli na większą skalę, w której wykorzystuje się podłoże płynne i jej automatyzację. Doświadczenie z wykorzystaniem podłoży płynnych stanowiło pierwszy krok do hodowli z użyciem bioreaktorów.

### **6.3. Zwiększanie skali hodowli**

Technologia bioreaktorów jest kluczowa dla masowego namnażania wybranych gatunków roślin w ściśle określonych, optymalnych warunkach. Pozwala na obniżenie kosztów hodowli przy jednoczesnej maksymalizacji wzrostu i produkcji kulturowanych roślin. Jednak ze względu na specyfikę, kultury organów wymagają odejścia od tradycyjnych systemów bioreaktorów, które stosuje się w hodowlach komórkowych. W ostatnich latach pojawiło się wiele doniesień na temat nowych systemów hodowli (Valdiani i in., 2019). Jednym z najbardziej obiecujących jest system czasowego zalewania, w którym materiał roślinny zostaje zanurzony w podłożu tylko przez pewien czas w ustalonych odstępach czasu. Jest to niezwykle korzystne dla kultywacji, ponieważ zapobiega całkowitemu zanurzeniu eksplantatów w pożywce, umożliwia uprawę aeroponiczną, naturalną dla roślin lądowych oraz eliminuje występowanie sił ścinających powstających podczas mieszania podłoża (Khan i in., 2018; Weremczuk-Jeżyna i in.,

2020). W związku z wieloma korzyściami systemu czasowego zalewania, bioreaktory na nim bazujące wykorzystano w niniejszej pracy w celu zwiększenia skali hodowli kultury transformowanych korzeni i pędów *S. bulleyana*.

Bioreaktory typu PlantForm i Rita niosą ze sobą wiele zalet, w tym prostotę budowy i obsługi, kompaktowość oraz stworzenie odpowiednich warunków wilgotności i wymiany gazowej (Georgiev i in., 2014). Kluczowymi aspektami hodowli w obu tych systemach jest częstotliwość oraz długość czasu zalewania materiału roślinnego. Są to systemy, które w wielu przypadkach sprzyjają także syntezie związków bioaktywnych. Taką sytuację raportowano dla korzeni włośnikowatych *Beta vulgaris* L. rosnących w bioreaktorach Rita, które charakteryzowały się szybkim wzrostem oraz stabilną produkcją betalain (Pavlov i Bley, 2006). Również korzenie transgeniczne *Centaureum maritimum* (L.) Fritch akumulowały znaczną ilość biomasy oraz więcej związków sekoirydoidowych podczas hodowli w systemie Rita w porównaniu z hodowlą w kolbach Erlenmayera (Miśić i in., 2013).

Hodowlę korzeni włośnikowatych *S. bulleyana* można było z powodzeniem prowadzić zarówno w bioreaktorach typu Rita jak i Plantform, ale uzyskane wyniki zarówno w odniesieniu do produkcji biomasy jak i zawartości związków bioaktywnych uzależnione były od typu naczynia hodowlanego, częstotliwości oraz czasu zalewania. O ile w przypadku bioreaktorów typu PlantForm korzystniejszy okazał się 10 minutowy kontakt z podłożem w odstępach 3 h, to dla systemu Rita efektywniejszy był 3 minutowy czas zalewania co 1,5 h. Trzeba jednak zauważyć, że produkcja uzyskana w przypadku obu systemów zalewowych chociaż wysoka, była niższa od tej uzyskanej w korzeniach transformowanych hodowanych w kolbach Erlenmayera. Warto jednak wspomnieć, że mamy tu do czynienia ze wstępnym doświadczeniem zwiększenia skali hodowli i przyszła optymalizacja takich parametrów jak czas zalewania, częstość zalewania czy wielkość inokulatu mogą istotnie poprawić uzyskane wyniki. Zwłaszcza, że trudno posiłkować się w tym zakresie wcześniejszymi badaniami, ponieważ raporty odnoszące się do wzrostu kultur korzeniowych w bioreaktorach wykorzystujących systemy czasowego zalewania są jeszcze stosunkowo nieliczne. Z drugiej strony zmiana warunków hodowli z wytrząsanej w kolbach na bioreaktorową skutkuje zasadniczą modyfikacją jej warunków i wielokrotnie wiązała się ze zmianami we wzroście i produkcji kultury. Taką obserwację odnotowano w przypadku produkcji kwasu rozmarynowego w transformowanych korzeniach *Salvia officinalis* (Grzegorzczuk

i Wysokińska, 2010), glikozydów sekoirydoidowych w *Centaurium maritimum* (Mišić i in., 2013), diterpenoidów w *Salvia sclarea* (Kuźma i in., 2009) czy serpentyny w kulturze zawieszinowej *Catharanthus roseus* (Scragg i in., 1987).

Znacznie więcej raportów dotyczących hodowli w bioreaktorach z wykorzystaniem systemów czasowego zalewania odnosi się do kultur pędów. Jednocześnie, nierzadko skutkują one istotnie wyższym współczynnikiem proliferacji oraz przyrostem biomasy (De Carlo i in., 2021; Mirzabe i in., 2022). Tak jak w przypadku kultur w podłożach płynnych ma to związek z łatwą dostępnością pędów do składników odżywczych zawartych w pożywce. Jednocześnie regulacja czasu zalewania i hodowla zasadniczo aeroponiczna chroni przed stresem wynikającym z ciągłego zanurzenia i anomaliami związanymi z syndromem szklistości.

Hodowla transformowanych pędów *S. bulleyana* zarówno w bioreaktorach typu PlantForm jak i Rita charakteryzowała się wysoką efektywnością. W obu przypadkach uzyskano istotnie wyższe współczynniki proliferacji i indeksy wzrostu niż w jakimkolwiek innym traktowaniu z udziałem podłoża stałego czy płynnego. Pędy z obu systemów charakteryzowały się też ponad dwukrotnie wyższą całkowitą zawartością polifenoli (PlantForm - 53,0 mg/g SM Rita - 47,9 mg/g SM) od tej raportowanej w pędach rosnących na podłożu stałym, ale również nieco wyższą niż ta uzyskana w kulturze ze zoptymalizowanego podłoża płynnego (podłoże płynne stacjonarne z podporą celulozową). Analogiczne obserwacje poczyniono względem poziomu dominującego w kulturze kwasu rozmarynowego. Co więcej, zawartość RA oznaczona w materiale roślinnym po 5 tygodniowej hodowli w systemach zalewowych stanowiła 7-8-krotność tej którą stwierdzono w pędach rośliny macierzystej z uprawy glebowej (Grzegorzyc-Karolak i in., 2020b). Jednocześnie, tak jak w przypadku kultury korzeni opisane w poniższej pracy doświadczenia zwiększenia skali hodowli są dopiero wstępnymi i wskazana jest optymalizacja przebiegu oraz warunków hodowli, która może służyć poprawie uzyskanych parametrów wzrostu i produkcji.

Zoptymalizowana kultywacja w bioreaktorze PlantForm sprzyjała również akumulacji biomasy i związków bioaktywnych w pędach *S. viridis* pozwalając uzyskać 4-krotnie wyższy współczynnik proliferacji i 2-krotnie wyższy poziom polifenoli w porównaniu do hodowli stałej (Grzegorzyc-Karolak i in., 2022). Ten system hodowli okazał się także niezwykle korzystny dla akumulacji biomasy, namnażania, ukorzeniania

oraz wydłużania pędów *Myrtus communis* L. (Aka Kaçar i in., 2020). Podczas gdy oba stosowane dla kultywacji kultur *S. bulleyana* systemy okazały się również efektywne podczas zwiększania skali hodowli pędów *Schisandra chinensis*, przy czym bioreaktor Rita umożliwił uzyskanie najwyższego przyrostu biomasy kultury, a PlantForm najwyższego poziomu lignanów (Szopa i in., 2017).

#### 6.4. Aktywność biologiczna

Końcowym etapem badań była wstępna ocena aktywności biologicznej uzyskanego materiału roślinnego. Przeprowadzone doświadczenia dotyczyły obszarów działania antyoksydacyjnego, cytotoksycznego oraz przeciwdrobnoustrojowego, które zostały potwierdzone w badaniach nad aktywnością kwasu rozmarynowego będącego związkiem dominującym we wszystkich ekstraktach z transformowanych korzeni oraz pędów *S. bulleyana* (Nadeem i in., 2019).

Większość dotychczasowych testów oceniających aktywność antyoksydacyjną gatunków z rodzaju szalwia bazowało na ich potencjale do zobojętniania wolnych rodników. Wśród nich najpopularniejszy jest ten wykorzystujący stabilny syntetyczny rodnik DPPH. Wartości  $IC_{50}$  uzyskane w tym teście dla kilkudziesięciu gatunków szalwii wahały się w granicach od 2,0 do ponad 500  $\mu\text{g/ml}$  (Firuzi i in., 2013; Kamatou i in., 2010; Pereira i in., 2018). Analiza materiału z nadziemnych i podziemnych części 2-letnich roślin *S. bulleyana* z uprawy glebowej wykazała, że uzyskane wartości  $IC_{50}$ , wynoszące odpowiednio 25,9  $\mu\text{g/l}$  i 32,9  $\mu\text{g/ml}$  (Grzegorzczak-Karolak i in., 2020b), wskazują na silny potencjał antyoksydacyjny gatunku, porównywalny do tego jaki wykazywały *S. verticillata* (33,4  $\mu\text{g/ml}$  dla pędów) (Katanić Stanković i in., 2020), *S. officinalis* (23,2  $\mu\text{g/ml}$  dla pędów i 32,5  $\mu\text{g/ml}$  dla korzeni) (Grzegorzczak i in., 2007), *S. miltiorrhiza* (12,14  $\mu\text{g/ml}$  dla korzeni), *S. przewalskii* (20,01  $\mu\text{g/ml}$  dla korzeni i 6,61  $\mu\text{g/ml}$  dla pędów) (Matkowski i in., 2008) czy *S. greggii* A. Gray (21,1  $\mu\text{g/ml}$  dla pędów) (Pereira i in., 2018).

Wyniki odnotowane w teście neutralizacji rodnika DPPH dla materiału uzyskanego w warunkach *in vitro* mieszczą się we wskazanym dla innych szalwii zakresie, przy czym kultura transformowanych korzeni charakteryzowała się znacznie silniejszą aktywnością (28,9 – 40,5  $\mu\text{g/l}$ ) niż kultura pędów ( $IC_{50} = 127,9 \mu\text{g/l}$ ). Spośród czterech poddawanych selekcji klonów korzeni największą aktywność stwierdzono dla



klonu C4 wykazującego najwyższy poziom polifenoli w tym także kwasu rozmarynowego. Była to wartość zbliżona do tej stwierdzonej dla ekstraktów z dwuletniej rośliny matecznej oraz dla użytego jako kontrola syntetycznego antyoksydantu jakim jest BHT (Grzegorzczuk-Karolak i in., 2020b). Aktywność przeciwrodnikowa wyselekcjonowanego klonu C4 wzrosła istotnie ( $IC_{50} = 11,1 \mu\text{g/ml}$ ) po optymalizacji jego warunków hodowli i poddaniu go elicytacji MJA, co znacznie zwiększyło poziom metabolitów wtórnych.

Podobnie wyglądał przebieg reakcji neutralizacji rodnika ABTS. Jest to metoda polegająca na redukcji barwnego kationorodnika, co skutkuje spadkiem absorbancji mieszaniny. Pomiar spektrofotometryczny został wykonany po 10 min przy długości fali 734 nm (Grzegorzczuk-Karolak i in., 2015). Stężenie potrzebne do zobojętnienia 50% rodnika ABTS wynosiło dla poszczególnych klonów korzeni między 14,4-21,6  $\mu\text{g/ml}$ , a dla ekstraktu z klonu C4 po optymalizacji jego warunków hodowli 6,52  $\mu\text{g/ml}$ . Były to wartości zbliżone do tych odnotowanych dla BHT (12,2  $\mu\text{g/ml}$ ) i w dolnych granicach stwierdzonych dla 16 innych gatunków szalwii (12-70  $\mu\text{g/ml}$ ) badanych przez Kamatou i in. (Kamatou i in., 2010). Tymczasem, wartości uzyskane w teście „wiązania” rodnika ABTS dla rośliny *S. bulleyana* z uprawy gruntowej wynosiły 19,9  $\mu\text{g/ml}$  dla pędów i 34,3  $\mu\text{g/ml}$  dla korzeni (Grzegorzczuk-Karolak i in., 2020b). Ponownie, nieco niższą aktywność odnotowano dla ekstraktu z transformowanych pędów ( $IC_{50} = 37,67 \mu\text{g/ml}$ ).

Testy antyrodnikowe na bazie syntetycznych rodników DPPH i ABTS są często używane do oceny potencjału przeciwutleniającego materiału roślinnego nie tylko w przypadku gatunków z rodzaju *Salvia*, ponieważ opierają się na prostej i szybkiej metodologii oraz są mało kosztowne. W opisywanym screeningu aktywności przeciwutleniającej dodatkowo oceniono właściwości przeciwrodnikowe ekstraktów w stosunku do rodnika nadadtlenkowego. Aktywność wobec anionorodnika nadadtlenkowego ekstraktów z korzeni transformowanych mieściła się w zakresie 83,3-110,7  $\mu\text{g/ml}$ , a po optymalizacji warunków wzrostu, dla klonu C4  $IC_{50}$  osiągnęło wartość 70  $\mu\text{g/ml}$ . Były to wartości wyższe niż te uzyskane dla kontroli (42,7  $\mu\text{g/ml}$ ), ale nadal wskazujące na wysoki potencjał antyoksydacyjny kultury korzeni. Tymczasem reakcja z rodnikiem  $O_2^{\cdot-}$  jest o tyle istotna, że mamy w niej do czynienia z cząsteczką, która naturalnie powstaje w organizmie człowieka i ma istotny udział w patogenezie wielu chorób cywilizacyjnych. I chociaż sam anion nadadtlenkowy nie jest cząstką bardzo reaktywną to stymuluje powstawanie silnych rodników hydroksylowych i tlenu

singletonowego. Podobny zakres zdolności do wychwytywania anionorodnika ponadtlenkowego do tego uzyskanego dla badanych kultur odnotowano dla pędów *S. viridis* (83 µg/ml) i *S. cadmica* (155 µg/ml) czy korzeni rośliny macierzystej *S. bulleyana* (145 µg/ml). Podczas gdy nadziemne części rosnących w gruncie roślin *S. bulleyana* charakteryzowały się nieco wyższą aktywnością, 55 µg/ml (Grzegorzczuk-Karolak i in., 2020b; Grzegorzczuk-Karolak i Kiss, 2018; Piąteczak i in., 2021).

Związki polifenolowe mogą także chronić tkanki przed tworzeniem się wolnych rodników poprzez ich zdolność do chelatowania jonów metali, w tym jonów żelaza, które w organizmie są czynnikami prooksydacyjnymi. Dlatego w badaniach oceniano również zdolność ekstraktów z korzeni klonów C1-C4 oraz pędów transformowanych *S. bulleyana* do redukcji jonów żelaza wykorzystując test FRAP. Jest to test często używany do oceny potencjału przeciwutleniającego ekstraktów roślinnych, który określa ich całkowitą zdolność redukcyjną. Jest to metoda tania i powtarzalna, a reakcja przebiega szybko. Jej wadą jest jednak niska specyficzność. Z drugiej strony wykazano, że wyniki testu FRAP zwykle są silnie skorelowane z całkowitą zawartością związków polifenolowych w ekstrakcie (Prior i in., 2005).

Badane ekstrakty z korzeni i pędów transformowanych wykazywały zdolności redukujące w zakresie 1050–1500 µM Fe(II)/g suchego ekstraktu. Podobne wyniki uzyskano dla nadziemnych i podziemnych części rosnących w gruncie roślin matecznych *S. bulleyana* oraz innych gatunków szalwii (Grzegorzczuk-Karolak i in., 2020b; Grzegorzczuk-Karolak i Kiss, 2018; Piąteczak i in., 2021).

Ostatnim testem antyoksydacyjnym wykorzystanym w poniższej pracy był test TBARS oceniający zdolność ekstraktów do inhibicji utleniania kwasu linolowego. Polega on na oznaczeniu spektrofotometrycznym barwnego połączenia produktu reakcji utleniania lipidów z kwasem tiobarbiturowym (Grzegorzczuk-Karolak i Kiss, 2018). Tym produktem jest dialdehyd malonowy, który powstaje w wyniku peroksydacji lipidów zachodzącego spontanicznie w organizmie człowieka lub w produktach spożywczych.

Ekstrakty z korzeni transformowanych w stężeniu 100 µg/ml wykazywały, zależnie od klonu, aż 40-50% zahamowania utleniania kwasu linolowego. Za to ekstrakt z transformowanych pędów wykazywał znacznie słabszą aktywność (ok. 20%). Były to wyniki zbliżone do inhibicji oksydacji wykazanej odpowiednio dla korzeni i pędów roślin uprawianych w glebie – 40 i 20% (Grzegorzczuk-Karolak i in., 2020b). Tymczasem około

50% inhibicję stwierdzono zarówno dla ekstraktów z korzeni jak i pędów roślin gruntowych *S. officinalis* oraz pędów roślin gruntowych *S. viridis* (Grzegorzczak i in., 2007), (Grzegorzczak-Karolak i Kiss, 2018).

Prowadzone badania udowodniły istotne właściwości przeciwutleniające transformowanych kultur *S. bulleyana*, a zwłaszcza hodowanych w zoptymalizowanych warunkach korzeni włóśnikowatych klonu C4. Jednocześnie potwierdzono, że aktywność antyoksydacyjna ekstraktów jest skorelowana z poziomem związków polifenolowych w badanym materiale roślinnym.

Liczne raporty wskazują, że ekstrakty roślinne posiadające silną aktywność antyoksydacyjną mają też potencjał jako środki w terapii nowotworów. Dotychczas, opisano działanie cytotoksyczne wobec różnych linii komórek nowotworów kilku gatunków szalwii: *S. eremophila*, *S. miltiorrhiza*, *S. officinalis*, *S. cadmica* czy *S. ceratophylla* L. (Firuzi i in., 2013; Y. Jiang i in., 2017; Piąteczak i in., 2021; Uysal i in., 2021). W niniejszej pracy uzyskano istotny efekt cytotoksyczny po zastosowaniu ekstraktu z korzeni włóśnikowatych *S. bulleyana* wobec linii LoVo oraz AGS, które wywodzą się z komórek nowotworów dotyczących przewód pokarmowy, odpowiednio komórek nabłonka gruczołakoraka żołądka i ludzkich komórek nabłonka okrężnicy. Są to wyniki tym bardziej obiecujące, że terapia *per os* nowotworów przewodu pokarmowego pozwala na osiągnięcie w miejscu zmiany znacznie wyższych stężeń związku czynnego niż gdziekolwiek indziej w organizmie. Jest to związane z faktem, że substancja bioaktywna może dotrzeć po podaniu doustnym w postaci niezmienionej do komórek nowotworowych znajdujących się w obrębie przewodu pokarmowego, z pominięciem efektu pierwszego przejścia w wątrobie. Tymczasem efekt ten jest główną przyczyną obserwowanych różnic w aktywności stwierdzonej *in vitro* na liniach komórkowych i *in vivo* na organizmach żywych; w takich przypadkach preparaty podawane *per os* mogą ulegać wielu przemianom metabolicznym i często mogą być inaktywowane lub przekształcane w mniej aktywne formy.

Aktywność cytotoksyczna ekstraktu *S. bulleyana* jest najprawdopodobniej związana z wysoką zawartością w nim kwasu rozmarynowego, którego działanie udokumentowano w wielu doniesieniach naukowych. Okazuje się, że RA indukował apoptozę i hamował proliferację komórek licznych linii nowotworowych takich jak: rak wątroby, prostaty, piersi, jajnika, płuc, białaczki i czerniak. Może on też uwrażliwiać

komórki raka na działanie chemioterapeutyków (Moore i in., 2016). Ostatnie badania wykazały, że kwas rozmarynowy i zawierające go ekstrakty *Salvia fruticosa* Mill. i *S. officinalis*, indukowały apoptozę komórek dwóch linii nowotworów jelita grubego (Xavier i in., 2009). Podczas gdy bogaty w RA ekstrakt z rozmarynu lekarskiego działał cytotoksycznie wobec linii komórkowej raka przewodu pokarmowego zatrzymując cykl komórkowy w fazie G2/M (Karimi i in., 2017). Wartości IC<sub>50</sub> uzyskane w tym ostatnim badaniu wynoszące 4,1, 1,8 oraz 1,3 mg/ml po, odpowiednio, 24, 48 i 72 h ekspozycji na ekstrakt były zbliżone do tych opisanych dla *S. bulleyana*. W literaturze nie ma jeszcze doniesień na temat cytotoksycznej aktywności kwasów salwianolowych zidentyfikowanych w korzeniach włóśnikowatych *S. bulleyana*. Jednakże liczne badania dokumentują silne działanie przeciwnowotworowe kwasów fenolowych o podobnej budowie, tj. kwas salwianolowego A i B, które są bardziej powszechne w roślinach. Wykazano, że w przypadku nowotworu jamy ustnej SAB ograniczał wzrost i procesy angiogenezy komórek raka, a SAA hamował jego zdolność do przerzutów. Ponadto SAB hamował wzrost komórek raka płaskonabłonkowego głowy i szyi poprzez indukcję apoptozy i inhibicję ekspresji COX-2, która ograniczała powstawanie guzów litych (Ma i in., 2019). SAB wykazał również efekt synergistyczny ze środkami chemioterapeutycznymi, takimi jak 5-fluorouracyl, w hamowaniu wzrostu komórek LoVo *in vivo* w sposób zależny od dawki (Guo i in., 2018). Podobnych właściwości można się spodziewać w przypadku innych kwasów salwianolowych takich jak SAE, SAK czy SAF zidentyfikowanych w korzeniach transformowanych *S. bulleyana*. Jednakże, najpierw należy wyizolować te związki z surowca będącego ich bogatym źródłem, aby przeprowadzić odpowiednie testy.

W dzisiejszych czasach, kiedy antybiotyki są nadużywane, a oporność drobnoustrojów wzrasta, istnieje potrzeba pozyskiwania nowych związków o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Potencjał na tym polu mają także surowce pochodzenia roślinnego (Ahmad i Beg, 2001; Holetz i in., 2002). Dlatego w niniejszej pracy dokonano również screeningu potencjału przeciwdrobnoustrojowego ekstraktu z korzeni transformowanych *S. bulleyana* bogatego w związki polifenolowe. W doświadczeniu wykorzystano bakterie Gram+: *Staphylococcus aureus* i *S. epidermidis*, bakterie Gram-: *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*, a także grzyby: *Candida albicans* oraz *C. glabrata*.

Badany ekstrakt okazał się mieć umiarkowane działanie przeciwbakteryjne,

ponieważ zakresy wartości MIC i MBC wynosiły odpowiednio 1,25-2,5 mg/ml oraz 2,5-10 mg/ml. Wyniki te są zbliżone do wartości otrzymanych dla innych gatunków szalwii. Podobną siłę działania przeciwbakteryjnego do ekstraktu *S. bulleyana* przeciwko *S. epidermidis*, a nieco większą w stosunku do *S. aureus* (MIC/MBC: 0,6–1,2 mg/ml/1,25 mg) /mL) i słabszą w stosunku do bakterii Gram-ujemnych stwierdzono dla *S. africana* L. i *S. mexicana* L. (Afonso i in., 2019). Firuzi i wsp. (2013) zanotowali, że metanolowe ekstrakty z części nadziemnych *S. eremophila*, *S. limbata* CA Mey., *S. santolinifolia* Boiss. i *S. sclarea* testowane przeciwko 6 szczepom bakterii Gram+ i Gram- osiągnęły wartości MIC na poziomie 0,3-5 mg/ml. Z czego najsilniejszą aktywność bakteriostatyczną opisano dla *S. eremophila* (Firuzi i in., 2013). Również metanolowo-wodne ekstrakty z części nadziemnych *S. cadmica* wykazały podobną aktywność wobec wybranych bakterii Gram+ (1,25–5 mg/ml), podczas gdy ekstrakt z korzeni tej rośliny charakteryzował się nieco wyższą aktywnością (0,156–2,5 mg/ml) (Piątczak i in., 2021).

Aktywność przeciwgrzybicza badanego ekstraktu *S. bulleyana* okazała się stosunkowo niewielka z MIC i MBC wynoszącymi 10 mg/ml. Podobny poziom aktywności przeciw grzybom z rodzaju *Candida* zanotowano dla *S. tigrina* Hedge & Hub.-Mor. (MIC=6,25-25 mg/ml) i *S. verticillata* (MIC=10 mg/ml) (Dulger i Hacıoglu, 2008; Katanić Stanković i in., 2020). Jednakże dla niektórych gatunków szalwii takich jak *S. cadmica* (0,312-5 mg/ml) czy *S. viridis* (0,312-1,25 mg/ml) stwierdzono istotnie silniejsze działanie przeciwgrzybicze (Grzegorzczak-Karolak i in., 2019; Piątczak i in., 2021).

## 7. Wnioski

- ❖ Potwierdzono, że wszystkie badane kloni korzeni transformowanych *S. bulleyana* (C1-C4) otrzymane w wyniku zakażenia *Rhizobium rhizogenes* zawierają w genomie fragmenty pochodzenia bakteryjnego. Transgeniczny charakter ma również otrzymana w wyniku spontanicznej regeneracji na korzeniach kultura pędów klonu P7.
- ❖ Po selekcji bazującej na ocenie przyrostu biomasy oraz produkcji związków bioaktywnych do dalszych badań wybrano najbardziej obiecującą linię korzeni oznaczoną jako C4.
- ❖ Najefektywniejsza pod względem akumulacji biomasy i produkcji związków polifenolowych okazała się 40-dniowa hodowla korzeni transformowanych w podłożu ½SH z obniżoną do połowy zawartością witamin oraz 3% zawartością cukru prowadzona w ciemności. Uzyskane w tych warunkach TPC oraz poziom RA (93,6 oraz 70,0 mg/g SM) był niemal 2-krotnie wyższy od tego stwierdzonego w korzeniach przed optymalizacją.
- ❖ Elicytacja może być korzystną strategią zwiększenia produkcji polifenoli w korzeniach transformowanych *S. bulleyana*. 3 dniowa ekspozycja kultury na jasmonian metylu w stężeniu 100 µM skutkowała podwojeniem zawartości polifenoli w porównaniu do kontroli. Uzyskane w tych warunkach TPC (124,4 mg/g SM) i zawartość RA (110,2 mg/g SM) były, odpowiednio, 5 i 13-razy wyższe od tych raportowanych dla korzeni dwuletnich roślin macierzystych rosnących w glebie.
- ❖ Wysoki współczynnik namnażania i intensywną produkcję związków polifenolowych w transformowanych pędach odnotowano podczas ich hodowli na podłożu MS z 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l BAPR podczas ekspozycji kultury na światło białe LED. Dodatkowy wzrost produktywności uzyskano po zoptymalizowaniu hodowli w systemie płynnym z wykorzystaniem jako podpory celulozy bakteryjnej. Odnotowana w tych warunkach zawartość polifenoli w pędach wynosiła 39,6 mg/g SM, a RA – 34,4 mg/g SM. Były to poziomy ponad 3-krotnie wyższe od tych stwierdzonych w kulturze przed optymalizacją warunków hodowli oraz ok. 6-krotnie wyższe od tych raportowanych dla pędów dwuletnich roślin macierzystych.

- ❖ Systemy czasowego zalewania Rita i PlantForm umożliwiają efektywne zwiększenie skali hodowli kultur transformowanych organów *S. bulleyana*. We wstępnych badaniach z tego zakresu, szczególnie korzystne okazały się hodowle transgenicznych pędów w obu stosowanych typach bioreaktorów. Jednocześnie zauważono, że pewne parametry takie jak rodzaj naczynia hodowlanego, długość czasu zalewania oraz odstępy między zalewaniami mogą mieć istotny wpływ na produktywność hodowli, co stwarza możliwość dalszej optymalizacji jej warunków.
- ❖ Stwierdzono, że będące bogatym źródłem polifenoli ekstrakty *S. bulleyana* otrzymane z transformowanych organów, zwłaszcza korzeni, charakteryzują się silną aktywnością antyoksydacyjną, która jest skorelowana z zawartością związków bioaktywnych w ekstrakcie.
- ❖ Stwierdzono obiecujący potencjał cytotoksyczny ekstraktu z wysoko produktywnej hodowli korzeni transformowanych względem wszystkich stosowanych w doświadczeniu linii komórek nowotworowych. Jednakże najwrażliwsza na działanie badanego ekstraktu okazała się linia komórkowa nowotworu żołądka – AGS. Jednocześnie, badany ekstrakt w stężeniach do 5 mg/ml nie powodował istotnego spadku żywotności komórek referencyjnej linii mysich fibroblastów, co wskazuje na jego bezpieczeństwo w tym zakresie stężeń.
- ❖ Screening działania przeciwdrobnoustrojowego ekstraktu z korzeni transformowanych rosnących w zoptymalizowanych warunkach wykazał jego umiarkowany potencjał w tym zakresie.

## 8. Streszczenie w języku polskim i angielskim

*Salvia bulleyana* Diels jest rośliną wywodzącą się z chińskiej prowincji Yunnan i stosowaną lokalnie w chińskiej medycynie ludowej jako zamiennik *Danshen*, tj. sproszkowanych korzeni i kłączy *Salvia miltiorrhiza*. Potencjał terapeutyczny tego surowca związany jest z obecnością w nim dwóch głównych grup metabolitów wtórnych polifenoli oraz tanszynonów. Jednakże ograniczona dostępność surowca ze stanowisk naturalnych uniemożliwia jego szczegółową analizę, potwierdzenie potencjału leczniczego czy też powszechne stosowanie. Alternatywną drogą pozyskiwania materiału pochodzenia roślinnego, którą można wykorzystać w takich przypadkach są roślinne kultury *in vitro*. Szczególnie obiecujące w tym zakresie są kultury transgenicznych organów otrzymywane na drodze genetycznej transformacji z zastosowaniem bakterii np. z rodzaju *Rhizobium*.

W związku z wieloma zaletami transformacji genetycznej oraz możliwościami, które daje prowadzenie hodowli w warunkach *in vitro*, celem pracy było zastosowanie wybranych technik biotechnologicznych dla uzyskania wysoko produktywnych kultur korzeni i pędów transformowanych *S. bulleyana*. Fakt transformacji badanych kultur potwierdzono metodą PCR wykorzystując wybrane geny bakteryjne: *aux1*, *aux2*, *rolB*, *rolC* i *rolD*. Następnie do dalszych badań wybrano najbardziej produktywny klon korzeni transformowanych (C4). Optymalizacja warunków wzrostu miała istotny wpływ na produktywność kultury. Wykazano, że 40-dniowa kultura korzeni włośnikowatych w podłożu ½SH zawierającym połowę zawartości witamin i 3% sacharozy prowadzona w ciemności była najkorzystniejsza dla akumulacji biomasy i zawierała dwa razy wyższy poziom polifenoli niż przed optymalizacją. Dalsza stymulacja biosyntezy metabolitów wtórnych była możliwa dzięki 3-dniowej ekspozycji korzeni włośnikowatych na jasmonian metylu w stężeniu 100 µM. Osiągnięty w tych warunkach poziom polifenoli (124,4 mg/g SM) i dominującego w kulturze kwasu rozmarynowego (110,2 mg/g SM) był, odpowiednio, 5 i 13-razy wyższy niż ten raportowany dla korzeni 2-letnich roślin matecznych. Z kolei w przypadku pędów transformowanych, najwyższą zawartość związków polifenolowych (39,6 mg/g SM) i kwasu rozmarynowego (34,4 mg/g) osiągnięto podczas ich 5-tygodniowej kultywacji na świetle białym w płynnym podłożu MS zawierającym 0,1 mg/l IAA oraz 1 mg/l BAPR z podporą celulozową; były to wartości, odpowiednio, 3- i ok. 6-krotnie wyższe od tych stwierdzonych w częściach nadziemnych 2-letnich roślin rosnących w glebie.



Technologia bioreaktorów jest kluczowa dla masowego namnażania wybranych gatunków roślin w ściśle określonych, optymalnych warunkach i pozwala na zautomatyzowanie procesu hodowli, co wiąże się z obniżeniem kosztów produkcji. Próba zwiększenia skali hodowli transformowanych pędów i korzeni *S. bulleyana* w dwóch systemach czasowego zalewania: PlantForm i Rita wykazała, że badane kultury można było z powodzeniem hodować w obu typach bioreaktorów. Uzyskane wyniki uzależnione były od typu naczynia hodowlanego, a także częstotliwości oraz czasu zalewania materiału roślinnego. Szczególnie korzystna okazała się 5-tygodniowa hodowla pędów transgenicznych w systemie Rita, dla której uzyskano 751,4 mg związków polifenolowych na litr podłoża, z czego 693,5 mg stanowił RA, a 28,6 mg – SAK. W przypadku kultury korzeni produktywność uzyskana w przypadku obu systemów zalewowych była wysoka, ale niższa od tej raportowanej w korzeniach transformowanych hodowanych w zoptymalizowanych warunkach w kolbach Erlenmayera.

Na podstawie wyników przeprowadzonych testów antyoksydacyjnych (testy neutralizacji wolnych rodników, test określający zdolność redukcyjną, test inhibicji utleniania lipidów) stwierdzono, że ekstrakty z transformowanych kultur *S. bulleyana* charakteryzują się silną aktywnością przeciwutleniającą, która była porównywalna lub wyższa niż ekstraktów z roślin otrzymanych metodą konwencjonalną. Jednocześnie stwierdzono obiecujący potencjał cytotoksyczny ekstraktu z korzeni transformowanych, będących bogatym źródłem polifenoli, względem wszystkich stosowanych w doświadczeniu linii komórek nowotworowych, a zwłaszcza nowotworów przewodu pokarmowego. Ponadto, ekstrakt z korzeni *S. bulleyana* wykazywał umiarkowane działanie przeciwdrobnoustrojowe.

Podsumowując, selekcja i optymalizacja warunków hodowli pozwoliły uzyskać wydajne hodowle transgenicznych korzeni i pędów *S. bulleyana*. Okazały się one pod względem produktywności jednymi z najlepszych biotechnologicznych źródeł kwasu rozmarynowego i mogą stanowić skuteczne narzędzie do przemysłowej produkcji tego związku oraz innych kwasów fenolowych zidentyfikowanych w tych kulturach. Ponadto, ekstrakt z korzeni *S. bulleyana* wykazywał bardzo silne działanie przeciwutleniające i znaczące działanie cytotoksyczne, będąc jednocześnie względnie bezpiecznym dla zdrowych komórek ssaków. Można więc przypuszczać, że w przyszłości surowiec ten znajdzie zastosowanie w terapii i profilaktyce chorób cywilizacyjnych.

*Salvia bulleyana* Diels derives from Yunnan Province and has been locally used in Traditional Chinese Medicine as a substitute of *Danshen* (micronized roots and rhizome of *Salvia miltiorrhiza*). Therapeutic potential of that species is due to the presence of two main groups of secondary metabolites – tanshinones and polyphenols. However, the restricted availability of the raw material from its natural sites restrains analysis, confirmation of therapeutic potential and its common usage. An alternative way of obtaining the plant material that can be used in such cases are plant *in vitro* cultures. Especially promising are transformed organ cultures which are acquired by genetic transformation with soil bacteria from genus *Rhizobium*.

Due to many advantages of genetic transformation and opportunities offered by *in vitro* cultivation, the aim of this study was to use selected biotechnological techniques to obtain highly productive cultures of transformed roots and shoots of *S. bulleyana*. The incorporation of bacterial DNA fragments was confirmed by PCR method using selected genes: *aux1*, *aux2*, *rolB*, *rolC* and *rolD*. Then, the most productive root clone (C4) was selected for further research. The process of optimization of growth conditions had significant impact on culture productivity. It turned out that a 40-day cultivation in the dark, in ½SH liquid medium containing half of vitamin concentration and 3% sucrose was the most favorable for biomass accumulation and resulted in two-fold increase in the polyphenol content in the plant material compared to the value obtained before optimization. Further stimulation of the biosynthesis of secondary metabolites was possible due to a 3-day exposure of hairy roots to 100 µM of methyl jasmonate. The levels of polyphenols (124,4 mg/g DW) and predominant rosmarinic acid (110,2 mg/g DW) obtained in these conditions were, respectively, 5 and 13-times higher than those reported for the roots of 2-year-old intact plant. On the other hand, in the case of transformed shoots, the highest polyphenol (39,6 mg/g DW) and rosmarinic acid (34,4 mg/g DW) contents were achieved during 5-week cultivation in liquid MS medium supplemented with 0,1 mg/l IAA and 1 mg/l BAPR with bacterial nanocellulose as a supporting material. These values were respectively, 3- and *approx.* 6-times higher than those found in the aerial parts of 2-year-old intact plants.

The technology of bioreactors is crucial for the mass multiplication of selected species in defined, optimal conditions and allows the automatization of the cultivation processes, what associates with the reduction of production costs. An attempt to scale up the culture which included cultivation in temporary immersion systems – PlantForm and

Rita showed that examined cultures of transgenic roots and shoots can be successfully cultivated in both types of bioreactors. It occurred that the results depended on the type of vessel, as well as on the frequency and length of immersion of the plant material. Especially beneficial was the 5-week cultivation of transgenic shoots in the Rita system were obtained in which 751,4 mg of polyphenolic compounds, 693,5 mg of rosmarinic acid and 28,6 mg of salvianolic acid K per liter of medium. In the case of hairy root culture, the productivity obtained in both immersion systems was high, but lower than that reported for roots grown in optimized conditions in Erlenmayer flasks.

Based on the results of antioxidant tests (free radical scavenging assays, reducing capacity assay, inhibition of lipid oxidation assay) it was found that extracts prepared from transformed cultures of *S. bulleyana* were characterized by a strong antioxidant activity, which was comparable or higher than for extracts from plants obtained by conventional methods. Moreover, a promising cytotoxic potential of the rich in polyphenols hairy root extract against all cancer cell lines (especially gastrointestinal cancers) used in the experiment was demonstrated. In addition, hairy root extract exhibited moderate antimicrobial activity.

In conclusion, the selection and optimization of the culture conditions enabled to obtain efficient transformed root and shoot cultures of *S. bulleyana*. They occurred to be one of the best biotechnological sources of rosmarinic acid, in terms of productivity, and can be an effective tool for the industrial production of this compound and also other phenolic acids identified in the plant material. What is more, the hairy root extract of *S. bulleyana* exhibited strong antioxidant and significant cytotoxic activity, while being relatively safe for normal mammalian cells. It can therefore be assumed that in the future, transformed cultures of *Salvia bulleyana* may be used in the therapy and prevention of civilization diseases.

## 9. Bibliografia

1. Abrishamchi, P., Attaran Dowom, S., Radjabian, T., Salami, S.A., 2022. Elicitor-induced phenolic acids accumulation in *Salvia virgata* Jacq. hairy root cultures. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 148, 107–117. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02170-8>
2. Aebi, H.E., 1983. Catalase, w: Bergmeyer, H.U. (Red.), *Methods of enzymatic analysis.* Verlag Chemie Weinheim, New York, ss. 273–286.
3. Afonso, A.F., Pereira, O.R., Fernandes, Â., Calhelha, R.C., Silva, A.M.S., Ferreira, R.C.F., Cardoso, S.M., 2019. Phytochemical composition and bioactive effects of *Salvia africana*, *Salvia officinalis* „Icterina” and *Salvia mexicana* aqueous extracts. *Molecules* 24, 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules24234327>
4. Agrawal, S., Rami, E., 2022. A review: *Agrobacterium*-mediated gene transformation to increase plant productivity. *J. Phytopharm.* 11, 111–117. <https://doi.org/10.31254/phyto.2022.11211>
5. Ahmad, I., Beg, A.Z., 2001. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J. Ethnopharmacol.* 74, 113–123. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00335-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00335-4)
6. Aka Kaçar, Y., Biçen, B., Şimşek, Dönmez, D., Erol, M.H., 2020. Evaluation and comparison of a new type of temporary immersion system (TIS) bioreactors for myrtle (*Myrtus communis* L.). *Appl. Ecol. Environ. Res.* 18, 1611–1620. [https://doi.org/10.15666/aer/1801\\_16111620](https://doi.org/10.15666/aer/1801_16111620)
7. Al-Khayri, J.M., Naik, P.M., 2020. Elicitor-induced production of biomass and pharmaceutical phenolic compounds in cell suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Molecules* 25. <https://doi.org/10.3390/molecules25204669>
8. Altabella, T., Angel, E., Biondi, S., Palazón, J., Bagni, N., Piñol, M.T., 1995. Effect of the *rol* genes from *Agrobacterium rhizogenes* on polyamine metabolism in tobacco roots. *Physiol. Plant.* 95, 479–485. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1995.tb00866.x>
9. Angelova, Z., Georgiev, S., Roos, W., 2006. Elicitation of plants. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 20, 72–83. <https://doi.org/10.1080/13102818.2006.10817345>
10. Angulo-Bejarano, P.I., De la Fuente Jimenez, J.L., Sujay, P., de Donato-Capote, M., Castillo-Malodonado, I., Betanzos-Cabrera, G., Valiente-Banuet, J., Sharma, A., 2019. Cell cultures and hairy roots as platform for production of high-value metabolites: current approaches, limitations and future prospects., w: Sathishkumar, R., Kumar, S.R., Hema, J., Baskar, V. (Red.), *Advances in Plant Transgenics: Methods and Applications.*

Springer, Singapore, ss. 23–57.

11. Aremu, A.O., Bairu, M.W., Szüćová, L., Doležal, K., Finnie, J.F., van Staden, J., 2012. Shoot and root proliferation in „Williams” banana: are the topolins better cytokinins? *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 111, 209–218. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0187-9>
12. Arya, H., Yadav, S.C., Lin, S.-Y., Syed, S.B., Charles, M.R.C., Kannadasan, S., Hsieh, H.-P., Singh, S.S., Gajurel, P.R., Coumar, M.S., 2020. Design of a potent anticancer lead inspired by natural products from traditional Indian medicine. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 38, 3563–3577. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1664326>
13. Astani, A., Navid, M.H., Schnitzler, P., 2014. Attachment and penetration of acyclovir-resistant *Herpes simplex* virus are inhibited by *Melissa officinalis* extract. *Phyther. Res.* 28, 1547–1552. <https://doi.org/10.1002/ptr.5166>
14. Ataei, E., 2013. Application of TOPSIS and fuzzy TOPSIS methods for plant layout design. *World Appl. Sci. J.* 23, 48-53. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2013.23.12.975>
15. Attaran Dowom, S., Abrishamchi, P., Radjabian, T., Salami, S.A., 2017. Enhanced phenolic acids production in regenerated shoot cultures of *Salvia virgata* Jacq. after elicitation with Ag<sup>+</sup> ions, methyl jasmonate and yeast extract. *Ind. Crops Prod.* 103, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.043>
16. Bach, A., Kapczyńska, A., Dziurka, K., Dziurka, M., 2018. The importance of applied light quality on the process of shoot organogenesis and production of phenolics and carbohydrates in *Lachenalia* sp. cultures *in vitro*. *South African J. Bot.* 114, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.10.015>
17. Baenas, N., García-Viguera, C., Moreno, D.A., 2014. Elicitation: A tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules* 19, 13541–13563. <https://doi.org/10.3390/molecules190913541>
18. Bandurska, K., Berdowska, A., Król, M., 2016. Transformacja roślin leczniczych za pomocą *Agrobacterium tumefaciens*. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 70, 1220–1228.
19. Bauer, N., Kiseljak, D., Jelaska, S., 2009. The effect of yeast extract and methyl jasmonate on rosmarinic acid accumulation in *Coleus blumei* hairy roots. *Biol. Plant.* 53, 650–656. <https://doi.org/10.1007/s10535-009-0118-8>
20. Bian, Z.H., Yang, Q.C., Liu, W.K., 2015. Effects of light quality on the accumulation of phytochemicals in vegetables produced in controlled environments: a review. *J. Sci. Food Agric.* 95, 869–877. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6789>
21. Bittner Fialová, S., Kello, M., Čoma, M., Slobodníková, L., Drobná, E., Holková, I.,

- Garajová, M., Mrva, M., Zachar, V., Lukáč, M., 2019. Derivatization of rosmarinic acid enhances its *in vitro* antitumor, antimicrobial and antiprotozoal properties. *Molecules* 24, 1078. <https://doi.org/10.3390/molecules24061078>
22. Bonhomme, V., Laurain-Mattar, D., Fliniaux, M.A., 2000. Effects of the *rolC* gene on hairy root: induction development and tropane alkaloid production by *Atropa belladonna*. *J. Nat. Prod.* 63, 1249–1252. <https://doi.org/10.1021/np990614l>
23. Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci.* 161, 839–851. <https://doi.org/10.1166/jnn.2008.18298>
24. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
25. Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., Bren, U., 2016. Polyphenols: extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules* 21, 901. <https://doi.org/10.3390/molecules21070901>
26. Bu, L., Dai, O., Zhou, F., Liu, F., Chen, J.F., Peng, C., Xiong, L., 2020. Traditional Chinese medicine formulas, extracts, and compounds promote angiogenesis. *Biomed. Pharmacother.* 132, 110855. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110855>
27. Bulgakov, V.P., Veselova, M. V., Tchernoded, G.K., Kiselev, K. V., Fedoreyev, S.A., Zhuravlev, Y.N., 2005. Inhibitory effect of the *Agrobacterium rhizogenes rolC* gene on rabsosiin and rosmarinic acid production in *Eritrichium sericeum* and *Lithospermum erythrorhizon* transformed cell cultures. *Planta* 221, 471–478. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1457-5>
28. Casanova, E., Zuker, A., Trillas, M.I., Moysset, L., Vainstein, A., 2003. The *rolC* gene in carnation exhibits cytokinin- and auxin-like activities. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 97, 321–331. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(02\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00155-3)
29. Chandra, S., 2012. Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnol. Lett.* 34, 407–415. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0785-3>
30. Chaudhuri, K.N., Ghosh, B., Tepfer, D., Jha, S., 2006. Spontaneous plant regeneration in transformed roots and calli from *Tylophora indica*: changes in morphological phenotype and tylophorine accumulation associated with transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* 25, 1059–1066. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0164-z>
31. Chen, C.C., Agrawal, D.C., Lee, M.-R., Lee, R.-J., Kuo, C.-L., Wu, C.-R., Tsay, H.-S.,

- Chang, H.-C., 2016. Influence of LED light spectra on *in vitro* somatic embryogenesis and LC–MS analysis of chlorogenic acid and rutin in *Peucedanum japonicum* Thunb.: a medicinal herb. *Bot. Stud.* 57, 9. <https://doi.org/10.1186/s40529-016-0124-z>
32. Chen, H., Chena, F., Chiu, F.C.K., Lo, C.M.Y., 2001. The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Enzyme Microb. Technol.* 28, 100–105. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00284-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00284-2)
33. Chen, H., Zhang, Q., Wang, X., Yang, J., Wang, Q., 2011. Qualitative analysis and simultaneous quantification of phenolic compounds in the aerial parts of *Salvia miltiorrhiza* by HPLC-DAD and ESI/MS. *Phytochem. Anal.* 22, 247–257. <https://doi.org/10.1002/pca.1272>
34. Chen, I.-G.J., Lee, M.-S., Lin, M.-K., Ko, C.-Y., Chang, W.-T., 2018. Blue light decreases tanshinone IIA content in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots via genes regulation. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 183, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.04.013>
35. Chodiseti, B., Rao, K., Gandi, S., Giri, A., 2012. Abiotic elicitation of gymnemic acid in the suspension cultures of *Gymnema sylvestre*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 741–747. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0870-8>
36. Chung, C.H., Jung, W., Keum, H., Kim, T.W., Jon, S., 2020. Nanoparticles derived from the natural antioxidant rosmarinic acid ameliorate acute inflammatory bowel disease. *ACS Nano* 14, 6887–6896. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c01018>
37. Cioć, M., Szewczyk, A., Żupnik, M., Kalisz, A., Pawłowska, B., 2018. LED lighting affects plant growth, morphogenesis and phytochemical contents of *Myrtus communis* L. *in vitro*. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 132, 433–447. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1340-2>
38. Crane, C., Wright, E., Dixon, R.A., Wang, Z.Y., 2006. Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens*-transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. *Planta* 223, 1344–1354. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0268-2>
39. Cuenca, S., Amo-Marco, J.B., 2000. *In vitro* propagation of two spanish endemic species of *Salvia* through bud proliferation. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 36, 225–229. <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0042-2>
40. Cui, X.-H., Murthy, H.N., Wu, C.H., Paek, K.-Y., 2010. Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 103, 7–14.

<https://doi.org/10.1007/s11240-010-9747-z>

41. Cvetkovikj, I., Stefkov, G., Acevska, J., Stanoeva, J.P., Karapandzova, M., Stefova, M., Dimitrovska, A., Kulevanova, S., 2013. Polyphenolic characterization and chromatographic methods for fast assessment of culinary *Salvia* species from South East Europe. *J. Chromatogr. A* 1282, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.068>
42. Dandin, V.S., Murthy, H.N., 2012. Enhanced *in vitro* multiplication of *Nothapodytes nimmoniana* Graham using semisolid and liquid cultures and estimation of camptothecin in the regenerated plants. *Acta Physiol. Plant.* 34, 1381–1386. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-0934-x>
43. Dang, J., Cui, Y., Pei, J., Yue, H., Liu, Z., Wang, W., Jiao, L., Mei, L., Wang, Q., Tao, Y., Shao, Y., 2018. Efficient separation of four antibacterial diterpenes from the roots of *Salvia prattii* using non-aqueous hydrophilic solid-phase extraction followed by preparative high-performance liquid chromatography. *Molecules* 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23030623>
44. De Carlo, A., Tarraf, W., Lambardi, M., Benelli, C., 2021. Temporary immersion system for production of biomass and bioactive compounds from medicinal plants. *Agronomy* 11. <https://doi.org/10.3390/agronomy11122414>
45. Dewir, Y.H., Chakrabarty, D., Ali, M.B., Hahn, E.J., Paek, K.Y., 2006. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. *Environ. Exp. Bot.* 58, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.06.019>
46. Dilshad, E., Noor, H., Nosheen, N., Gilani, S.R., Ali, U., Khan, M.A., 2021. Influence of rol genes for enhanced biosynthesis of potent natural products, w: ul Islam, S., Bandy, Ja.A. (Red.), *Chemistry of Biologically Potent Natural Products and Synthetic Compounds*. Scrivener Publishing LLC, ss. 379–404. <https://doi.org/10.1002/9781119640929.ch13>
47. Ding, L., Jin, D., Chen, X., 2010. Luteolin enhances insulin sensitivity via activation of PPAR  $\gamma$  transcriptional activity in adipocytes. *J. Nutr. Biochem.* 21, 941–947. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.07.009>
48. Domínguez, M., Avila, J.G., Nieto, A., Céspedes, C.L., 2011. Anti-inflammatory activity of *Penstemon gentianoides* and *Penstemon campanulatus*. *Pharm. Biol.* 49, 118–124. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.503708>
49. Dubrovina, A.S., Kiselev, K. V., Veselova, M. V., Isaeva, G.A., Fedoreyev, S.A., Zhuravlev, Y.N., 2009. Enhanced resveratrol accumulation in *rolB* transgenic cultures of *Vitis amurensis* correlates with unusual changes in CDPK gene expression. *J. Plant*



- Physiol. 166, 1194–1206. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.01.006>
50. Dulger, B., Hacıoglu, N., 2008. Antifungal activity of endemic *Salvia tigrina* in Turkey. Trop. J. Pharm. Res. 7, 1051–1054. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v7i3.14690>
51. Echeverrigaray, S., Carrer, R.P., Andrade, L.B., 2010. Micropropagation of *Salvia guaranitica* Benth. through axillary shoot proliferation. Brazilian Arch. Biol. Technol. 53, 883–888. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000400018>
52. Ehmke, A., Ohmstede, D., Eilert, U., 1995. Steroidal glycoalkaloids in cell and shoot teratoma cultures of *Solanum dulcamara*. Plant Cell. Tissue Organ Cult. 43, 191–197. <https://doi.org/10.1007/BF00052175>
53. Ekiert, H., 2009. Farmaceutyczne aspekty biotechnologii roślin. Część I. Wprowadzenie – metodyka i główne kierunki badawcze. Farm. Pol. 65, 69–77.
54. Elebeedy, D., Elkhatib, W.F., Kandeil, A., Ghanem, A., Kutkat, O., Alnajjar, R., Saleh, M.A., Abd El Maksoud, A.I., Badawy, I., Al-Karmalawy, A.A., 2021. Anti-SARS-CoV-2 activities of tanshinone IIA, carnosic acid, rosmarinic acid, salvianolic acid, baicalein, and glycyrrhetic acid between computational and *in vitro* insights. RSC Adv. 11, 29267–29286. <https://doi.org/10.1039/d1ra05268c>
55. Elmaaty, A.A., Darwish, K.M., Khattab, M., Elhady, S.S., Salah, M., Hamed, M.I.A., Karmalawy, A.A. Al, Saleh, M.M., Salah, M., Hamed, M.I.A., Al-Karmalawy, A.A., Saleh, M.M., 2021. In a search for potential drug candidates for combating COVID-19 : computational study revealed salvianolic acid B as a potential therapeutic targeting 3CLpro and spike proteins. J. Biomol. Struct. Dyn. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1918256>
56. Ertola, R.J., Hours, R., 1998. Role of yeast extract components in microbial cultures not associated with amino acids, vitamins and minerals: a review. Appl. Biol. Sci. 4, 1–15.
57. Fachel, F.N.S., Schuh, R.S., Veras, K.S., Bassani, V.L., Koester, L.S., Henriques, A.T., Braganhol, E., Teixeira, H.F., 2019. An overview of the neuroprotective potential of rosmarinic acid and its association with nanotechnology-based delivery systems: a novel approach to treating neurodegenerative disorders. Neurochem. Int. 122, 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.11.003>
58. Fallarini, S., Miglio, G., Paoletti, T., Minassi, A., Amoruso, A., Bardelli, C., Brunelleschi, S., Lombardi, G., 2009. Clovamide and rosmarinic acid induce neuroprotective effects in *in vitro* models of neuronal death. Br. J. Pharmacol. 157, 1072–1084. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00213.x>
59. Fazal, H., Abbasi, B.H., Ahmad, N., Ali, S.S., Akbar, F., Kanwal, F., 2016. Correlation

- of different spectral lights with biomass accumulation and production of antioxidant secondary metabolites in callus cultures of medicinally important *Prunella vulgaris* L. J. Photochem. Photobiol. B Biol. 159, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.008>
60. Firuzi, O., Miri, R., Asadollahi, M., Eslami, S., Jassbi, A.R., 2013. Cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities and phenolic contents of eleven *Salvia* species from Iran. Iran. J. Pharm. Res. 12, 801–810.
61. Flora of China [WWW Document], 2008. URL <http://www.efloras.org> (udostępniono 3.15.22).
62. Foyer, C.H., Noctor, G., 2016. Stress-triggered redox signalling: what's in pROSpec? Plant Cell Environ. 39, 951–964. <https://doi.org/10.1111/pce.12621>
63. Fraga, B.M., Díaz, C.E., Guadaño, A., González-Coloma, A., 2005. Diterpenes from *Salvia broussonetii* transformed roots and their insecticidal activity. J. Agric. Food Chem. 53, 5200–5206. <https://doi.org/10.1021/jf058045c>
64. Fu, K., Feng, C., Shao, L., Mei, L., Cao, R., 2021. Tanshinone IIA exhibits anti-inflammatory and antioxidative effects in LPS-stimulated bovine endometrial epithelial cells by activating the Nrf2 signaling pathway. Res. Vet. Sci. 136, 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.03.004>
65. Fu, L., Han, B., Zhou, Y., Ren, J., Cao, W., Patel, G., Kai, G., Zhang, J., 2020. The anticancer properties of tanshinones and the pharmacological effects of their active ingredients. Front. Pharmacol. 11, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00193>
66. Gam, D.T., Khoi, P.H., Ngoc, P.B., Linh, L.K., Hung, N.K., Anh, P.T.L., Thu, N.T., Hien, N.T., Khanh, T.D., Ha, C.H., Hoang H., C., 2020. LED lights promote growth and flavonoid accumulation of *Anoectochilus roxburghii* and are linked to the enhanced expression of several related genes. Plants 9, 1344.
67. Gamborg, O.L., 1967. Aromatic metabolism in plants-IV. The interconversion of shikimic acid and quinic acid by enzymes from plant cell cultures. Phytochemistry 6, 1067–1073. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86063-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86063-X)
68. Gelvin, S.B., 2009. *Agrobacterium* in the genomics age. Plant Physiol. 150, 1665–1676. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139873>
69. George, E.F., De Klerk, G.-J., 2008. The components of plant tissue media I: macro- and micro-nutrients, w: George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.-J. (Red.), Plant Propagation by Tissue Culture. Springer Netherlands, Dordrecht, ss. 65–113.
70. Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., Bley, T., 2014. Temporary immersion systems

- in plant biotechnology. *Eng. Life Sci.* 14, 607–621.  
<https://doi.org/10.1002/elsc.201300166>
71. Ghosh, B., Mukherjee, S., Jha, S., 1997. Genetic transformation of *Artemisia annua* by *Agrobacterium tumefaciens* and artemisinin synthesis in transformed cultures. *Plant Sci.* 122, 193–199. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(96\)04558-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(96)04558-X)
  72. Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide dismutases. *Plant Physiol.* 59, 309–314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
  73. Giri, A., Narasu, M.L., 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnol. Adv.* 18, 1–22. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00016-6](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00016-6)
  74. Gornowicz, A., Bielawska, A., Poplawska, B., Bielawski, K., 2019. Mucyna-1 (MUC1) jako obiecujący cel molekularny w terapii przeciwnowotworowej. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 73, 53–64. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0013.0310>
  75. Grishchenko, O. V., Kiselev, K. V., Tchernoded, G.K., Fedoreyev, S.A., Veselova, M. V., Bulgakov, V.P., Zhuravlev, Y.N., 2016. *RoIB* gene-induced production of isoflavonoids in transformed *Maackia amurensis* cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 7479–7489. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7483-y>
  76. Grzegorzczak-Karolak, I., 2020. Optimization of culture conditions and cultivation phase for the growth of *Salvia viridis* transformed roots and polyphenolic compound production. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 142, 571–581. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01883-6>
  77. Grzegorzczak-Karolak, I., Grąbkowska, R., Piątczak, E., 2021a. Plant liquid cultures as a source of bioactive metabolites, w: Ramawat, K.G., Ekiert, H.M., Goyal, S. (Red.), *Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites. Reference Series in Phytochemistry.* Springer International Publishing, Cham, ss. 743–771. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-30185-9\\_33](https://doi.org/10.1007/978-3-030-30185-9_33)
  78. Grzegorzczak-Karolak, I., Hnatuszko-Konka, K., Krzemińska, M., Olszewska, M.A., Owczarek, A., 2021b. Cytokinin-based tissue cultures for stable medicinal plant production: regeneration and phytochemical profiling of *Salvia bulleyana* shoots. *Biomolecules* 11, 1–14. <https://doi.org/10.3390/biom11101513>
  79. Grzegorzczak-Karolak, I., Hnatuszko-Konka, K., Zarzycka, M., Kuźma, Ł., 2020a. The stimulatory effect of purine-type cytokinins on proliferation and polyphenolic compound accumulation in shoot culture of *Salvia viridis*. *Biomolecules* 10, 1–15. <https://doi.org/10.3390/biom10020178>
  80. Grzegorzczak-Karolak, I., Kiss, A.K., 2018. Determination of the phenolic profile and

- antioxidant properties of *Salvia viridis* L. shoots: a comparison of aqueous and hydroethanolic extracts. *Molecules* 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23061468>
81. Grzegorzyc-Karolak, I., Krzemińska, M., Kiss, A.K., Olszewska, M.A., Owczarek, A., 2020b. Phytochemical profile and antioxidant activity of aerial and underground parts of *Salvia bulleyana* Diels. plants. *Metabolites* 10, 1–18. <https://doi.org/10.3390/metabo10120497>
82. Grzegorzyc-Karolak, I., Krzemińska, M., Kiss, A.K., Owczarek-Januszkiewicz, A., Olszewska, M.A., 2023. Role of phytohormones in biomass and polyphenol accumulation in *Salvia bulleyana* *in vitro* culture. *Biomolecules* 13, 227. <https://doi.org/10.3390/biom13020227>
83. Grzegorzyc-Karolak, I., Kuźma, Ł., Lisiecki, P., Kiss, A., 2019. Accumulation of phenolic compounds in different *in vitro* cultures of *Salvia viridis* L. and their antioxidant and antimicrobial potential. *Phytochem. Lett.* 30, 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.02.016>
84. Grzegorzyc-Karolak, I., Kuźma, Ł., Skała, E., Kiss, A.K., 2018. Hairy root cultures of *Salvia viridis* L. for production of polyphenolic compounds. *Ind. Crops Prod.* 117, 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.014>
85. Grzegorzyc-Karolak, I., Kuźma, Ł., Wysokińska, H., 2015. Study on the chemical composition and antioxidant activity of extracts from shoot culture and regenerated plants of *Scutellaria altissima* L. *Acta Physiol. Plant.* 37, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1736-0>
86. Grzegorzyc-Karolak, I., Rytczak, P., Bielecki, S., Wysokińska, H., 2017. The influence of liquid systems for shoot multiplication, secondary metabolite production and plant regeneration of *Scutellaria alpina*. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 128, 479–486. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1126-y>
87. Grzegorzyc-Karolak, I., Staniewska, P., Lebelt, L., Piotrowska, D.G., 2022. Optimization of cultivation conditions of *Salvia viridis* L. shoots in the Platform bioreactor to increase polyphenol production. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 149, 269–280. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02168-2>
88. Grzegorzyc, I., Królicka, A., Wysokińska, H., 2006. Establishment of *Salvia officinalis* L. hairy root cultures for the production of rosmarinic acid. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 61, 351–356. <https://doi.org/10.1515/znc-2006-5-609>
89. Grzegorzyc, I., Matkowski, A., Wysokińska, H., 2007. Antioxidant activity of extracts from *in vitro* cultures of *Salvia officinalis* L. *Food Chem.* 104, 536–541.

- <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.003>
90. Grzegorzczak, I., Wysokińska, H., 2010. Antioxidant compounds in *Salvia officinalis* L. shoot and hairy root cultures in the nutrient sprinkle bioreactor. *Acta Soc. Bot. Pol.* 79, 7–10. <https://doi.org/10.5586/asbp.2010.001>
  91. Grzegorzczak, I., Wysokińska, H., 2009. The effect of methyl jasmonate on production of antioxidant compounds in shoot cultures of *Salvia officinalis* L. *Herba Pol.* 55, 238–243.
  92. Grzegorzczak, I., Wysokińska, H., 2008. Liquid shoot culture of *Salvia officinalis* L. for micropropagation and production of antioxidant compounds; effect of triacontanol. *Acta Soc. Bot. Pol.* 77, 99–104. <https://doi.org/10.5586/asbp.2008.013>
  93. Guerrero, L., Castillo, J., Quiñones, M., Garcia-Vallvé, S., Arola, L., Pujadas, G., Muguerza, B., 2012. Inhibition of angiotensin-converting enzyme activity by flavonoids: structure-activity relationship studies. *PLoS One* 7, e49493. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049493>
  94. Gülçin, I., 2006. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* 217, 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.09.011>
  95. Gunjan, S.K., Lutz, J., Bushong, A., Rogers, D.T., Littleton, J., 2013. Hairy root cultures and plant regeneration in *Solidago nemoralis* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Am. J. Plant Sci.* 4, 1675–1678. <https://doi.org/10.4236/ajps.2013.48203>
  96. Guo, P., Wang, J., Gao, W., Liu, X., Wu, S., Wan, B., Xu, L., Li, Y., 2018. Salvianolic acid B reverses multidrug resistance in nude mice bearing human colon cancer stem cells. *Mol. Med. Rep.* 18, 1323–1334. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9086>
  97. Gutierrez-Valdes, N., Häkkinen, S.T., Lemasson, C., Guillet, M., Oksman-Caldentey, K.M., Ritala, A., Cardon, F., 2020. Hairy root cultures - a versatile tool with multiple applications. *Front. Plant Sci.* 11, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00033>
  98. Habtemariam, S., 2018. Molecular pharmacology of rosmarinic and salvianolic acids: potential seeds for Alzheimer's and vascular dementia drugs. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 458. <https://doi.org/10.3390/ijms19020458>
  99. Halder, M., Roychowdhury, D., Jha, S., 2018. Hairy roots an effective tool of plant biotechnology. Springer Nature Singapore Pte Ltd., Singapore.
  100. Han, J., Wang, D., Ye, L., Li, P., Hao, W., Chen, X., Ma, J., Wang, B., Shang, J., Li, D., Zheng, Q., 2017. Rosmarinic acid protects against inflammation and cardiomyocyte apoptosis during myocardial ischemia/reperfusion injury by activating peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *Front. Pharmacol.* 8, 456. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00456>

101. Han, Y.H., Kee, J.Y., Hong, S.H., 2018. Rosmarinic acid activates AMPK to inhibit metastasis of colorectal cancer. *Front. Pharmacol.* 9, 68. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00068>
102. Hemeda, H.M., Klein, B.P., 1990. Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. *J. Food Sci.* 55, 184–186.
103. Heo, J.Y., Im, D.S., 2019. Anti-allergic effects of salvianolic acid A and tanshinone IIA from *Salvia miltiorrhiza* determined using *in vivo* and *in vitro* experiments. *Int. Immunopharmacol.* 67, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.12.010>
104. Hnatuszko-Konka, K., Łuchniak, P., Wiktorek-Smagur, A., Greszberg, A., Kowalczyk, T., Kononowicz, A.K., 2009. Transformacja roślin za pośrednictwem *Agrobacterium rhizogenes*. *Postępy Biol. komórki* 25, 189–200.
105. Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R., Cortez, D.A.G., Nakamura, C.V., Filho, B.P.D., 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 1027–1031.
106. Hooykaas, P.J.J., Klapwijk, P.M., Nuti, M.P., Schilperoort, R.A., Rörsch, A., 1977. Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* TI plasmid to avirulent *Agrobacteria* and to *Rhizobium* ex planta. *J. Gen. Microbiol.* 98, 477–484. <https://doi.org/10.1099/00221287-98-2-477>
107. Hsieh, C.F., Jheng, J.R., Lin, G.H., Chen, Y.L., Ho, J.Y., Liu, C.J., Hsu, K.Y., Chen, Y.S., Chan, Y.F., Yu, H.M., Hsieh, P.W., Chern, J.H., Horng, J.T., 2020. Rosmarinic acid exhibits broad anti-enterovirus A71 activity by inhibiting the interaction between the five-fold axis of capsid VP1 and cognate sulfated receptors. *Emerg. Microbes Infect.* 9, 1194–1205. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1767512>
108. Hu, Huilin, Zhai, C., Qian, G., Gu, A., Liu, J., Ying, F., Xu, W., Jin, D., Wang, H., Hu, Haizhen, Zhang, Y., Tang, G., 2015. Protective effects of tanshinone IIA on myocardial ischemia reperfusion injury by reducing oxidative stress, HMGB1 expression, and inflammatory reaction. *Pharm. Biol.* 53, 1752–1758. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1005753>
109. Huang, L., Zhu, J., Zheng, M., Zou, R., Zhou, Y., Zhu, M., 2018. Tanshinone IIA protects against subclinical lipopolysaccharide induced cardiac fibrosis in mice through inhibition of NADPH oxidase. *Int. Immunopharmacol.* 60, 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.04.036>
110. Huttunen, S., Toivanen, M., Liu, C., Tikkanen-Kaukanen, C., 2016. Novel

- anti-infective potential of salvianolic acid B against human serious pathogen *Neisseria meningitidis*. *BMC Res. Notes* 9, 25. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-1838-4>
111. Jiang, G., Liu, J., Ren, B., Zhang, L., Owusu, L., Liu, L., Zhang, J., Tang, Y., Li, W., 2017a. Anti-tumor and chemosensitization effects of cryptotanshinone extracted from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. on ovarian cancer cells *in vitro*. *J. Ethnopharmacol.* 205, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.04.026>
112. Jiang, Y., Zhang, L., Rupasinghe, H.P.V., 2017b. Antiproliferative effects of extracts from *Salvia officinalis* L. and *Salvia miltiorrhiza* Bunge on hepatocellular carcinoma cells. *Biomed. Pharmacother.* 85, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.113>
113. Jing, Z., Fei, W., Zhou, J., Zhang, L., Chen, L., Zhang, X., Liang, X., Xie, J., Fang, Y., Sui, X., Han, W., Pan, H., 2016. Salvianolic acid B, a novel autophagy inducer, exerts antitumor activity as a single agent in colorectal cancer cells. *Oncotarget* 7, 61509–61519. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11385>
114. Jung, S.H., Seol, H.J., Jeon, S.J., Son, K.H., Lee, J.R., 2009. Insulin-sensitizing activities of tanshinones, diterpene compounds of the root of *Salvia miltiorrhiza* Bunge 16, 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.017>
115. Kamatou, G.P.P., Viljoen, A.M., Steenkamp, P., 2010. Antioxidant, antiinflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species. *Food Chem.* 119, 684–688. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.010>
116. Kamizela, A., Gawdzik, B., Urbaniak, M., Lechowicz, Ł., Białonska, A., Kutniewska, S.E., Gonciarz, W., Chmiela, M., 2019. New  $\gamma$ -Halo- $\delta$ -lactones and  $\delta$ -Hydroxy- $\gamma$ -lactones with strong cytotoxic activity. *Molecules* 24, 1875. <https://doi.org/10.3390/molecules24101875>
117. Karimi, N., Rashedi, J., Poor, B.M., Arabi, S., Ghorbani, M., Tahmasebpour, N., Asgharzadeh, M., 2017. Cytotoxic effect of rosemary extract on gastric adenocarcinoma (AGS) and esophageal squamous cell carcinoma (KYSE30) cell lines. *Gastroenterol. Hepatol. from Bed to Bench* 10, 102–107.
118. Kasimu, R., Tanaka, K., Tezuka, Y., Gong, Z.-N., Li, J.-X., Basnet, P., Namba, T., Kadota, S., 1998. Comparative study of seventeen *Salvia* plants: aldose reductase inhibitory activity of water and MeOH extracts and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis of water extracts. *Chem. Pharm. Bull.* 46, 500–504. <https://doi.org/10.1248/cpb.46.500>
119. Katanić Stanković, J.S., Srećković, N., Mišić, D., Gašić, U., Imbimbo, P., Monti,

- D.M., Mihailović, V., 2020. Bioactivity, biocompatibility and phytochemical assessment of lilac sage, *Salvia verticillata* L. (Lamiaceae) - a plant rich in rosmarinic acid. *Ind. Crops Prod.* 143, 111932. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111932>
120. Katary, M.A., Abdelsayed, R., Alhashim, A., Abdelhasib, M., Elmarakby, A.A., 2019. Salvianolic Acid B Slows the Progression of breast cancer cell growth via enhancement of apoptosis and reduction of oxidative stress, inflammation and angiogenesis. *Mol. Sci.* 20, 5653. <https://doi.org/10.3390/ijms20225653>
121. Kentsop, R.A.D., Iobbi, V., Donadio, G., Ruffoni, B., De Tommasi, N., Bisio, A., 2021. Abietane diterpenoids from the hairy roots of *Salvia corrugata*. *Molecules* 26, 5144. <https://doi.org/10.3390/molecules26175144>
122. Kępa, M., Mikłasińska-Majdanik, M., Wojtyczka, R.D., Idzik, D., Korzeniowski, K., Smoleń-Dzirba, J., Wąsik, T.J., 2018. Antimicrobial potential of caffeic acid against *Staphylococcus aureus* clinical strains. *Biomed Res. Int.* 2018, 7413504. <https://doi.org/10.1155/2018/7413504>
123. Khamse, S., Sadr, S.S., Roghani, M., Hasanzadeh, G., Mohammadian, M., 2015. Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect in the kainate rat model of temporal lobe epilepsy: underlying mechanisms. *Pharm. Biol.* 53, 1818–1825. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1010738>
124. Khan, S.A., Siddiqui, M.H., Osama, K., 2018. Bioreactors for hairy roots culture: a review. *Curr. Biotechnol.* 7, 417–427. <https://doi.org/10.2174/2211550108666190114143824>
125. Kim, E.J., Jung, S.N., Son, K.H., Kim, S.R., Ha, T.Y., Park, M.G., Jo, I.G., Park, J.G., Choe, W., Kim, S.S., Ha, J., 2007. Antidiabetes and antiobesity effect of cryptotanshinone via activation of AMP-activated protein kinase. *Mol. Pharmacol.* 72, 62–72. <https://doi.org/10.1124/mol.107.034447>
126. Kim, S.J., Hahn, E.J., Heo, J.W., Paek, K.Y., 2004. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets *in vitro*. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 101, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2003.10.003>
127. Kiviharju, E., Moisander, S., Laurila, J., 2005. Improved green plant regeneration rates from oat anther culture and the agronomic performance of some DH lines. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 81, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-1560-0>
128. Knurek, J., Buchaj, A., 2017. Działanie chemioterapeutyczne i przeciwnowotworowe luteoliny. *Oncol. Radiother.* 4, 64–72.
129. Kochan, E., Szymczyk, P., Kúzma, Ł., Szymńska, G., Wajs-Bonikowska, A.,



- Bonikowski, R., Sienkiewicz, M., 2018. The increase of triterpene saponin production induced by trans-Anethole in hairy root cultures of *Panax quinquefolium*. *Molecules* 23, 2674. <https://doi.org/10.3390/molecules23102674>
130. Kohlmünzer, S., 1998. *Farmakognozja: podręcznik dla studentów farmacji.*, Wydanie V. ed. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
131. Kołodziejczyk-Czepas, J., Szejka, M., Pawlak, A., Żbikowska, H.M., 2015. Właściwości przeciwutleniające kwasu kawowego i jego pochodnych. *Żywność. Nauk. Technol. Jakość.* 3, 5–17. <https://doi.org/10.15193/zntj/2015/100/035>
132. Kołwzan, B., 2011. Analiza zjawiska biofilmu - warunki jego powstawania i funkcjonowania. *Ochr. Środowiska* 33, 3–14.
133. Kowalczyk, S., Bandurski, R.S., 1991. Enzymic synthesis of 1-O-(indol-3-ylacetyl)-b-d-glucose. Purification of the enzyme from *Zea mays*, and preparation of antibodies to the enzyme. *Biochem. J.* 279, 509–514.
134. Kucharska, D., Orlikowska, T., Maciorowski, R., Kunka, M., Wójcik, D., Pluta, S., 2020. Application of meta-Topolin for improving micropropagation of gooseberry (*Ribes grossularia*). *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 272, 109529. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109529>
135. Kumar, Suresh, Kashyap, P., Chowdhury, S., Kumar, Shivani, Panwar, A., Kumar, A., 2021. Identification of phytochemicals as potential therapeutic agents that binds to Nsp15 protein target of coronavirus (SARS-CoV-2) that are capable of inhibiting virus replication. *Phytomedicine* 85, 153317. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153317>
136. Kuźma, Ł., Bruchajzer, E., Wysokińska, H., 2009. Methyl jasmonate effect on diterpenoid accumulation in *Salvia sclarea* hairy root culture in shake flasks and sprinkle bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.* 44, 406–410. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.01.005>
137. Kuźma, Ł., Kisiel, W., Królicka, A., Wysokińska, H., 2011. Genetic transformation of *Salvia austriaca* by *Agrobacterium rhizogenes* and diterpenoid isolation. *Pharmazie* 66, 904–907. <https://doi.org/10.1691/ph.2011.1586>
138. Kuźma, Ł., Skrzypek, Z., Wysokińska, H., 2006. Diterpenoids and triterpenoids in hairy roots of *Salvia sclarea*. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 84, 171–179. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-9018-6>
139. Langland, J., Jacobs, B., Wagner, C.E., Ruiz, G., Cahill, T.M., 2018. Antiviral activity of metal chelates of caffeic acid and similar compounds towards *Herpes simplex*,

- VSV-Ebola pseudotyped and vaccinia viruses. *Antiviral Res.* 160, 143–150.  
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.10.021>
140. Lee, D.S., Lee, S.H., Noh, J.G., Hong, S.D., 1999. Antibacterial activities of cryptotanshinone and dihydrotanshinone i from a medicinal herb, *Salvia miltiorrhiza* bunge. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 2236–2239.  
<https://doi.org/10.1271/bbb.63.2236>
141. Lee, S.Y., Lee, C.Y., Eom, S.H., Kim, Y.K., Park, N., Park, S.U., 2010. Rosmarinic acid production from transformed root cultures of *Nepeta cataria* L. *Sci. Res. Essays* 5, 1122–1126.
142. Li, B., Wang, B., Li, H., Peng, L., Ru, M., Liang, Z., Yan, X., Zhu, Y., 2016. Establishment of *Salvia castanea* Diels f. *tomentosa* Stib. hairy root cultures and the promotion of tanshinone accumulation and gene expression with Ag+, methyl jasmonate, and yeast extract elicitation. *Protoplasma* 253, 87–100. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0790-9>
143. Li, C., Liu, B., Wang, Z., Xie, F., Qiao, W., Cheng, J., Kuang, J., Wang, Y., Zhang, M., Liu, D., 2020a. Salvianolic acid B improves myocardial function in diabetic cardiomyopathy by suppressing IGFBP3. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 139, 98–112.  
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.01.009>
144. Li, J., Li, B., Luo, L., Cao, F., Yang, B., Gao, J., Yan, Y., Zhang, G., Peng, L., Hu, B., 2020b. Increased phenolic acid and tanshinone production and transcriptional responses of biosynthetic genes in hairy root cultures of *Salvia przewalskii* Maxim. treated with methyl jasmonate and salicylic acid. *Mol. Biol. Rep.* 47, 8565–8578.  
<https://doi.org/10.1007/s11033-020-05899-1>
145. Li, L., Wang, J., Wang, W., Lu, Y., Wang, Y., Zhou, G., Kai, G., 2008c. Optimization of induction and culture conditions and tropane alkaloid production in hairy roots of *Anisodus acutangulus*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 13, 606–612.  
<https://doi.org/10.1007/s12257-008-0035-2>
146. Li, M.-H., Chen, J.-M., Peng, Y., Wu, Q., Xiao, P.-G., 2008a. Investigation of *Danshen* and related medicinal plants in China. *J. Ethnopharmacol.* 120, 419–426.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.09.013>
147. Li, M.-H., Chen, J.-M., Peng, Y., Xiao, P.-G., 2008b. Distribution of phenolic acids in Chinese *Salvia* plants. *World Sci. Technol.* 10, 46–52.  
[https://doi.org/10.1016/s1876-3553\(09\)60025-9](https://doi.org/10.1016/s1876-3553(09)60025-9)
148. Li, M.-H., Li, Q.-Q., Liu, Y.-Z., Cui, Z.-H., Zhang, N., Huang, L.-Q., Xiao, P.-G.,

- 2013a. Pharmacophylogenetic study on plants of genus *Salvia* L. from China. Chinese Herb. Med. 5, 164–181. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1674-6348.2013.03.001>
149. Li, M.-H., Li, Q., Zhang, C., Zhang, N., Cui, Z., Huang, L., Xiao, P.-G., 2013b. An ethnopharmacological investigation of medicinal *Salvia* plants (*Lamiaceae*) in China. Acta Pharm. Sin. B 3, 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2013.06.001>
150. Li, M.-H., Peng, Y., Xiao, P.G., 2010. Distribution of tanshinones in the genus *Salvia* (family *Lamiaceae*) from China and its systematic significance. J. Syst. Evol. 48, 118–122. <https://doi.org/10.1111/j.1759-6831.2010.00070.x>
151. Li, X., Park, S.J., Jin, F., Deng, Y., Yang, J.H., Chang, J., Kim, D., Kim, J., Lee, Y.J., Murakami, M., Ho, K., Chang, H.W., 2018. Tanshinone IIA suppresses FcεRI - mediated mast cell signaling and anaphylaxis by activation of the Sirt1 / LKB1 / AMPK pathway. Biochem. Pharmacol. 152, 362–372. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.04.015>
152. Li, Y., Gong, Y., Li, L., Abdolmaleky, H.M., Zhou, J.-R., 2013c. Bioactive tanshinone I inhibits the growth of lung cancer in part via downregulation of aurora A function. Mol. Carcinog. 52, 535–543. <https://doi.org/10.1002/mc.21888>
153. Liang, Z., Wu, L., Deng, X., Liang, Q., Xu, Y., Deng, R., Lv, L., Ji, M., Hao, Z., He, J., 2020. The antioxidant rosmarinic acid ameliorates oxidative lung damage in experimental allergic asthma via modulation of NADPH oxidases and antioxidant enzymes. Inflammation 43, 1902–1912. <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01264-3>
154. Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., 2001. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. Curr. Protoc. Food Anal. Chem. 1, F4.3.1-F4.3.8. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>
155. Lin, W.Y., Yu, Y.J., Jinn, T.R., 2019. Evaluation of the virucidal effects of rosmarinic acid against enterovirus 71 infection via *in vitro* and *in vivo* study. Virol. J. 16, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1203-z>
156. Lin, Z., Bao, Y., Hong, B., Wang, Y., Zhang, X., Wu, Y., 2021. Salvianolic acid B attenuated cisplatin-induced cardiac injury and oxidative stress via modulating Nrf2 signal pathway. J. Toxicol. Sci. 46, 199–207.
157. Liu, M., Li, Y.G., Zhang, F., Yang, L., Chou, G.X., Wang, Z.T., Hu, Z.B., 2007. Chromatographic fingerprinting analysis of *Danshen* root (*Salvia miltiorrhiza* radix et rhizoma) and its preparations using high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray mass spectrometry (HPLC-DAD-ESI/MS). J. Sep. Sci. 30, 2256–2267. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700149>
158. Lloyd, G., McCown, B., 1980. Commercially-feasible micropropagation of

- mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Int. Plant Propagators' Soc. 30, 421–427.
159. Lobiuc, A., Vasilache, V., Pintilie, O., Stoleru, T., Burducea, M., Oroian, M., Zamfirache, M.M., 2017. Blue and red LED illumination improves growth and bioactive compounds contents in acyanic and cyanic *Ocimum basilicum* L. microgreens. *Molecules* 22, 2111. <https://doi.org/10.3390/molecules22122111>
160. Long, J.H., Pu, M., Huang, Z.W., Li, J.P., Xu, Z.G., 2018. Research progress of spectral regulation of plant growth and development. *China Illum. Eng. J.* 29, 8–16.
161. Luo, C., Zou, L., Sun, H., Peng, J., Gao, C., Bao, L., Ji, R., Jin, Y., Sun, S., 2020a. A review of the anti-inflammatory effects of rosmarinic acid on inflammatory diseases. *Front. Pharmacol.* 11, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00153>
162. Luo, Y., Song, L., Wang, X., Huang, Y., Liu, Y., Wang, Q., Hong, M., Yuan, Z., 2020b. Uncovering the mechanisms of cryptotanshinone as a therapeutic agent against hepatocellular carcinoma. *Front. Pharmacol.* 11, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01264>
163. Luo, Z., Wu, R., 1989. A simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway. *Plant Mol. Biol. Report.* 7, 69–77. <https://doi.org/10.1007/BF02668692>
164. Lv, B., Deng, L., Xie, T., Wei, X., Liu, X., Tan, W., Wang, X., Gao, X., 2021. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant pharmacodynamic components of naoxintong capsules as a basis of broad spectrum effects. *Pharm. Biol.* 59, 242–251. <https://doi.org/10.1080/13880209.2020.1870506>
165. Ma, L., Tang, L., Yi, Q., 2019. Salvianolic acids: Potential source of natural drugs for the treatment of fibrosis disease and cancer. *Front. Pharmacol.* 10, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00097>
166. Ma, Z., Yang, J., Yang, Y., Wang, X., Chen, G., Shi, A., Lu, Y., Jia, S., Kang, X., Lu, L., 2020. Rosmarinic acid exerts an anticancer effect on osteosarcoma cells by inhibiting DJ-1 via regulation of the PTEN-PI3K-Akt signaling pathway. *Phytomedicine* 68, 153186. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153186>
167. Majumdar, S., Garai, S., Jha, S., 2011. Genetic transformation of *Bacopa monnieri* by wild type strains of *Agrobacterium rhizogenes* stimulates production of bacopa saponins in transformed calli and plants. *Plant Cell Rep.* 30, 941–954. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1035-9>
168. Manivannan, A., Soundararajan, P., Halimah, N., Ko, C.H., Jeong, B.R., 2015.

- Blue LED light enhances growth, phytochemical contents and antioxidant enzyme activities of *Rehmannia glutinosa* cultured *in vitro* 56, 105–113. <https://doi.org/10.1007/s13580-015-0114-1>
169. Manzoor, M.F., Ahmad, N., Ahmed, Z., Siddique, R., Zeng, X.-A., Rahaman, A., Aadil, R.M., Wahab, A., 2019. Novel extraction techniques and pharmaceutical activities of luteolin and its derivatives. *J. Food Biochem.* 43, e12974. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12974>
170. Mao, J., Zhang, Jian, Lam, C.S.P., Zhu, M., Yao, C., Chen, S., Liu, Z., Wang, F., Wang, Y., Dai, X., Niu, T., An, D., Miao, Y., Xu, T., Dong, B., Ma, X., Zhang, F., Wang, Xiaolong, Fan, R., Zhao, Y., Jiang, T., Zhang, Y., Wang, Xianliang, Hou, Y., Zhao, Z., Su, Q., Zhang, Junhua, Wang, B., Zhang, B., 2020. Qishen Yiqi dripping pills for chronic ischaemic heart failure: results of the CACT-IHF randomized clinical trial. *ESC Hear. Fail.* 7, 3881–3890. <https://doi.org/10.1002/ehf2.12980>
171. Marchev, A., Georgiev, V., Ivanov, I., Badjakov, I., Pavlov, A., 2011. Two-phase temporary immersion system for *Agrobacterium rhizogenes* genetic transformation of sage (*Salvia tomentosa* Mill.). *Biotechnol. Lett.* 33, 1873–1878. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0625-5>
172. Marchev, A.S., Vasileva, L. V., Amirova, K.M., Savova, M.S., Koycheva, I.K., Balcheva-Sivenova, Z.P., Vasileva, S.M., Georgiev, M.I., 2021. Rosmarinic acid - from bench to valuable applications in food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 117, 182–193. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.015>
173. Mathur, A., Mathur, A.K., Gangwar, A., Yadav, S., Verma, P., Sangwan, R.S., 2010. Anthocyanin production in a callus line of *Panax sikkimensis* Ban. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 46, 13–21. <https://doi.org/10.1007/s11627-009-9253-3>
174. Matkowski, A., Zielińska, S., Oszmiański, J., Lamer-Zarawska, E., 2008. Antioxidant activity of extracts from leaves and roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, *S. przewalskii* Maxim., and *S. verticillata* L. *Bioresour. Technol.* 99, 7892–7896. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.013>
175. Mederos Molina, S., Amaro Luis, J.M., Luis, J.G., 1997. *In vitro* mass propagation of *Salvia canariensis* by axillary shoots. *Acta Soc. Bot. Pol.* 66, 351–354. <https://doi.org/10.5586/asbp.1997.043>
176. Mehrotra, S., Goel, M.K., Rahman, L.U., Kukreja, A.K., 2013. Molecular and chemical characterization of plants regenerated from Ri-mediated hairy root cultures of *Rauwolfia serpentina*. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 114, 31–38.

<https://doi.org/10.1007/s11240-013-0302-6>

177. Merkli, A., Christen, P., Kapetanidis, I., 1997. Production of diosgenin by hairy root cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. *Plant Cell Rep.* 16, 632–636. <https://doi.org/10.1007/BF01275505>
178. Messeha, S.S., Zarmouh, N.O., Asiri, A., Soliman, K.F.A., 2020. Rosmarinic acid-induced apoptosis and cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.* 885, 173419. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173419>
179. Min, J., Shen, H., Xi, W., Wang, Q., Yin, L., Zhang, Y., Yu, Y., Yang, Q., Wang, Z., 2018. Synergistic anticancer activity of combined use of caffeic acid with paclitaxel enhances apoptosis of non-small-cell lung cancer H1299 cells *in vivo* and *in vitro*. *Cell. Physiol. Biochem.* 48, 1433–1442. <https://doi.org/10.1159/000492253>
180. Mirzabe, A.H., Hajiahmad, A., Fadavi, A., Rafiee, S., 2022. Temporary immersion systems (TISs): a comprehensive review. *J. Biotechnol.* 357, 56–83. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.08.003>
181. Mirzaei, S., Gholami, M.H., Zabolian, A., Saleki, H., Farahani, M.V., Hamzehlou, S., Far, F.B., Sharifzadeh, S.O., Samarghandian, S., Khan, H., Aref, A.R., Ashrafzadeh, M., Zarrabi, A., Sethi, G., 2021. Caffeic acid and its derivatives as potential modulators of oncogenic molecular pathways: new hope in the fight against cancer. *Pharmacol. Res.* 171, 105759. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105759>
182. Mišić, D., Grubišić, D., Konjević, R., 2006. Micropropagation of *Salvia brachyodon* through nodal explants. *Biol. Plant.* 50, 473–476. <https://doi.org/10.1007/s10535-006-0074-5>
183. Mišić, D., Šiler, B., Skorić, M., Djurickovic, M.S., Nestorović Živković, J., Jovanović, V., Giba, Z., 2013. Secoiridoid glycosides production by *Centaureum maritimum* (L.) Fritch hairy root cultures in temporary immersion bioreactor. *Process Biochem.* 48, 1587–1591. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.07.015>
184. Modarres, M., Asili, J., Lahouti, M., Gangali, A., Iranshahy, M., Sahebkar, A., 2014. Simultaneous determination of rosmarinic acid, salvianolic acid B and caffeic acid in *Salvia leriifolia* Benth. root, leaf and callus extracts using a high-performance liquid chromatography with diode-array detection technique. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 37, 1721–1730. <https://doi.org/10.1080/10826076.2013.807466>
185. Mohini, J., Deshpande, J.D., 2010. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *Int. J. Biomed. Res.* 1, 81–97.
186. Moore, J., Yousef, M., Tsiani, E., 2016. Anticancer effects of rosemary

- (*Rosmarinus officinalis* L.) extract and rosemary extract polyphenols. *Nutrients* 8, 731.  
<https://doi.org/10.3390/nu8110731>
187. Morrow, R.C., 2008. LED lighting in horticulture. *HortScience* 43, 1947–1950.  
<https://doi.org/10.21273/hortsci.43.7.1947>
188. Murakami, Y., Omoto, T., Asai, I., Shimomura, K., Yoshihira, K., Ishimaru, K., 1998. Rosmarinic acid and related phenolics in transformed root cultures of *Hyssopus officinalis*. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 53, 75–78.  
<https://doi.org/10.1023/A:1006007707722>
189. Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with *Tobacco* tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497.
190. Nadeem, M., Imran, M., Gondal, T.A., Imran, A., Shahbaz, M., Amir, R.M., Sajid, M.W., Qaisrani, T.B., Atif, M., Hussain, G., Salehi, B., Ostrander, E.A., Martorell, M., Sharifi-Rad, J., Cho, W.C., Martins, N., 2019. Therapeutic potential of rosmarinic acid: a comprehensive review. *Appl. Sci.* 9, 3139.
191. Nakao, M., Fukushima, T., 1934. On the chemical composition of *Salvia miltiorrhiza* (Chinese drug Tan-shen). *Yakugaku Zasshi* 54, 844–858.
192. Ngo, Y.L., Lau, C.H., Chua, L.S., 2018. Review on rosmarinic acid extraction, fractionation and its anti-diabetic potential. *Food Chem. Toxicol.* 121, 687–700.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.064>
193. Nikolova, M., Aneva, I., 2018. European species of genus *Salvia*: distribution, chemodiversity and biological activity, w: Georgiev, V., Pavlov, A. (Red.), *Salvia Biotechnology*. Springer International Publishing, Cham, ss. 1–30.  
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-73900-7>
194. Norouzi, R., Babalar, M., Mirmasoumi, M., 2017. Investigation of hairy root induction in some *Salvia* L. species. *Nov. Biol. Reper.* 4, 173–180.  
<https://doi.org/10.21859/acadpub.nbr.4.2.173>
195. Nussbaumer, P., Kapétanidis, I., Christen, P., 1998. Hairy roots of *Datura candida* x *D. aurea*: effect of culture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis. *Plant Cell Rep.* 17, 405–409. <https://doi.org/10.1007/s002990050415>
196. 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 Biotechnol.* 21, 393–396.  
<https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.21.393>

197. Oğuz, A., Böyük, A., Ekinci, A., Alabalik, U., Türkoglu, A., Tuncer, M.C., Ekingen, A., Devenci, E., Gültürk, B., Aday, U., 2020. Investigation of antioxidant effects of rosmarinic acid on liver, lung and kidney in rats: a biochemical and histopathological study. *Folia Morphol. (Warsz)*. 79, 288–295. <https://doi.org/10.5603/FM.a2019.0087>
198. Ouzounis, T., Parjikolaei, B.R., Fretté, X., Rosenqvist, E., Ottosen, C.-O., 2015. Predawn and high intensity application of supplemental blue light decreases the quantum yield of PSII and enhances the amount of phenolic acids, flavonoids, and pigments in *Lactuca sativa*. *Front. Plant Sci.* 6, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00019>
199. Ożarowski, M., Piasecka, A., Gryszczyńska, A., Sawikowska, A., Pietrowiak, A., Opala, B., Mikołajczak, P., Kujawski, R., Kachlicki, P., Buchwald, W., Seremak-Mrozikiewicz, A., 2017. Determination of phenolic compounds and diterpenes in roots of *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia przewalskii* by two LC–MS tools: Multi-stage and high resolution tandem mass spectrometry with assessment of antioxidant capacity. *Phytochem. Lett.* 20, 331–338. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.12.001>
200. Paciello, F., Pino, A. Di, Rolesi, R., Troiani, D., Paludetti, G., Grassi, C., Fetoni, A.R., 2020. Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of caffeic acid: *in vivo* evidences in a model of noise-induced hearing loss. *Food Chem. Toxicol.* 143, 111555. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111555>
201. Pal, A., Swain, S.S., Mukherjee, A.K., Chand, P.K., 2013. Agrobacterium pRI TL-DNA rolB and TR-DNA opine genes transferred to the spiny amaranth (*Amaranthus spinosus* L.), a nutraceutical crop. *Food Technol. Biotechnol.* 51, 26–35.
202. Park, W.T., Yeo, S.K., Sathasivam, R., Park, J.S., Kim, J.K., Park, S.U., 2020. Influence of light-emitting diodes on phenylpropanoid biosynthetic gene expression and phenylpropanoid accumulation in *Agastache rugosa*. *Appl. Biol. Chem.* 63, 25. <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00510-4>
203. Parus, A., 2013. Przeciwwutleniające i farmakologiczne właściwości kwasów fenolowych. *Postępy Fitoter.* 1, 48–53.
204. Pati, P.K., Kaur, J., Singh, P., 2011. A liquid culture system for shoot proliferation and analysis of pharmaceutically active constituents of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 105, 299–307. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9868-4>
205. Pattananandecha, T., Apichai, S., Julsrigival, J., Ungsurungsie, M., Kawasaki, N., Saenjum, C., 2021. Antioxidant activity and anti-photoaging effects on UVA-irradiated human fibroblasts of rosmarinic acid enriched extract prepared from *Thunbergia*



- laurifolia leaves. *Plants* 10, 1648. <https://doi.org/10.3390/plants10081648>
206. Pavlov, A., Bley, T., 2006. Betalains biosynthesis by *Beta vulgaris* L. hairy root culture in a temporary immersion cultivation system. *Process Biochem.* 41, 848–852. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.10.026>
207. Pelinson, L.P., Assmann, C.E., Palma, T.V., da Cruz, I.B.M., Pillat, M.M., Mânica, A., Stefanello, N., Weis, G.C.C., de Oliveira Alves, A., de Andrade, C.M., Ulrich, H., Morsch, V.M.M., Schetinger, M.R.C., Bagatini, M.D., 2019. Antiproliferative and apoptotic effects of caffeic acid on SK-Mel-28 human melanoma cancer cells. *Mol. Biol. Rep.* 46, 2085–2092. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04658-1>
208. Pereira, O.R., Catarino, M.D., Afonso, A.F., Silva, A.M.S., Cardoso, S.M., 2018. *Salvia elegans*, *Salvia greggii* and *Salvia officinalis* decoctions: antioxidant activities and inhibition of carbohydrate and lipid metabolic enzymes. *Molecules* 23, 3169. <https://doi.org/10.3390/molecules23123169>
209. Pérez-Fons, L., Garzón, M.T., Micol, V., 2010. Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order. *J. Agric. Food Chem.* 58, 161–171. <https://doi.org/10.1021/jf9026487>
210. Pesaraklu, A., Radjabian, T., Salami, S.A., 2021. Methyl jasmonate and Ag<sup>+</sup> as effective elicitors for enhancement of phenolic acids contents in *Salvia officinalis* and *Salvia verticillata*, as two traditional medicinal plants. *South African J. Bot.* 141, 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.04.032>
211. Petersen, M., Abdullah, Y., Benner, J., Eberle, D., Gehlen, K., Hücherig, S., Janiak, V., Kim, K.H., Sander, M., Weitzel, C., Wolters, S., 2009. Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry* 70, 1663–1679. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.05.010>
212. Petersen, M., Simmonds, M.S.J., 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62, 121–125. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00513-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00513-7)
213. Petrova, M., Nikolova, M., Dimitrova, L., Zayova, E., 2015. Micropropagation and evaluation of flavonoid content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* L. *Genet. Plant Physiol.* 5, 48–60.
214. Phillips, G.C., Garda, M., 2019. Plant tissue culture media and practices: an overview. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 55, 242–257. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09983-5>
215. Piątczak, E., Królicka, A., Wielanek, M., Wysokińska, H., 2012. Hairy root

- cultures of *Rehmannia glutinosa* and production of iridoid and phenylethanoid glycosides. *Acta Physiol. Plant.* 34, 2215–2224. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1022-y>
216. Piątczak, E., Królicka, A., Wysokińska, H., 2006. Genetic transformation of *Centaureum erythraea* Rafn by *Agrobacterium rhizogenes* and the production of secoiridoids. *Plant Cell Rep.* 25, 1308–1315. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0155-0>
217. Piątczak, E., Kuźma, Ł., Skała, E., Żebrowska, M., Balcerczak, E., Wysokińska, H., 2015. Iridoid and phenylethanoid glycoside production and phenotypical changes in plants regenerated from hairy roots of *Rehmannia glutinosa* Libosch. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 122, 259–266. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0727-1>
218. Piątczak, E., Owczarek, A., Lisiecki, P., Gonciarz, W., Kozłowska, W., Szemraj, M., Chmiela, M., Kiss, A.K., Olszewska, M.A., Grzegorzczak-Karolak, I., 2021. Identification and quantification of phenolic compounds in *Salvia cadmica* Boiss. and their biological potential. *Ind. Crops Prod.* 160, 113113. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113113>
219. Piątczak, E., Wielanek, M., Wysokińska, H., 2005. Liquid culture system for shoot multiplication and secoiridoid production in micropropagated plants of *Centaureum erythraea* Rafn. *Plant Sci.* 168, 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.08.013>
220. Pitta-Alvarez, S.I., Spollansky, T.C., Giulietti, A.M., 2000. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 252–258. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00137-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00137-4)
221. Prasad, A., Mathur, A., Singh, M., Gupta, M.M., Uniyal, G.C., Lal, R.K., Mathur, A.K., 2012. Growth and asiaticoside production in multiple shoot cultures of a medicinal herb, *Centella asiatica* (L.) Urban, under the influence of nutrient manipulations. *J. Nat. Med.* 66, 383–387. <https://doi.org/10.1007/s11418-011-0588-9>
222. Praveen, N., Naik, P.M., Manohar, S.H., Nayeem, A., Murthy, H.N., 2009. *In vitro* regeneration of brahmi shoots using semisolid and liquid cultures and quantitative analysis of bacoside A. *Acta Physiol. Plant.* 31, 723–728. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0284-5>
223. Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
224. Radtke, O.A., Foo, L.Y., Lu, Y., Kiderlen, A.F., Kolodziej, H., 2003. Evaluation

- of sage phenolics for their antileishmanial activity and modulatory effects on interleukin-6, interferon and tumour necrosis factor- $\alpha$ -release in RAW 264.7 cells. *Zeitschrift für Naturforsch. C* 58, 395–400. <https://doi.org/10.1515/znc-2003-5-618>
225. Radziejewska, I., Supruniuk, K., Bielawska, A., 2021. Anti-cancer effect of combined action of anti-MUC1 and rosmarinic acid in AGS gastric cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.* 902, 174119. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174119>
226. Ran, X., Zhao, W., Li, W., Shi, J., Chen, X., 2016. Cryptotanshinone inhibits TNF- $\alpha$ -induced LOX-1 expression by suppressing reactive oxygen species (ROS) formation in endothelial cells. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 20, 347–355. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2016.20.4.347>
227. Rao, K., Chodisetti, B., Gandi, S., Giri, A., Kavi Kishor, P.B., 2021. Cadmium chloride elicitation of *Abutilon indicum* cell suspension cultures for enhanced stigmasterol production. *Plant Biosyst. - an Int. J. Deal. with all Asp. Plant Biol.* 156, 613–618. <https://doi.org/10.1080/11263504.2021.1891151>
228. Read, P.E., Preece, J.E., 2003. Environmental management for optimizing micropropagation. *Acta Hort.* 616, 49–58. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.616.2>
229. Różańska, D., Regulska-Ilow, B., 2019. Znaczenie flawonoidów w redukcji ciśnienia tętniczego krwi – wybrane aspekty. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 73, 173–181.
230. Ruffoni, B., Bertoli, A., Pistelli, Laura, Pistelli, Luisa, 2016. Micropropagation of *Salvia wagneriana* Polak and hairy root cultures with rosmarinic acid production. *Nat. Prod. Res.* 30, 2538–2544. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1120725>
231. Russowski, D., Maurmann, N., Rech, S.B., Fett-Neto, A.G., 2006. Role of light and medium composition on growth and valepotriate contents in *Valeriana glechomifolia* whole plant liquid cultures. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 86, 211–218. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9109-z>
232. Santos, P.A.G., Figueiredo, A.C., Oliveira, M.M., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Deans, S.G., Scheffer, J.J.C., 2005. Growth and essential oil composition of hairy root cultures of *Levisticum officinale* W.D.J. Koch (lovage). *Plant Sci.* 168, 1089–1096. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.12.009>
233. Santos, P.M., Figueiredo, A.C., Oliveira, M.M., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Deans, S.G., Younus, A.K.M., Scheffer, J.J.C., 1998. Essential oils from hairy root cultures and from fruits and roots of *Pimpinella anisum*. *Phytochemistry* 48, 455–460. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00022-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00022-3)

234. Savio, L.E.B., Astarita, L.V., Santarém, E.R., 2012. Secondary metabolism in micropropagated *Hypericum perforatum* L. grown in non-aerated liquid medium. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 108, 465–472. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0058-9>
235. Scarpati, M.L., Oriente, G., 1958. Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal rosmarinus off.). *Rice Sci.* 28, 2329–2333.
236. Schenk, R.U., Hildebrandt, A.C., 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50, 199–204.
237. Scragg, A.H., Morris, P., Allan, E.J., Fowler, M.W., 1987. Effect of scale-up on serpentine formation by *Catharanthus roseus* suspension cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 9, 619–624.
238. Sha, W., Zhou, Y., Ling, Z.-Q., Xie, G., Pang, X., Wang, P., Gu, X., 2018. Antitumor properties of salvianolic acid B against triple-negative and hormone receptor-positive breast cancer cells via ceramide-mediated apoptosis. *Oncotarget* 9, 36331–36343.
239. Shang, A.J., Yang, Y., Wang, H.Y., Tao, B.Z., Wang, J., Wang, Z.F., Zhou, D.B., 2017. Spinal cord injury effectively ameliorated by neuroprotective effects of rosmarinic acid. *Nutr. Neurosci.* 20, 172–179. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2015.1103460>
240. Sharma, Y., Fagan, J., Schaefer, J., 2019. Medicinal properties of garden sage (*Salvia officinalis* L.). *J. Pharmacogn. Phytochem.* 8, 3139–3148.
241. Shilpha, J., Satish, L., Kavikkuil, M., Joe Virgin Largia, M., Ramesh, M., 2015. Methyl jasmonate elicits the solasodine production and anti-oxidant activity in hairy root cultures of *Solanum trilobatum* L. *Ind. Crops Prod.* 71, 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.083>
242. Shinde, A.N., Malpathak, N., Fulzele, D.P., 2010. Impact of nutrient components on production of the phytoestrogens daidzein and genistein by hairy roots of *Psoralea corylifolia*. *J. Nat. Med.* 64, 346–353. <https://doi.org/10.1007/s11418-010-0419-4>
243. Shkryl, Y.N., Veremeichik, G.N., Bulgakov, V.P., Tchernoded, G.K., Mischenko, N.P., Fedoreyev, S.A., Zhuravlev, Y.N., 2008. Individual and combined effects of the *rolA*, *B*, and *C* genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 118–125. <https://doi.org/10.1002/bit.21727>
244. Skąła, E., Picot, L., Bijak, M., Saluk-Bijak, J., Szemraj, J., Kicel, A., Olszewska, M.A., Sitarek, P., 2019. An efficient plant regeneration from *Rhaponticum carthamoides* transformed roots, enhanced caffeoylquinic acid derivatives production in pRi-

- transformed plants and their biological activity. *Ind. Crops Prod.* 129, 327–338. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.020>
245. Slobodníková, L., Fialová, S., Hupková, H., Grančai, D., 2013. Rosmarinic acid interaction with planktonic and biofilm *Staphylococcus aureus*. *Nat. Prod. Commun.* 8, 1747–1750. <https://doi.org/10.1177/1934578x1300801223>
246. Souza, P.A. de, Rodrigues, C., Santiago, A.P.S.A., Lucas, N.C. de, Leitao, G.G., Filho, A.G., 2011. Antioxidant activity of natural compounds of *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, *Verbenaceae*, by scavenger of mitochondrial reactive oxygen species. *Brazilian J. Pharmacogn.* 21, 420–426. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000050>
247. Srivastava, S., Conlan, X.A., Adholeya, A., Cahill, D.M., 2016. Elite hairy roots of *Ocimum basilicum* as a new source of rosmarinic acid and antioxidants. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 126, 19–32. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-0973-x>
248. Stohs, S.J., Bagchi, D., Hassoun, E., Bagchi, M., 2001. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 20, 201–213.
249. Sui, H., Zhao, J., Zhou, L., Wen, H., Deng, W., Li, C., Ji, Q., Liu, X., Feng, Y., Chai, N., Zhang, Q., Cai, J., Li, Q., 2017. Tanshinone IIA inhibits  $\beta$ -catenin/VEGF-mediated angiogenesis by targeting TGF- $\beta$ 1 in normoxic and HIF-1 $\alpha$  in hypoxic microenvironments in human colorectal cancer. *Cancer Lett.* 403, 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.05.013>
250. Swarup, V., Ghosh, J., Ghosh, S., Saxena, A., Basu, A., 2007. Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3367–3370. <https://doi.org/10.1128/AAC.00041-07>
251. Szopa, A., Kokotkiewicz, A., Luczkiewicz, M., Ekiert, H., 2017. *Schisandra* lignans production regulated by different bioreactor type. *J. Biotechnol.* 247, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.02.007>
252. Szopa, A., Kokotkiewicz, A., Marzec-Wróblewska, U., Bucinski, A., Luczkiewicz, M., Ekiert, H., 2016. Accumulation of dibenzocyclooctadiene lignans in agar cultures and in stationary and agitated liquid cultures of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 3965–3977. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7230-9>
253. Szopa, A., Starzec, A., Ekiert, H., 2018. The importance of monochromatic lights

- in the production of phenolic acids and flavonoids in shoot cultures of *Aronia melanocarpa*, *Aronia arbutifolia* and *Aronia* × *prunifolia*. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 179, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.01.005>
254. Tada, H., Murakami, Y., Omoto, T., Shimomura, K., Ishimaru, K., 1996. Rosmarinic acid and related phenolics in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry* 42, 431–434. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00005-2](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00005-2)
255. Tariq, U., Ali, M., Abbasi, B.H., 2014. Morphogenic and biochemical variations under different spectral lights in callus cultures of *Artemisia absinthium* L. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 130, 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.11.026>
256. Tascan, A., Adelberg, J., Tascan, M., Rimando, A., Joshee, N., Yadav, A.K., 2010. Hyperhydricity and flavonoid content of *Scutellaria* species *in vitro* on polyester-supported liquid culture systems. *HortScience* 45, 1723–1728. <https://doi.org/10.21273/hortsci.45.11.1723>
257. Tepe, B., Eminagaoglu, O., Akpulat, H.A., Aydin, E., 2007. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. *Food Chem.* 100, 985–989. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.062>
258. Topçu, G., 2006. Bioactive triterpenoids from *Salvia* species. *J. Nat. Prod.* 69, 482–487. <https://doi.org/10.1021/np0600402>
259. Toplan, G.G., Kurkcuoglu, M., Goger, F., İşcan, G., Ağalar, H.G., Mat, A., Baser, K.H.C., Koyuncu, M., Sarıyar, G., 2017. Composition and biological activities of *Salvia veneris* Hedge growing in Cyprus. *Ind. Crops Prod.* 97, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.055>
260. Torkamani, M.R.D., Jafari, M., Abbaspour, N., Heidary, R., Safaie, N., 2014. Enhanced production of valerenic acid in hairy root culture of *Valeriana officinalis* by elicitation. *Cent. Eur. J. Biol.* 9, 853–863. <https://doi.org/10.2478/s11535-014-0320-3>
261. Tripathi, L., Tripathi, J.N., 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. *Trop. J. Pharm. Res.* 2, 243–253. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v2i2.14607>
262. Tuleja, M., 2013. Transformacja genowa roślin metodą balistyczną (mikrowstrzeliwanie) na przykładzie słonecznika *Helianthus annuus* L. *Wszechświat* 114, 244–247.
263. Tusevski, O., Vinterhalter, B., Krstić Milošević, D., Soković, M., Ćirić, A., Vinterhalter, D., Zdravković Korać, S., Petreska Stanoeva, J., Stefova, M., Gadzovska Simic, S., 2017. Production of phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial

- activities in hairy root and shoot cultures of *Hypericum perforatum* L. Plant Cell. Tissue Organ Cult. 128, 589–605. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1136-9>
264. Ullah, M.A., Tungmunnithum, D., Garros, L., Hano, C., Abbasi, B.H., 2019. Monochromatic lights-induced trends in antioxidant and antidiabetic polyphenol accumulation in *in vitro* callus cultures of *Lepidium sativum* L. J. Photochem. Photobiol. B Biol. 196, 111505. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.05.002>
265. Uysal, S., Zengin, G., Sinan, K.I., Ak, G., Ceylan, R., Mahomoodally, M.F., Uysal, A., Sadeer, N.B., Jekő, J., Cziáky, Z., Rodrigues, M.J., Yıldızıtugay, E., Elbasan, F., Custodio, L., 2021. Chemical characterization, cytotoxic, antioxidant, antimicrobial, and enzyme inhibitory effects of different extracts from one sage (*Salvia ceratophylla* L.) from Turkey: open a new window on industrial purposes. RSC Adv. 11, 5295–5310. <https://doi.org/10.1039/d0ra10044g>
266. Valdiani, A., Hansen, O.K., Nielsen, U.B., Johannsen, V.K., Shariat, M., Georgiev, M.I., Omidvar, V., Ebrahimi, M., Tavakoli Dinanai, E., Abiri, R., 2019. Bioreactor-based advances in plant tissue and cell culture: challenges and prospects. Crit. Rev. Biotechnol. 39, 20–34. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1489778>
267. Veena, V., Taylor, C.G., 2007. *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. Vit. Cell. Dev. Biol. - Plant 43, 383–403. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9096-8>
268. Vereshchagina, Y. V., Bulgakov, V.P., Grigorchuk, V.P., Rybin, V.G., Veremeichik, G.N., Tchernoded, G.K., Gorpenchenko, T.Y., Koren, O.G., Phan, N.H.T., Minh, N.T., Chau, L.T., Zhuravlev, Y.N., 2014. The *rolC* gene increases caffeoylquinic acid production in transformed artichoke cells. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98, 7773–7780. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5869-2>
269. Verma, P., Mathur, A.K., Shanker, K., 2012. Growth, alkaloid production, *rol* genes integration, bioreactor up-scaling and plant regeneration studies in hairy root lines of *Catharanthus roseus*. Plant Biosyst. 146, 27–40. <https://doi.org/10.1080/11263504.2011.649797>
270. Verma, P.C., ur Rahman, L., Negi, A.S., Jain, D.C., Khanuja, S.P.S., Banerjee, S., 2007. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Picrorhiza kurroa* Royle ex Benth.: establishment and selection of superior hairy root clone. Plant Biotechnol. Rep. 1, 169–174. <https://doi.org/10.1007/s11816-007-0029-0>
271. Walker, J.B., Sytsma, K.J., 2007. Staminal evolution in the genus *Salvia* (*Lamiaceae*): Molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the staminal lever.

Ann. Bot. 100, 375–391. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl176>

272. Wang, B.Q., 2010. *Salvia miltiorrhiza* chemical and pharmacological review of a medicinal plant. J. Med. Plants Res. 4, 2813–2820.
273. Wang, C., Luo, H., Xu, Y., Tao, L., Chang, C., Shen, X., 2018. Salvianolic acid B-alleviated angiotensin II induces cardiac fibrosis by suppressing NF- $\kappa$ B pathway *in vitro*. Med. Sci. Monit. 24, 7654–7664. <https://doi.org/10.12659/MSM.908936>
274. Wang, J., Xu, H., Jiang, H., Du, X., Sun, P., Xie, J., 2012. Neurorescue effect of rosmarinic acid on 6-hydroxydopamine-lesioned nigral dopamine neurons in rat model of Parkinson's disease. J. Mol. Neurosci. 47, 113–119. <https://doi.org/10.1007/s12031-011-9693-1>
275. Wang, Q.J., Zheng, L.P., Yuan, H.Y., Wang, J.W., 2013. Propagation of *Salvia miltiorrhiza* from hairy root explants via somatic embryogenesis and tanshinone content in obtained plants. Ind. Crops Prod. 50, 648–653. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.031>
276. Weremczuk-Jeżyna, I., Grzegorzczuk-Karolak, I., Frydrych, B., Królicka, A., Wysokińska, H., 2013. Hairy roots of *Dracocephalum moldavica*: rosmarinic acid content and antioxidant potential. Acta Physiol. Plant. 35, 2095–2103. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1244-7>
277. Weremczuk-Jeżyna, I., Kuźma, Ł., Grzegorzczuk-Karolak, I., 2021. The effect of different light treatments on morphogenesis, phenolic compound accumulation and antioxidant potential of *Dracocephalum forrestii* transformed shoots cultured *in vitro*. J. Photochem. Photobiol. B Biol. 224, 112329. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112329>
278. Weremczuk-Jeżyna, I., Lisiecki, P., Gonciarz, W., Kuźma, Ł., Szemraj, M., Chmiela, M., Grzegorzczuk-Karolak, I., 2020. Transformed shoots of *Dracocephalum forrestii* W. W. Smith from different bioreactor systems as a rich source of natural phenolic compounds. Molecules 25, 4533. <https://doi.org/10.3390/molecules25194533>
279. Weremczuk-Jeżyna, I., Skała, E., Kuźma, Ł., Kiss, A.K., Grzegorzczuk-Karolak, I., 2019. The effect of purine-type cytokinin on the proliferation and production of phenolic compounds in transformed shoots of *Dracocephalum forrestii*. J. Biotechnol. 306, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.09.014>
280. Weremczuk-Jeżyna, I., Skała, E., Olszewska, M.A., Kiss, A.K., Balcerczak, E., Wysokińska, H., Kicel, A., 2016. The identification and quantitative determination of rosmarinic acid and salvianolic acid B in hairy root cultures of *Dracocephalum forrestii*



- W.W. Smith. Ind. Crops Prod. 91, 125–131.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.07.002>
281. Wojciechowska, M., 2017. Transformacja *Salvia bulleyana* Diels przy użyciu *Agrobacterium rhizogenes*. Uniwersytet Medyczny w Łodzi.
282. Wojtania, A., 2010. Effect of meta-topolin on *in vitro* propagation of *Pelargonium x hortorum* and *Pelargonium x hederacifolium* cultivars. Acta Soc. Bot. Pol. 79, 101–106.
283. Woźny, A., 2012. Zastosowanie światła w kontroli wzrostu i rozwoju roślin ozdobnych. Pr. Inst. Elektrotechniki 225, 225–227.
284. Wysokińska, H., 2000. Wytwarzanie metabolitów wtórnych w kulturach korzeni transformowanych. Biotechnologia 4, 32–39.
285. Wysokińska, H., Biologii Botaniki Farmaceutycznej, Z., Grzegorzczak, I., Wysokińska Zakład Biologii Botaniki, H., 2004. Mikrorozmnażanie *Salvia officinalis* L. z wierzchołków pędów. Biotechnologia 2, 212–218.
286. Xavier, C.P.R., Lima, C.F., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C., 2009. *Salvia fruticosa*, *Salvia officinalis* and rosmarinic acid induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: the role in MAPK/ERK pathway. Nutr. Cancer 61, 564–571. <https://doi.org/10.1080/01635580802710733>
287. Xing, B., Yang, D., Liu, L., Han, R., Sun, Y., Liang, Z., 2018a. Phenolic acid production is more effectively enhanced than tanshinone production by methyl jasmonate in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. Plant Cell. Tissue Organ Cult. 134, 119–129. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1405-x>
288. Xing, B., Yang, D., Yu, H., Zhang, B., Yan, K., Zhang, X., Han, R., Liang, Z., 2018b. Overexpression of SmbHLH10 enhances tanshinones biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. Plant Sci. 276, 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.07.016>
289. Xu, F., Cao, S., Shi, L., Chen, W., Su, X., Yang, Z., 2014. Blue light irradiation affects anthocyanin content and enzyme activities involved in postharvest strawberry fruit. J. Agric. Food Chem. 62, 4778–4783. <https://doi.org/10.1021/jf501120u>
290. Xu, H., Park, J.H., Kim, Y.K., Park, N. Il, Lee, S.Y., Park, S.U., 2009. Optimization of growth and pyranocoumarins production in hairy root culture of *Angelica gigas* Nakai. J. Med. Plants Res. 3, 978–981.
291. Xu, J., Wei, K., Zhang, G., Lei, L., Yang, D., Wang, W., Han, Q., Xia, Y., Bi, Y., Yang, M., Li, M., 2018. Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of Chinese *Salvia* species: a review. J. Ethnopharmacol. 225, 18–30.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.06.029>

292. Xu, Z.-H., Yang, L.-J., 1993. Transformation in *Salvia chinensis*, w: Bajaj, Y.P.S. (Red.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry 22. Plant Protoplasts and Genetic Engineering III*. Springer Berlin Heidelberg, ss. 308–313.
293. Xue, L., Wu, Z., Ji, X.P., Gao, X.Q., Guo, Y.H., 2014. Effect and mechanism of salvianolic acid B on the myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 7, 280–284. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60038-9](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60038-9)
294. Yan, Q., Shi, M., Ng, J., Wu, J.Y., 2006. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Sci.* 170, 853–858. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.12.004>
295. Yan, Y.P., Wang, Z.Z., 2007. Genetic transformation of the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 88, 175–184. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9187-y>
296. Yang, J., Yang, X., Li, B., Lu, X., Kang, J., Cao, X., 2020. Establishment of *in vitro* culture system for *Codonopsis pilosula* transgenic hairy roots. *3 Biotech* 10, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2130-9>
297. Ye, S., Shao, Q., Xu, M., Li, S., Wu, M., Tan, X., Su, L., 2017. Effects of light quality on morphology, enzyme activities, and bioactive compound contents in *Anoectochilus roxburghii*. *Front. Plant Sci.* 8, 857. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00857>
298. Yen, J., Huang, H. Sen, Chuang, C.J., Huang, S.-T., 2019. Activation of dynamin-related protein 1 - dependent mitochondria fragmentation and suppression of osteosarcoma by cryptotanshinone. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 38, 42. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-1008-8>
299. Yen, J.H., Huang, S.T., Huang, H. Sen, Fong, Y.C., Wu, Y.Y., Chiang, J.H., Su, Y.C., 2018. HGK-sestrin 2 signaling-mediated autophagy contributes to antitumor efficacy of Tanshinone IIA in human osteosarcoma cells. *Cell Death Dis.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1016-9>
300. Yu, L., An, C., Jia, L., Li, Y., Chen, Q., Zhen, F., Wang, S., Wang, M., 2016. Combination therapy of salvianolic acid and fluoxetine improves the cognitive function of rats with chronic stress-induced depression. *World Neurosurg.* 86, 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2015.09.071>
301. Yuan, J.P., Chen, H., Chen, F., 1998. Simultaneous determination of rosmarinic acid, lithospermic acid B and related phenolics in *Salvia miltiorrhiza* by HPLC. *J. Agric.*

- Food Chem. 46, 2651–2654. <https://doi.org/10.1021/jf980088o>
302. Yücel, Ç., Karatoprak, G.Ş., Değim, İ.T., 2019. Anti-aging formulation of rosmarinic acid-loaded ethosomes and liposomes. *J. Microencapsul.* 36, 180–191. <https://doi.org/10.1080/02652048.2019.1617363>
303. Zeng, Z., Zhang, H., Wang, X., Liu, K., Li, T., Sun, S., Li, H., 2018. Salvianolic acid B suppresses cell proliferation and induces apoptosis in osteosarcoma through p38 - mediated reactive oxygen species generation. *Oncol. Lett.* 15, 2679–2685. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7609>
304. Zengin, G., Llorent-Martínez, E.J., Córdova, M.L.F. de, Bahadori, M.B., Mocan, A., Locatelli, M., Aktumsek, A., 2018. Chemical composition and biological activities of extracts from three *Salvia* species: *S. blepharochlaena*, *S. euphratica* var. *leiocalycina*, and *S. verticillata* subsp. *amasiaca*. *Ind. Crops Prod.* 111, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.065>
305. Zengin, G., Mahomoodally, F., Picot-Allain, C., Diuzheva, A., Jekó, J., Cziáky, Z., Cvetanović, A., Aktumsek, A., Zeković, Z., Rengasamy, K.R.R., 2019. Metabolomic profile of *Salvia viridis* L. root extracts using HPLC–MS/MS technique and their pharmacological properties: a comparative study. *Ind. Crops Prod.* 131, 266–280. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.060>
306. Zeynali, Z., Hosseini, B., Rezaei, E., 2016. Effect of elicitation on antioxidant activity and production of tropane alkaloids in *Hyoscyamus reticulatus* hairy root cultures. *Res. J. Pharmacogn.* 3, 43–53.
307. Zhang, S., Yan, Y., Wang, B., Liang, Z., Liu, Y., Liu, F., Qi, Z., 2014. Selective responses of enzymes in the two parallel pathways of rosmarinic acid biosynthetic pathway to elicitors in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *J. Biosci. Bioeng.* 117, 645–651. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.10.013>
308. Zhang, W., Cheng, C., Sha, Z., Chen, C., Yu, C., Lv, N., Ji, P., Wu, X., Ma, T., Cheng, H., Shi, L., 2021. Rosmarinic acid prevents refractory bacterial pneumonia through regulating Keap1/Nrf2-mediated autophagic pathway and mitochondrial oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 168, 247–257. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.03.038>
309. Zhang, Y., Jiang, P., Ye, M., Kim, S.H., Jiang, C., Lü, J., 2012. Tanshinones: Sources, pharmacokinetics and anti-cancer activities. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 13621–13666. <https://doi.org/10.3390/ijms131013621>
310. Zhao, J., Lou, J., Mou, Y., Li, P., Wu, J., Zhou, L., 2011a. Diterpenoid tanshinones

- and phenolic acids from cultured hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge and their antimicrobial activities. *Molecules* 16, 2259–2267. <https://doi.org/10.3390/molecules16032259>
311. Zhao, J., Park, Y.G., Jeong, B.R., 2020. Light quality affects growth and physiology of *Carpesium triste* Maxim. cultured *in vitro*. *Agriculture* 10, 258.
312. Zhao, J.L., Zhou, L.G., Wu, J.Y., 2010. Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 137–144. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2443-4>
313. Zhao, S.J., Zhang, J.J., Yang, L., Wang, Z.T., Hu, Z.B., 2011b. Determination and biosynthesis of multiple salvianolic acids in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza*. *Yaoxue Xuebao* 46, 1352–1356.
314. Zheng, Z., Wang, Y., Yu, H., Li, W., Wu, J., Cai, C., He, Y., 2020. Salvianolic acid B inhibits ototoxic drug – induced ototoxicity by suppression of the mitochondrial apoptosis pathway. *J. Cell. Mol. Med.* 24, 6883–6897. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15345>
315. Zhi, B.H., Alfermann, A.W., 1993. Diterpenoid production in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry* 32, 699–703. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)95156-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)95156-2)
316. Zhou, M.L., Zhu, X.M., Shao, J.R., Tang, Y.X., Wu, Y.M., 2011. Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1229–1239. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3228-0>
317. Zhou, R., Long, H., Zhang, B., Lao, Z., Zheng, Q., Wang, T., Yongxin, Z., Wu, Q., Lai, X., Li, G., Lin, L., 2019. Salvianolic acid B , an antioxidant derived from *Salvia miltiorrhiza* , protects mice against  $\gamma$  - radiation - induced damage through Nrf2/Bach1. *Mol. Med. Rep.* 19, 1309–1317. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9718>

## 10. Wykaz publikacji i komunikatów zjazdowych

Wyniki opisane w rozprawie doktorskiej opublikowano dotychczas w 3 pracach:

**Wojciechowska M.**, Owczarek A., Kiss A. K., Grąbkowska R., Olszewska M. A., Grzegorzczak-Karolak I.: Establishment of hairy root cultures of *Salvia bulleyana* Diels. for production of polyphenolic compounds. *Journal of Biotechnology*, 2020, 318, 10-19. MNiSW = 70, IF = 3,595.

**Krzemińska M.**, Owczarek A., Gonciarz W., Chmiela M., Olszewska M., Grzegorzczak-Karolak I.: The Antioxidant, cytotoxic and antimicrobial potential of phenolic acids-enriched extract of elicited hairy roots of *Salvia bulleyana*. *Molecules*, 2022, 27 (3), 1-20. MNiSW = 140, IF = 4,927.

**Krzemińska M.**, Owczarek A., Olszewska M. A., Grzegorzczak-Karolak I.: *In vitro* strategy for the enhancement of the production of bioactive polyphenols in transformed roots of *Salvia bulleyana*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23 (14), 1-18. MNiSW = 140, IF = 6,208.

Wyniki obejmujące zakres rozprawy doktorskiej zostały również zaprezentowane w postaci ośmiu doniesień zjazdowych:

„Potwierdzenie transformacji korzeni włósnikowatych *Salvia bulleyana* Diels.” – III Konferencja Studentów Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi; 12-13.04.2019 – poster.

„Produkcja związków polifenolowych w korzeniach transformowanych *Salvia bulleyana* Diels.” – VII Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii; 9-10.05.2019 – poster.

„Analiza fitochemiczna korzeni *Salvia bulleyana* Diels i ich potencjał przeciwutleniający.” – II Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Rośliny w naukach medycznych i przyrodniczych” (24.05.2019, Lublin) – poster.

„Dobór optymalnego podłoża dla zwiększenia produkcji związków bioaktywnych w korzeniach włósnikowatych *Salvia bulleyana*” – XXIV Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego „*Salus aegroti suprema lex*” (22-24.09.2021) – poster.

„Elicitation of *Salvia bulleyana* hairy root culture for enhancing polyphenolic acid production.” – II Interdyscyplinarna Konferencja Doktorantów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi „DocUmed” (22-24.10.2021) – poster.

„Kultury transformowane *Salvia bulleyana* Diels jako źródło kwasu rozmatynowego” – V Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Rośliny w naukach medycznych i przyrodniczych” (27.05.2022) – prezentacja ustna.

„The effect of cytokinins on shoot proliferation and rosmarinic acid production in transformed shoot cultures of *Salvia bulleyana*” – III Interdyscyplinarna Konferencja Doktorantów Uczelni Medycznych „DocUmed” (8-10.06.2022) – flashposter.

“Aktywność cytotoksyczna metanolowo-wodnego ekstraktu z korzeni transformowanych *Salvia bulleyana* Diels hodowanych w zoptymalizowanych warunkach” – Bonifraterska Konferencja Ziołolecznictwa „Fitoterapia u osób starszych” (25.11.2022, Warszawa) - poster.

#### Pozostały dorobek naukowy

##### Prace doświadczalne:

Grzegorzycy-Karolak I., **Krzemińska M.**, Kiss A. K., Olszewska M. A., Owczarek A.: Phytochemical profile and antioxidant activity of aerial and underground parts of *Salvia bulleyana* Diels plants. *Metabolites*, 2020, 10 (12), 1-18. MNiSW = 100, IF = 4,932.

Grzegorzycy-Karolak I., Hnatuszko-Konka K., **Krzemińska M.**, Olszewska M. A., Owczarek A.: Cytokinin-based tissue cultures for stable medicinal plant production: regeneration and phytochemical profiling of *Salvia bulleyana* shoots. *Biomolecules*, 2021, 11 (10), 1-14. MNiSW = 100, IF = 6,064.

Grzegorzycy-Karolak I., **Krzemińska M.**, Kiss A. K., Owczarek-Januszkiewicz A., Olszewska M. A.: Role of phytohormones in biomass and polyphenol accumulation in *Salvia bulleyana* *in vitro* culture. *Biomolecules*, 2023, 13 (2), 227. MNiSW = 100, IF = 6,064.

Prace przeglądowe:

**Wojciechowska M.**, Grzegorzczak-Karolak I.: Owoce acai – potencjał terapeutyczny bazujący na profilu fitochemicznym surowca i współczesnych badaniach farmakologicznych. *Farmacja Polska*, 2019, 75 (3), 134-147. MNiSW = 70.

Staniewska P., **Wojciechowska M.**, Grzegorzczak-Karolak I.: Guggul – roślinne panaceum z Indii. *Farmacja Polska*, 2019, 75 (12), 664-675. MNiSW = 70.

Marta Krzemińska  
(imię i nazwisko Kandydata)

**Przewodnicząca Rady Nauk  
Farmaceutycznych  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi**

#### **OŚWIADCZENIE AUTORA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

Świadomy/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że prezentowana przeze mnie rozprawa doktorska nie była wcześniej podmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w żadnej wyższej uczelni, instytucie badawczym i/lub jednostce badawczo-rozwojowej.

14.03.2023 Marta Krzemińska  
(data i podpis Kandydata)