



Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



„BioTechNan – Program Interdyscyplinarnych Środowiskowych Studiów Doktoranckich KNOW z obszaru Biotechnologii i Nanotechnologii”



UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU

Rozprawa doktorska

**Kultury *in vitro* roślin z rodzaju *Sarracenia* jako źródło związków
biologicznie aktywnych**

mgr inż. Kinga Maria Pilarska

Praca wykonana pod kierunkiem
dr hab. Magdaleny Wróbel- Kwiatkowskiej, prof. uczelni
oraz dr hab. Anny Kulmy, prof. uczelni
w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności

Wrocław 2023



Politechnika Wrocławska



Uniwersytet
Wrocławski



UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU

Projekt współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania:

*Pani Promotor, dr hab. Magdalenie Wróbel- Kwiatkowskiej
za możliwość wykonania pracy pod Jej opieką, za okazaną pomoc oraz zrozumienie.*

*Pani Promotor, dr hab. Annie Kulmie
za wsparcie merytoryczne oraz pomoc udzieloną podczas badań.*

*Panu prof. dr hab. inż. Zbigniewowi Lazarowi oraz Pani dr inż. Annie Kanceliście
za nieustającą motywację i wiarę w moje możliwości.*

*Panu dr hab. inż. Wojciechowi Łabie
za okazaną pomoc merytoryczną i wsparcie.*

*Koleżankom i Kolegom z Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu
Przyrodniczego we Wrocławiu
za wspianą atmosferę pracy i okazaną życzliwość.*

*Narzeczonemu, Arturowi Dudziakowi, za troskę, niesłabnącą motywację
i pomoc każdego dnia.*

*Najbliższym i Przyjaciółom, którzy nigdy we mnie nie zwątpili
i wspierali mnie w mojej pracy.*

Pracę dedykuję moim Rodzicom.

Spis treści	
Wykaz skrótów	6
Streszczenie	7
Abstract	9
1. Wstęp.....	10
1.1. Rośliny owadożerne.....	10
1.1.1. Znaczenie terapeutyczne roślin mięsożernych.....	11
1.1.2. Metabolity wtórne roślin owadożernych.....	14
1.1.3. Rośliny z rodzaju <i>Sarracenia</i> L.	16
1.2. Kultury <i>in vitro</i> roślin	20
1.2.1. Techniki kultur <i>in vitro</i> roślin	20
1.2.2. Modyfikacje genetyczne roślin	21
1.2.3. Zastosowanie hodowli <i>in vitro</i> roślin.....	22
1.3. Korzenie włośnikowate.....	24
1.3.1. Bakterie glebowe z rodzaju <i>Rhizobium</i>	25
1.3.2. Mechanizm agroinfekcji	27
1.3.3. Praktyczne możliwości zastosowania hodowli korzeni włośnikowatych.....	28
1.4. <i>Sarracenia purpurea</i> L. jako obiekt badań.....	31
Cel pracy	33
3. Materiały i metody	34
3.1. Materiały.....	34
3.1.1. Materiał roślinny	34
3.1.2. Szczepy bakteryjne	35
3.1.3. Podłoża mikrobiologiczne	36
3.1.4. Odczynniki chemiczne i komercyjne zestawy odczynnikowe.....	37
3.2. Metody	40
3.2.1. Zakładanie aseptycznych kultur roślin z rodzaju <i>Sarracenia</i>	40
3.2.2. Optymalizacja warunków wzrostu w warunkach <i>in vitro</i>	41
3.2.3. Hodowla bakterii	42
3.2.3.1. Przechowywanie bakterii.....	42
3.2.3.2. Namnażanie bakterii w hodowli płynnej	42
3.2.4. Transformacja genetyczna roślin	43
3.2.4.1. Transformacja za pomocą metody iniekcji.....	43
3.2.4.2. Transformacja za pomocą metody kokultury	43

3.2.4.2. Izolacja DNA plazmidowego z <i>Rhizobium rhizogenes</i>	44
3.2.4.3. Optymalizacja warunków reakcji PCR	45
3.2.4.4. Reakcja łańcuchowa polimerazy	46
3.2.4. Oznaczenie suchej masy korzeni	46
3.2.5. Optymalizacja metody ekstrakcji związków bioaktywnych	47
3.2.6. Ocena składu biochemicznego roślin z gatunku <i>Sarracenia purpurea</i> L. pochodzących z kultur <i>in vitro</i>	48
3.2.7.1. Oznaczenie całkowitej zawartości polifenoli w badanych roślinach	48
3.2.7.2. Oznaczenie całkowitej zawartości triterpenów w badanych roślinach <i>Sarracenia purpurea</i> L.	49
3.2.6.3. Oznaczenie zawartości chlorofilu w tkankach zielonych.....	49
3.2.6.4. Oznaczenie zawartości karotenoidów w materiale roślinnym	50
3.2.6.5. Oznaczenie zawartości związków fenolowych w roślinach <i>Sarracenia purpurea</i> L.....	50
3.2.6.6. Oznaczenie zawartości kwasu betulinowego metodą HPLC w badanych roślinach <i>Sarracenia purpurea</i> L.	51
3.2.6.7. Oznaczenie profilu kwasów tłuszczowych badanych roślin metodą GC- MS2	
3.2.6.8. Badania strukturalne FT-IR/ ATR.....	52
3.2.7. Oznaczenie pojemności antyoksydacyjnej materiału roślinnego.....	53
3.2.8. Oznaczenie właściwości przeciwbakteryjnych badanych roślin.....	54
3.2.9.1. Przechowywanie bakterii	54
3.2.9.2. Warunki hodowli bakterii.....	54
3.2.8.3. Metoda dyfuzyjno- krążkowa.....	54
3.2.9. Oznaczenie zawartości aminokwasów w materiale roślinnym.....	55
3.2.10. Oznaczenie cytotoksyczności ekstraktów roślinnych	56
3.2.11.1. Linie komórkowe	56
3.2.11.2. Test MTT.....	56
3.2.11. Oznaczenie właściwości przeciwnowotworowych ekstraktów roślinnych.....	57
3.2.12. Analiza statystyczna i przedstawienie wyników.....	58
3.2.13. Oprogramowanie i urządzenia	58
4. Wyniki	60
4.1. Aseptyczne kultury roślin z rodzaju <i>Sarracenia</i>	60
4.1.1. Optymalizacja warunków wzrostu <i>Sarracenia purpurea</i> w kulturach <i>in vitro</i>	60
4.1.1.1. Odmienne wartości pH podłoża	60
4.1.1.2. Odmienne warianty podłoża.....	66
4.2. Transformacja genetyczna roślin <i>Sarracenia purpurea</i> L.....	72

4.2.1. Agroinfekcja	72
4.2.2. Potwierdzenie integracji T-DNA	75
4.3. Świeża i sucha masa korzeni	77
4.4. Optymalizacja ekstrakcji związków bioaktywnych z badanych roślin	78
4.5. Ocena składu biochemicznego wybranych linii roślin	84
4.5.1. Oznaczenie całkowitej zawartości polifenoli w materiale roślinnym.....	84
4.5.2. Oznaczenie całkowitej zawartości triterpenów w badanych roślinach <i>Sarracenia purpurea</i> L.	85
4.5.3. Oznaczenie zawartości chlorofilu w tkankach zielonych	86
4.5.4. Oznaczenie zawartości karotenoidów w materiale roślinnym.....	88
4.5.5. Oznaczenie zawartości kwasu betulinowego w badanych roślinach	89
4.5.6. Profil kwasów tłuszczowych badanych roślin	91
4.5.7. Analiza spektralna FT-IR/ ATR.....	93
4.5.7.1. Analiza części zielonych roślin	93
4.5.7.2. Analiza korzeni transformowanych	99
4.6. Oznaczenie pojemności antyoksydacyjnej materiału roślinnego	100
4.7. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe ekstraktów z <i>Sarracenia purpurea</i> L.....	102
4.8. Analizy dotyczące wyselekcjonowanych linii roślin <i>Sarracenia purpurea</i> L. o najlepszych właściwościach	108
4.8.1. Oznaczenie zawartości aminokwasów w badanych roślinach.....	108
4.8.2. Oznaczenie zawartości związków fenolowych w roślinach <i>Sarracenia purpurea</i> L.	113
4.8.3. Oznaczenie cytotoksyczności	115
4.8.4. Właściwości przeciwnowotworowe wybranych ekstraktów	120
4.8.5. Analiza ekstraktów wodnych z <i>Sarracenia purpurea</i> L. na liniach komórkowych	130
5. Dyskusja.....	136
6. Wnioski końcowe	150
7. Literatura.....	152
8. Spis rycin.....	176
9. Spis tabel.....	179
10. Załączniki	180

Wykaz skrótów

FAME	estry metylowe kwasów tłuszczowych (ang. Fatty Acids Methyl Esters)
GAE	kwasy galusowy (ang. Gallic Acid)
jtk.	jednostka tworząca kolonię
kom.	komórka
MS	podłoże Murashige & Skoog
MQ	woda ultraczysta
OD	gęstość optyczna (ang. Optical Density)
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction)
PDAC	rak przewodowy trzustki
PPM	biocyd o szerokim spektrum działania (ang. Plant Preservative Mixture)
pz	para zasad (ang. Base Pair)
rpm	obroty na minutę (ang. Revolutions per Minute)
r-r.	roztwór
ryc.	Rycina
s.m.	sucha biomasa roślinna (ang. Dry Weight)
%v/v	procentowy stosunek objętościowy (ang. Volume to Volume)
%w/v	procentowy stosunek wagowo- objętościowy (ang. Weight per Volume)

Streszczenie

Problem rosnącej liczby zachorowań na nowotwory, choroby o podłożu bakteryjnym i wirusowym, wzrost przypadków antybiotykooporności bakterii chorobotwórczych, a także braku skutecznych metod leczenia nowotworów niesie poważne konsekwencje dla zdrowia i życia ludzi. Istotnym obszarem badań jest poszukiwanie nowych terapii chorób oraz związków o działaniu terapeutycznym, które będą bezpieczne i łatwo dostępne. Alternatywnym i coraz częściej stosowanym rozwiązaniem może być wykorzystywanie metod inżynierii genetycznej, które pozwalają w precyzyjny sposób modyfikować cechy organizmów, włączając w to rośliny.

W niniejszej pracy wprowadzono do kultur *in vitro* roślinę owadożerną *Sarracenia purpurea* L., a następnie poddano ją modyfikacji genetycznej za pomocą bakterii *Rhizobium rhizogenes* w celu uzyskania korzeni włóśnikowatych. W wyniku przeprowadzonej transformacji uzyskano siedem linii roślin kompozytowych, które zostały poddane badaniom w kierunku określenia ich składu biochemicznego. Zoptymalizowano warunki wzrostu uzyskanych roślin oraz metodę ekstrakcji związków o potencjale farmakologicznym. Określono zawartość związków polifenolowych, triterpenów, chlorofilu, karotenoidów, a także właściwości antyoksydacyjne ekstraktów pozyskiwanych z modyfikowanych korzeni oraz części zielonych roślin kompozytowych.

W kolejnym etapie wyselekcjonowano dwie linie o najlepszym potencjale bioaktywnym i poddano je testom w kierunku oznaczenia ich właściwości przeciwdrobnoustrojowych dla pięciu szczepów bakterii chorobotwórczych w stosunku do człowieka (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*). Następnie oceniono cytotoksyczność uzyskanych ekstraktów w stosunku do zdrowych komórek skóry, badając je z wykorzystaniem linii komórkowej keratynocytów ludzkich (HaCaT) oraz linii komórkowej fibroblastów ludzkich (NHDF), a także linii komórkowej komórek jajnika chomika chińskiego (CHO-K1). Ocenę aktywności przeciwnowotworowej badanych roślin określono dla trzech linii nowotworowych (linia komórek raka trzustki, przerzutów raka trzustki, raka szyjki macicy).

Przeprowadzone badania pokazują, że uzasadnionym jest wprowadzanie modyfikacji genetycznych do roślin *Sarracenia purpurea* L. w kierunku wytwarzania korzeni włóśnikowatych, ponieważ wskutek transformacji uzyskano rośliny charakteryzujące się

zwiększoną akumulacją cennych związków o potencjale prozdrowotnym oraz istotnym wzrostem właściwości antyoksydacyjnych. Ponadto ekstrakty pozyskane z roślin modyfikowanych nie wykazywały działania cytotoksycznego na zdrowe komórki ludzkie, natomiast posiadały aktywność antyproliferacyjną w stosunku do komórek linii komórkowej raka trzustki oraz przerzutów raka trzustki.

Abstract

The problem of the increased incidence of cancer, bacterial and viral diseases and antibiotic-resistant pathogenic bacteria, as well as the lack of effective cancer treatment methods entail serious consequences for human life and health. An important area of research focuses on seeking new therapies for diseases and therapeutic compounds that would be safe and easily available. Genetic engineering techniques offer an alternative and increasingly more common solution allowing for precise modification of organisms' traits, including those of plants.

In the present work, a carnivorous plant *Sarracenia purpurea* L., was introduced to *in vitro* cultures and then genetically modified using *Rhizobium rhizogenes* to obtain hairy roots. This transformation yielded seven composite plant lines, whose chemical composition was subsequently analyzed. The growth conditions of the obtained plants and the method of extracting compounds with pharmacological potential were optimized. The content of polyphenols, triterpenes, chlorophyll, and carotenoids, and antioxidant properties of extracts obtained from modified roots and green parts of composite plants were determined.

The next stage involved the selection of two lines with the best bioactive potential and testing them for antibacterial effect against human pathogenic bacterial strains (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*). Next, cytotoxicity of the extracts towards healthy skin cells was assessed using a human keratinocyte cell line (HaCaT) and a human dermal fibroblast cell line (NHDF), as well as Chinese hamster ovary cell line. The anticancer effect of the plant extracts was determined for three cancer cell lines (pancreatic cancer, metastatic pancreatic cancer, cervical cancer).

The study showed that it is justified to introduce genetic modifications to *Sarracenia purpurea* L. to obtain hairy roots, since transformation resulted in plants displaying an increased accumulation of valuable compounds with health-promoting potential and significantly enhanced antioxidant properties. Furthermore, the extracts from modified plants did not show cytotoxicity to healthy human cells, but they possessed an antiproliferative effect against pancreatic cancer cells and metastatic pancreatic cancer cells.

1. Wstęp

1.1. Rośliny owadożerne

Rośliny owadożerne to wyjątkowi, ze względu na mechanizm odżywiania, przedstawiciele królestwa roślin. Podwaliny pod współczesne badania nad roślinami owadożernymi stworzył Charles Darwin, który w swojej książce „*Insectivorous plants*” (1875) przedstawił staranne opisy ich struktur, co w znaczny sposób przyczyniło się do dalszych prac w tym zakresie. Słynny botanik szczególną uwagę zwrócił na muchołówkę z gatunku *Dionaea muscipula* J. Ellis, która stała się dobrym modelem do badań nad tą wyjątkową grupą roślin. Ostatnie trzy dekady badań molekularnych pozwoliły na uzyskanie bardziej precyzyjnych informacji o ich ewolucji i fizjologii oraz przyczyniły się do zrozumienia syndromu mięsożerności (Hedrich, Fukushima, 2021).

Ze względu na brak precyzji, we współczesnej systematyce określenie „owadożerne” stosuje się zamiennie z mianem „mięsożerne” (łac. *carnis*- mięso, *vorare*- połykać). Rośliny te bowiem posiadają szerokie spektrum chwytania ofiar, tzn. owadów i pajęczaków oraz bezkręgowców i drobnych kręgowców. Taki sposób odżywiania roślin wykształcił się w związku z koniecznością przetrwania w ubogim środowisku i jest wynikiem adaptacji roślin do takich warunków. Naturalnym miejscem występowania tych roślin są obszary podmokłe i ubogie w składniki odżywcze. Występują one głównie na terenach bagiennych i torfowiskach, ale spotkać je można także na terenach górzystych czy w lasach tropikalnych (Krauska i wsp., 2015). Rośliny owadożerne mają zdolność do przetrwania w porze suchej nawet do 5 miesięcy (Adlassnig i wsp., 2005). Wykształciły zdolność do pozyskiwania związków odżywczych, dzięki wydzielanym zewnątrzkomórkowo enzymom trawiennym, a także przy pomocy mikroorganizmów i pierwotniaków, co stanowi fenomen w królestwie roślin (Dash, 2016). U niektórych przedstawicieli owadożernych wskazano na podwójny mechanizm pozyskiwania składników odżywczych. Poza narządem pułapkowym osobniki te mają zdolność do prowadzenia procesu fotosyntezy za pomocą organów fotosyntetycznych (Adamec, 2010). Wyróżnia się więc rośliny, które wykształciły syndrom-mięsożerności w dosłownym znaczeniu oraz protomięsożerne, wymagające do funkcjonowania utrzymywania związków mutualistycznych (Adlassnig i wsp., 2011).

Rośliny mięsożerne stanowią niedużą, w porównaniu do wszystkich roślin naczyniowych, grupę. Ich przedstawiciele wśród jednoliściennych i dwuliściennych podzielono

na 6 rzędów i 20 rodzajów w obrębie około 650 gatunków (Juniper i wsp., 1989). Z wyjątkiem niektórych rodzajów, są to rośliny jednoroczne lub wieloletnie z bulwiastymi korzeniami (Kumar i in., 2018). Rośliny te wykształciły liczne rodzaje pułapek, wśród których wyróżnić można liście chwytne (*Dionea* sp.), dzbaneczniki (*Nepenthes* sp.), lepy (*Drosera* sp.), kaptury (*Sarracenia* sp.) czy pęcherzyki chwytne (*Utricularia* sp.) (Kumar i wsp., 2018). Pułapki dzielą się na pasywne, które występują u roślin nie wykazujących ruchu podczas chwytania ofiary i wyposażone są w lepki śluz lub płyn oraz pułapki aktywne u roślin zdolnych do poruszania częściami pułapkowymi (Kumar i wsp., 2018). Ofiary wabione są dzięki wytwarzanym zapachom, interesującym barwom i słodkiemu, lepkiemu nektarowi. Niektóre gatunki przywabiają ofiary za pomocą widzialnych w świetle UV wzorów (Scholz i wsp., 2010; Bauer i wsp., 2011). Wytworzenie pułapek i mięsożerność wiążą się u opisanych roślin z wydatkowaniem dużych nakładów energetycznych (Pavlović i wsp., 2009).

1.1.1. Znaczenie terapeutyczne roślin mięsożernych

Wartości etnobotaniczne roślin mięsożernych znane są od kilku wieków. Pierwsze dostępne wzmianki literaturowe opisujące ich zastosowanie sięgają XII wieku (Kołodziejcki, 2011). Rośliny te wykorzystywane były przez rdzennych mieszkańców Kanady w leczeniu różnych schorzeń (Moerman, 1998). Dzięki obecności w ich tkankach związków, takich jak: kwas ursolowy, kwas betulinowy, kwercetyna, plumbagina, ramentaceon czy aldehyd betulinowy, mogą posiadać znaczny potencjał leczniczy (Kołodziejcki, 2011).

Dane literaturowe z końca XIX wieku wskazują na działanie antypoksywirusowe ekstraktów z roślin owadożernych. Prowadzone wówczas badania miały na celu uzyskanie skutecznej metody walki z epidemią ospy prawdziwej (Miles, 1862). W sprawozdaniu medycznym z 1862 roku widnieją dane, według których u najcięższej chorych po podaniu wywarów z *Sarracenia* występowała poprawa stanu zdrowia (Marson, 1863). Obecnie mieszkańcy Bengalii Północnego (Mitra, Mukherjee, 2010) oraz malajskich społeczności plemiennych (Vaidyanathan i wsp., 2013) wykorzystują pastę z *Drosera burmannii* Vahl. w leczeniu dyzenterii. Plemię Garo stosuje rośliny z gatunku *Nepenthes khasiana* Hook.f. do terapii schorzeń oczu, takich jak kurza ślepotą czy świąd (Singh i wsp., 2011).

Jak donosi Arndt i wsp. (2012), związki zawarte w roślinach *Sarracenia purpurea* L. są skutecznymi inhibitorami replikacji wirusa ospy już na poziomie wczesnej transkrypcji. Na

podstawie badań Armdta i wsp. (2012), w których wykorzystano linie komórek raka szyjki macicy (HeLa) oraz komórek nerek królika (RK13), stwierdzono możliwość stosowania ekstraktów pozyskiwanych z kaptownic w leczeniu indywidualnym lub jako wsparcie leczenia konwencjonalnego chorób, wywołanych przez wirusy z rodzaju *Orthopoxvirus*.

Z biegiem lat zmniejsza się podatność drobnoustrojów na istniejące środki o działaniu przeciwbakteryjnym. Problem ten jest szczególnie duży w oddziałach opieki zdrowotnej oraz szpitalach. Potencjał leczniczy roślin owadożernych wskazuje, że mogą one być dobrym źródłem związków bioaktywnych do walki z opornością na antybiotyki (Kumar, 2017). Ekstrakty, pozyskiwane z roślin z rodzaju *Sarracenia* z powodzeniem stosowane były w leczeniu zakażeń, wywoływanych przez bakterie *Mycobacterium tuberculosis* przez ludy ze wschodniego Kaukazu (Moerman, 1998). Natomiast w walce z bakteriami, takimi jak: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella choleraesuis* pomocne okazały się rośliny z rodzaju *Drosera* (Ferreina, 2004), a do zwalczania bakterii: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* i *Staphylococcus aureus* stosowano ekstrakty z roślin z rodzaju *Nepenthes* (Majeed i wsp., 2016). Według Didry i wsp. (1998) rośliny z gatunku *Drosera peltata* Thunb. skutecznie hamują wzrost bakterii jamy ustnej. Ekstrakty z *Drosera peltata* Thunb. stanowią popularny środek w leczeniu próchnicy zębów (Didry i wsp., 1998).

W badaniach Ghate (2015) wykazano, że 70% ekstrakt metanolowy z roślin *Drosera burmannii* Vahl. (DBME) ma właściwości przeciwutleniające i działa jako zmiatacz wolnych rodników. Badania *in vivo* na szwajcarskich myszach albinosach wykazały, że DBME jest skuteczny w łagodzeniu stresu oksydacyjnego wywołwanego przez wolne żelazo (Ghate, 2015). DBME może być w przyszłości wykorzystany jako lek chelatujący w leczeniu chorób związanych z przeciążeniem tym pierwiastkiem. Uriah i wsp. (2015) odnotowali, iż ekstrakt z rośliny z gatunku *Nepenthes khasiana* Hook. f. wykazuje działanie przeciwutleniające oraz hepatoprotekcyjne przeciwko uszkodzeniu wątroby u szczurów.

Etkin (2008) w swoich badaniach wskazał na możliwość stosowania roślin owadożernych w infekcjach grzybiczych skóry. Opisał właściwości lecznicze *Pinguicula vulgaris* ssp. *vulgaris* w leczeniu głębokich ran oraz działanie przeciwgrzybicze ekstraktów z roślin z rodzaju *Nepenthes* w stosunku do grzybów: *Aspergillus niger*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* (Shin i wsp., 2007).

Rośliny z rodzaju *Sarracenia* mogą być pomocne w leczeniu dolegliwości bólowych mięśni (Etkin, 2008), natomiast ekstrakty z *Utricularia aurea* Lour. wykazują działanie

łagodzące w objawach związanych z zakażeniami układu moczowego (Divakar i wsp., 2013). Odnotowano, że ekstrakty z roślin z rodzaju *Drosera* cechują się działaniem przeciwskurczowym (Singh, Bajwa, 2017), natomiast pozyskiwane z roślin z rodzaju *Nepenthes* mogą być wykorzystywane w uśmierzaniu dolegliwości jelitowo-żołądkowych (Etkin, 2008). Wskazano także na korzystne działanie ekstraktów: z *Drosera indica* L., *Drosera burmannii* Vahl. i *Drosera peltata* Thunb., zawartych w preparacie Swarna Bhasma w dolegliwościach bólowych oczu (Shaikh i wsp., 2016).

W XXI wieku cukrzyca stanowi pierwszą niezakaźną epidemię. Jak podaje Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, ang. World Health Organization), co 6 sekund jedna osoba na świecie umiera z powodu cukrzycy i jej powikłań (WHO Report, 2014). W tym obszarze również interesujące są doniesienia dotyczące zastosowania ekstraktów z roślin mięsożernych jako terapii. Harris i wsp. (2012) uwzględnili w swoich badaniach rdzenną ludność Kanady (Cree of Eeyou Istchee), wśród której obserwuje się zwiększoną zachorowalność na cukrzycę typu II. Średni wiek, w którym u przedstawicieli tej grupy się ją diagnozuje, wynosi 41 lat (Pollex i wsp., 2006). W badaniach, którymi objęto tę społeczność, wykazano działanie przeciwcukrzycowe ekstraktów z roślin mięsożernych (Bournival i wsp., 2012). Podawanie preparatów na bazie tych roślin może wspomagać eliminację problemów związanych z dyslipidemią (Muhammad i wsp., 2013). Muhammad i wsp. (2013) wykazali w swoich badaniach na myszach i szczurach, że działanie przeciwcukrzycowe związków zawartych w *Sarracenia* może być związane ze zmniejszoną intensywnością produkcji glukozy oraz poprzez stymulację jej wychwytu.

Kolejną grupą chorób, dla których sprawdzano możliwość stosowania roślin mięsożernych jako terapeutyków, są choroby neurologiczne i neurodegeneracyjne. Shaikh i wsp. (2016) wskazali na pozytywny wpływ ekstraktów z roślin: *Drosera indica* L., *Drosera burmannii* Vahl. i *Drosera peltata* Thunb. w objawach klinicznych utraty pamięci. Wyniki te są obiecującą przesłanką do prowadzenia dalszych badań nad uzyskaniem skutecznego w leczeniu chorób otępiennych środka na bazie roślin mięsożernych. Bhupendra i wsp. (2009) przeprowadzili badania nad działaniem przeciwpadaczkowym ekstraktów z *Drosera burmannii* Vahl. W tym celu podawano myszom albinosom obojga płci ekstrakty roślinne i badano reakcję na wstrzyknięty pentylenotetrazol, który wywoływał napady padaczkowe (Bhupendra i wsp., 2009). Zaobserwowano, że ekstrakt etanolowy z rośliny *Drosera burmannii* Vahl. w dawce 500 mg/ kg masy ciała wykazywał znaczące działanie przeciwpadaczkowe.

Według danych Cancer Statistics Center z 2023 roku, w ciągu każdej minuty na świecie z powodu nowotworu umiera jedna osoba, zaś 4 kolejne otrzymują diagnozę (1). Rosnąca liczba zachorowań na nowotwory oraz spowodowanych nimi zgonów przyczyniła się do określenia raka mianem jednej z najgroźniejszych chorób na świecie (Choi i wsp., 2022, Zhou i wsp., 2017). Pomimo postępu medycyny i wprowadzania nowych terapii przeciwnowotworowych, w 2022 roku z powodu raka i jego powikłań zmarło ponad 10 milionów osób (1). Obecnie, najczęściej stosowanymi metodami leczenia nowotworów są chemioterapia oraz radioterapia. Niestety, ich stosowanie wiąże się z występowaniem ciężkich objawów niepożądanych, a także komplikacji, które utrudniają skuteczne leczenie. W związku z tym, istotnym obszarem badań jest poszukiwanie nowych metod, które cechować się będą wysoką efektywnością, lecz nie będą wiązały się z uciążliwymi konsekwencjami ich stosowania. Takich środków poszukuje się wśród naturalnie występujących komponentów roślin (Khan i wsp., 2022). Pozyskiwane z roślin związki, takie jak: kurkumina, likopen, winkrystyna czy kolchicyna wykazują obiecujące właściwości przeciwnowotworowe, które mogą mieć zastosowanie w praktyce klinicznej (Garcia-Oliveira i wsp., 2021). Już w 1974 roku wskazano na możliwość stosowania preparatów z roślin mięsożernych we wspomaganiu leczenia nowotworów (Miles i wsp., 1974). Badania wskazują, że ekstrakty z roślin *Nepenthes miranda* wykazują działanie cytotoksyczne w stosunku do komórek nowotworowych (Huang i wsp., 2020). Także doniesienia Guan i wsp. (2021) oraz Huang i wsp. (2020) dotyczą cytotoksycznych właściwości ekstraktów z dzbanecznika *Nepenthes miranda*, związanych z indukowaniem apoptozy komórek nowotworowych. Badania na liniach komórkowych MCF-7 wykazały, że ekstrakty pozyskiwane z roślin gatunku *Drosera burmannii* Vahl. mogą być użytecznym środkiem przeciwko rakowi piersi (Ghate i wsp., 2016). Związki zawarte w tej roślinie zaangażowane mogą być w różne szlaki, co skutkuje indukcją apoptozy i zahamowaniem cyklu komórkowego komórek raka piersi (Ghate i wsp., 2016). Badania przeprowadzone na myszach z chłoniakiem Daltona sugerują, że ekstrakty *Drosera indica* L. wykazują istotną aktywność przeciwnowotworową (Asirvatham i Christina, 2013).

1.1.2. Metabolity wtórne roślin owadożernych

Na świecie wciąż jeszcze istnieje wiele roślin, których potencjał leczniczy nie zostaje w pełni wykorzystany. Wśród nich znajdują się rośliny owadożerne, które swoje właściwości biologiczne zawdzięczają wytwarzanym metabolitom wtórnym. Są to

produkowane przez rośliny związki, które nie są im niezbędne do prowadzenia procesów życiowych (Pickens i wsp., 2011). Substratami do ich produkcji są substancje pochodzące z podstawowych przemian metabolicznych (Kowalczyk, 2013). Ze względu na swoje właściwości, metabolity wtórne mogą pełnić w roślinach istotne funkcje, polegające na ochronie przed drobnoustrojami, zwierzętami i szkodliwym wpływem promieni UV czy wabieniu owadów zapylających (Kowalczyk, 2013). Wykazują dużą aktywność biologiczną, co sprawiło, że są przedmiotem zainteresowania ludzi od wielu wieków (Corson i Crews, 2007). W tabeli 1 przedstawiono przykłady metabolitów wtórnych syntezowanych w roślinach owadożernych.

Tabela 1. Przykłady metabolitów wtórnych izolowanych z roślin owadożernych

Grupa związków	Nazwa związku	Przykład rośliny	Bibliografia
Naftochinony	Plumbagina	<i>Nepenthes khasiana</i> Hook. f.	Eilenberg i wsp., 2010
	Ramentaceon	<i>Nepenthes insignis</i> Danser	Rischer i wsp., 2002
	Rosolizyd	<i>Drosera rotundifolia</i> L.	Schlauer i wsp., 2005
	Droseron	<i>Drosera gigantea</i> Lindl.	Crouch i wsp., 1990
Flawonoidy	Kwercetyna	<i>Nepenthes anamensis</i> Macfarlane	Kováčik i wsp., 2012
	Kaempferol	<i>Drosera capensis</i> L.	Kováčik i wsp., 2012
	Miryctyna	<i>Drosera muscipula</i> J.Ellis	Króllicka i wsp., 2008
Terpeny	Kwas betulinowy	<i>Sarracenia purpurea</i> L.	Morrison i wsp., 2016
	Kwas ursolowy	<i>Sarracenia flava</i> L.	Miclea, 2022
	Aldehyd betulinowy	<i>Sarracenia purpurea</i> L.	Morrison i wsp., 2016
Antocyjany	Cyjanidyno-3-O-glukozyd	<i>Drosera muscipula</i> J.Ellis	Hearejos-Escudero, 2018
	Cyjanidyno-3-O-galaktozyd	<i>Nepenthes x ventrata</i>	Dávila-Lara i wsp., 2021
	Cyjanidyna	<i>Sarracenia leucophylla</i> Raf.	Sheridan i Griesbach, 2001

Syntezywane metabolity wtórne pełnią u roślin funkcje związane z syndromem mięsożerności, ułatwiając zdobywanie ofiar i pozyskiwanie z nich substancji odżywczych. Jedną z technik jest przyciąganie owadów za pomocą wydzielania intensywnych zapachów,

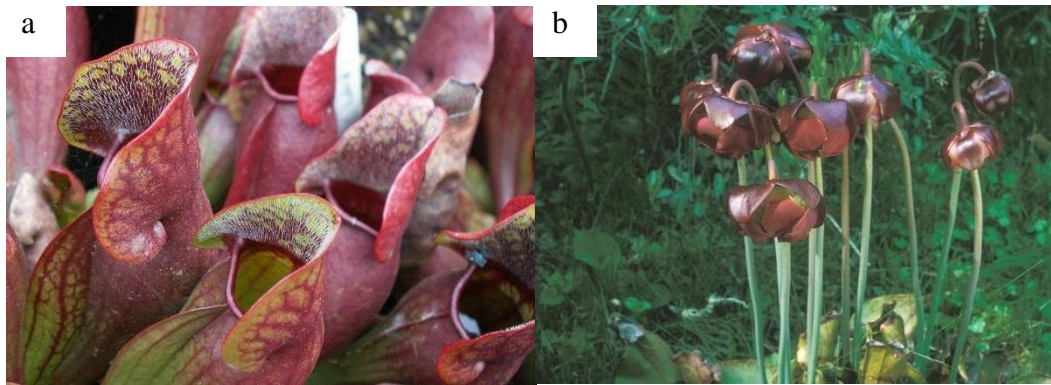
takich jak: α -pinen, linalol czy limonen. Według Di Giusto i wsp. (2010) rośliny z gatunku *Nepenthes rafflesiana* Jack produkują około 54 lotnych związków organicznych, spełniających funkcje atraktantów. Kreuzweiser i wsp. (2014) donoszą natomiast, że *Dionaea muscipula* J.Ellis produkuje ich nawet 60, z czego 1/3 jest bezpośrednio związana z naśladowaniem zapachów kwiatów i soczystych owoców. Hatcher i wsp. (2020) wskazują, że u roślin mięsożernych istnieje około 26 metabolitów wtórnych, które są bezpośrednio zaangażowane w chwytanie ofiar.

Metabolity wtórne, do których należą pigmenty, również stanowią rodzaj komunikacji roślina owadożerna-ofiara. Za tworzenie barwników pułapek odpowiadają, między innymi cyjanidyna, kwercetyna czy kaempferol (Sheridan i Griesbach, 2001). Pigmentacja rozumiana jako atraktant dla zdobyczy może działać w sposób bezpośredni lub tworzyć kontrast pomiędzy zabarwieniem rośliny a tłem, co jest obserwowane u interakcji z tymi gatunkami chwytanymi ofiar, które nie są zdolne do odbierania czerwonych barw (Foot i wsp., 2014).

1.1.3. Rośliny z rodzaju *Sarracenia* L.

Obiektem badawczym niniejszej pracy są rośliny *Sarracenia purpurea* L. Rodzaj *Sarracenia* obejmuje obecnie 13 gatunków. Jednak ze względu na zdolność do tworzenia przez gatunki należące do tego rodzaju mieszańców, w danych literaturowych spotkać można pewne rozbieżności. Rośliny z gatunku *Sarracenia purpurea* L. w naturalnych warunkach rosną na terenach stale podmokłych lub torfowiskach o kwaśnym odczynie (Srivastava i wsp., 2011). Są to byliny wyposażone w silne kłącza, które umożliwiają poziomy rozrost. Budowa liści kaptownicy stanowi bardzo dobrze przystosowaną pułapkę dla chwytanymi ofiar. Liście w kształcie rurki przyjmują formę lejka z kołnierzykiem zakończonym u góry kielichem wyposażonym w kaptur. Zbierany na kołnierzyku nektar wabi potencjalne ofiary, które spadają ze śliskiego kielicha do zgromadzonego na dnie liścia płynu. Liście *Sarracenia purpurea* L. przyjmują zielono-żółtą barwę z charakterystycznymi czerwonymi wybarwieniami (Ryc. 1). W trawieniu pokarmu przez kaptownicę uczestniczą bakterie i pierwotniaki, których zadaniem jest rozkład ofiary i dostarczenie roślinie składników odżywczych (Gotelli i Ellison, 2006). Jak podaje Gibson (1991) oraz Whitmann i wsp. (2005), mikroorganizmy znajdujące się w dzbanie najczęściej wprowadzane są do niego ze środowiska zewnętrznego przez ofiary, a ponadto, jeśli zdobycz wydostaje się z pułapki i wpada do kolejnej, może powodować zanieczyszczenia

krzyżowe pomiędzy kielichami. Jednak jak dowodzą badania Gallie i Chang (1997), po zastosowaniu wobec *Sarracenia purpurea* L. antybiotyków o szerokim spektrum działania, roślina wciąż wytwarza enzymy hydrolityczne, co dowodzi, że mikroorganizmy nie są jej niezbędne do procesów trawienia ofiar.



Ryc. 1. *Sarracenia purpurea*: a) liście oraz kaptur (2), b) kwiaty (3)

Ellison i Gotelli (2002) opisali zależność pomiędzy ograniczeniem dostępu substancji odżywczych z chwytych ofiar, a zmianami morfologicznymi dzbanów. Również Botti i wsp. (2008) wskazali na fakt, iż cechy te są silnie determinowane przez uwarunkowania środowiska. Zmiany te dotyczą liczby, długości, średnicy liści oraz stopnia odsłonięcia kielicha. Dochodzi do poszerzenia dzbanów i rozplaszczenia liści, co ogranicza skuteczność chwytania ofiar, ale przekłada się na możliwość przeprowadzania fotosyntezy (Hogan i Walbridge, 2007).

Obszar geograficzny naturalnie występujących obecnie przedstawicieli tej grupy (Ryc. 2) obejmuje Nową Funlandię, Saskatchewan i rozciąga się przez wschodnią część Ameryki Północnej, aż po Teksas i Florydę (Mellichamp i Case, 1993). Na skutek introdukcji kapturnice występują także na niewielkich obszarach w Azji (Mellichamp i Case, 1993) i Europie (Phillips i Rix, 2022). *Sarraceniaceae* zyskały także popularność wśród hodowców jako rośliny kolekcjonerskie, co naraża je na niszczenie ich naturalnych siedlisk (Clarke i wsp., 2018). W celu ochrony roślin i możliwości prowadzenia badań naukowych, rozpowszechnione są w wielu ogrodach botanicznych na całym świecie.



Ryc. 2. Obszary naturalnego występowania roślin z rodzaju *Sarracenia* L. (4).

Sarracenia purpurea L. zyskuje na popularności wśród hobbystów hodowli roślin. Roślina ta jest stosunkowo łatwo dostępna w sklepach ogrodniczych i nie wymaga intensywnej pielęgnacji. Podstawową kwestią jest dobór odpowiedniego podłoża, stanowiącego mieszankę ziemi, piasku i torfu o kwaśnym odczynie, połączonego z keramzytem. *Sarracenia purpurea* L. nie preferuje dużych zmian w zakresie temperatur. Optimum w okresie letnim oscyluje wokół 25°C, zaś w okresie spoczynku 10°C. Roślina szybko reaguje na drobne nawet zmiany w oświetleniu. Preferuje stanowiska jasne, lecz nie w bezpośrednim obszarze działania promieni słonecznych. Kiedy poziom naświetlenia jest zbyt niski, kaptury nie wybarwiają się.

Rośliny z gatunku *Sarracenia purpurea* L. produkują wiele cennych metabolitów wtórnych (Pilarska i wsp., 2022). Do trzech najbardziej istotnych zalicza się: kwas betulinowy (Barthelemy i wsp., 2009), kwas ursolowy (Rosa i wsp., 2008) oraz aldehyd betulinowy (Morrison i wsp., 2016). Duże znaczenie farmakologiczne posiada także, izolowany z *Sarracenia*, morronizyd, który należy do grupy glikozydów irydoidowych (Cieniak i wsp., 2015). Wykazuje on działanie przeciwutleniające i przeciwapoptyczne, a także odpowiada za ochronę komórek przed toksycznymi stężeniami glukozy w organizmie (Cieniak i wsp., 2015). Izolowana z *Sarracenia purpurea* L. taksyfolina chroni rośliny przed atakami patogenów grzybowych. Istotne z punktu potencjalnego zastosowania w przemyśle farmaceutycznym, są jej właściwości przeciwzapalne i antyhepatotoksyczne. Związek ten posiada zdolność do usuwania wolnych rodników, pozwalając na redukcję stresu oksydacyjnego, co może być

bardzo przydatne w leczeniu wielu chorób. Jak podają Cieniak i wsp. (2015) z *Sarracenia purpurea* L. wyizolowano także: katechinę, epikatechinę, rutynę i mirycetynę, które wykazują dużą aktywność biologiczną. Rośliny te są bogate we flawonoidy, takie jak: 7-O-glukozyd luteoliny (Cieniak i wsp., 2015), 3-O-galaktozyd kwercetyny (Foo i wsp., 2000), 7-O-galaktozyd taksyfoliny (Joyeux i wsp., 1995) i 3-O-arabinozyd kwercetyny (Jarman i Crowden, 1977). Jak podają Hatcher i wsp. (2020) wśród związków biologicznie czynnych u *Sarracenia purpurea* L. występują także: kwas tetradekanowy, limonen, α -terpinen, koniina, α -pinen oraz erukamid, pełniąc u roślin funkcje atraktantów i będąc użytecznymi dla człowieka. Sarraceina, irydoidowy związek lotny o szerokim spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego, także znajduje się wśród związków pozyskiwanych z roślin *Sarracenia purpurea* L. (Tor-Anyiin i wsp., 2015).

Ziele *Sarracenia* stosowano w leczeniu cukrzycy (Leduc i wsp., 2006), schorzeń i dolegliwości ze strony układu pokarmowego oraz nerek (Muhammad i wsp., 2012). Badania Spoor'a i wsp. (2006) wykazały, że związki zawarte w *Sarracenia purpurea* L. mają silne działanie insulinomimetyczne, które charakteryzuje się lepszymi właściwościami, niż powszechnie dziś stosowana metformina, a wynika to z aktywacji kinazy białkowej aktywowanej monofosforanem adenozy (Martineau i wsp., 2010). W doświadczeniach na komórkach PC12 wykazano, że rośliny te mają także działanie neuroprotektoryjne w stanach toksycznych stężeń glukozy (Spoor i wsp., 2006; Harris i wsp., 2012). Wodne ekstrakty *Sarracenia purpurea* wykazują właściwości przeciwbólowe, a Melnic i wsp. (2009) wskazują, że mogą być stosowane w terapii bólu neuropatycznego. Dopuszczone do obrotu w leczeniu bólu u koni były dwa preparaty: Sarapin oraz P-Bloc, zawierające ekstrakty z *Sarracenia purpurea* L. (Melnic i wsp., 2009; Manchikanti i wsp., 2001). Kannan i wsp. (2020) odnotowali przeciwwirusowe działanie *Sarracenia purpurea* na wirusa opryszczki pospolitej HSV-1. Związane jest to ze zdolnością hamowania przyłączania wirusa do komórek gospodarza oraz hamowaniem transkrypcji genów wirusa (Kannan i wsp., 2020). W badaniach *in vitro* na linii komórkowej mysiego czerniaka B16F10 Liu i wsp. (2022) wykazali, że acetonowe ekstrakty z *Sarracenia purpurea* mogą hamować proliferację czerniaka, dzięki indukowaniu wstrzymania cyklu komórkowego w fazie G2. Również Huang i wsp. (2022) zbadali właściwości przeciwnowotworowe ekstraktów z *Sarracenia purpurea* i przedstawili ich cytotoksyczne działanie przeciwko rakowi sutka 4T1.

1.2. Kultury *in vitro* roślin

Kultury *in vitro* roślin składają się z żywotnego eksplantatu umieszczonego w pożywkach hodowlanych, a na cały układ działają kontrolowane czynniki zewnętrzne (natężenie światła, długość ekspozycji na światło, temperatura otoczenia, skład gazowy atmosfery, wilgotność powietrza). Pionierem badań nad kulturami *in vitro* był Gottlieb Haberlandt, który w 1902 ogłosił teorię totipotencji (Haberlandt, 1902). Zgodnie z tą teorią, każda żywa komórka roślinna, przy zastosowaniu odpowiedniej pożywki, posiada zdolność do odtworzenia wyspecjalizowanych organów i całych roślin. Polskim naukowcem, który zapoczątkował prace badawcze w zakresie hodowli tkanek, był Jerzy Czosnowski (Sekrecka, Michałowska, 2015).

Rośliny owadożerne należą do gatunków zagrożonych wyginięciem między innymi ze względu ich powolne rozmnażanie w środowisku naturalnym. Techniki kultur *in vitro* pozwalają w ich przypadku na szybką propagację, dzięki czemu możliwe jest uzyskiwanie licznych rozmnażanych wegetatywnie roślin. Dodatkowo, dzięki zastosowaniu w kulturach *in vitro* tych roślin elitorów (biotycznych i abiotycznych), możliwe jest zwiększanie syntezy związków biologicznie aktywnych (Królicka i wsp., 2008).

1.2.1. Techniki kultur *in vitro* roślin

Rodzaj wykorzystanego do kultury *in vitro* eksplantatu determinuje typ prowadzonej kultury. Wśród najczęściej stosowanych wyróżnia się kultury organów roślinnych (w tym korzeni, pąków wierzchołkowych, kwiatostanów i innych), zawiesin komórkowych, kalusa i protoplastów.

Kultury zawiesin komórkowych uzyskuje się poprzez równomierne rozproszenie w podłożu płynnym pojedynczych komórek roślinnych lub ich drobnych agregatów. Prowadzi się je najczęściej w hodowlach bioreaktorowych przystosowanych do wytwarzania mniejszych sił ścinających podczas mieszania. Jest to niezbędne ze względu na podatność komórek roślinnych na uszkodzenia mechaniczne. Roślinne kultury zawiesinowe wykorzystywane są do badania procesów różnicowania i wzrostu komórek roślinnych. Prowadzi się w nich procesy biotransformacji pożądaných związków chemicznych, a w biotechnologii przemysłowej służą one do produkcji metabolitów wtórnych, mających zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu, medycynie i farmacji.

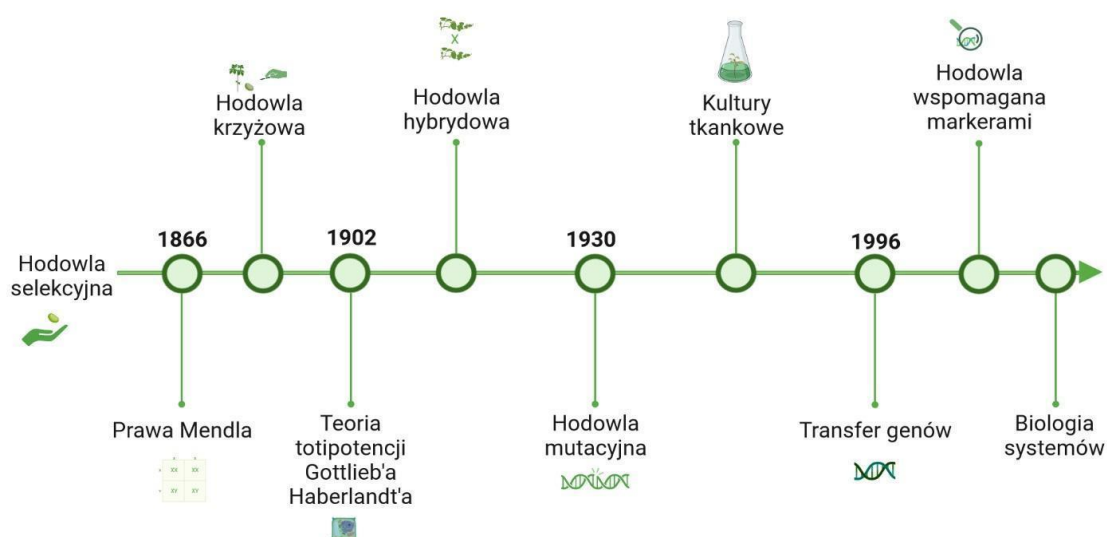
Kalus jest niezróżnicowaną tkanką zbudowaną z komórek parenchymatycznych, w której zachodzą stałe podziały (Malepszy, 2009). Formowanie kalusa należy zaindukować zranieniem rośliny. Przy zastosowaniu odpowiednio dobranych regulatorów wzrostu, w kulturach *in vitro* kalus można uzyskać z większości eksplantatów, lecz jest to ściśle uzależnione od gatunku rośliny. Rośliny jednoliścienne posiadają mniejszą zdolność do wytwarzania tkanki kalusowej niż rośliny dwuliścienne, a podobną zależność wykazują fragmenty roślin nieposiadające merystemów w porównaniu do eksplantatów w nie zaopatrzonych (Malepszy, 2009). W zależności od sił adhezji międzykomórkowej, kalus przyjmuje strukturę od luźnej po silnie zbitą (Malepszy, 2009). Tkanka ta, w zależności od zdolności do syntezy barwników, może przybierać szeroką gamę barw. Kultury kalusa mogą być stosowane do pozyskiwania metabolitów wtórnych oraz rozmnażania roślin. Wadą kalusa jest jednak brak stabilności w zachowaniu struktury chromosomów, co może powodować różnice otrzymanych tą drogą roślin w porównaniu do materiału wyjściowego.

Wśród kultur organów roślinnych wykorzystuje się korzenie. Po odcięciu ich od stożka wzrostu, wprowadzane są do pożywki o obniżonej ilości soli mineralnych, a hodowla prowadzona jest w ciemności. Formowanie korzeni przybyszowych jest nieodłącznym elementem rozmnażania ozdobnych gatunków roślin, u których indukowanie wytwarzania pędów bocznych jest utrudnione (Malepszy, 2009). Kluczowe w tym procesie są fitohormony, choć znane są przypadki zawiązywania korzeni bez udziału regulatorów wzrostu, co jest prawdopodobnie efektem działania auksyn endogennych (Malepszy, 2009). W ostatnich dwóch dekadach popularność zyskują kultury korzeni włóśnikowatych, które zostały opisane w następnych rozdziałach niniejszej pracy.

1.2.2. Modyfikacje genetyczne roślin

Nauka o doskonaleniu cech roślin uprawnych zaczęła rozwijać się w XIX wieku i korzystała początkowo z technik podstawowych (Ryc. 3). Metody te obejmowały, m.in. krzyżowanie i selekcję, hodowlę hybrydową oraz mutagenezę, jednak wiązały się z dużymi nakładami czasu i pracy na każdym z etapów. Nieustanne rozszerzanie i doskonalenie metod w ciągu ostatnich 50 lat, przyczyniło się do rozwoju technik inżynierii genetycznej, pozwalających na znaczne skrócenie drogi uzyskiwania użytecznych odmian roślin.

Transformacja komórek roślinnych jest obecnie jednym z najczęściej stosowanych w agrobiotechnologii narzędzi. Pozwala ona na poprawę składu biochemicznego roślin, tj. uzyskanie w większych stężeniach związków o potencjale farmakologicznym oraz ulepszanie cech użytkowych roślin uprawnych o dużym znaczeniu gospodarczym. Wśród technik modyfikacji genetycznych roślin można wyróżnić: techniki bezwektorowe, pozwalające na bezpośrednie wprowadzenie określonych genów do roślin oraz wektorowe, wymagające zastosowania nośnika materiału genetycznego. Do pierwszej grupy metod należą: elektroporacja, mikroiniekcja, mikrowstrzeliwanie, metoda z użyciem glikolu polietylenowego oraz fuzja protoplastów. Natomiast drugą grupę technik stanowią metody z wykorzystaniem bakterii glebowych z rodzaju *Rhizobium* (wcześniej klasyfikowane jako *Agrobacterium*) i są obecnie najczęściej wykorzystywaną metodą transformacji roślin.



Ryc. 3. Rys historyczny technik hodowli roślin. Opracowanie własne na podstawie Kowalczyk (2013). (Utworzono przy pomocy BioRender).

1.2.3. Zastosowanie hodowli *in vitro* roślin

Pozyskiwanie metabolitów wtórnych z hodowli *in vitro* roślin stanowi bardzo dobrą alternatywę do ich otrzymywania z całych roślin, rosnących w środowisku. Pozwala to na wyeliminowanie stresogennych czynników środowiskowych, uniezależnienie hodowli od ograniczeń geograficznych i rozwiązuje problem ochrony naturalnych siedlisk roślin

(Kowalczyk, 2013). Warunki *in vitro* zapewniają roślinom optymalne warunki wzrostu, co przekładać się może na produkcję większej ilości cennych związków. Należy jednak mieć na uwadze aspekty ekonomiczne związane między innymi z wysokimi nakładami finansowymi na niezbędne materiały oraz zapobieganie zakażeniom mikrobiologicznym.

W kulturach *in vitro* roślin produkcja metabolitów wtórnych na skalę przemysłową związana jest obecnie z uzyskiwaniem związków o potencjale farmaceutycznym. Jak podaje Karuppusamy (2009) i Oleszek (2009) w kulturach kalusa z powodzeniem produkuje się saponiny wykorzystywane w przemyśle kosmetycznym (z *Agave amaniensis*), przeciwmalaryczną artemizynę (z *Ambrosia tenuifolia* Spreng.) oraz związki fenolowe o szerokim spektrum właściwości biologicznie czynnych (z *Scutellaria columnae* All.). Do innych metabolitów uzyskiwanych z kultur zawieszinowych roślin należą: kapsaicyna o silnym działaniu przeciwzapalnym (z *Capsicum annuum* L.), diosgenina o właściwościach antyseptycznych (z *Dioscorea deltoidea* Wall. Ex. Griseb.), czy usprawniające procesy metaboliczne, ginsenozydy (z *Panax notoginseng* [Burkill] F. H. Chen) (Karuppusamy, 2009 i Olszek, 2009). Jak podaje Kowalczyk (2003), w kulturach korzeni rozpowszechniona jest produkcja olejków eterycznych o szerokim zastosowaniu medycznym (z *Artemisia absinthium* L.), eskuliny wykazującej działanie antyoksydacyjne (z *Cichorium intybus* L.) oraz alkaloidów tropanowych stosowanych m.in. w okulistyce (z *Duboisia leichhardtii* F. Muell.). Jedną z wiodących japońskich firm chemicznych, jaką jest Mitsui Chemicals, komercyjnie produkuje z roślin metabolity wtórne, takie jak: antocyjany stosowane w pigmentacji tekstyliów, stosowaną powszechnie berberynę o szerokim spektrum właściwości czy przeciwzapalny geraniol (Espinosa-Leal i wsp., 2018).

Pozyskiwanie metabolitów wtórnych nie stanowi jedynej możliwości wykorzystania technik *in vitro* roślin. Rozmnażanie wegetatywne jest szeroko stosowane w rolnictwie i nasiennictwie. Umożliwia namnażanie roślin na dużą skalę w relatywnie krótkim czasie, co jest szczególnie istotne w produkcji roślin ozdobnych. Technika ta umożliwiła także opracowanie metody uzyskiwania sztucznych nasion (ang. synthetic seeds), składających się z zarodka somatycznego zamkniętego w otoczce chroniącej przed niekorzystnymi warunkami środowiska. Choć wymaga to dużych nakładów finansowych, techniki hodowli *in vitro* wykorzystywane są przez banki genów do zabezpieczenia zasobów genowych roślin. Techniki te są szeroko wykorzystywane między innymi ze względu na możliwość

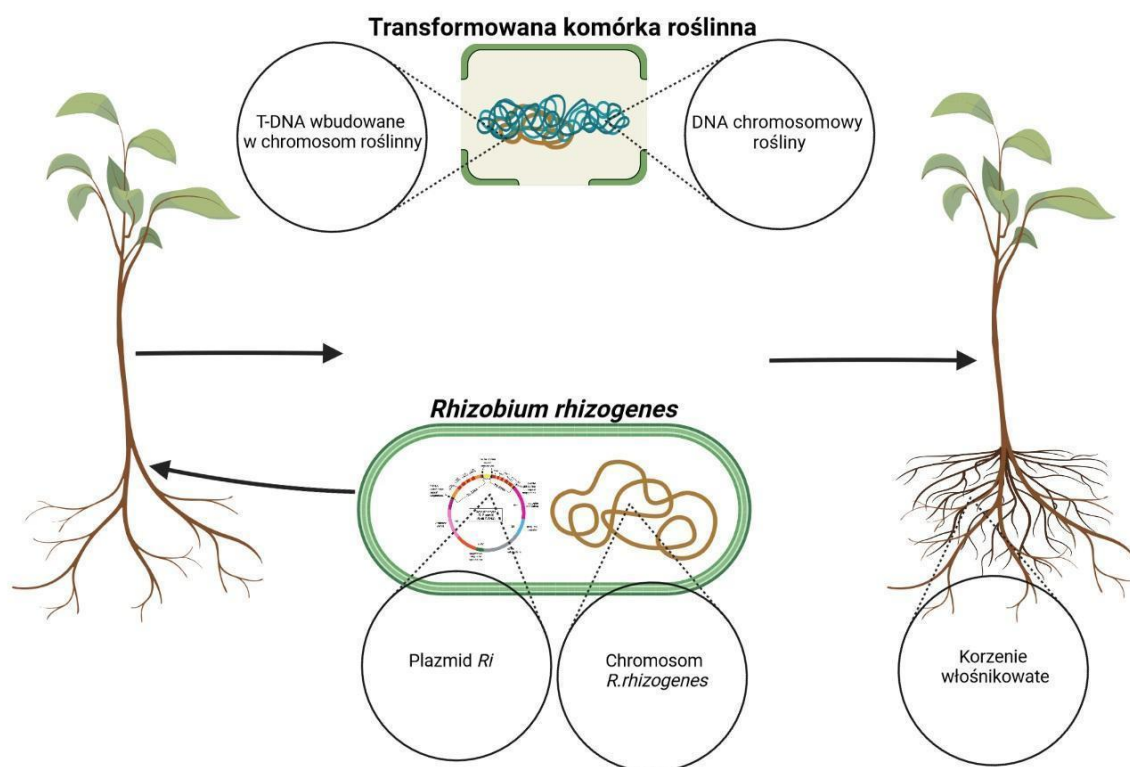
eliminacji chorób bakteryjnych, wirusowych czy grzybiczych roślin uprawnych, co pozwala na uzyskiwanie kwalifikowanego materiału do rozmnażania.

Przemysł spożywczy jest doskonałą przestrzenią do praktycznego wykorzystania roślin z hodowli *in vitro*. Uprawiany od ponad 7000 lat ryż, jako bogate źródło węglowodanów, stanowi jedną z głównych upraw na świecie. Jednym ze sposobów zwiększenia jego produkcji jest zastosowanie hodowli tkankowych (Yaqoob i wsp., 2016). Naukowcy z powodzeniem uzyskują odmiany ryżu o zwiększonym plonowaniu (Benlioglu i wsp., 2015). Również pszenica jest uprawiana na całym świecie jako jedno z głównych zbóż. Uzyskano linie transgenicznych odmian pszenicy odpornych na jej typowe choroby (Liu i wsp., 2013; Chen i wsp., 2008). Obiecujące są także badania nad zwiększeniem plonu pszenicy dzięki wykorzystaniu metod biotechnologicznych (Contardo- Jara i wsp., 2018). Ze względu na ograniczone ilości sadzonek konwencjonalna produkcja popularnego w tropikalnych szerokościach geograficznych ananasa również wspierana jest przez techniki biotechnologii roślin (Roy i wsp., 2000). Przedstawione przykłady stanowią niewielki odsetek praktycznego zastosowania hodowli *in vitro* roślin, lecz są potwierdzeniem celowości wykorzystywania tych technik.

1.3. Korzenie włośnikowate

Korzenie włośnikowate wytwarzane są u roślin, które zostały zainfekowane przez bakterie z gatunku *Rhizobium rhizogenes* (Ryc. 4). Ich cechą charakterystyczną jest intensywny przyrost korzeni bocznych, które strukturą przypominają włosowate odgałęzienia. Struktury te wykazują także ukierunkowaną reakcję na bodźce, określaną jako plagiotropizm. W przeciwieństwie do innych hodowli tkankowych roślin, kultury korzeni włośnikowatych cechują się bardzo wysoką stabilnością genetyczną, brakiem zmian somaklonalnych, co pozwala na wieloletnie prowadzenie hodowli, a w połączeniu z relatywnie szybkim tempem ich namnażania jest opłacalne ekonomicznie. Dodatkowym aspektem jest także zdolność wzrostu korzeni włośnikowatych w pożywkach pozbawionych dodatków hormonów roślinnych (Schwab, 2012). Ze względu na odtworzenie naturalnych warunków wzrostu korzeni, kultury *in vitro* korzeni włośnikowatych w większości prowadzone są w ciemności, choć nie wyklucza się hodowli z udziałem oświetlenia (Kowalczyk i wsp., 2016). Szczególnie istotną cechą omawianych struktur jest ich zdolność do wytwarzania metabolitów wtórnych, które syntezowane są

równocześnie ze wzrostem roślin, co pozwala na ich pozyskiwanie przez cały okres hodowli. Intensywność produkcji związków biologicznie czynnych może zostać zintensyfikowana poprzez dobór odpowiednich składników pożywki oraz warunków hodowli, a także dzięki zastosowaniu odpowiedniego szczepu bakterii z rodzaju *Rhizobium*.



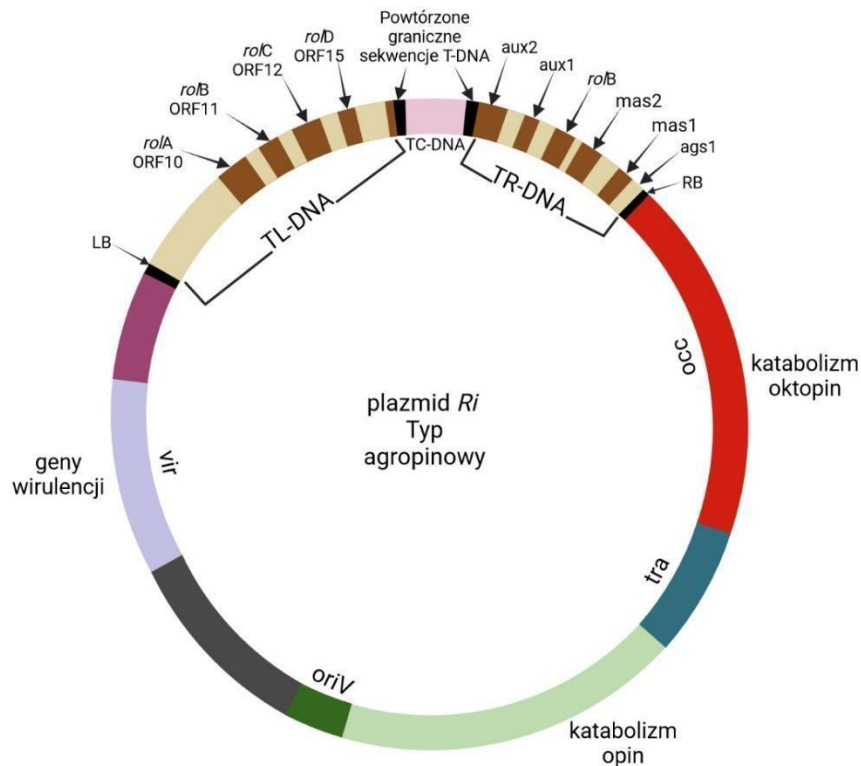
Ryc. 4. Mechanizm powstawania korzeni włosnikowatych. Zmodyfikowano na podstawie Wasilewska, Królicka (2005). (Utworzono przy pomocy BioRender).

1.3.1. Bakterie glebowe z rodzaju *Rhizobium*

Bakterie z gatunku *Rhizobium rhizogenes* należą do grupy Gram-ujemnych fitopatogenów glebowych. Optymalne warunki środowiska, pozwalające na ich wzrost, oscylują w pH 5-9 oraz w temperaturze 26°C (Young i wsp., 2001). Bakterie te posiadają zdolność przenikania do tkanek roślin w miejscu zranienia oraz integracji fragmentu plazmidu z genomem roślin. W komórkach bakterii *Rhizobium rhizogenes* występuje plazmid *Ri* (ang. root inducing) (Ryc. 5.), zawierający geny indukujące wytwarzanie korzeni włosnikowatych (ang. hairy roots), natomiast bakterie *Rhizobium radiobacter* posiadają plazmid *Ti* (ang. tumor

inducing), zawierający geny odpowiedzialne za wytwarzanie charakterystycznych guzów. Najważniejszym elementem w obu plazmidach jest fragment T-DNA (ang. transferred DNA) o wielkości około 15 000-30 000 par zasad (Gelvin, 2003), który zawiera geny kodujące enzymy niezbędne do syntezy hormonów roślinnych oraz geny związane z syntezą opin (Davioud i wsp., 1988). Ze względu na to, że bakterie z rodzaju *Rhizobium* nie posiadają zdolności do wiązania azotu atmosferycznego, opiny, takie jak: agropina, mannopina czy kukumopina są niezbędnym dla nich źródłem azotu i węgla. Rodzaj produkowanych przez bakterie glebowe opin pozwala je podzielić na poszczególne typy, które różnią się budową fragmentu T-DNA (Tepfer, Casse- Delbart, 1987). Bakterie typu agropinowego, które zostały zastosowane w niniejszych badaniach, posiadają dwa odcinki: lewy (T_L-DNA) oraz prawy (T_R-DNA), zaś szczepy typu mannopinowego i kukumopinowego zaopatrzone są tylko w jeden fragment T-DNA (de Paolis i wsp., 1985). Region T_L-DNA zawiera geny *rol* z czterema loci: *rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD*, które mają wpływ na morfologiczne cechy infekcji oraz wykształcenie zmian w roślinach określanych jako „fenotyp korzeni włósnikowatych” (Malepszy, 2009). W ogólnym pojęciu ekspresja genów *rolA* i *rolD* jest odpowiedzialna za objawy infekcji u rośliny, zaś genów *rolB* i *rolC* odpowiada za ujawnienie się nowych cech fenotypowych (Rangslang i wsp., 2018; Favero i wsp., 2021). Funkcja białka RolA nie jest do końca poznana, lecz przypuszcza się, że stanowi czynnik transkrypcyjny w szlaku biosyntezy giberelin (Desmet i wsp., 2021). Występujący we wszystkich plazmidach *Ri* gen *rolB* jest silnym induktorem zmian metabolizmu wtórnego u roślin (Shkryl i wsp., 2008) i pełni istotną rolę w tworzeniu korzeni. Produkt tego genu- β -glukozydaza może uczestniczyć w uwalnianiu kwasu 3-octowego z jego koniugatów z glukozą (Malepszy, 2009). *RolC* posiada sekwencję wrażliwą na sacharozę i jest β -glukozydazą hydrolizującą koniugaty glukozy z cytokinami (Malepszy, 2009). Przypuszcza się, że może pełnić funkcje związane z regulacją metabolizmu cukrów (Faiss i wsp., 1996). Jak wskazują Maurizio i wsp. (2001), funkcjonowanie genu *rolD* związane jest z konwersją ornityny do proliny (gen ten koduje deaminazę ornityny), a także wspomaga intensywne tworzenie generatywnych pąków pomocniczych. Prolina bierze udział w odpowiedzi roślin na stres środowiskowy (Gerszberg, Wiktorek-Smagur, 2022). Odcinek T_R-DNA zawiera geny *aux* (*aux1* i *aux2*) kodujące enzymy, które uczestniczą w biosyntezie auksyn, a także geny odpowiedzialne za syntezę i wydzielanie opin (Malepszy, 2009). Zespół zmian, zwany „fenotypem korzeni owłosionych”, obejmuje szereg cech roślin, takich jak: karłowatość, pofałdowanie struktur liści, opóźniony proces kwitnienia i wytwarzanie zmienionych morfologicznie kwiatów czy zaburzenia w obrębie formowania nasion (Gerszberg, Hnatuszko- Konka, 2017).

Bezpieczne wycięcie fragmentów T-DNA w plazmidach obu bakterii możliwe jest dzięki sekwencjom sygnałowym umieszczonym na ich końcach. Sekwencje te są rozpoznawane przez białka VirD2, co umożliwia nacięcie DNA (Hooykaas, Schilperoort, 1992). Białko podczas tego procesu zostaje związane z końcem 5' ss-DNA, co pozwala ochronić materiał genetyczny przed szkodliwym działaniem endonukleaz 5' → 3'.



Ryc. 5. Schemat plazmidu bakterii *Rhizobium rhizogenes* typu agropinowego. Zmodyfikowano na podstawie Ozyigit i wsp. (2013). (Utworzono przy pomocy BioRender).

1.3.2. Mechanizm agroinfekcji

Mechanizm agroinfekcji roślin za pomocą bakterii glebowych z rodzaju *Rhizobium* wykazuje podobieństwo dla obu gatunków *R. rhizogenes* i *R. radiobacter* (Królicka, Wasilewska, 2005). Zdolność tych mikroorganizmów do infekcji roślin związana jest z obecnością w ich komórkach plazmidów *Ri* i *Ti*. Kluczowe w przeprowadzeniu transformacji są trzy odcinki DNA. Pierwszy zawiera geny *chv* i zlokalizowany jest w chromosomie bakteryjnym, a dwa kolejne znajdują się w plazmidzie i jest to region *vir* oraz T-DNA (Nester i wsp., 1984). Patogeneza rozpoczyna się od absorpcji bakterii glebowych na powierzchni

infekowanej rośliny. Istotny w tym procesie jest region *chv* odpowiedzialny za syntezę glikoprotein i białek. W miejscu powstałego zranienia roślina wytwarza związki fenolowe, które na skutek kaskady sygnałowej aktywują region wirulencji *vir*. Za syntezę enzymu wycinającego fragment T-DNA z plazmidu bakteryjnego odpowiedzialne jest białko VirD2. Po uzyskaniu ss T-DNA białko VirE2 opłaszczca wycięty fragment (Dürrenberger i wsp., 1989). Białka VirB i VirD4 odpowiadają za utworzenie kanału umożliwiającego transport tak powstałego kompleksu białkowo-nukleinowego (de la Riva i wsp., 1998). Kolejno kompleks zostaje wprowadzony do genomu biorcy, a następnie dochodzi do nadpisania nici komplementarnej. Po integracji z genomem rośliny zachodzi synteza hormonów roślinnych, na skutek czego u roślin występują guzy (*Rhizobium radiobacter*) lub korzenie włośnikowate (*Rhizobium rhizogenes*).

1.3.3. Praktyczne możliwości zastosowania hodowli korzeni włośnikowatych

Kultury korzeni włośnikowatych otrzymanych w wyniku agroinfekcji roślin przez bakterie *Rhizobium rhizogenes* są najczęściej badany i szeroko stosowanym systemem współczesnej biotechnologii (Gerszberg, Wiktorek-Smagur, 2022). Kultury te stanowią model do badań nad procesami fizjologicznymi u roślin i pozwoliły na poznanie szlaków biosyntezy wielu metabolitów wtórnych. Są one wykorzystywane w modyfikacjach roślin oraz analizie funkcjonalnej genów (Qin i wsp., 2022). Kultury korzeni włośnikowatych prowadzone są w ściśle kontrolowanych warunkach, dzięki czemu mogą być bezpieczną platformą do produkcji użytecznych dla ludzi związków (Kowalczyk i wsp., 2016; Rage i wsp., 2020).

Pierwszym biofarmaceutykiem produkowanym dzięki hodowli roślinnej, który uzyskał pozytywną opinię Amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (ang. FDA, Food and Drug Administration) i został wprowadzony do obrotu, był enzym taliglukaraza alfa (Kaiser, 2008 i Maxmen, 2012). Jest to substancja niezbędna w terapii choroby Gauchera, w wyniku której nie dochodzi do wytwarzania glukocerebrozydazy (Grabowski i wsp., 2014). Stan ten przyczynia się do gromadzenia w narządach glukozyloceramidu, czego skutkiem są zaburzenia w funkcjonowaniu całego organizmu (Goldblatt, 1988). W związku z tym, iż jest to choroba uwarunkowana genetycznie, niezbędne jest dostarczanie brakującego enzymu. Na świecie wiele badań klinicznych opartych jest

obecnie na związkach pozyskiwanych z kultur tkankowych roślin, w tym kultur korzeni włośnikowatych. Gaume i wsp. (2003) wykazali, że wytwarzanie innego enzymu ludzkiej fosfatazy alkalicznej w kulturach korzeni włośnikowatych jest znacznie bardziej wydajne, niż w przypadku hodowli korzeni przybyszowych. W modelowej roślinie *Nicotiana tabacum* L. zauważono, że w porównaniu z innymi hodowlami ilość wytwarzanej fosfatazy alkalicznej jest taka sama, natomiast kultury korzeni włośnikowatych wykazują się znacznie wyższą ilością wydzielania jej do podłoża, co ułatwia oczyszczenie finalnego produktu (Gaume i wsp., 2003).

W oparciu o kultury korzeni włośnikowatych produkowanych jest wiele użytecznych w leczeniu chorób związków, dla których, ze względu na rosnące zapotrzebowanie, poszukiwane są alternatywne metody ich pozyskiwania (Tabela 2). Niezbędna w leczeniu niskorosłości somatotropina produkowana jest w kulturach korzeni włośnikowatych *Nicotiana benthamiana* Domin w ilości do 6 mg/ kg świeżej masy (Sharp i Doran, 1999). Za pomocą tej rośliny pozyskuje się także stosowany w terapiach chorób: autoimmunologicznych, nowotworowych i wirusowych interferon (Kuzovkina i Schneider, 2006). Liu i wsp. (2009) opisali możliwość produkcji interleukin w kulturach *Nicotiana tabacum* L. Hodowle korzeni włośnikowatych tytoniu mogą być także wykorzystywane do wytwarzania przeciwciał monoklonalnych klasy IgG i IgA o właściwościach podobnych tych uzyskiwanych z komórek ssaczych (Häkkinen i wsp., 2014). Kolejnym, istotnym w leczeniu chorych predysponowanych do powstawania zakrzepów krwi, związkiem produkowanym w hodowlach korzeni włośnikowatych *Cucumis melo* L. jest aktywator plazminogenu tkankowego (Gołąb i wsp., 2004). Antygeny i enzymy stanowią dużą grupę terapeutyków wielu chorób. Również ich uzyskiwanie możliwe jest dzięki zastosowaniu hodowli roślinnych. Przykład stanowi antygen wirusa zapalenia wątroby z kultur korzeni włośnikowatych ziemniaka (Sudha i wsp., 2013), cholinoesterazy z *Nicotiana benthamiana* Domin (Wirz i wsp., 2012) czy wspomniana fosfataza alkaliczna z *Nicotiana tabacum* L. (Gaume i wsp., 2003).

Tabela 2. Przykłady związków terapeutycznych produkowanych w kulturach korzeni włośnikowatych

Przykład roślin w kulturach korzeni włośnikowatych	Produkowany związek	Możliwe zastosowanie	Bibliografia
<i>Andrographis paniculata</i> (Burm. f.) Nees	Andrographis	Wspomaganie działania układu immunologicznego	Marwani i wsp., 2015
<i>Artemisia annua</i> L.	Artemizyna	Środek przeciwmalaryczny	Ahlawat i wsp., 2012
<i>Portulaca oleracea</i> L.	Dopamina	Leczenie zaburzeń hemodynamicznych	Mohghadam i wsp., 2014
<i>Ophiorrhiza mungos</i> L.	Kamptotecyna	Środek przeciwnowotworowy	Wetterauer i wsp., 2018
<i>Papaver somniferum</i> L.	Kodeina	Środek przeciwkaszlowy	Le Flem-Bonhomme i wsp., 2004
<i>Papavar orientale</i> L.	Morfina	Terapia bólu	Hashemi i Naghavi, 2016
<i>Corylus avellana</i> L.	Paklitaksel	Terapia przeciwnowotworowa	Parizi i wsp., 2020
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Rekombinowana erytropoetyna	Leczenie niedokrwistości	Gurusamy i wsp., 2017
<i>Rauvolfia serpentina</i> (L.) Benth. Ex Kurz	Rezerpina	Terapia nadciśnienia tętniczego	Pandey i wsp., 2014
<i>Hyoscyamus muticus</i> L.	Skopolamina	Leczenie stanów skurczowych mięśni gładkich	Dehghan i wsp., 2012

Kultury korzeni włośnikowatych mogą być także wykorzystywane do procesów fitoremediacji zanieczyszczeń środowiska (Perotti i wsp., 2020; Kaushal, Mahajan, 2022). W praktyce jako pierwsze mają kontakt z substancjami toksycznymi, więc są zdolne do wykształcenia odpowiednich mechanizmów w walce z nimi. Jak zauważają Agostini i wsp. (2013), połączenie biotechnologii roślin oraz fitoremediacji wspomaganą mikroorganizmami, stanowi doskonałą przestrzeń do uzyskiwania systemów roślinnych, pomocnych w oczyszczaniu środowiska z toksyn, takich jak: metale ciężkie, radionuklidy, barwniki czy odpady farmaceutyczne. Lystvan i wsp. (2021) wykazali, że korzenie

włosnikowate *Convolvulus tricolor* L. posiadają zdolność akumulacji jonów metali ciężkich, więc mogą być z powodzeniem wykorzystywane w fitoremediacji. Potencjał w komercyjnym oczyszczaniu ścieków po produkcji tekstyliów wykazują korzenie włosnikowate słonecznika *Helianthus annuus* L. (Srikantan i wsp., 2021). Zaobserwowano u nich zdolność do usuwania barwników azotowych z roztworów wodnych i zwiększoną produkcję przeciwutleniaczy (Srikantan i wsp., 2021).

1.4. *Sarracenia purpurea* L. jako obiekt badań

W literaturze naukowej dostępnych jest jedynie kilka pozycji dotyczących roślin *Sarracenia purpurea* L. w kulturach *in vitro*. Badania prowadzone przez Miclea i Bernat'a (2018) miały służyć możliwości stymulacji namnażania kaptownic za pomocą regulatorów wzrostu NAA i BAP. Chang (2011) przeprowadził eksperymenty nad *Sarracenia purpurea* L. w kulturach *in vitro* w celu opisanie produkcji proteaz podczas trawienia schwytanej ofiary. Brak jest jednak szczegółowych informacji opisujących procedury związane z odkażaniem materiału roślinnego przed wprowadzeniem do kultur *in vitro* oraz dokładnych opisów etapów ich namnażania w warunkach laboratoryjnych. Jak opisano w podrozdziale 1.3.1., dostępne doniesienia naukowe związane są z badaniem składu biochemicznego ekstraktów pozyskiwanych z *Sarracenia purpurea* L. (Rosa i wsp., 2008; Barthelemy i wsp., 2009; Cieniak i wsp., 2015; Tor-Anyiim i wsp., 2015; Morrison i wsp., 2016; Hatcher i wsp., 2020) oraz potencjalną aktywnością biologiczną związków w nich zawartych (Leduc i wsp., 2006; Spoor i wsp., 2006; Melnic i wsp., 2009; Martineau i wsp., 2010; Harris i wsp., 2012; Muhammad i wsp., 2012; Kannan i wsp., 2020; Liu i wsp., 2022; Huang i wsp., 2022).

Współczesny tryb życia ludzi, związany między innymi z brakiem zbilansowanej diety i ruchu, zanieczyszczeniami środowiska czy przewlekłym stresem, przyczynia się do wzrostu zachorowalności na schorzenia już znane, ale także powstawania nowych jednostek chorobowych. Determinuje to znaczny wzrost zapotrzebowania na uzyskiwanie nowych terapii oraz środków leczniczych. Podwaliny pod współczesną farmakoterapię powstały na bazie związków naturalnie występujących w przyrodzie, zwłaszcza w roślinach. Nowoczesna farmakoterapia, oparta na środkach syntetycznych, doskonale przenika się z medycyną naturalną, związaną z surowcami roślinnymi. W związku z tym,

naukowcy na całym świecie poszukują nowych, bezpiecznych i skutecznych substancji ekstrahowanych z roślin za pomocą technik, które są także opłacalne ekonomicznie.

Uwzględniając znaczny potencjał *Sarracenia purpurea* L., potrzebę uzupełnienia literatury naukowej o szczegółowe dane dotyczące mikropropagacji tych roślin, a także możliwość zastosowania technik inżynierii genetycznej w celu uzyskania korzeni włóśnikowatych w kulturach tych roślin, zdecydowano się na wykorzystanie *Sarracenia purpurea* L. jako obiektu badań niniejszej pracy. Istotną przesłanką, potwierdzającą zasadność prowadzonych prac, było także rosnące zapotrzebowanie na naturalne substancje o potencjale terapeutycznym i chemoprewencyjnym.

Cel pracy

Problem rosnącej liczby zachorowań na nowotwory, choroby o podłożu bakteryjnym i wirusowym, a także wzrostu przypadków antybiotykoodporności bakterii chorobotwórczych niesie poważne konsekwencje dla zdrowia i życia ludzi. Istotnym obszarem badań jest poszukiwanie nowych terapii chorób oraz związków o działaniu terapeutycznym.

Mając na uwadze potencjalne właściwości bioaktywne związków występujących w *Sarracenia purpurea* L. założeniem niniejszej pracy było wprowadzenie tych roślin do kultur *in vitro* i ukierunkowanie ich wzrostu oraz rozwoju na wytwarzanie korzeni włóśnikowatych, akumulujących cenne substancje o potencjale farmakologicznym.

Zadania badawcze, których celem było zrealizowanie przedstawionych powyżej zagadnień obejmowały następujące etapy:

1. Wyprowadzenie sterylnych kultur *in vitro* *Sarracenia purpurea* L.
2. Optymalizacja warunków wzrostu roślin w kulturach *in vitro*.
3. Transformacja roślin przy użyciu bakterii *Rhizobium rhizogenes* i selekcja otrzymanych roślin.
4. Ocena składu biochemicznego roślin *Sarracenia purpurea* L. rosnących w warunkach *in vitro*, pod kątem zawartości związków o potencjale antybakteryjnym i przeciwnowotworowym.
5. Optymalizacja metody ekstrakcji związków bioaktywnych z pędów i korzeni otrzymanych roślin.
6. Oznaczenie właściwości antybakteryjnych ekstraktów roślinnych *S.purpurea* L. w odniesieniu do bakterii chorobotwórczych w stosunku do ludzi.
7. Ocena cytotoksyczności oraz aktywności przeciwnowotworowej ekstraktów *Sarracenia purpurea* L.

3. Materiały i metody

3.1. Materiały

3.1.1. Materiał roślinny

Materiał roślinny będący przedmiotem badań stanowiły rośliny owadożerne z gatunku *Sarracenia purpurea* L., które pozyskano dzięki uprzejmości Ogrodu Botanicznego Uniwersytetu Wrocławskiego.

Hodowlę roślin prowadzono w komorze fitotronowej (Panasonic MLR- 352) w stałej temperaturze 26°C. Wilgotność utrzymywano na poziomie 65% przy fotoperiodzie (stosunek dobowy dnia do nocy: 16h/ 8h). Natężenie oświetlenia światła białego wynosiło 40 $\mu\text{mol/s/m}^2$.

Rośliny hodowano na podłożu MS (Murashige i Skoog, 1962), którego skład zamieszczono w tabeli poniżej (Tabela 3). Stosowano 1/3 siły MS.

Tabela 3. Skład podstawowego podłoża MS

Składnik	Zawartość (mg/L)
Azotan (V) amonu (NH_4NO_3)	1650
Azotan (V) potasu (KNO_3)	1900
Chlorek kobaltu (II) sześciowodny ($\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)	0,025
Chlorek wapnia (CaCl_2)	332,2
Chlorowodorek pirydoksyny ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$)	0,5
Chlorowodorek tiaminy ($\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS}$)	0,1
Diwodorofosforan potasu (KH_2PO_4)	170
Glicyna ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)	2,0
Jodek potasu (KI)	0,83
Kwas borowy (H_2BO_3)	6,2
Kwas nikotynowy ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$)	0,5
Mioinozytol ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	100,0

Składnik	Zawartość (mg/L)
Siarczan (VI) cynku siedmiowodny ($ZnSO_4 \times 7H_2O$)	10,6
Siarczan (VI) magnezu ($MgSO_4$)	180,7
Siarczan (VI) magnezu jednowodny ($MnSO_4 \times H_2O$)	16,9
Siarczan (VI) miedzi pięciowodny ($CuSO_4 \times 5H_2O$)	0,025
Siarczan (VI) żelaza siedmiowodny ($FeSO_4 \times 7H_2O$)	27,8
Wersenian sodu (Na_2EDTA)	37,26

W celu inicjacji kallusa na uzyskanych eksplantatach roślin po transformacji genetycznej zastosowano podłoże z dodatkiem hormonów roślinnych, którego skład podano w tabeli 4.

Tabela 4. Skład podłoża

Regulator wzrostu	Stężenie (mg/L)
6- benzyloaminopuryna (BAP)	0,8
Kwas- 1- naftylooctowy (NAA)	0,25
Składniki podstawowe	Stężenie (g/L)
MS	1,46
Sacharoza	30
Agar	8

3.1.2. Szczepy bakteryjne

W niniejszej pracy do przeprowadzenia transformacji genetycznej roślin *Sarracenia purpurea* L. wykorzystano szczepy bakterii *Rhizobium rhizogenes*: A4 oraz LBA 9402 pozyskane z kolekcji mikroorganizmów Katedry Chemii Żywności i Biokatalizy Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu oraz szczep ATCC 15834 pochodzący z kolekcji mikroorganizmów Uniwersytetu Technicznego w Dreźnie (Technische Universität Dresden). Są to szczepy typu agropinowego, które charakteryzują się najwyższą wirulencją wśród szczepów bakterii *Rhizobium rhizogenes*.

W celu oznaczenia właściwości przeciwdrobnoustrojowych badanych roślin zastosowano 2 szczepy bakterii Gram- dodatnich (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) oraz 3 szczepy bakterii Gram- ujemnych (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*). Szczepy: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* i *Pseudomonas aeruginosa*, pochodziły z kolekcji czystych kultur Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (Wrocław, Polska), natomiast szczepy: *Escherichia coli* i *Salmonella typhi*, z kolekcji kultur komórkowych DSMZ (Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen) (Lipsk, Niemcy).

3.1.3. Podłoża mikrobiologiczne

Agar Muellera- Hinton, skład na 1L

Odwodniony napar z wołowiny 300,0 g

Hydrolizat kazeiny 17,5 g

Skrobia 1,5 g

Agar 17,0 g

pH podłoża: 7,3

Bulion LB, skład na 1L

NaCl 10,0 g

Trypton 10,0 g

Wyciąg drożdżowy 5,0 g

pH podłoża: 6,8-7,2

podłoże PDA, skład na 1L

Wyciąg ziemniaczany 4,0 g

Glukoza 20,0 g

Agar 15,0 g

pH podłoża: 5,6

podłoże YEB, skład na 1L

Ekstrakt drożdżowy	1,0 g
Ekstrakt wołowy	5,0 g
Pepton	5,0 g
Sacharoza	5,0 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,49 g
Agar	20,0 g

pH podłoża: 6,8-7,2

Podłoża sterylizowano w autoklawie w temperaturze 121,0°C, pod ciśnieniem 1 atmosfery przez 20 minut.

3.1.4. Odczynniki chemiczne i komercyjne zestawy odczynnikowe**Tabela 5. Odczynniki organiczne**

Nazwa	Producent
Aceton (C ₃ H ₆ O)	POCH, Polska
Acetosyringon (C ₁₀ H ₁₂ O ₄)	Sigma Aldrich, USA
Agar	Biocorp, Polska
Agar high gel strength	Sigma- Aldrich, USA
Agarozza	Merck Millipore, USA
Agar Mueller- Hinton	Sigma Aldrich, USA
Alkohol etylowy 99,9% (C ₂ H ₅ OH)	Stanlab, Polska
Alkohol izopropylowy cz.d.a. (C ₃ H ₈ O)	Stanlab, Polska
Alkohol metylowy cz.d.a. (CH ₃ OH)	Stanlab, Polska
Cefotaxime sodium	A&A Biotechnology, Polska

Nazwa	Producent
Ekstrakt drożdżowy	Merck Millipore, USA
Ekstrakt wołowy	Merck Millipore, USA
Etanol 96% (C ₂ H ₅ OH)	POCH, Polska
Eter dietylowy ((C ₂ H ₅) ₂ O)	POCH, Polska
Fuksyna zasadowa	POCH, Polska
Glicerol (C ₃ H ₈ O ₃)	POCH, Polska
Glukoza (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Merck Millipore, USA
Heksan 99% (C ₆ H ₁₄)	Stanlab, Polska
Kwas 2,4- dichlorofenoksyoctowy (C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃)	Sigma Aldrich, USA
Kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA, C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	MP Biomedicals, LCC
Kwas indoilo- 3- masłowy (C ₁₂ H ₁₃ NO ₂)	Sigma Aldrich, USA
Kwas mrówkowy 85% cz.d.a. (HCOOH)	POCH, Polska
Kwas naftylo- 1- octowy (C ₁₂ H ₁₀ O ₂)	Sigma Aldrich, USA
Kwas octowy ≥ 99% (CH₃COOH)	POCH, Polska
Laurylosiarczan sodu (SDS, NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄)	Sigma- Aldrich, USA
Lizozym	Sigma- Aldrich, USA
Metanol cz.d.a. (CH ₃ OH)	POCH, Polska
Murashige and Skoog Basal Medium	Sigma- Aldrich, USA
Octan etylu cz.d.a. (C ₄ H ₈ O ₂)	Stanlab, Polska
Octan potasu (CH ₃ CO ₂ K)	Sigma- Aldrich, USA
Odczynnik Folina- Ciocalteu	Sigma- Aldrich, USA
Oksytetracyklina (C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉)	A&A Biotechnology, Polska

Nazwa	Producent
Phytigel™	Sigma Aldrich, USA
Podłoże Potato Extract Dextrose Agar	Merck Millipore, USA
PPM (Plant Preservative Mixture™)	Plant Cell Technology, USA
Sacharoza cz.d.a. (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	Chempur, Polska
SYBR- Green	Syngen Biotech, Polska
Wankomycyna (C ₆₆ H ₇₅ N ₉ O ₂₄ Cl ₂)	Sigma Aldrich, USA
6- benzyloaminopuryna (C ₁₂ H ₁₁ N ₅)	Sigma Aldrich, USA
4- dimetyloaminobenzaldehyd (C ₉ H ₁₁ NO)	Chempur, Polska
2- izopentyloadenina (C ₁₀ H ₁₃ N ₅)	Sigma Aldrich, USA

Tabela 6. Odczynniki nieorganiczne

Nazwa	Producent
Chlorek magnezu (MgCl ₂)	POCH, Polska
Chlorek sodu (NaCl)	POCH, Polska
Kwas chlorowodorowy (HCl)	Chempur, Polska
Kwas azotowy V (HNO ₃)	POCH, Polska
Kwas siarkowy VI (H ₂ SO ₄)	POCH, Polska
Węglan wapnia (CaCO ₃)	POCH, Polska
Wodorotlenek litu (LiOH)	POCH, Polska
Wodorotlenek potasu (KOH)	POCH, Polska
Wodorotlenek sodu (NaOH)	POCH, Polska
Wodoru nadtlenuk r-r 30% cz.d.a. (H ₂ O ₂)	Chempur, Polska

Tabela 7. Komercyjne zestawy i odczynniki do biologii molekularnej

Nazwa	Producent
O'GeneRuler Express DNA Ladder marker	Thermo Fisher Scientific, USA
DNAase I, RNase- free (1 U/ μ L)	Thermo Fisher Scientific, USA
Reaction Buffer with MgCl ₂ for DNase I (10X)	Thermo Fisher Scientific, USA
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder marker	Thermo Fisher Scientific, USA
Midori Green Advance DNA Stain	Nippon Genetics Europe, Niemcy
Phire Plant Direct PCR Kit	Thermo Fisher Scientific, USA
Plasmid Mini AX	Thermo Fisher Scientific, USA
Startery PCR	Thermo Fisher Scientific, USA
Woda DEPC wolna od nukleaz	Thermo Fisher Scientific, USA

3.2. Metody

3.2.1. Zakładanie aseptycznych kultur roślin z rodzaju *Sarracenia*

Wstępna sterylizacja roślin polegała na kilkukrotnym, dokładnym umyciu roślin sterylną wodą destylowaną. Kolejnym etapem było uzyskanie z liści za pomocą skalpela, w warunkach sterylnych, eksplantatów o wielkości około 5 mm x 5mm. Przygotowane fragmenty roślin płukano w 70% roztworze etanolu przez jedną minutę. Następnie eksplantaty płukano przez 3 minuty w sterylnej wodzie destylowanej, a następnie przez 5 minut w 10% roztworze nadtlenku wodoru. Kolejny etap stanowiło zanurzenie eksplantatów w roztworze zawierającym 10% komercyjnego wybielacza „Domestos” oraz 10% SDS (Pilarska i wsp., 2022). Po tej czynności każdy z fragmentów był 4-krotnie płukany przez 5 minut w jałowej wodzie destylowanej. Sterylne części roślin oczyszczono z uszkodzeń powstałych na brzegach na skutek działania wybielacza. Tak uzyskane eksplantaty wytrząsano przez 4 godziny w 3% roztworze PPM, a następnie umieszczono w pożywce zawierającej 1,46 g/L MS, 30,0 g/L sacharozy, 8,0 g/L agaru oraz 750 μ L/L PPM. Eksplantaty inkubowano w komorze fitotronowej (3 LS, 65% wilgotność, 25°C) przez tydzień i przenoszono co 7 dni na świeże podłoże.

3.2.2. Optymalizacja warunków wzrostu w warunkach *in vitro*

Dostępne dane literaturowe dotyczące hodowli *in vitro* roślin owadożernych wskazują na ich odpowiednie warunki wzrostu w następujących parametrach podłoża: 1,46 g/L podłoża MS, 3% sacharozy oraz pH=5,8. W naturalnych warunkach rośliny *Sarracenia purpurea* L. występują na terenach charakteryzujących się niskim odczynem pH. Optymalizacja składu podłoża dla *Sarracenia purpurea* L. w warunkach *in vitro* stanowiła ważny element prowadzonych badań.

W pierwszym etapie przygotowano cztery warianty podłoża, uwzględniające różne wartości pH: Wariant 1- pH=3,6, Wariant 2- pH=4,6, Wariant 3- pH=5,6 i Wariant 4- pH=6,6. Rośliny przeniesiono do tak przygotowanych pożywek i prowadzono obserwacje ich zmian fenotypowych. Po 12 tygodniach w roślinach oznaczono ogólną zawartość chlorofilu, karotenoidów, związków fenolowych, triterpenów oraz pojemność antyoksydacyjną.

Drugim etapem była analiza, w oparciu o model planowania doświadczeń Box-Behnken Design, trzech zmiennych niezależnych: zawartość pożywki MS (X_1 , 0,73-2,20 g/L), stężenie sacharozy (X_2 , 0,8-3,0%) oraz pH podłoża (X_3 , 3,6-6,6), których wartości podano w tabeli 8. Zgodnie z projektem eksperymentu, przygotowano 15 wariantów pożywki (załącznik 1), do której wprowadzono rośliny. Na tym etapie eksperymentu uwzględniano ocenę makroskopową zmian fenotypowych roślin (tempo wzrostu roślin oraz ich kondycja), która stanowiła ważny jego aspekt- odrzucono rośliny niezdolne do przeżycia w danych warunkach (obumieranie, zeszklenie lub zahamowanie wzrostu roślin). Następnie w uzyskanych z czterech wariantów pożywki roślinach oznaczono ogólną zawartość chlorofilu oraz karotenoidów- wartości te stanowiły zmienną zależną. W roślinach określono także ogólną zawartość związków fenolowych, triterpenów oraz pojemność antyoksydacyjną. Na podstawie uzyskanych danych, określono optymalny skład pożywki dla roślin *Sarracenia purpurea* L. w kulturach *in vitro*.

Tabela 8. Zmienne niezależne dla modelu planowania doświadczenia

Zmienna niezależna	Zmienna zależna			
	Czynnik	Wartość niska (-1)	Wartość średnia (0)	Wartość wysoka (+1)
Zawartość pożywki MS (g/L)	X_1	0,73	1,47	2,20
Stężenie sacharozy (%)	X_2	0,8	1,9	3,0
pH podłoża	X_3	3,6	5,1	6,6

3.2.3. Hodowla bakterii

Hodowle bakterii *Rhizobium rhizogenes* ATTC 15834, LBA 9402 oraz A4 prowadzono w podłożu YEB w temperaturze 26°C. Najpierw metodą płytek rysowych uzyskano czyste kultury, a następnie pojedyncze kolonie wykorzystywano do uzyskania hodowli płynnej w podłożu YEB.

3.2.3.1. Przechowywanie bakterii

Czyste kultury bakterii przechowywano w temperaturze -80°C w stokach glicerynowych o stężeniu 65%. Do bieżącej pracy bakterie wysiewano na płytki z podłożem YEB i inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 26°C, w ciemności. Płytki z czystymi kulturami przechowywano przez tydzień w warunkach chłodniczych (+4°C).

3.2.3.2. Namnażanie bakterii w hodowli płynnej

Pojedyncze kolonie bakterii *Rhizobium rhizogenes* trzech szczepów: ATCC 15834, LBA 9402 oraz A4, wprowadzano za pomocą jałowej ezy do 45 ml sterylnego podłoża YEB. Hodowle inkubowano w temperaturze 26°C przez 48 godzin, a następnie sprawdzano ich gęstość optyczną przy użyciu czytnika płytek Tecan. Do transformacji *Sarracenia purpurea* L. stosowano hodowle o $OD_{600} = 0,4-1,0$.

3.2.4. Transformacja genetyczna roślin

W celu uzyskania kultur korzeni włósnikowatych u roślin *Sarracenia purpurea* L. zastosowano dwie alternatywne metody transformacji wykorzystujące *Rhizobium rhizogenes*. Przed przystąpieniem do transformacji, przy pomocy skalpela, przygotowano eksplantaty *Sarracenia purpurea* L. (fragmenty liści lub młode rośliny). Każdy z etapów wykonano zachowując wysoki reżim sanitarny.

3.2.4.1. Transformacja za pomocą metody iniekcji

Kultury *Rhizobium rhizogenes* wstrzyknięto do przygotowanych eksplantatów roślinnych za pomocą sterylnej igły, a następnie umieszczono je na podłożu MS i inkubowano przez 24 godziny w 26°C. W kolejnym etapie eksplantaty wypłukano w 45 ml sterylnej wody destylowanej z dodatkiem 100 mg/L karbenicyliny, umieszczono na sterylnych papierkach filtracyjnych w celu odprowadzenia nadmiaru płynów, a następnie wyłożono na podłoże MS zawierające 100 mg/L karbenicyliny i 400 mg/L claforanu, celem wyeliminowania z eksplantatów pozostałości bakterii *Rhizobium rhizogenes*. Po 7 dniach eksplantaty przełożono na nowe podłoże MS z 200 mg/L claforanu i inkubowano w komorze fitotronowej przez 14 dni w ciemności. Następnie fragmenty roślin przeniesiono do nowego podłoża MS zawierającego claforan oraz 30,0 g/L sacharozy, 750µL/L PPM i inkubowano przez 14 dni. Kolejnym etapem było przeniesienie eksplantatów na podłoże MS niezawierające antybiotyku. Tak uzyskane eksplantaty pasażowano na świeże podłoże co 7 dni.

3.2.4.2. Transformacja za pomocą metody kokultury

Otrzymane eksplantaty roślin umieszczono w sterylnych płytkach Petriego, zawierających 50µL kultury bakterii *Rhizobium rhizogenes* zawieszonej w 25 ml sterylnej wody destylowanej. Tak przygotowane płytki inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 26°C. Następnie eksplantaty wypłukano kilkakrotnie w jałowej wodzie destylowanej i umieszczono na podłożu MS z dodatkiem sacharozy (3%), karbenicyliny i claforanu, celem wyeliminowania pozostałości stosowanych do transformacji bakterii. W dalszych etapach zastosowano procedury zmniejszania stężenia antybiotyków, opisane wyżej.

3.2.4.2. Izolacja DNA plazmidowego z *Rhizobium rhizogenes*

Przeprowadzenie optymalizacji warunków reakcji PCR stanowiło niezbędny etap analizy efektów zastosowanych technik transformacji. W tym celu założono hodowle wykorzystanych bakterii *Rhizobium rhizogenes*, które prowadzono przez 48 godzin w temperaturze 26°C w ciemności. Następnie zawiesiny zwirowano przy 13000 rpm przez 10 minut. Czynność tę powtórzono trzykrotnie, usuwając supernatant. Uzyskany osad przemyto za pomocą 1 ml 1M roztworu chlorku sodu. Tak uzyskany osad zawieszono w 200µL roztworu I (Tabela 9) i inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 minut. Następnie dodano 400µL roztworu II (Tabela 9). Falcon zawierający mieszaninę ostrożnie odwrócono i inkubowano w temperaturze pokojowej. Po upływie 5 minut dodano 300µL roztworu III (Tabela 9) i falcon ponownie delikatnie odwrócono, pozostawiając go na 5 minut w temperaturze pokojowej. Uzyskaną mieszaninę zwirowano przy 13000 rpm przez 10 minut i przeniesiono supernatant do czystej probówki. Do supernatantu dodano 750µL izopropanolu i całość inkubowano w temperaturze 25°C przez 15 minut i odwirowano. Uzyskany DNA przemyto 70% roztworem etanolu. Czynność tę powtórzono dwukrotnie. Próbkę suszono przez 10 minut w temperaturze 56°C. Po upływie 10 minut zawieszono ją w 30µL wody MQ z RNAzą. Inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 minut.

Tabela 9. Skład roztworów do izolacji DNA plazmidowego z *Rhizobium rhizogenes*

Roztwór I		Roztwór II		Roztwór III	
Składnik	Zawartość	Składnik	Zawartość	Składnik	Zawartość
Lizozym	50 mg/ml	SDS	1%	Octan potasu	3M
Glukoza	50 mg/ml	NaOH	0,2M	Kwas octowy	11,5%
EDTA (pH 8,0)	10 mM				
Tris-HCl (pH 8,0)	25 mM				

3.2.4.3. Optymalizacja warunków reakcji PCR

Przeprowadzono reakcję PCR (Flores i in., 1993) w gradiencie temperatur w celu ustalenia optymalnych warunków reakcji dla plazmidów izolowanych z poszczególnych szczepów bakterii *R. rhizogenes*. Zastosowano gradient od 55°C do 65°C. Sekwencje starterów podano w tabeli 10, zaś warunki przeprowadzonej reakcji w tabeli 11. Oczekiwana wielkość produktów: szczep ATCC 15832: 423 pz; szczep A4: 383 pz; szczep LBA 9402: 670 pz.

Tabela 10. Sekwencje starterów

Szczep bakteryjny	Starter Reverse	Starter Forward
ATCC 15834	5'GAAGGTGCAAGCTACCTCTC 3'	5'GCTCTTGCAGTGCTAGATTT 3'
A4	5'GAAGGTGCAAGCTACCTCTC 3'	5'GCTCTTGCAGTGCTAGATTT 3'
LBA 9402	5'GGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCA G 3'	5' TAGCCGTGACTATAGCAAACCCCTCC 3'

Tabela 11. Skład mieszaniny reakcji PCR w gradiencie temperatur

Składniki mieszaniny	Objętość (µl)
2 x Phire Plant Direct PCR Master Mix	10
Plazmidowy DNA z bakterii	0,5
Starter forward	0,5
Starter reverse	0,5
Woda MQ	8,5

3.2.4.4. Reakcja łańcuchowa polimerazy

Wybrane warunki reakcji PCR zostały zastosowane we właściwej selekcji uzyskanych korzeni włósnikowatych i pędów roślin *S.purpurea* L.. W tym celu zebrany materiał roślinny tj. korzenie i pędy po osiągnięciu długości 2 cm zbadano w celu określenia obecności genu *rolB*. Do wykrycia obecności genu *rolB* w genomie roślinnym zastosowano zestaw Phire Plant Direct PCR Master Mix (Thermo Scientific). Fragment korzenia lub pędu wielkości 0,5 mm umieszczono w probówce typu Eppendorf i dodano 20 μ l Dillution Buffer. Całość homogenizowano, następnie zwirowano i pobrano 0,5 μ l supernatantu. Jako kontrolę negatywną zastosowano genomowe DNA z roślin *Sarracenia purpurea* L. niepoddanych transformacji.

W celu zamplifikowania genu *rolB* przeprowadzono reakcję PCR. Objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 μ L, a jej skład przedstawiono w tabeli 12.

Tabela 12. Skład mieszaniny reakcji PCR dla korzeni

Składniki mieszaniny	Objętość (μ l)
2x Phire Plant Direct PCR Master Mix	10
Starter forward	0,5
Starter reverse	0,5
Genomowe DNA z korzeni	0,5
Woda MQ	8,5

Produkty reakcji PCR rozdzielono za pomocą elektroforezy w 1% żelu agarozowym w obecności barwnika Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics Europe, Germany).

3.2.4. Oznaczenie suchej masy korzeni

Suchą masę korzeni oznaczono w celu zweryfikowania zmian masy korzeni włósnikowatych w stosunku do korzeni rośliny niepoddanej modyfikacji. W tym celu odcięto korzenie od roślin (7-10 roślin na jedną próbkę), zważono próbki, a następnie suszono je w temperaturze 70°C przez 24 godziny. Ponownie zważono próbki, poddano procesowi suszenia o podanych wyżej parametrach i sprawdzono ich masę. Wyniki przedstawiono w miligramach suchej masy w przeliczeniu na jedną roślinę.

3.2.5. Optymalizacja metody ekstrakcji związków bioaktywnych

Celem badania był dobór stężenia alkoholu etylowego, a także czasu i temperatury ekstrakcji w oparciu o model planowania doświadczeń Box- Behnken Design, aby uzyskać w ekstraktach największe zawartości związków potencjalnie bioaktywnych.

W pierwszym etapie optymalizacji określono możliwości ekstrakcji za pomocą mieszania (użycie siły mechanicznej). Przygotowano 60 mg liofilizowanej tkanki roślinnej i dodano 6 ml 80% etanolu. Ekstrakcję prowadzono przy użyciu ThermoMixer® C (Eppendorf, Niemcy), w temperaturze 25°C, przy wstrząsaniu (800 rpm) przez 24 godziny, pobierając próbki po 10, 30, 60, 120, 180, 300, 360 minutach oraz po zakończonej ekstrakcji. W każdej z prób zbadano zawartość związków fenolowych (metoda opisana w punkcie 3.2.7.2.) i triterpenów (metoda opisana w punkcie 3.2.7.3.). Na podstawie uzyskanych wyników zaobserwowano spadek wydajności ekstrakcji związków bioaktywnych po sześciu godzinach prowadzonego procesu.

Kolejny etap optymalizacji stanowiło przeprowadzenie ekstrakcji za pomocą fal ultradźwiękowych. Przygotowano naważki badanych roślin, do których dodano etanol tak, jak opisano wyżej. Ekstrakcję prowadzono w temperaturze 25°C przy użyciu myjki ultradźwiękowej XUB5 (XUB Series Digital Ultrasonic Baths, BioSan, Łotwa) o mocy grzewczej 150W (Bubalo i wsp., 2016). Próbkę pobierano po 10, 30, 45, 60, 90, 120, 150 i 180 minutach prowadzonego procesu. W każdej z prób zbadano zawartość związków fenolowych oraz triterpenów.

W następnej fazie zastosowano model planowania doświadczeń Box- Behnken wprowadzony w wersji Statistica 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA), w którym poddano analizie trzy zmienne niezależne: czas ekstrakcji (X_1 , 10-60 min), stężenie alkoholu etylowego (X_2 , 64-96% v/v) oraz temperatura ekstrakcji (X_3 , 25-60°C), których wartości podano w tabeli 13. Zmienną zależną stanowiła zawartość wyekstrahowanych związków fenolowych oraz triterpenów. W oparciu o badania Fernández'a i wsp. (2018), wpływ wszystkich opisanych parametrów analizowano na trzech poziomach (+1, 0, -1) i zgodnie z uzyskanym projektem eksperymentu przeprowadzono losowo 15 eksperymentów (załącznik 1). Do analizy wykorzystano oprogramowanie ANOVA Design- Expert (wersja 7.0.0., Suite 48, Mineapolis,

MN 55416). Model ten został utworzony w celu opisanego wpływu parametrów procesu na ekstrakcję związków fenolowych oraz triterpenów.

Tabela 13. Zmienne niezależne dla modelu planowania doświadczenia

Zmienna niezależna	Zmienna zależna			
	Czynnik	Wartość niska (-1)	Wartość średnia (0)	Wartość wysoka (+1)
Czas (min)	X_1	10	35	60
Stężenie EtOH (%v/v)	X_2	64	80	96
Temperatura (°C)	X_3	25	42,5	60

Ponadto przygotowano także ekstrakty wodne badanych roślin. W tym celu naważono 60 mg liofilizowanej tkanki roślinnej i dodano 6 ml wody ultraczystej (MQ). Ekstrakcję prowadzono przez 10 minut w temperaturze 60°C przy użyciu myjki ultradźwiękowej XUB5 (XUB Series Digital Ultrasonic Baths, BioSan, Łotwa) o mocy grzewczej 150W. Ekstrakty odwirowano i poddano badaniom na liniach komórkowych.

3.2.6. Ocena składu biochemicznego roślin z gatunku *Sarracenia purpurea* L. pochodzących z kultur *in vitro*

Na tym etapie badań rośliny z gatunku *Sarracenia purpurea* L. poddane zostały analizie składu biochemicznego pod względem zawartości związków o potencjale farmakologicznym.

3.2.7.1. Oznaczenie całkowitej zawartości polifenoli w badanych roślinach

Do analizy całkowitej zawartości polifenoli w uzyskanych ekstraktach roślinnych zastosowano metodę Folina- Ciocalteu (Debetić i in., 2020). Próbkę rozcieńczono za pomocą 80% roztworu etanolu. 250µl rozcieńczonych próbek oraz seryjnych rozcieńczeń roztworu wzorcowego, który stanowił kwas galusowy, wprowadzono do szklanych probówek, a następnie dodano 1,25 ml 10-krotnie rozcieńzonego odczynnika Folina- Ciocalteu. Probówkę inkubowano w ciemności przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 1 ml Na_2CO_3 (75g/L) i inkubowano w temperaturze 50°C przez kolejne 5 minut. Probówkę

ochłodzono do temperatury 4°C i zmierzono absorbancję (Shimadzu UV- 1800, Europa) przy długości fali $\lambda=760$ nm. Wszystkie analizy wykonano dla części zielonych i korzeni, w trzech powtórzeniach dla każdej próbki. Całkowitą zawartość polifenoli wyrażono w ekwiwalencie kwasu gallusowego (mg GAE) na gram suchej biomasy roślinnej (mg GAE g⁻¹ s.m.) (Debetić i in., 2020).

3.2.7.2. Oznaczenie całkowitej zawartości triterpenów w badanych roślinach *Sarracenia purpurea* L.

W celu oznaczenia całkowitej zawartości triterpenów zastosowano zmodyfikowaną metodę spektrofotometryczną (Le i in., 2018). Naważono 6 mg liofilizowanej tkanki roślinnej, dodano 6 ml 64% etanolu i przeprowadzono ekstrakcję ultradźwiękową w czasie 10 minut w temperaturze 60°C w myjce ultradźwiękowej (MW-ER-02, Lab Kits, USA). 50µl otrzymanego ekstraktu roślinnego inkubowano w szczelnie zamkniętych, szklanych probówkach przez 15 minut w łaźni wodnej o temperaturze 60°C. Następnie dodano 50µl 8% roztworu waniliny w alkoholu etylowym oraz 72% (v/v) roztworu kwasu siarkowego i inkubowano przez kolejne 15 minut w tych samych warunkach, stosując dodatkowo mieszanie. Po zakończeniu inkubacji próbki schłodzono i zmierzono absorbancję przy długości fali 560nm przy pomocy spektrometru (Shimadzu UV- 1800, Europa). Próbę wzorcową przygotowano zastępując ekstrakt roślinny 80% roztworem etanolu. Analizy wykonano w trzech powtórzeniach dla korzeni transformowanych oraz liści. Całkowitą zawartość triterpenów wyrażono w ekwiwalencie kwasu betulinowego (mg BA) na gram suchej biomasy roślinnej (mg BA g⁻¹ s.m.).

3.2.6.3. Oznaczenie zawartości chlorofilu w tkankach zielonych

Analizy zawartości chlorofilu wykonano za pomocą metody spektrofotometrycznej opisanej przez Lichtenthalera (Lichtenthaler, 1987). W tym celu przygotowano 5-10 mg naważki materiału roślinnego. Następnie do każdej próby dodano 100 mg węgla wapnia w celu zahamowania tworzenia feofityny oraz zneutralizowania kwasów roślinnych. W kolejnym etapie dodano 500 µL acetonu i całość ucierano w moździerzu. Do prób wprowadzono jeszcze 1500 µL acetonu, przeniesiono uzyskany ekstrakt do probówek wirówkowych (V=5 mL) i uzupełniono objętość do 5 mL za pomocą acetonu. Próby odwirowano w temperaturze 10°C przez 5 minut (1500 rpm). 1 mL supernatantu przeniesiono do kuwet kwarcowych i zmierzono absorbancję dla dwóch długości fali: 662 nm (chlorofil a)

oraz 645 nm (chlorofil b). W celu obliczenia zawartości chlorofilu w badanych próbach zastosowano wzory:

$$C_a = 11,24A_{661,6} - 2,04A_{644,8}$$

$$C_b = 20,13A_{644,8} - 4,19A_{661,6}$$

C_a - zawartość chlorofilu a ($\mu\text{g/ mL}$)

C_b - zawartość chlorofilu b ($\mu\text{g/ mL}$)

Analizy wykonano w trzech powtórzeniach, wyrażając wyniki w miligramach na gram suchej masy roślin.

3.2.6.4. Oznaczenie zawartości karotenoidów w materiale roślinnym

Zawartość karotenoidów oznaczono metodą spektrofotometryczną (Lichtenthaler, 1987), przygotowując próby tak, jak w punkcie 3.2.9.4. Absorbancję mierzono dla długości fali 470 nm. Do obliczeń zastosowano podane wzory:

$$C_{(x+c)} = (1000A_{470} - 1,90C_a - 63,14C_b) / 214$$

C_a - zawartość chlorofilu a ($\mu\text{g/ mL}$)

C_b - zawartość chlorofilu b ($\mu\text{g/ mL}$)

$C_{(x+c)}$ - zawartość karotenoidów ($\mu\text{g/ mL}$)

Analizy wykonano w trzech powtórzeniach, a wyniki przedstawiono w miligramach na gram suchej masy roślin.

3.2.6.5. Oznaczenie zawartości związków fenolowych w roślinach *Sarracenia purpurea* L.

Analizę HPLC badanych ekstraktów przeprowadzono za pomocą systemu HPLC Agilent 1200 Series (Agilent, San Jose, CA, USA) wyposażonego w detektor diodowy (DAD) oraz kolumnę Phenomenex C18 (Kinetex; 150 mm x 4,6 mm; 2,6 μm , 100A). Badaniu poddano ekstrakty z części zielonych oraz korzeni roślin z linii 4#4 oraz 7#1 oraz roślin kontrolnych WT. Przed przystąpieniem do analizy próbki przefiltrowano przy użyciu filtrów strzykawkowych 0,22 μm PTFE (politetrafluoroetylen). Jako fazę ruchomą zastosowano rozpuszczalnik A, na który składała się woda/ kwas mrówkowy (99,1: 0,1, v/v) oraz

rozpuszczalnik B: metanol/ kwas mrówkowy (99,1: 0,1, v/v). Ustalono następujące warunki gradientu: B: 0- 3 min, 10%; 3- 15 min, 10%- 50%; 15- 20 min, 50%- 60%; 20- 25 min, 60%- 100%; 25- 26 min 100%. Szybkość przepływu ustalono na 0,9 ml/min. Temperaturę autosamplera utrzymywano na poziomie 4°C, zaś kolumny na poziomie 30°C. Do ilościowego oznaczenia kwasów fenolowych i katechin użyto fali o długości 280 nm, natomiast do oznaczenia pochodnych flawonolu 360 nm. Uzyskane dane spektralne oraz czasy retencji związków porównano ze standardami zewnętrznymi. Związki oznaczono ilościowo z wykorzystaniem krzywych kalibracyjnych wzorów zewnętrznych.

3.2.6.6. Oznaczenie zawartości kwasu betulinowego metodą HPLC w badanych roślinach *Sarracenia purpurea* L.

W celu oznaczenia zawartości kwasu betulinowego w badanych roślinach przygotowano z nich ekstrakty etanolowe. Naważono 6 mg liofilizowanej tkanki roślinnej, dodano 6 ml 64% etanolu i przeprowadzono ekstrakcję ultradźwiękową w czasie 10 minut w temperaturze 60°C w myjce ultradźwiękowej (MW-ER-02, Lab Kits, USA). Uzyskane ekstrakty przefiltrowano przez filtry strzykawkowe o wielkości porów 0,22µm (Millex Millipore). Analizy zawartości kwasu betulinowego przeprowadzono za pomocą systemu Agilent 1200 series HPLC (Agilent, San Jose, CA, USA). Zastosowano kolumnę Phenomenex C18 (Kinetex; 2,6µm, 100A, 150 x 4,6 nm) i detektor diodowy (DAD). Fazy ruchome stanowił rozpuszczalnik A (99,9:0,1 v/v, woda: kwas mrówkowy) i rozpuszczalnik B (99,9:0,1 v/v, acetonitryl: woda), zaś wybrana szybkość przepływu wyniosła 0,9 mL/min. Ustalono następujące warunki gradientu: B: 0- 3 min, 10%; 3- 15 min, 10%- 50%; 15- 20 min, 50%- 60%; 20- 25 min, 60%- 100%; 25- 26 min 100%. Ekstrakty roślinne przed przystąpieniem do analizy przefiltrowano za pomocą filtrów politetrafluoroetylenowych (0,22 µm). Temperaturę kolumny utrzymywano na poziomie 30°C, zaś autosamplera 4°C. Zawartość kwasu betulinowego w biomacie roślinnej oznaczono ilościowo z użyciem wzorca zewnętrznego tego związku (Sigma- Aldrich, USA) i wyrażono w mg związków na gram suchej masy (s.m.). Każdą z prób przygotowano w trzech powtórzeniach zarówno z liści, jak i korzeni.

3.2.6.7. Oznaczenie profilu kwasów tłuszczowych badanych roślin metodą GC- MS

W celu określenia profilu kwasów tłuszczowych w badanych roślinach *Sarracenia purpurea* L. przeprowadzono transestryfikację. Do próbek typu Pyrex odważono 10-15 mg zliofilizowanej tkanki zielonej oraz korzeni i dodano roztwór zawierający 2,5% kwasu siarkowego i 97,5% metanolu. Probówki intensywnie wytrząsano przez 3 minuty, a następnie inkubowano w temperaturze 80°C przez 1,5 godziny. W kolejnym etapie do mieszaniny dodawano 0,5 ml 0,9% roztworu chlorku sodu oraz 1 ml heksanu i intensywnie wytrząsano przez minutę. Próbki wirowano w 2000 rpm przez 5 minut i pobierano górną frakcję, zawierającą estry metylowe kwasów tłuszczowych. Próbki analizowano za pomocą chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrią mas GC- MS (Shimadzu, Kyoto, Japonia) zaopatrzonego w kolumnę kapilarną Zebron ZB- FAME (30 m x 0,25 mm x 0,20 µm; Phenomenex, Torrance, CA, USA). Gaz nośny stanowił hel o czystości 99,99% podawany przy przepływie stałym 1 mL/min. Temperatura interfejsu wyniosła 240°C, a iniektora 250°C. Temperatura kolumny mieściła się w przedziale 100- 210°C, gradient temperaturowy: 3°C/ min. Stosunek podziału ustalono na 1:20, zaś detekcja MS wynosiła 35-350 Da. Analizę profilu kwasów tłuszczowych w badanych próbkach przeprowadzono przez porównanie czasów retencji ze związkami referencyjnymi (Supelco 37 Component FAME mix, Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA).

3.2.6.8. Badania strukturalne FT-IR/ ATR

Badania strukturalne dotyczące komponentów ściany komórkowej przeprowadzono z zastosowaniem spektroskopii fourierowskiej w podczerwieni. Analiza wykonana została w Katedrze Chemii Bioorganicznej Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu przez Panią dr hab. Lucynę Dymińską. Analizie poddano 7 linii roślin transgeniczných oraz roślinę kontrolną (wild type), które zostały wysuszone temperaturze 40°C przez 48 godzin, a następnie utarte w mrożdziejzu. Widma w podczerwieni (IR) zmierzono za pomocą spektrofotometru z transformacją Fouriera FT- IR Thermo Scientific Nicolet 6700 (rozdzielczość 2 cm⁻¹), w zakresie spektralnym 4000- 400 cm⁻¹. Aparaturę ATR- diamond zastosowano do rejestracji widm odbiciowych. Dla wszystkich badanych próbek zastosowano identyczne parametry: moc źródła wzbudzenia, akwizycja i akumulacja, zaś dla każdej zarejestrowano pięć powtórzeń

widm FTIR. Widma analizowano i porównywano przy pomocy komercyjnego oprogramowania komputerowego (Origin 7.5). Zastosowano odjęcie tła i dekonwolucję pasm eksperymentalnych na składowe Lorentza. W celu wyeliminowania przypadkowej zmienności intensywności na ogólnym poziomie intensywności, znormalizowano wszystkie integralne intensywności obserwowanych pasm, wykorzystując współczynnik statystyczny R2 (przy użyciu dużej i zmiennej ilości składników przeprowadzono kilka dekonwulsji Lorentza). Zastosowano dyfraktometr proszkowy X'Pert PRO (PANalytical) w celu zarejestrowania w temperaturze pokojowej wzorów proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej (dyfraktometr wyposażony w liniowy detektor PIXcel, wykorzystujący promieniowanie $\text{CuK}\alpha_1$ $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$).

3.2.7. Oznaczenie pojemności antyoksydacyjnej materiału roślinnego

Badanie zdolności absorpcji rodników tlenowych przeprowadzono zgodnie z metodą ORAC (ang. Oxygen Radical Absorbance Capacity) opisaną przez Ninfali i wsp. (2005). Na mieszaninę reakcyjną (tabela 14) składała się sól sodowa fluoresceiny ($0,04 \mu\text{mol/L}$) rozpuszczonej w buforze fosforanowym ($\text{pH}=7$) oraz rozcieńczone ekstrakty z badanych roślin. Trolox ($25 \mu\text{mol/L}$) stanowił standard, natomiast bufor fosforanowy był próbą odczynnikową. Mieszaniny inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 minut. Po czasie inkubacji dodano do każdej z prób $0,375 \text{ ml}$ AAPH (2,2'-Azobis[2-methylpropionamide]dihydrochloride). Fluorescencję rejestrowano za pomocą spektrofluorymetru Varian Cary Eclipse Spectrofluorimeter (Palto Alto, USA) na minutę, aż do wartości 0, przy wzbudzeniu 485 nm oraz emisji 520 nm . Wyniki obliczono wykorzystując różnicę obszarów pod krzywą rozkładu fluoresceiny pomiędzy próbą odczynnikową, a próbą badaną. Wyniki wyrażono jako ekwiwalent troloxu na 1 g suchej tkanki roślinnej. Eksperymenty wykonano w trzech powtórzeniach, a wyniki podano jako wartości średnie $\pm\text{SD}$.

Tabela 14. Skład mieszaniny reakcyjnej dla badania pojemności antyoksydacyjnej

	Próba odczynnikowa	Próba właściwa	Standard
Fluoresceina	2,25 ml	2,25 ml	2,25 ml
Bufor fosforanowy	0,375 ml	-	-
Badany ekstrakt	-	0,375 ml	-
Trolox	-	-	0,375 ml

3.2.8. Oznaczenie właściwości przeciwbakteryjnych badanych roślin

W celu oznaczenia właściwości przeciwbakteryjnych badanych ekstraktów użyto pięciu szczepów bakterii powodujących choroby ludzi i zwierząt. Trzy szczepy bakterii Gram-ujemnych: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* oraz dwa szczepy bakterii Gram- dodatnich: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*.

Do przygotowania testów przeciwdrobnoustrojowych czyste kultury przesiewano na skosy w probówkach z podłożem Muellera- Hinton, a następnie inkubowano przez dobę w temperaturze 37°C.

3.2.9.1. Przechowywanie bakterii

Czyste kultury bakterii przechowywano w temperaturze -80°C w stokach glicerynowych o stężeniu 65%. Do bieżącej pracy bakterie wysiewano na płytki z podłożem LB i inkubowano przez noc w temperaturze 35°C. Płytki z czystymi kulturami przechowywano przez tydzień w warunkach chłodniczych (+4°C).

3.2.9.2. Warunki hodowli bakterii

W celu wykonania testów dyfuzyjnych, każdy szczep bakteryjny hodowano na skosach z agarem Muellera- Hinton. Hodowle inkubowano przez noc w temperaturze 35°C.

3.2.8.3. Metoda dyfuzyjno- krążkowa

W celu określenia właściwości przeciwdrobnoustrojowych uzyskanych ekstraktów roślinnych wykorzystano metodę opisaną przez Mostafa i wsp. (2017). Ekstrakty roślinne wysterylizowano przez filtry strzykawkowe o średnicy porów 0,22 µm (Millex Millipore), a następnie wprowadzono na sterylne krążki bibuły filtracyjnej ($\varnothing = 8$ mm) tak, aby końcowe stężenie wynosiło 10 mg ekstraktu na krążek. Nasączone krążki pozostawiono do odparowania

etanolu. W kolejnym etapie przygotowano kwadratowe, sterylne płytki (10 cm x 10 cm), do których wprowadzono 30 ml agaru Muellera- Hinton. W kolbach o pojemności 100 ml przygotowano agar Muellera-Hinton, zaszczerpiony wystandaryzowanymi zawiesinami testowanych bakterii (1 mL 10^7 j.t.k./ 100 mL podłoża), który następnie wprowadzono na warstwę podstawową podłoża we wcześniej przygotowanych płytkach. Na pożywce umieszczono krążki bibułowe obciążone ekstraktami. Jako kontrolę pozytywną zastosowano krążki bibułowe z naniesionym etanolem, zaś wzorzec odniesienia stanowił cefotaksym. W celu umożliwienia dyfuzji badanych związków do podłoża hodowlanego, płytki pozostawiono w temperaturze 4°C przez 8 godzin, a następnie inkubowano w temperaturze 30°C przez 24-96 godzin. Wyrażna strefa przejaśnienia (bez mikrokolonii) obserwowana wokół krążka badanego ekstraktu była zinterpretowana jako jego zdolność do hamowania wzrostu danego szczepu bakterii. Strefy zahamowania wzrostu mierzono za pomocą suwmiarki elektronicznej (TOPEX 31C628). Testy dla każdego ekstraktu wykonano w trzech powtórzeniach.

3.2.9. Oznaczenie zawartości aminokwasów w materiale roślinnym

Analizę zawartości aminokwasów metodami chromatografii jonowymiennej oraz kolorymetryczną przeprowadzono w Katedrze Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, dzięki uprzejmości Pani dr Mai Słupczyńskiej. Zawartość aminokwasów oznaczono w roślinie kontrolnej (wild type) oraz dwóch, wybranych liniach roślin transgenicznych 4#1 oraz 7#1. Oznaczenia wykonano dla części zielonych (liście) oraz korzeni. Próbkę poddano procesowi liofilizacji, a następnie kwaśnej hydrolizie w 6M kwasie solnym (110°C, 24h). Celem oznaczenia zawartości aminokwasów siarkowych, próbki utleniono w mieszaninie kwasu mrówkowego (HCOOH) i nadtlenu wodoru (H₂O₂), zachowując proporcję związków 9:1 (v/v) (0°C, 16 h), jeszcze przed etapem kwaśnej hydrolizy. Rozdział wykonano za pomocą chromatografii jonowymiennej (AAA 400 Ingos), zgodnie z procedurami opisanymi przez Moore'a i Stein'a (1963) oraz Moore'a (1963). Oznaczenie zawartości tryptofanu w badanym materiale roślinnym możliwe było po poddaniu go hydrolizie w 4-dimetyloaminobenzaldehydzie (DMAB) oraz wodorotlenku litu (LiOH) (110°C, 4 h). Zawartość tryptofanu oznaczono zgodnie z procedurą opisaną przez Landry i wsp., 1992, stosując metodę kolorymetryczną.

3.2.10. Oznaczenie cytotoksyczności ekstraktów roślinnych

Wszystkie analizy związane z użyciem ludzkich linii komórkowych zostały zrealizowane we współpracy z Panią dr Magdaleną Zarembą- Czogallą z Zakładu Lipidów i Liposomów Uniwersytetu Wrocławskiego oraz Panią Profesor Kristiną Radošević z Laboratorium Technologii Kultur Komórkowych i Biotransformacji Uniwersytetu w Zagrzebiu.

3.2.11.1. Linie komórkowe

Testy aktywności cytotoksycznej wykonano z użyciem dwóch linii zdrowych komórek ludzkich. Pierwszy wariant stanowiła linia komórkowa keratynocytów ludzkich (HaCaT). Komórki HaCaT namnażano w pożywce Eagle'a Dulbecco (DMEM) z dodatkiem 10% FBS (v/v). Drugą z nich stanowiła linia komórkowa prawidłowych fibroblastów skóry ludzkiej (NHDF). Komórki namnożono na pożywce alpha-MEM suplementowanej 10% (v/v) inaktywowaną termicznie surowicą bydlęcą (FBS) z dodatkiem GlutaMAX™ oraz środkami eliminującymi wzrost mikroorganizmów patogennych (Zaremba-Czogalla i wsp., 2020). Hodowle komórek prowadzono w inkubatorze Innova Co-180 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) w temperaturze 37°C, w wilgotnej atmosferze przy 5% CO₂. Dodatkowo test aktywności cytotoksycznej wykonano na linii komórkowej komórek jajnika chomika chińskiego. Komórki namnażano w warunkach opisanych dla linii NHDF.

3.2.11.2. Test MTT

Wpływ badanych ekstraktów na żywotność zdrowych komórek analizowano za pomocą kolorymetrycznego, ilościowego testu MTT (Mosmann, 1986). Komórki wysiewano na 96-dółkowe mikropłytki zachowując gęstość równą $5 \cdot 10^4$ komórek/ dółek w 100µL odpowiedniej pożywki hodowlanej. Po 24 godzinach inkubacji, komórki w 3 powtórzeniach traktowano badanymi ekstraktami. Po 72- godzinnej ekspozycji usunięto medium hodowlane zawierające badane ekstrakty, komórki przepłukano buforem PBS, a następnie do każdej studzienki dodawano 50µL roztworu MTT i inkubowano przez 3 godziny w temperaturze 37°C. W celu rozpuszczenia kryształów formazanu, po tym czasie roztwór MTT zastępowano DMSO w ilości 50 µL na studzienkę (Zaremba- Czogalla i wsp., 2020). Absorbancję mierzono przy długości fali 560 nm na czytniku mikropłytek Asys UVM 340 (Cambridge, Wielka Brytania). Żywotność komórek przedstawiono jako odsetek komórek poddanych ekspozycji na badane

ekstrakty w stosunku do komórek nie poddanych ich działaniu, zgodnie ze wzorem podanym poniżej:

$$\text{żywołność komórek (\%)} = \frac{AT}{AK} \times 100\%$$

gdzie:

AT- absorbanca dla komórek poddanych ekspozycji na badane ekstrakty

AK- absorbanca dla komórek niepoddanych ekspozycji na badane ekstrakty

3.2.11. Oznaczenie właściwości przeciwnowotworowych ekstraktów roślinnych

Oznaczenie właściwości przeciwnowotworowych wykonano z użyciem linii komórek nowotworowych. Jedna linia pochodziła z Ruder Bošković Institute (Zagrzeb, Chorwacja) i była to linia komórek raka szyjki macicy (HeLa). Komórki namnażano w modyfikowanej pożywce Eagle'a Dulbecco (DMEM). Hodowle linii HeLa inkubowano w atmosferze wilgotnej z 5% CO₂ w temperaturze 37°C.

Kluczowy etap badań przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch linii komórkowych raka przewodowego trzustki (PDAC) pochodzących z ATCC (ang. *American Type Culture Collection*). Pierwszą linię stanowiła BxPC3 z komórek pierwotnego guza trzustki, drugą zaś AsPC1 z komórek z wodobrzusza pacjenta z rakiem trzustki. Obie linie hodowano w pożywce RPMI-1640 uzupełnionej 10% inaktywowaną termicznie surowicą bydlęcą, uzupełnioną o GlutaMAX™ i środki przeciwdrobnoustrojowe. Hodowle inkubowano 37°C, w wilgotnej atmosferze zawierającej 5% CO₂ w inkubatorze Memmert ICO150 Med. (Memmert, Schwachbach, Niemcy).

Oznaczenia wykonano z użyciem testu MTT opisanego w punkcie 3.2.11.2.

3.2.12. Analiza statystyczna i przedstawienie wyników

Uzyskane wyniki przedstawiono jako wartości średnie i odchylenia standardowe serii doświadczeń. Analizę statystyczną przeprowadzono wykorzystując program STATISTICA ver. 13.3. (TIBICO Software Polska). W celu porównania zmienności kilku grup, wykorzystano model ANOVA- jednoczynnikową analizę wariancji. Dane, dla których uzyskano istotny wynik, analizowano stosując test Dunnett'a- jego celem była weryfikacja, dla których grup uzyskane wartości średnie w sposób istotny różnią się od pozostałych wyników. Analizowane wartości średnie, które były statystycznie istotne w odniesieniu do wariantu kontrolnego oznaczano jako $*p < 0,05$. W celu analizy przeprowadzonej optymalizacji ekstrakcji związków bioaktywnych z badanych roślin wykonano doświadczenia w oparciu o 3-czynnikowy układ według Boxa-Behnkena obrazujący powiązania pomiędzy parametrami prowadzonego procesu, a wydajnością ekstrakcji związków biologicznie czynnych.

3.2.13. Oprogramowanie i urządzenia

Analiza statystyczna

Oprogramowanie STATISTICA ver. 13.3 (TIBICO Software, Polska)

Analiza wariancji

Oprogramowanie Design- Expert (wersja 7.0.0., Suite 48, Minneapolis, MS 55413)

Analiza widm w podczerwieni

Origin® 7.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA)

Inkubacja roślin w warunkach *in vitro*:

Komora fitotronowa (Panasonic MLR- 352): 25°C, 3LS, 65% wilgotność.

Izolacja DNA:

Analiza obrazów żeli po rozdziale elektroforetycznym: transiluminator UV (Vilber, Francja)

Oznaczenie profilu kwasów tłuszczowych

Chromatograf gazowy sprzężony ze spektrometrią mas (GC- MS) (Shimadzu, Kyoto, Japonia)

Oznaczenie zdolności absorpcji rodników tlenowych metodą ORAC:

Varian Cary Eclipse Spectrofluorimeter (Palo Alto, CA, USA)

Pomiar gęstości optycznej (OD₆₀₀) hodowli bakteryjnych:

Czytnik płytek Spark® Multimode Microplate Reader (Tecan Trading AG., Szwajcaria)

4. Wyniki

4.1. Aseptyczne kultury roślin z rodzaju *Sarracenia*

Roślina z gatunku *Sarracenia purpurea* L., przekazana przez Ogród Botaniczny Uniwersytetu Wrocławskiego, pozyskana została z gleby w warunkach polowych. W celu wyeliminowania pozostałości ziemi oraz skażeń roślinę poddano wstępnej sterylizacji za pomocą wody destylowanej, a następnie wieloetapowemu odpłukiwaniu z zastosowaniem pięciu roztworów o działaniu odkażającym. Uzyskano 500 eksplantatów, które hodowano na podłożu 1/3 MS z dodatkiem 3% sacharozy oraz 0,8% agaru, w komorze fitotronowej i co siedem dni przenoszono na świeże podłoże. Eksplantaty, które utraciły żywotność lub wykazywały cechy zakażeń mikrobiologicznych, utylizowano z zastosowaniem obowiązujących procedur.

4.1.1. Optymalizacja warunków wzrostu *Sarracenia purpurea* w kulturach *in vitro*

Dobór składników podłoża pozwalających na optymalny wzrost roślin z gatunku *Sarracenia purpurea* L. w kulturach *in vitro* stanowił bardzo istotny etap prowadzonych badań. Optymalizację przeprowadzono dwuetapowo: pierwszy etap stanowiła hodowla roślin na podłożach o różnych wartościach pH (1: pH= 3,6; 2: pH: 4,6; 3: pH=5,6; 4: pH=6,6), a następnie oznaczenie w uzyskanych roślinach zawartości chlorofilu, karotenoidów, związków fenolowych, triterpenów oraz pojemności antyoksydacyjnej. Na kolejny etap składała się hodowla badanych roślin na różnych wariantach podłoża o odmiennej zawartości sacharozy, MS oraz wartości pH (tabela 8).

4.1.1.1. Odmienne wartości pH podłoża

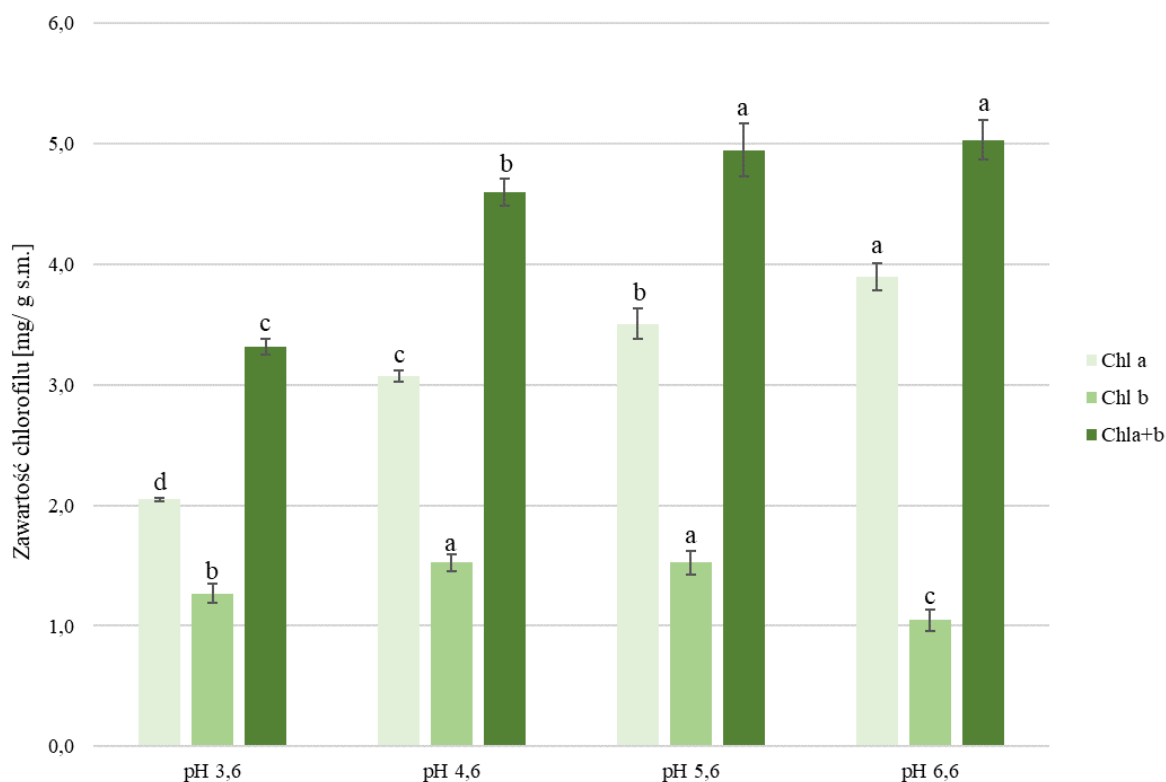
W roślinach *Sarracenia purpurea* L. uzyskanych z hodowli w różnych wariantach pH podłoża zbadano zawartość chlorofilu A (Chl_a), chlorofilu B (Chl_b) oraz całkowitą zawartość chlorofilu (Chl_{a+b}). Wyniki przedstawiono na rycinie 6.

Zaobserwowano związek pomiędzy wzrostem wartości pH podłoża, a przyrostem zawartości chlorofilu A w badanych roślinach. Najwyższa wartość, którą odnotowano w *Sarracenia purpurea* L. hodowanej w podłożu o pH 6,6 była 1,9- krotnie większa od

najniższej wartości zmierzonej w roślinach pochodzących z podłoża o pH 3,6. Wartości odnotowane u roślin pochodzących z podłoży o pH 4,6 i pH 5,6 stanowiły odpowiednio 78,8% oraz 89,9% zawartości zbadanej u kapturonic z podłoża o pH 6,6.

Dla chlorofilu B odnotowano najwyższe wartości dla roślin pochodzących z podłoży o wartości pH 4,6 oraz pH 5,6 i stanowiły one wspólną grupę jednorodną. Najniższą zawartość zaobserwowano dla *Sarracenia purpurea* L. namnażanych w podłożu o pH 6,6 i była ona mniejsza o 31,3% od najwyższej.

Scharakteryzowano zależność pomiędzy wzrostem całkowitej zawartości chlorofilu w badanych roślinach, a zwiększaniem pH podłoża MS. W pH 5,6 i pH 6,6 wartości nie różniły się między sobą w sposób istotny, a wynik dla pH 6,6 był 1,5- krotnie większy od najmniejszej wartości odnotowanej dla roślin namnażanych w pożywce o pH 3,6.

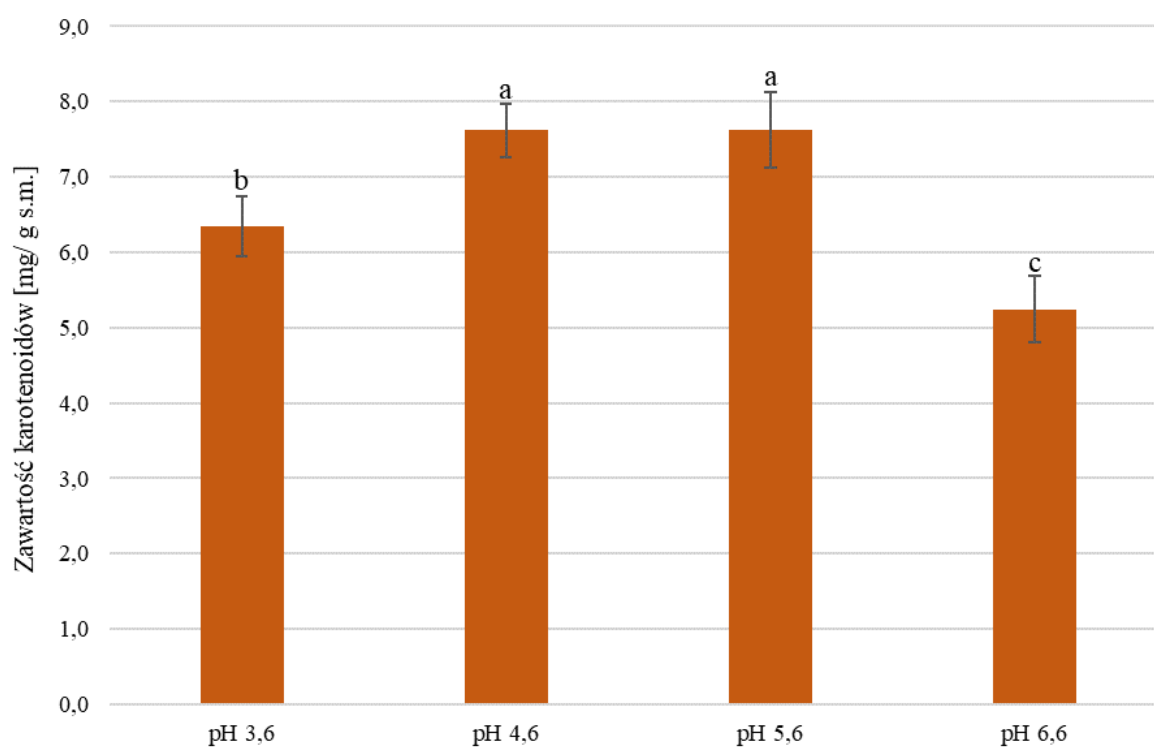


Ryc. 6. Zawartość chlorofilu w roślinach hodowanych na podłożach o różnej wartości pH. Dane przedstawiono jako wartości średnie (n=3) i odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną przeprowadzono w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Grupy jednorodne rozpatrywano oddzielnie dla każdego z typów chlorofilu. Słupki oznaczone takimi samymi literami nie różnią się statystycznie.

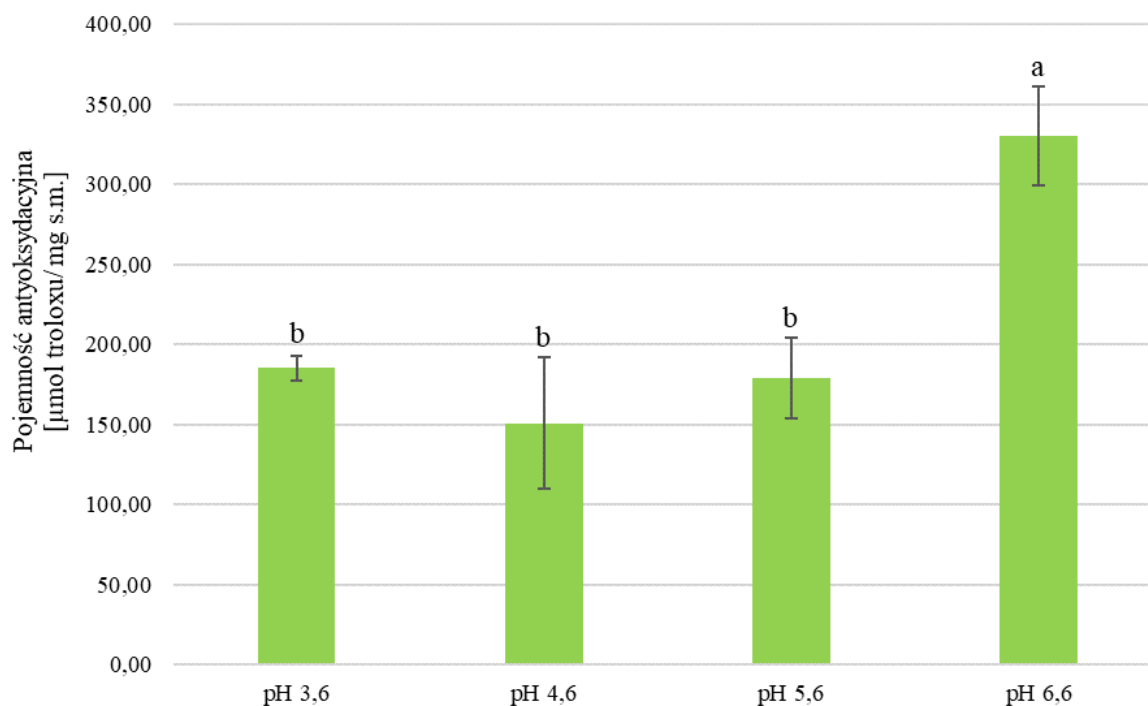
Kolejną grupę związków, które oznaczono w badanych roślinach stanowiły karotenoidy, a wyniki przedstawiono na rycinie 7, a. Największą ich zawartość odnotowano dla roślin rosnących w podłożu o pH 4,6 i pH 5,6, a wartości te stanowiły grupę jednorodną. Zaobserwowano najniższą wartość ilości badanych związków w eksplantatach z podłoża o pH 6,6 i była ona o 31,3% od najwyższego wyniku uzyskanego w *Sarracenia purpurea* L. wzrastających w pH 5,6.

Istotny parametr, który scharakteryzowano w badanych roślinach stanowiła pojemność antyoksydacyjna (Ryc. 7, b.). Największą wartość właściwości antyoksydacyjnej zaobserwowano u roślin pochodzących z podłoża o pH 6,6. Była ona 2,2- krotnie większa od najniższej wartości odnotowanej dla *Sarracenia purpurea* L. namnażanych w pH 4,6. Wartości uzyskane u kapturknic hodowanych w pH 3,6 oraz pH 5,6 stanowiły grupę jednorodną i były mniejsze od wyników określonych dla pH 6,6 o odpowiednio 43,9% i 45,9%.

a)



b)

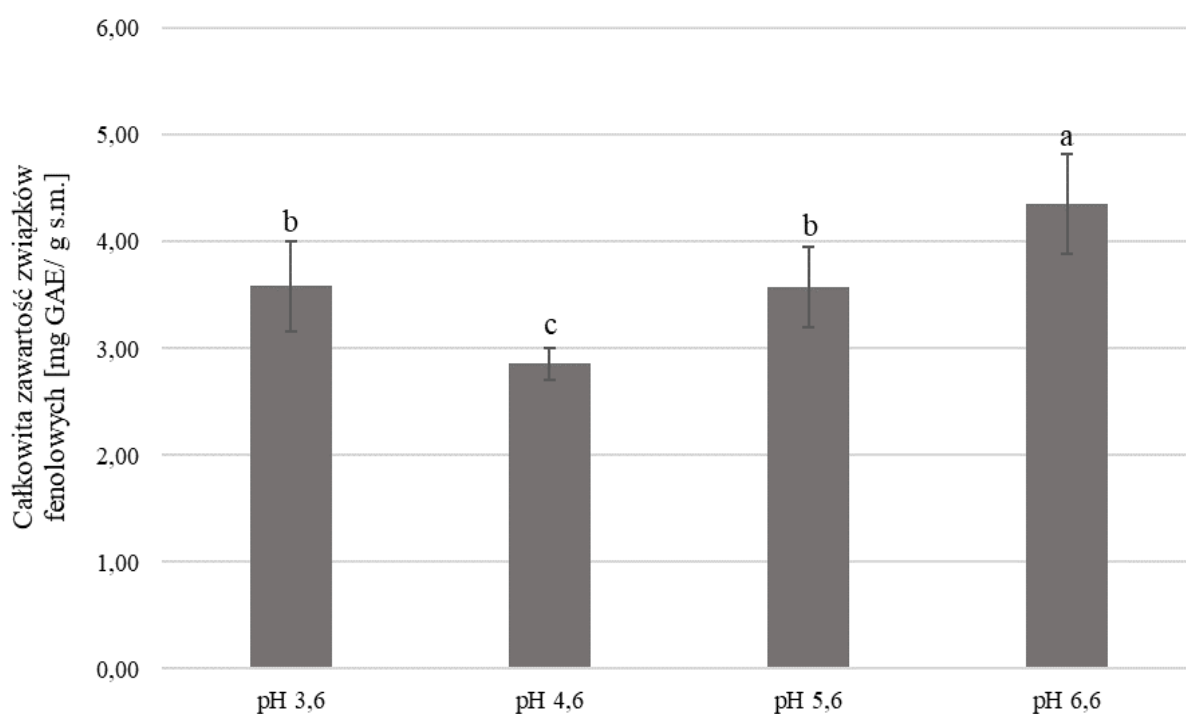


Ryc. 7. Zawartość karotenoidów (a) oraz pojemność antyoksydacyjna (b) oznaczone w roślinach hodowanych na podłożach o różnej wartości pH. Dane przedstawiono jako wartości średnie (n=3) i odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną przeprowadzono w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Słupki oznaczone takimi samymi literami nie różnią się statystycznie.

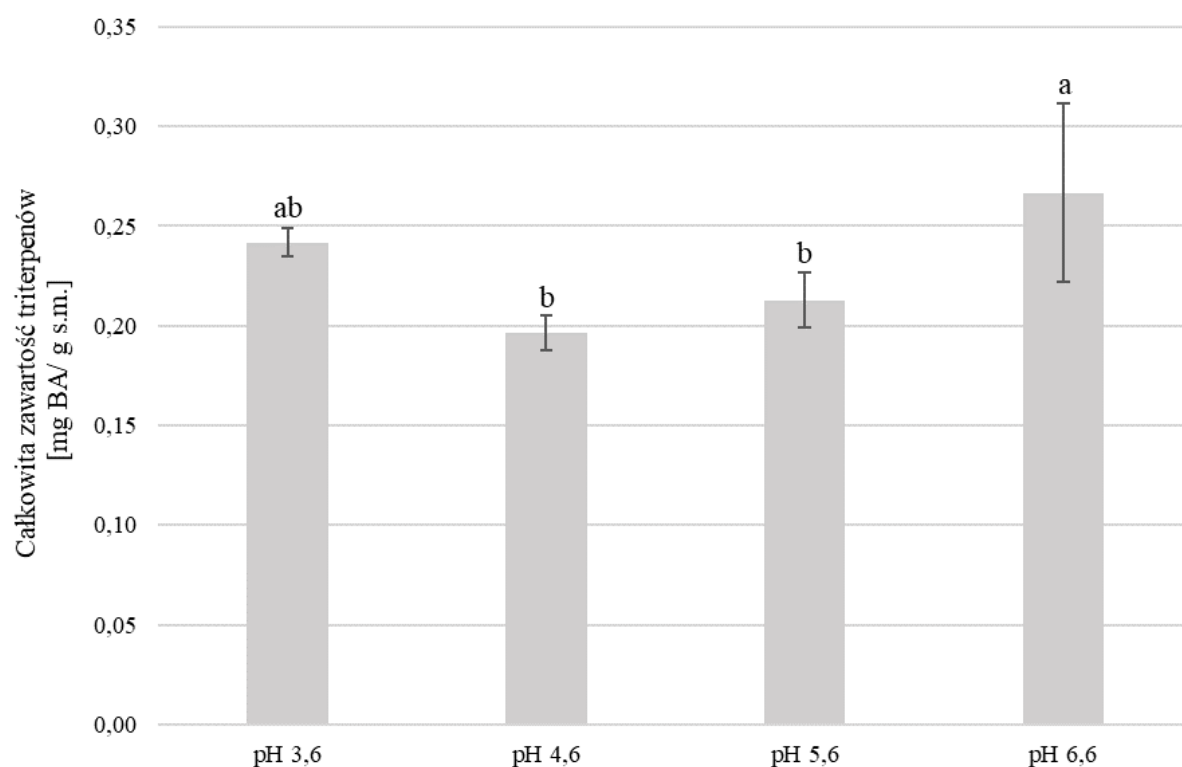
W badanych roślinach zmierzono ogólną zawartość związków fenolowych, które stanowią grupę substancji o dużym potencjale farmakologicznym (Ryc. 8, a). Największą ich zawartość zaobserwowano u roślin pochodzących z podłoża o pH 6,6. Była ona większa o 34,3% od najmniejszej wartości uzyskanej w kapturkach namnażanych w podłożu o pH 4,6. Wyniki odnotowane u roślin z MS o pH 3,6 oraz pH 5,6 stanowiły grupę jednorodną.

Następną ważną grupę związków oznaczonych podczas prowadzonej optymalizacji stanowiły triterpeny (Ryc. 8, b). Największą ich ogólną zawartość odnotowano u roślin namnażanych w podłożu o pH 6,6 i była ona o 26,6% większa od najniższego wyniku uzyskanego u kapturki pochodzących z podłoża o pH 4,6. Wartości uzyskane dla roślin z podłoża o pH 4,6 i pH 5,6 nie różniły się między sobą w sposób istotny.

a)



b)



Ryc. 8. Całkowita zawartość związków fenolowych (a) oraz całkowita zawartość triterpenów (b) w roślinach hodowanych na podłożach o różnej wartości pH. Dane przedstawiono jako wartości średnie (n=3) i odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną przeprowadzono w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Słupki oznaczone takimi samymi literami nie różnią się statystycznie.

Wyniki uzyskane w pierwszym etapie optymalizacji warunków wzrostu *Sarracenia purpurea* L. pozwoliły na wyselekcjonowanie podłoża o pH 6,6 jako predysponowanego do namnażania tych roślin w celu uzyskania w nich najwyższych poziomów zawartości związków bioaktywnych. Obserwacja wzrostu i kondycji badanych roślin potwierdziła tę tendencję. *Sarracenia purpurea* L. w podłożu o pH 6,6 wykazywała najszybsze tempo wzrostu oraz najlepszą kondycję (intensywne wybarwienie liści, dobrze wykształcone kielichy, odpowiedni turgor).

4.1.1.2. Odmienne warianty podłoża

W drugim etapie optymalizacji warunków wzrostu *Sarracenia purpurea* L. w kulturach *in vitro* przygotowano 15 wariantów podłoża (załącznik 1), w których prowadzono kultury roślin. Dla każdego z wariantów założono 6 kolb, po 5 roślin w każdej. Kultury prowadzono w komorze fitotronowej i obserwowano wzrost oraz zachodzące zmiany w fenotypie roślin. Po 8 tygodniach odrzucono warianty podłoża, w których rośliny wykazywały niekorzystne cechy (załącznik 1). Na podstawie przeprowadzonych obserwacji wyodrębniono 4 warianty podłoży, dla których prowadzono dalsze etapy badań. Wytypowane warianty oznaczono jako O1, O2, O3 i O4, a ich skład podano w tabeli 15. W otrzymanych roślinach wykonano oznaczenia zawartości chlorofilu, karotenoidów, związków fenolowych, triterpenów oraz określono pojemność antyoksydacyjną.

Tabela 15. Skład wariantów podłoży wyodrębnionych do dalszych etapów badań

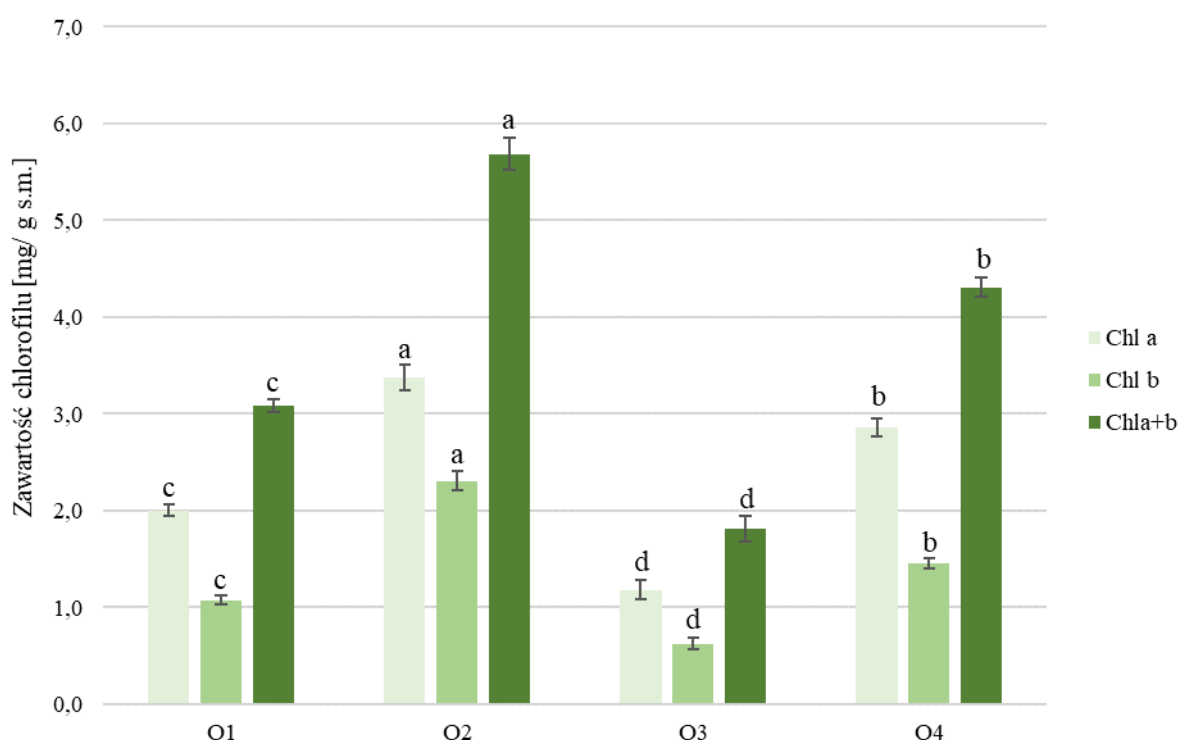
Oznaczenie wariantu	Zawartość pożywki MS (g/L)	Stężenie sacharozy (%)	pH podłoża
O1	2,20	3,0	3,6
O2	2,20	0,8	6,6
O3	0,73	3,0	3,6
O4	0,73	0,8	6,6

W badanych roślinach oznaczono poszczególne frakcje chlorofilu (Chl_a, Chl_b) oraz całkowitą jego zawartość (Chl_{a+b}), a wyniki przedstawiono na ryc. 9. Największą ilość chlorofilu A odnotowano dla roślin uzyskanych z podłoża określonego jako wariant 2 i była ona 2,9- krotnie wyższa od najmniejszej wartości uzyskanej dla roślin namnażanych w podłożu

O3. Zaobserwowano spadek zawartości chlorofilu A u roślin otrzymanych przy zastosowaniu wariantu 1 oraz 4 i była ona niższa o odpowiednio 40,7% i 15,5% w porównaniu z ilością oznaczoną w roślinach rosnących w podłożu o składzie określonym w O2.

Zaobserwowano, że wyniki uzyskane dla chlorofilu B i poszczególnych wariantów wykazały tendencję podobną do zmierzonych dla chlorofilu A. Najwyższą wartość odnotowano dla roślin rosnących w podłożu według wariantu drugiego i była ona 3,7-krotnie większa od najniższej wartości zanotowanej u roślin pochodzących z wariantu 3. Otrzymane wyniki były niższe o odpowiednio 53,4% i 37,1% w porównaniu do wartości u roślin namnażanych w warunkach określonych przez O2.

Odnotowano największą wartość całkowitej zawartości chlorofilu w roślinach uzyskanych z podłoża o składzie determinowanym przez wariant 2. Wynik ten był 3,1-krotnie większy od wartości najniższej zaobserwowanej u *Sarracenia purpurea* L. namnażanej w wariancie podłoża O3. Ogólna zawartość chlorofilu u roślin pochodzących z wariantów O1 i O4 była niższa o odpowiednio 45,8% i 24,2% w porównaniu do roślin namnażanych w podłożu o składzie określonym przez wariant 2.

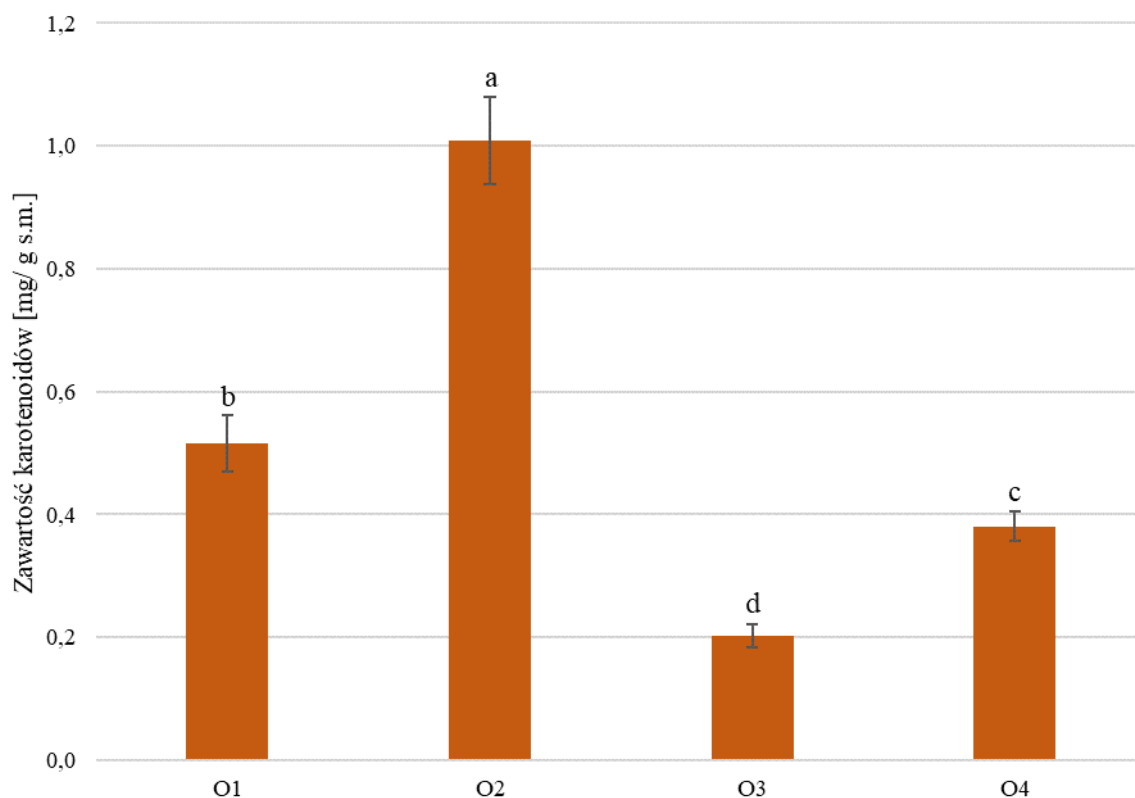


Ryc. 9. Zawartość chlorofilu w roślinach pochodzących z hodowli *in vitro* na podłożach o zróżnicowanym składzie. Dane przedstawiono jako wartości średnie (n=3) i odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną przeprowadzono w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Grupy jednorodnie rozpatrywano oddzielnie dla każdego z typów chlorofilu. Słupki oznaczone takimi samymi literami nie różnią się statystycznie.

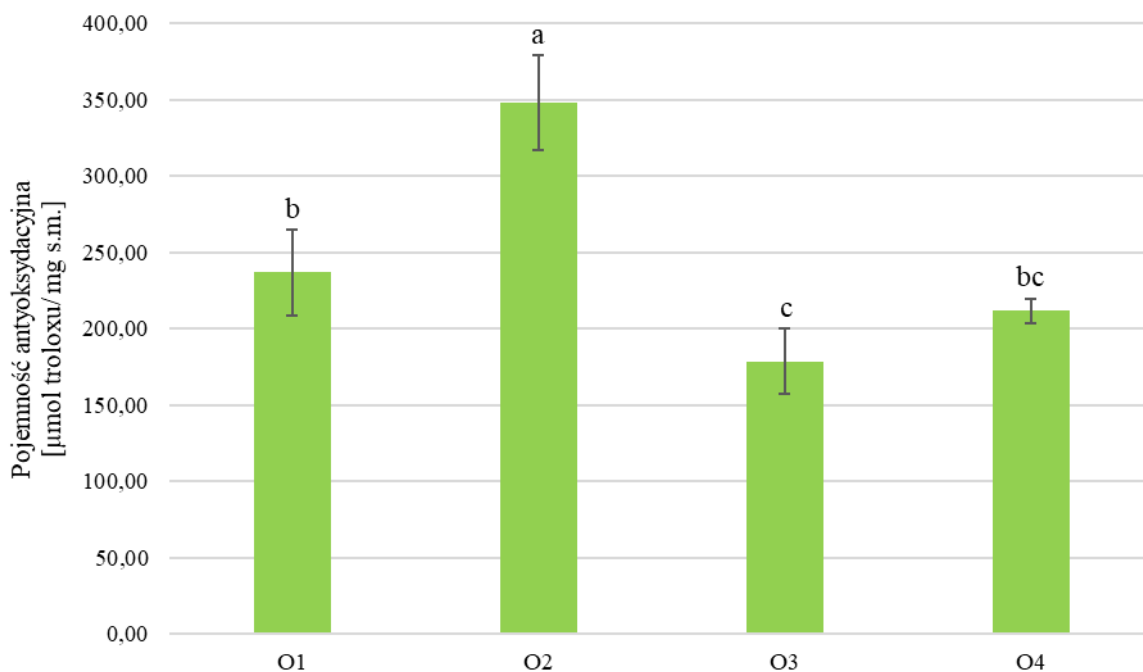
Drugą grupę związków, których zawartość oznaczono na tym etapie badań, stanowiły karotenoidy (Ryc. 10, a). Największą ich zawartość odnotowano dla kaptownic hodowanych w podłożu o składzie określonym przez wariant drugi, a wartość ta była 5-krotnie wyższa od najmniejszej, którą zaobserwowano w roślinach pochodzących z podłoża O3. Wyniki uzyskane dla roślin namnażanych w podłożach o wariacie 1 oraz 4 były niższe o odpowiednio 48,8% i 62,2% w porównaniu z wartościami oznaczonymi w roślinach rosnących na podłożu O2.

Na rycinie 10, b przedstawiono wyniki dotyczące pojemności antyoksydacyjnej badanych roślin. Najwyższy wynik ponownie odnotowano u kaptownic rosnących w wariacie 2 podłoża i był on 2-krotnie wyższy od najmniejszej wartości odnotowanej w roślinach pochodzących z podłoża o składzie określonym przez wariant 3. Wyniki odnotowane u *Sarracenia purpurea* L. hodowanych w O1 i O4 były niższe o odpowiednio 31,9% i 39,2% od poziomu scharakteryzowanego w wariacie 2.

a)



b)

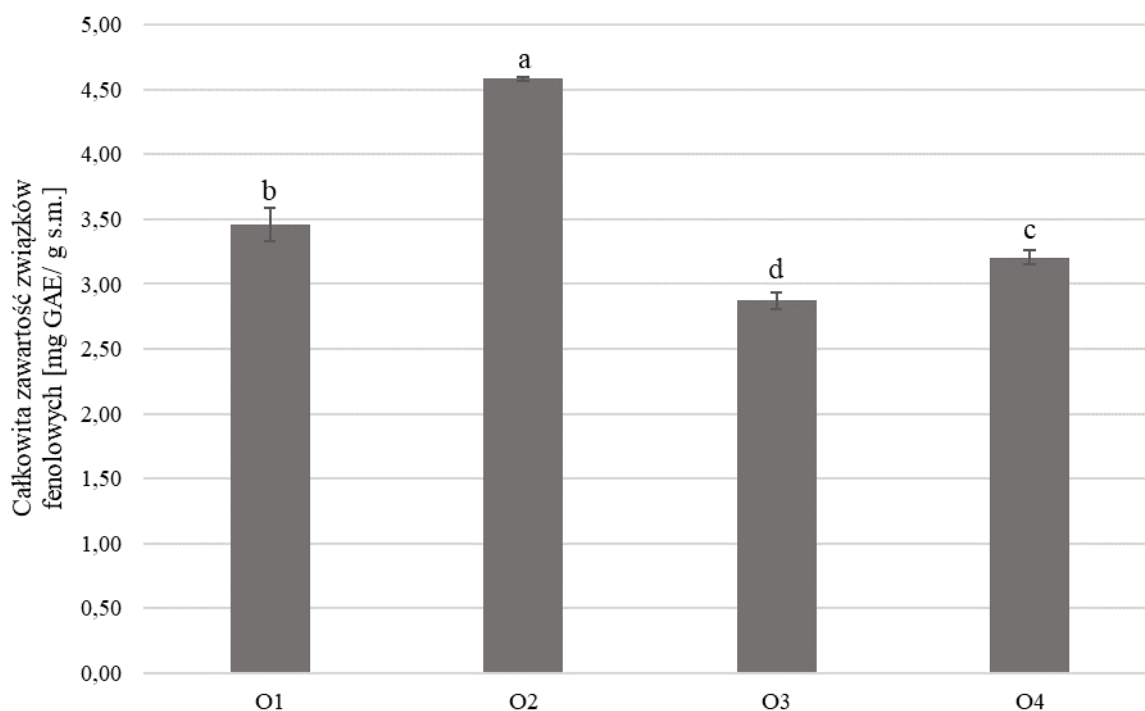


Ryc. 10. Zawartość karotenoidów (a) oraz pojemność antyoksydacyjna (b) oznaczone dla roślin pochodzących z kultur *in vitro* na podłożach o zróżnicowanym składzie. Dane przedstawiono jako wartości średnie (n=3) i odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną przeprowadzono w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Słupki oznaczone takimi samymi literami nie różnią się statystycznie.

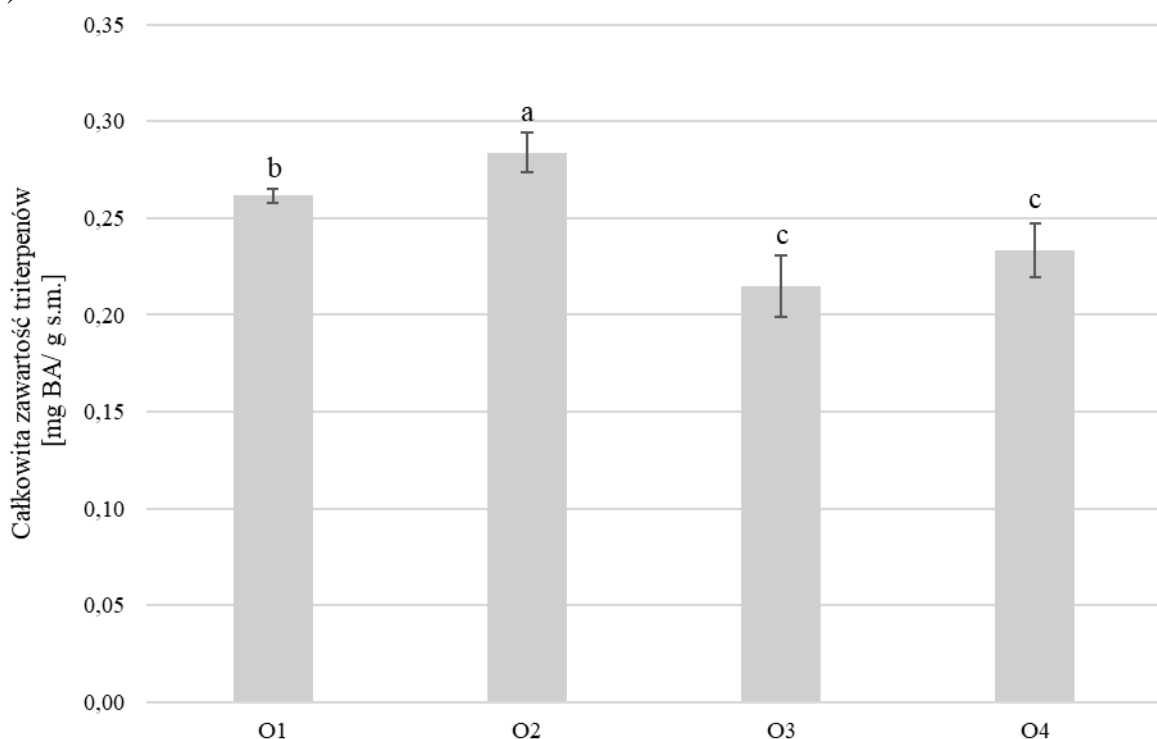
Fenylopropanoidy stanowiły kolejną grupę związków o aktywności biologicznej, których zawartość całkowitą określono w badanych roślinach (Ryc. 11, a). Największy poziom związków fenolowych zaobserwowano u roślin rosnących w podłożu, którego skład scharakteryzowano w wariacie opisanym jako 2. W wariantach O1, O3 i O4 wartości te były niższe o odpowiednio 24,6%, 37,3% i 30,0%.

Na rycinie 11, b przedstawiono wartości oznaczone w roślinach triterpenów. Największą ich zawartość zaobserwowano w tkankach roślin namnażanych w podłożu, którego skład determinował wariant drugi. Wartość ta była o 8,1% większa od wyniku uzyskanego dla kapturnic pochodzących z O1. Ilości odnotowane dla *Sarracenia purpurea* L. w wariantach O3 i O4 stanowiły grupę jednorodną i były o odpowiednio 24,3% i 18,0% mniejsze od uzyskanych dla roślin z O2.

a)



b)



Ryc. 11. Calkowita zawartość związków fenolowych (a) oraz calkowita zawartość triterpenów (b) oznaczonych w roslinach hodowanych *in vitro* na podlozjach o roznicowanym skladzie. Dane przedstawiono jako wartosci srednie (n=3) i odchylenia standardowe serii pomiarow. Analize statystyczna przeprowadzono w oparciu o jednoczynnikowa analize wariacji (ANOVA). Slupki oznaczone takimi samymi literami nie rozni sa statystycznie.

Na podstawie uzyskanych w dwóch etapach optymalizacji wyników, wyselekcjonowano wariant 2 jako najbardziej optymalny dla prawidłowego wzrostu i rozwoju *Sarracenia purpurea* L. w kulturach *in vitro* oraz dla pozyskania związków bioaktywnych. Podobnie, jak w etapie pierwszym, wnioski uzyskane na podstawie oznaczeń, poparte zostały obserwowanym tempem wzrostu i kondycją roślin. W dalszych badaniach wszystkie podłoża przygotowywano zgodnie ze składem określonym przez wariant 2.

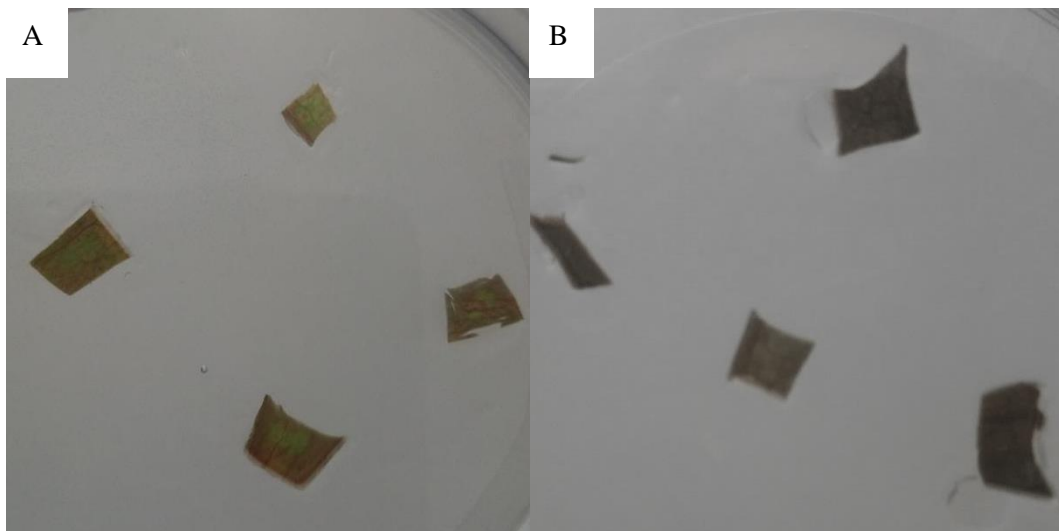
4.2. Transformacja genetyczna roślin *Sarracenia purpurea* L.

4.2.1. Agroinfekcja

Transformację genetyczną roślin *Sarracenia purpurea* L. przeprowadzono dwiema metodami: metodą iniekcji oraz metodą kokultury, za pomocą trzech szczepów *Rhizobium rhizogenes*: ATCC 15834, A4 oraz LBA 9402.

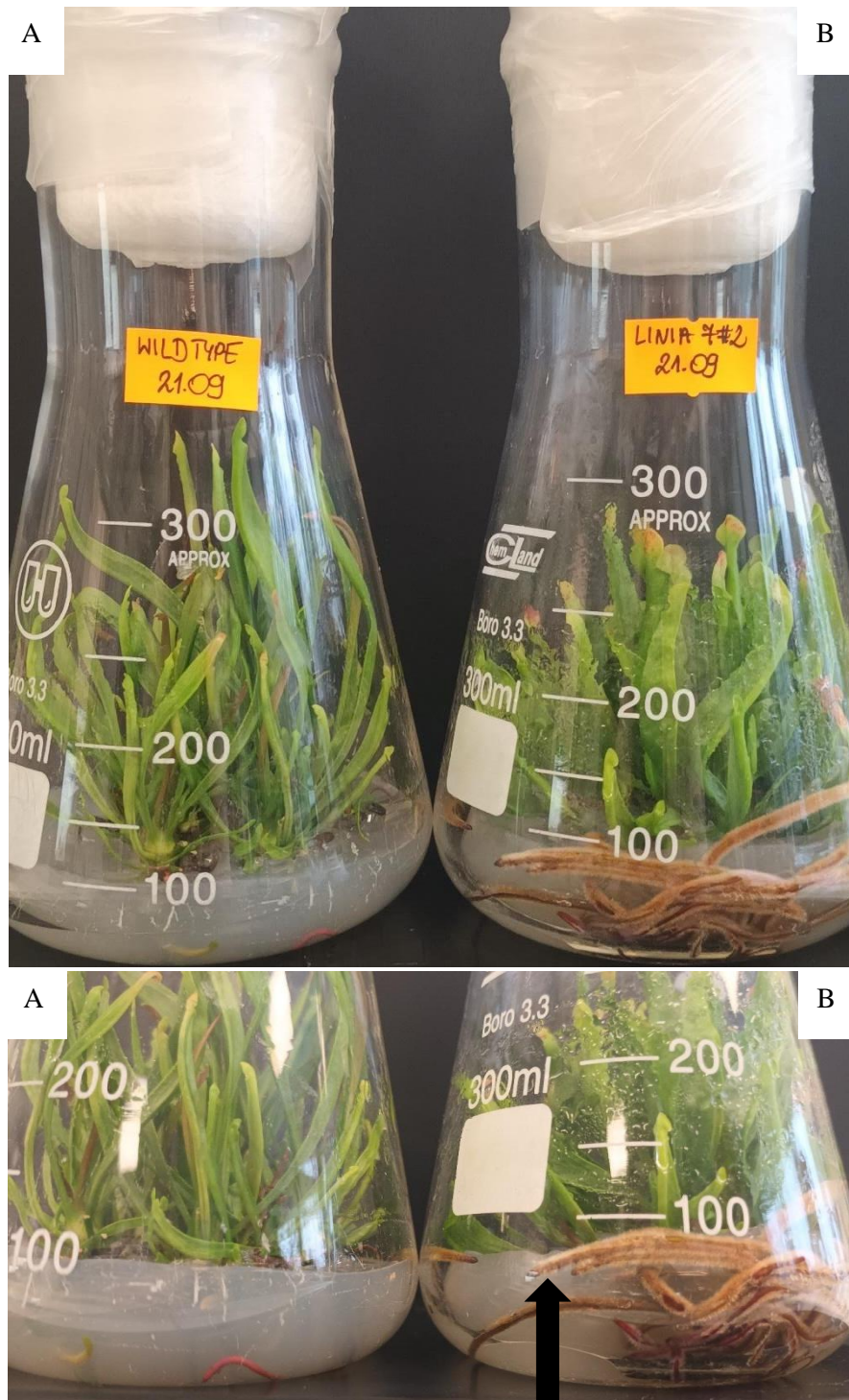
Podjęto 30 niezależnych prób transformacji kokultury eksplantatów kaptownicy z płynną zawiesiną bakterii wszystkich trzech zastosowanych szczepów. Żadna z nich nie przyniosła rezultatu, po 2 dobach kokultury eksplantaty obumierały.

Metoda iniekcji za pomocą sterylnych igieł insulinowych z wykorzystaniem szczepów *Rhizobium rhizogenes* A4 oraz LBA 9402 również nie zakończyła się powodzeniem. Po około 2 tygodniach od modyfikacji eksplantaty traciły żywotność (Ryc. 12). Pozytywny efekt zastosowanej agroinfekcji odnotowano dla tej metody z zastosowaniem *Rhizobium rhizogenes* szczep ATCC 15834.



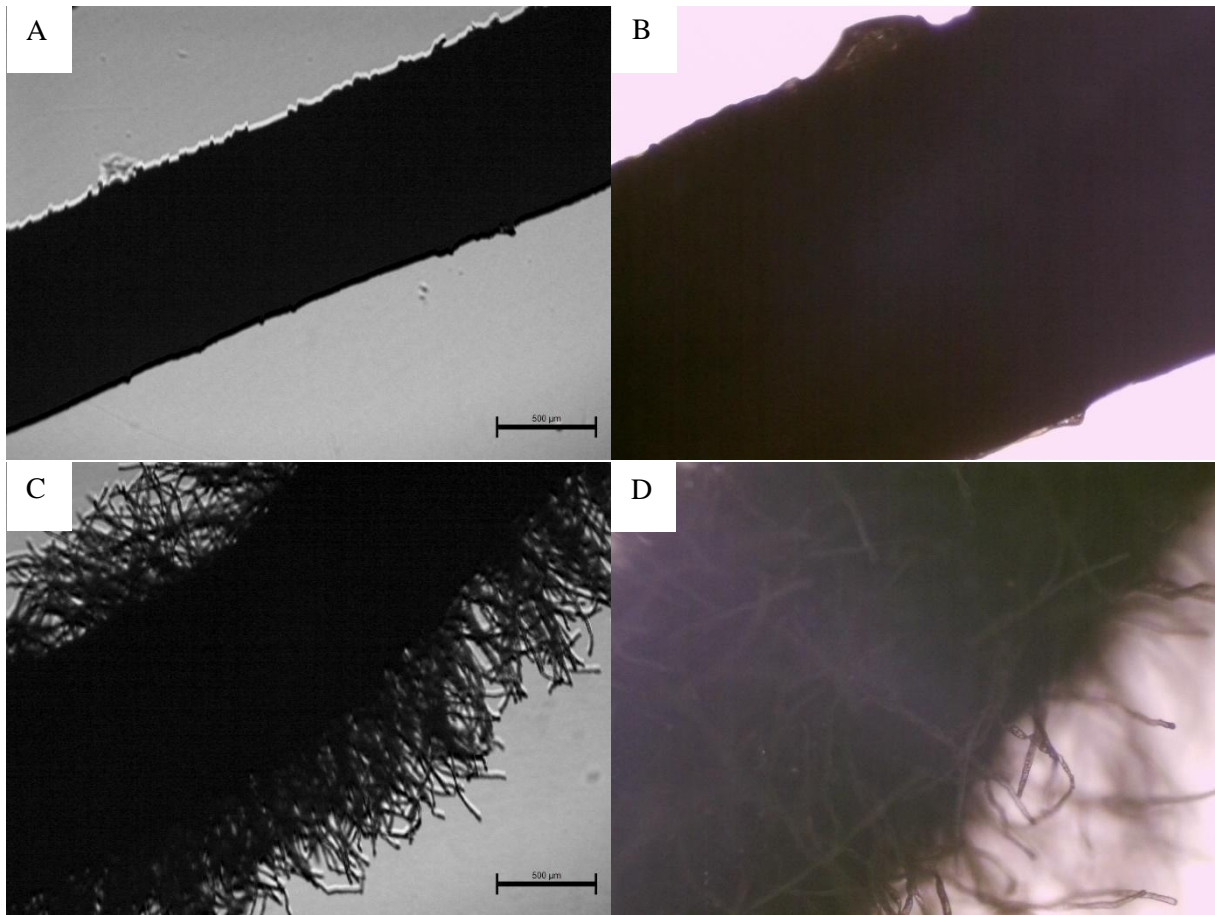
Ryc. 12. Eksplantaty *Sarracenia purpurea* L. transformowane metodą kokultury z bakteriami *Rhizobium rhizogenes*, szczep A4: A- eksplantaty wykorzystane do transformacji, B- eksplantaty po 14 dniach od transformacji (fot. Kinga Pilarska).

Uzyskane korzenie włośnikowate charakteryzowały się wyraźnymi różnicami morfologicznymi. Korzenie transformowane prezentowały wyraźnie zmienioną barwę (intensywny czerwono-brunatny kolor), 6-krotnie większą długość oraz znacznie bardziej zwartą strukturę w porównaniu do korzeni roślin niemodyfikowanych (Ryc. 13). Ponadto zmodyfikowane korzenie wykazywały zaburzony geotropizm, czyli zmniejszoną wrażliwość na grawitację. Nadmienić należy, iż jest to cecha znamienna dla korzeni włośnikowatych, opisywana w literaturze i wynikająca prawdopodobnie ze zmienionej wrażliwości tych organów na auksyny (Wasilewska, Królicka, 2005; Gutierrez-Valdes i wsp., 2020).



Ryc. 13. Korzenie transformowane roślin *Sarracenia purpurea* L.: A- roślina typu dzikiego, nie poddawana transformacji, B- roślina poddana agroinfekcji (fot. Kinga Pilarska).

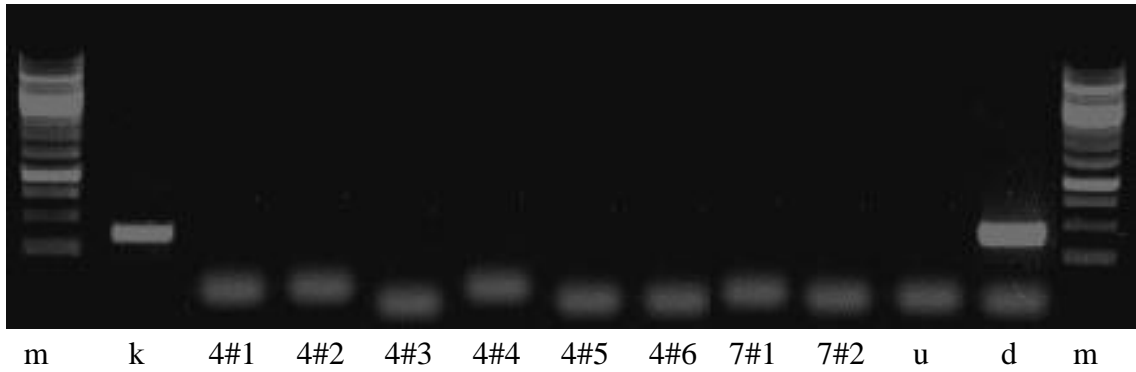
Korzenie badanych roślin poddano analizie mikroskopowej. Zaobserwowano wyraźnie silniej rozgałęziony system korzeniowy roślin modyfikowanych (ang. hairy roots) w porównaniu do korzeni roślin WT (Ryc. 14).



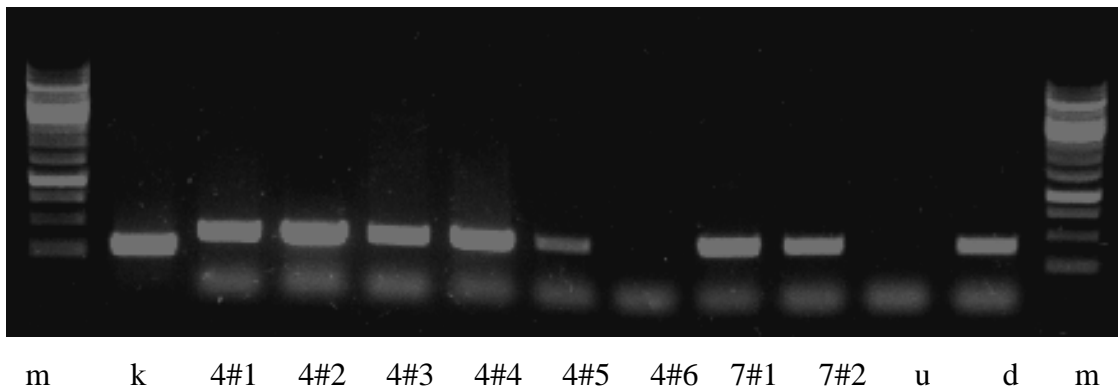
Ryc. 14. Analiza mikroskopowa korzeni badanych roślin: A i B- korzenie rośliny niemodyfikowanej (WT), C i D- korzenie włósnikowate, uzyskane po transformacji *R. rhizogenes* szczepem 15834 metodą mikroiniekcji (fot. Kinga Pilarska).

4.2.2. Potwierdzenie integracji T-DNA

Integracja genu *rolB* z plazmidu *Ri* do genomu rośliny jest najważniejszym elementem procesu transformacji roślin za pomocą bakterii *Rhizobium rhizogenes*. Selekcję linii transgeniczných przeprowadzono spośród 70 roślin, które pomyślnie przeszły etap transformacji. Obecność genu *rolB* potwierdzono dla korzeni sześciu linii, natomiast nie został wykryty w genomie korzeni roślin kontrolnych, niepoddanych modyfikacji (Ryc. 16). W częściach zielonych badanych roślin nie wykryto obecności genu *rolB* (Ryc. 15).



Ryc. 15. Identyfikacja genu *rolB* w genomie części zielonych roślin *Sarracenia purpurea* L. poddanych agroinfekcji. Ścieżki: m- marker mas (1 kb); 4#1- 7#2- produkty PCR namnożone na matrycy DNA genomowego z części zielonych; k- kontrola zestawu, fragment konserwatywnego regionu DNA amplifikowanego przy użyciu specyficznych starterów dostarczonych przez producenta zestawu; u- kontrola negatywna, DNA genomowy wyizolowany z części zielonych roślin niepoddanych agroinfekcji; d- kontrola pozytywna, plazmid *Ri* z *Rhizobium rhizogenes* ATCC 15834. Produktem jest fragment DNA o długości 423 pz.



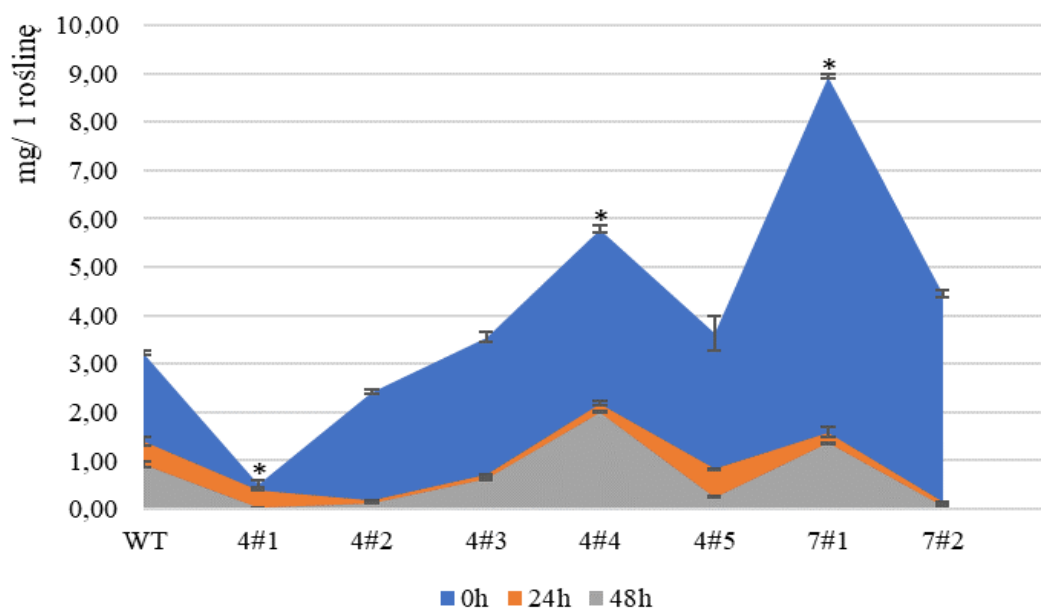
Ryc. 16. Identyfikacja genu *rolB* w genomie korzeni transformowanych *Sarracenia purpurea* L. Ścieżki: m- marker mas (1 kb); 4#1-7#2- produkty PCR namnożone na matrycy DNA genomowego z korzeni włósnikowatych; k- kontrola zestawu, fragment konserwatywnego regionu DNA amplifikowanego przy użyciu specyficznych starterów dostarczonych przez producenta zestawu; u- kontrola negatywna, DNA genomowy wyizolowany z korzeni roślin niepoddanych agroinfekcji; d- kontrola pozytywna, plazmid *Ri* z *Rhizobium rhizogenes* ATCC 15834. Produktem jest fragment DNA o długości 423 pz.

Na podstawie uzyskanych wyników dotyczących integracji T-DNA określono uzyskane linie roślin *Sarracenia purpurea* L. jako kompozytowe. Rośliny takie charakteryzują się posiadaniem nietransgenicznym pędów oraz transgenicznym korzeni włósnikowatych (Hansen i wsp., 1989; Torregrosa i Bouquet, 1997; Geng i wsp., 2012).

Wyselekcjonowane rośliny poddawano kondycjonowaniu na zestalonej pożywce MS zawierającej 1 mg/L TDZ przez okres 6 tygodni. Po upływie tego czasu rośliny podzielono na mniejsze fragmenty i umieszczono na zestalonym podłożu SIM. Z każdej rośliny wyjściowej uzyskano liczbę klonów niezbędną do prowadzenia dalszych badań. Pomimo wyeliminowania linii 4#6 na podstawie metody PCR, zdecydowano się wprowadzić ją do dalszych badań strukturalnych ze względu na wyraźne różnice morfologiczne jej korzeni w porównaniu do korzeni rośliny niemodyfikowanej. Uzyskane linie transgeniczne charakteryzowały się zwiększoną zdolnością do regeneracji oraz namnażania w odniesieniu do linii kontrolnej (WT).

4.3. Świeża i sucha masa korzeni

Ocenę świeżej oraz suchej masy korzeni przeprowadzono w celu określenia rozwoju systemu korzeniowego badanych roślin oraz wpływu przeprowadzonej transformacji na te parametry. Oznaczenia wykonano dla roślin rosnących w kulturach *in vitro* oraz po 24h i 48h inkubacji korzeni w temperaturze 70°C. Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinie 17.



Ryc. 17. Sucha masa korzeni. Dane przedstawiono jako wartości średnie (n=3) i odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Dla danych istotnych statystycznie zastosowano test Dunnett'a. Na wykresie zaznaczono różnice istotne statystycznie względem grupy kontrolnej (WT) dla * $p < 0,05$.

Świeżą masę korzeni roślin kontrolnych oznaczono na poziomie 3,22 mg/ jedną roślinę. Dla korzeni włósnikowatych z linii 4#3, 4#4, 4#5, 7#1 i 7#2 odnotowano wyraźny przyrost

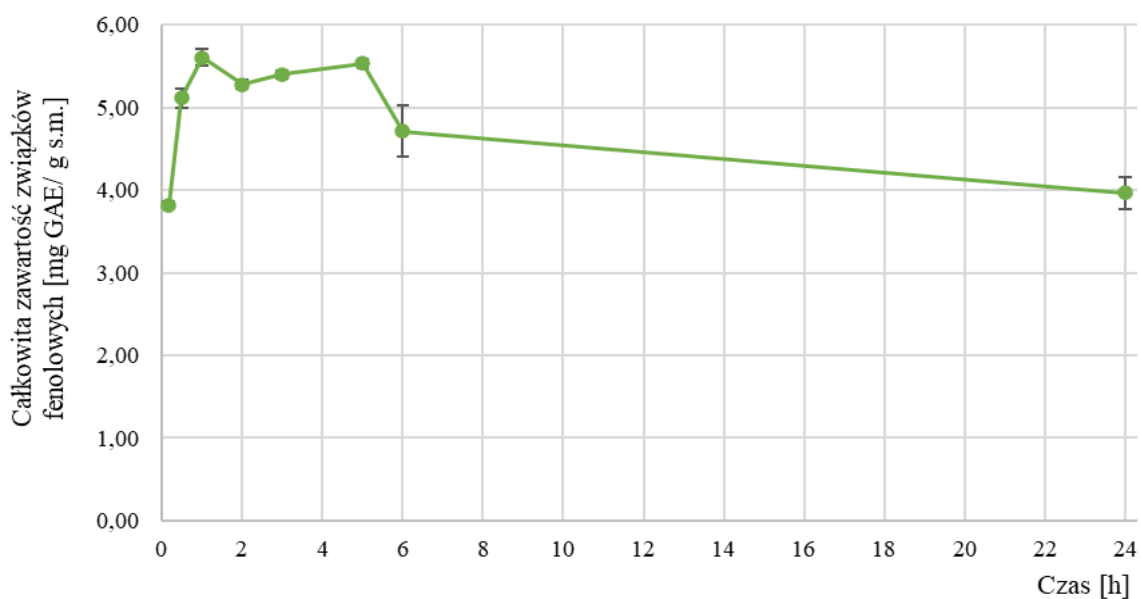
świeżej masy w porównaniu do korzeni roślin niemodyfikowanych. Największe wartości zaobserwowano dla linii 4#4 i 7#1 i były 1,8- krotnie oraz 2,8- krotnie wyższe w odniesieniu do korzeni roślin szczepu dzikiego, zmiany te były istotne statystycznie. Wykazano również, że świeża masa korzeni z linii 4#3, 4#5 oraz 7#2 wyniosła więcej o odpowiednio 37,9% (3,55 mg/1 roślina), 12,4% (3,62 mg/ 1 roślina) oraz 37,9% (4,44 mg/1 roślina) w odniesieniu do świeżej masy korzeni roślin typu dzikiego. Spadek świeżej masy korzeni o 83,9% odnotowano dla linii 4#1. Przeprowadzona transformacja genetyczna wpłynęła więc pozytywnie na wzrost masy korzeni, a największą różnicę i istotną statystycznie obserwowano dla linii 4#4 i 7#1.

4.4. Optymalizacja ekstrakcji związków bioaktywnych z badanych roślin

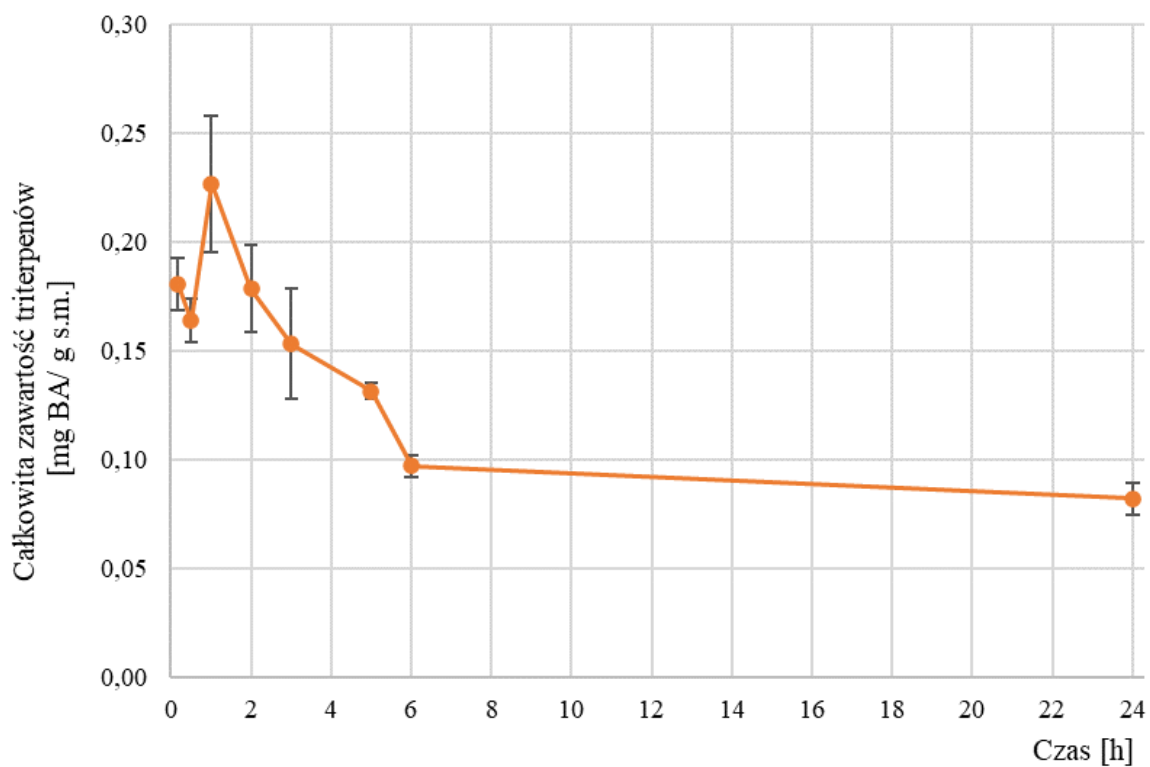
Dobór stężenia alkoholu etylowego jako ekstrahentu oraz czasu i temperatury jako parametrów procesu ekstrakcji, stanowił kolejny bardzo ważny etap prowadzonych badań. Jego celem było określenie najlepszych parametrów ekstrakcji tak, aby uzyskać jak największą ilość związków o potencjale bioaktywnym podczas prowadzonych badań. Wybór ekstrahentu związany był z zaplanowanymi dalszymi etapami badań, w których uwzględniono testy na liniach komórkowych. Zastosowanie rozpuszczalników, takich jak: metanol, glikol propylenowy, glicerol mogłoby niekorzystnie wpłynąć na komórki badanych linii. Na optymalizację ekstrakcji związków bioaktywnych z badanych roślin *Sarracenia purpurea* L. składały się trzy etapy.

W pierwszej fazie przygotowano ekstrakty z kaptownic, zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.2.3. niniejszej pracy i przeprowadzono ekstrakcję przy użyciu siły mechanicznej (wstrząsanie). W uzyskanych ekstraktach oznaczono zawartość związków fenolowych oraz triterpenów, a wyniki przedstawiono na rycinie 18. Odnotowano największe ilości obu grup ekstrahowanych związków po 10, 30 i 60 minutach prowadzonego procesu. W obu przypadkach zaobserwowano wyraźny spadek izolowanych produktów po pierwszej godzinie ekstrakcji. Zaobserwowano, że wydłużenie czasu ekstrakcji do 24 godzin stało się niekorzystne ze względu na obniżenie ilości ekstrahowanych związków fenolowych o 29,2% oraz triterpenów o 63,9%, w porównaniu do najwyższych uzyskanych w procesie wartości. Na tym etapie podjęto decyzję o skróceniu ekstrakcji w kolejnym etapie do 3 godzin.

a)



b)

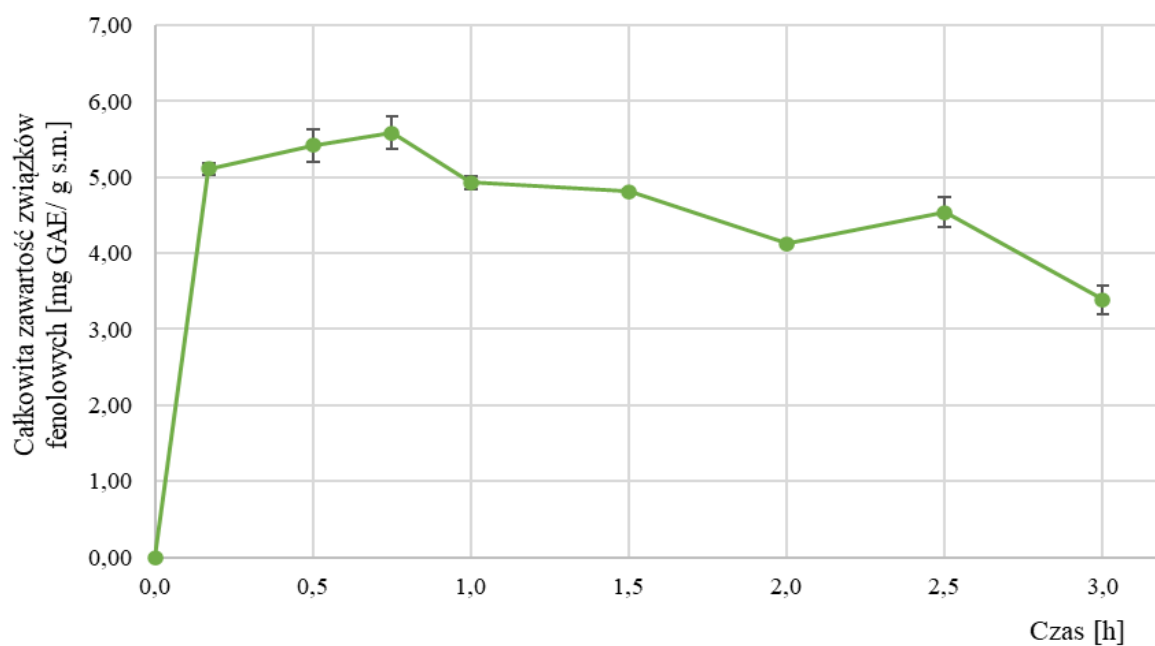


Ryc. 18. Krzywe ilustrujące zawartość ekstrahowanych związków w zależności od czasu prowadzonej ekstrakcji mechanicznej: (a) całkowita zawartość związków fenolowych, (b) całkowita zawartość triterpenów. Analizę statystyczną przeprowadzono w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA).

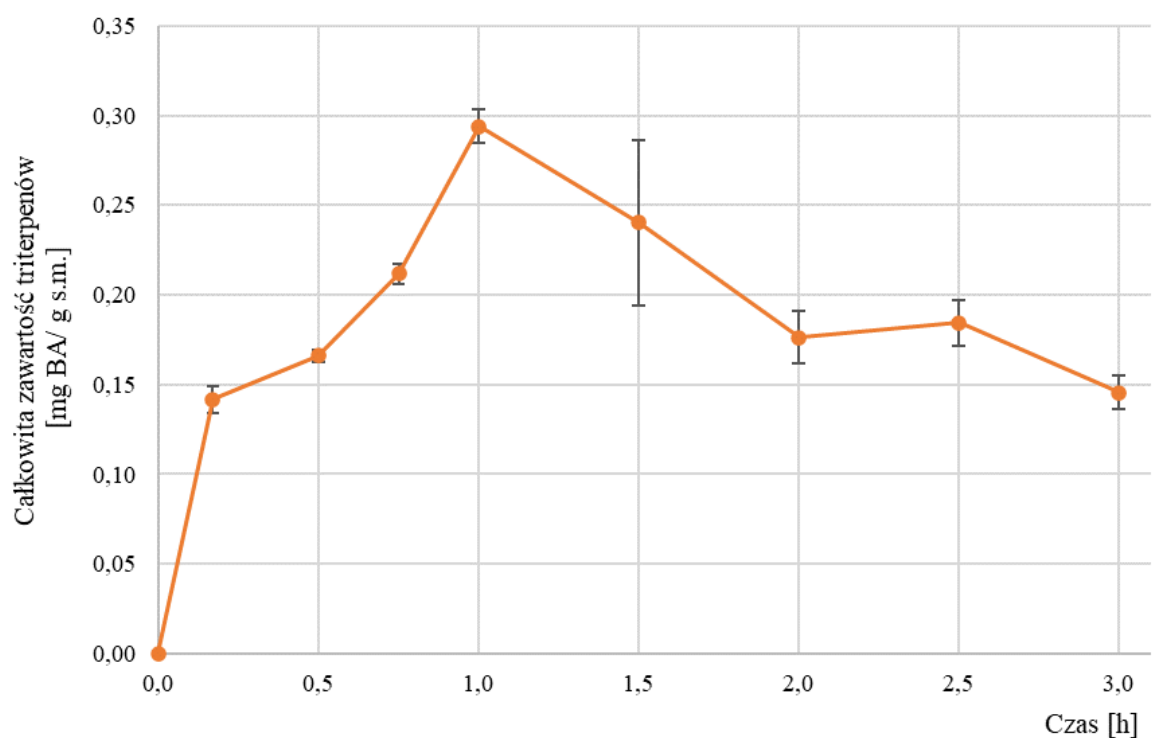
Drugi etap stanowiło ponowne przygotowanie ekstraktów zgodnie z opisem w rozdziale 3.2.3. i przeprowadzenie procesu z wykorzystaniem fal ultradźwiękowych. W pobranych po 10, 30, 45, 60, 90, 120, 150 i 180 minutach prowadzonego procesu ekstraktach oznaczono całkowitą zawartość związków fenolowych oraz triterpenów. Widoczny wzrost ilości ekstrahowanych związków fenolowych obserwowano w 10, 30, 45, 60 i 120 minucie prowadzonej ekstrakcji, natomiast po tym czasie odnotowano spadek wydajności procesu (Ryc. 19, a). Najwyższą zawartość fenylopropanoidów zanotowano w 45 minucie ekstrakcji.

Ekstrakcja triterpenów przebiegała w sposób rosnący do pierwszej godziny prowadzonego procesu (Ryc. 19, b). W każdym kolejnym odczycie zaobserwowano spadek wydajności ekstrakcji.

a)



b)



Ryc. 19. Krzywe ilustrujące zawartość ekstrahowanych związków w zależności od czasu prowadzonej ekstrakcji ultradźwiękowej: (a) całkowita zawartość związków fenolowych, (b) całkowita zawartość triterpenów. Analizę statystyczną przeprowadzono w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA).

Porównano wydajność ekstrakcji za pomocą sił mechanicznych oraz ekstrakcji z wykorzystaniem fal ultradźwiękowych i odnotowano nieznacznie lepsze parametry procesu z wykorzystaniem ultradźwięków. Ta metoda została zastosowana w następnych etapach badań.

Następnym etapem prowadzonej optymalizacji było wykorzystanie modelu planowania doświadczeń Box- Behnken, do którego wprowadzono analizowane zmienne niezależne (parametry ekstrakcji). Uzyskano 15 wariantów doboru zmiennych determinujących dla każdego określone warunki ekstrakcji (załącznik 2). W każdym z przygotowanych ekstraktów oznaczono ogólną zawartość związków fenolowych oraz triterpenów. Na podstawie analizy uzyskanych wyników przygotowano model i przedstawiono wstępne optymalne warunki ekstrakcji: 10 minut, 60°C oraz 64% EtOH. W zastosowanym programie komputerowym zasymulowano podane parametry w celu uzyskania najbardziej prawdopodobnych poziomów wyekstrahowanych związków. Kolejno przeprowadzono ekstrakcję w oparciu o ustalone parametry, a w uzyskanych ekstraktach oznaczono ogólną zawartość związków fenolowych oraz triterpenów.

Na podstawie prognozowanych oraz rzeczywistych zawartości badanych związków przyjęto opisane warunki jako optymalne dla prowadzenia procesu ekstrakcji na dalszych etapach prowadzonych badań.

W celu analizy przeprowadzonej optymalizacji ekstrakcji związków bioaktywnych z badanych roślin wykonano doświadczenia w oparciu o 3-czynnikowy układ wg Boxa- Behnkena obrazujący powiązania pomiędzy parametrami prowadzonego procesu, a wydajnością ekstrakcji związków bioaktywnych.

Powierzchnie odpowiedzi zawarte w załącznikach 5, 6 i 7 przedstawiają jednoczesny wpływ 2 z 3 zmiennych niezależnych (czas i temperatura procesu oraz stężenie etanolu) na zmienną zależną, którą jest odpowiednio zawartość związków fenolowych lub triterpenów. Pozwalają one na określenie czy opisywana zależność wykazuje charakter liniowy (w przypadku uzyskania płaskich powierzchni) lub też charakter kwadratowy (w przypadku wypukłej bądź wklęsłej powierzchni). Dodatkowo, powierzchnie te uwidaczniają potencjalne interakcje pomiędzy zmiennymi, co przejawia się niesymetryczną powierzchnią oraz różnym przebiegiem zależności jednej zmiennej od wartości innej.

W przypadku związków fenolowych, najwyższy poziom ekstrakcji uzyskano w temperaturze dolnej granicy układu doświadczalnego, czyli 25°C, jednak wyłącznie przy

krótkim czasie trwania tego procesu (10 min), co potwierdza statystycznie istotną interakcję między temperaturą a czasem (załącznik 7a, 8.). W przypadku triterpenów można wyznaczyć optymalną wartość temperatury ekstrakcji wynoszącą 43°C, jednak także przy krótkim czasie ekstrakcji, co w tym przypadku także związane jest z interakcją pomiędzy zmiennymi. Otrzymany model regresji sugeruje, że najwyższy poziom ekstrakcji zawartości związków fenolowych, jak i triterpenów można uzyskać zarówno przy krótkim czasie procesu, stosując 64% EtOH lub też czasie wydłużonym do 60 min, lecz przy maksymalnym stężeniu EtOH (96%), ze względu na kolejną interakcję obejmującą stężenie alkoholu i czas ekstrakcji (załącznik 6, 8, 9). Mając na względzie dalsze etapy badań związane z testami na liniach komórkowych i związaną z tym potrzebę ograniczania stężenia etanolu do najmniejszych możliwych wartości, za korzystny uznano pierwszy wariant (10 min, 64%). Z kolei powierzchnie odpowiedzi obejmujące współzależność temperatury i stężenia EtOH wskazują na zasadność stosowania 64% EtOH w temp. 60°C w celu efektywnej ekstrakcji związków fenolowych oraz temperatury 43°C przy tym samym stężeniu alkoholu do ekstrakcji triterpenów (załącznik 5). Należy zaznaczyć, iż mimo że efekt stężenia EtOH został uznany za nieistotny statystycznie (załącznik 10, 11) jego uwikłanie w statystycznie istotną interakcję wymusza uwzględnienie go do modelu.

Złożoność interakcji pomiędzy czasem ekstrakcji, temperaturą i stężeniem etanolu dla obu ekstrahowanych składników bioaktywnych spowodowała rozbieżność w optymalnych parametrach procesu w kierunku maksymalizacji odzysku związków fenolowych i triterpenów. W efekcie zdecydowano się na zastosowanie w dalszych badaniach następujących parametrów ekstrakcji: 64% EtOH, 10 minut, temp. 60°C, co pozwala na optymalną ekstrakcję związków fenolowych i jednocześnie wystarczająco dobrą ekstrakcję triterpenów.

Odrzucono zastosowanie wysokich stężeń etanolu jako ekstrahenta ze względu na zaplanowane w kolejnych etapach badania z wykorzystaniem linii komórkowych, a także na ewentualny potencjał aplikacyjny uzyskiwanych ekstraktów. Zbyt duże stężenia alkoholu oddziałują niekorzystnie na zdrowe komórki w testach określających cytotoksyczność oraz mogłyby zaburzać odczyty żywotności komórek w testach przeciwnowotworowych. Zważając na dostępne dane literaturowe, ograniczono także zastosowanie nadmiernie wysokich temperatur ekstrakcji. W roślinach *Sarracenia purpurea* L. oprócz oznaczonych grup związków, znajduje się jeszcze około 20, których nie udało się wciąż scharakteryzować. Zarówno dla już poznanych, jak i nowych substancji stosowanie zbyt wysokich temperatur

mogłoby skutkować uszkodzeniem ich struktur, obniżeniem wydajności ekstrakcji oraz potencjału farmakologicznego.

4.5. Ocena składu biochemicznego wybranych linii roślin

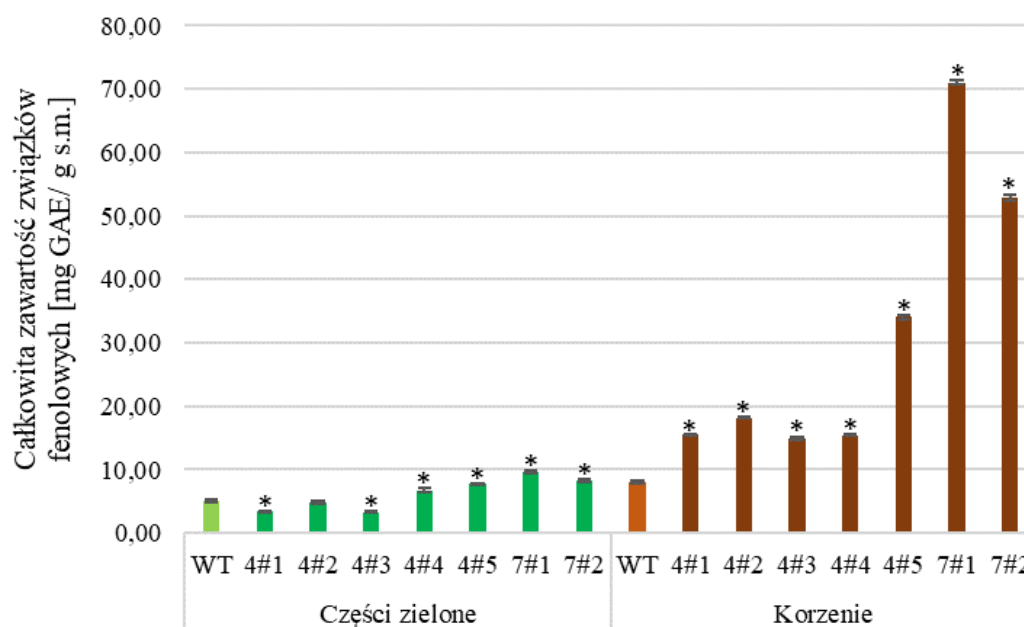
4.5.1. Oznaczenie całkowitej zawartości polifenoli w materiale roślinnym

Polifenole to związki naturalnie występujące w roślinach, które charakteryzują się dużą aktywnością biologiczną. Ekstrakty z części zielonych oraz korzeni siedmiu linii roślin poddanych modyfikacji genetycznej zbadano pod kątem całkowitej zawartości związków polifenolowych. Wykorzystano metodę spektrofotometryczną wykorzystującą zdolność związków fenolowych do wytwarzania barwnych reakcji z odczynnikiem Folina- Cioacalteu. Kontrolę stanowiły ekstrakty z roślin niepoddanych modyfikacji (WT). Wyniki przedstawiono na rycinie 20.

Statystycznie istotny wzrost całkowitej zawartości polifenoli zaobserwowano dla wszystkich indukowanych korzeni włósnikowatych w porównaniu do korzeni roślin typu dzikiego. W odniesieniu do roślin niepoddanych modyfikacji, w korzeniach roślin linii 4#1, 4#2 oraz 4#3 znajdowało się więcej związków polifenolowych o odpowiednio 94,7% (15,5 mg GAE/ g s.m.), 128,9% (18,22 mg GAE/ g s.m.) oraz 88,7% (15,02 mg GAE/ g s.m.). Największy wzrost zawartości badanych związków w korzeniach odnotowano dla trzech linii 4#5, 7#1 oraz 7#2, dla których zmierzono odpowiednio 4-krotnie, 9-krotnie i 7-krotnie większe wartości. Związki fenolowe w roślinach syntetyzowane są z fenyloalaniny i tyrozyny. Zawartość tyrozyny w korzeniach linii 4#1 i 7#1 była istotnie niższa niż w roślinach niemodyfikowanych, natomiast w przypadku fenyloalaniny również odnotowano obniżenie zawartości, chociaż zmiana ta nie była istotna statystycznie (Ryc. 37). Obserwowane zmiany w poziomie aminokwasów mogą wskazywać na przekierowanie ich do syntezy związków fenolowych, dla których są one prekursorami.

Części zielone badanych roślin nie wykazywały tak silnej tendencji przyrostu związków polifenolowych (Ryc. 20) jak korzenie. Mimo to odnotowano zwiększoną zawartość tych związków w częściach zielonych linii 4#4, 4#5, 7#1 i 7#2 o odpowiednio 33,0% (6,77 mg GAE/g s.m.), 52,6% (7,78 mg GAE/g s.m.), 89,8% (9,66 mg GAE/g s.m.) i 63,5% (8,32 mg GAE/g s.m.). W przypadku linii 4#4 i 7#1 obserwowano również istotne statystycznie

obniżenie zawartości prekursora tych związków, czyli tyrozyny w pędach, natomiast w przypadku fenyloalaniny redukcję obserwowano dla linii 7#1 (choć nie była ona istotna statystycznie).



Ryc. 20. Całkowita zawartość związków fenolowych w badanych ekstraktach. Dane przedstawiono jako wartości średnie (n=3) i odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Dla danych istotnych statystycznie zastosowano test Dunnett'a. Na wykresie zaznaczono różnice istotne statystycznie względem grupy kontrolnej (WT) dla *p<0,05.

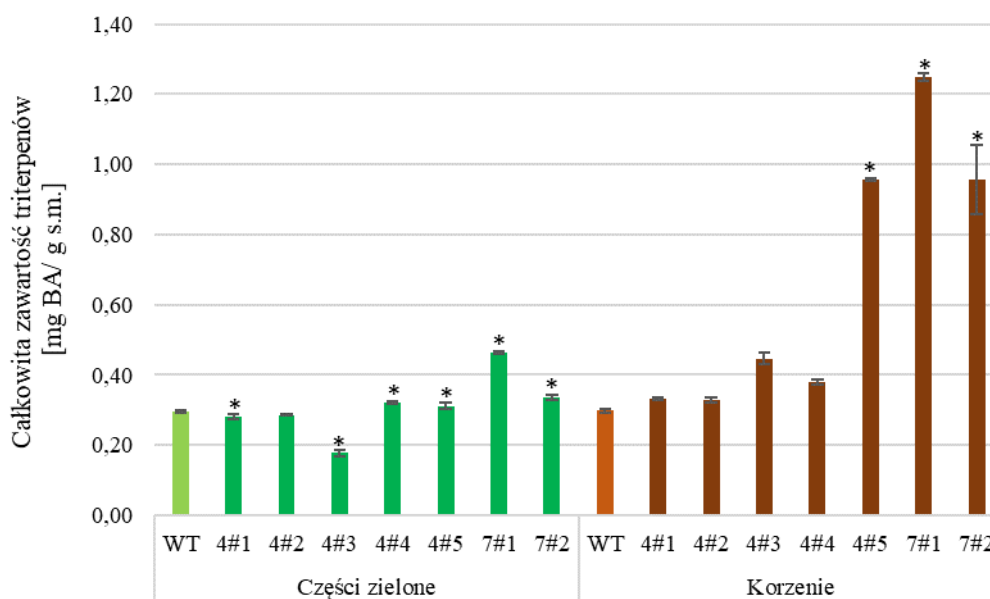
4.5.2. Oznaczenie całkowitej zawartości triterpenów w badanych roślinach *Sarracenia purpurea* L.

Triterpeny stanowią bardzo dużą grupę związków chemicznych szeroko rozpowszechnionych w roślinach i wykazujących właściwości bioaktywne. Całkowitą zawartość tych związków zbadano w ekstraktach z części zielonych i korzeni wszystkich uzyskanych linii modyfikowanych, wykorzystując jako kontrolę rośliny typu dzikiego. Zastosowano w tym celu zmodyfikowaną metodę spektrofotometryczną opisaną przez Le i wsp. (2019). Wyniki przedstawiono na rycinie 21.

Najwyższą całkowitą zawartość triterpenów, podobnie jak w przypadku polifenoli, odnotowano dla korzeni włósnikowatych linii 7#1, 7#2 i 4#5, a wzrost ten był 4-krotnie wyższy dla linii 7#1 i 3-krotnie wyższy dla dwóch pozostałych, w porównaniu do korzeni *Sarracenia*

purpurea typu dzikiego. Zawartość związków triterpenowych w korzeniach linii 4#1, 4#2, 4#3 i 4#4 była wyższa o odpowiednio 10% dla dwóch pierwszych oraz o 50% i 27,7% dla kolejnych.

Całkowita zawartość triterpenów w częściach zielonych roślin typu dzikiego wyniosła 0,29 mg BA/ g s.m. W roślinach linii 4#1, 4#2 i 4#3 odnotowano obniżenie zawartości badanych związków o odpowiednio 5,2%, 2,8% i 39,9%. Dla części zielonych roślin z linii 4#4, 4#5, 7#1 oraz 7#2 wykazano wzrost ilości triterpenów o odpowiednio 9,4%, 5,7%, 57,3% i 14,0% (Ryc. 21).



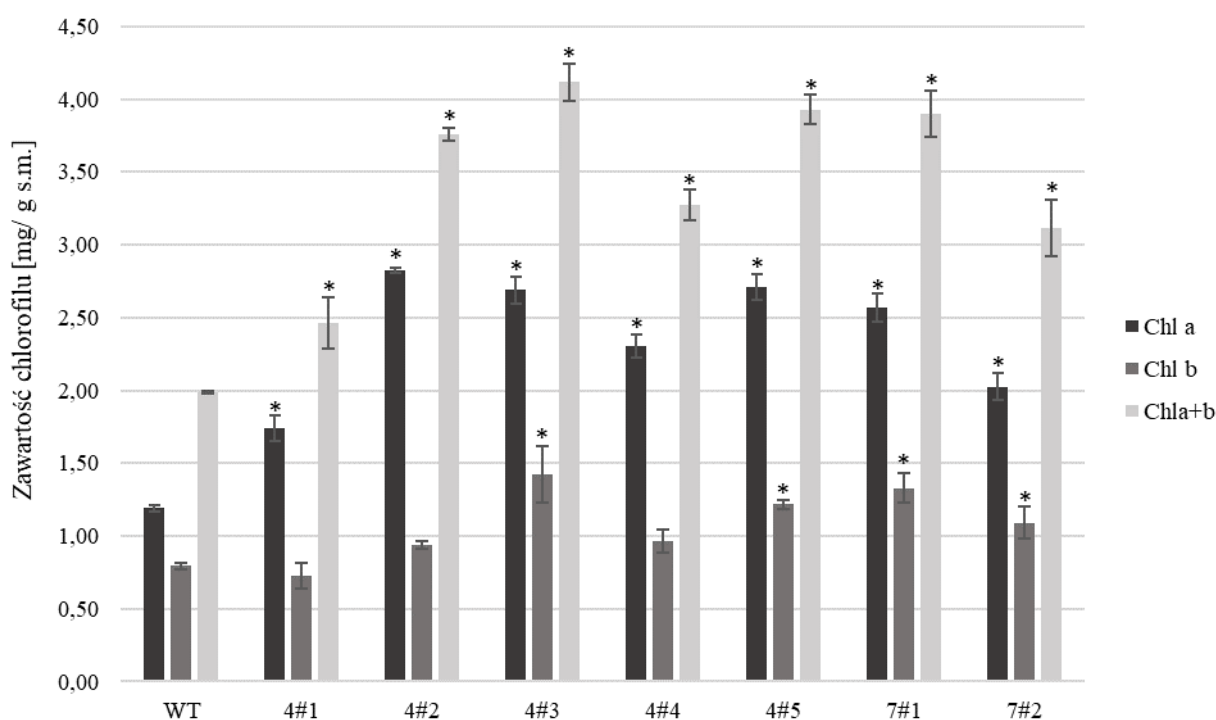
Ryc. 21. Całkowita zawartość triterpenów w badanych ekstraktach. Dane przedstawiono jako wartości średnie (n=3) i odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Dla danych istotnych statystycznie zastosowano test Dunnett'a. Na wykresie zaznaczono różnice istotne statystycznie względem grupy kontrolnej (WT) dla *p< 0,05.

4.5.3. Oznaczenie zawartości chlorofilu w tkankach zielonych

Chlorofil jest barwnikiem fotosyntetycznie czynnym odpowiedzialnym za proces fotosyntezy. Głównym pigment stanowi chlorofil A, zaś chlorofil B pełni funkcję pigmentu pomocniczego. W przeprowadzonym badaniu analizowano całkowitą zawartość chlorofilu (Chl_{a+b}), a także poszczególnych frakcji: chlorofilu A (Chl_a) oraz chlorofilu B (Chl_b). Zawartości związków oznaczono w częściach zielonych siedmiu linii roślin poddanych transformacji, przyjmując za próbę kontrolną wartości dla roślin szczepu dzikiego (WT).

Wykorzystano w tym celu metodę spektrofotometryczną opisaną przez Lichtenthalera (Lichtenthaler, 1987). Wyniki zaprezentowano na rycinie 22.

Całkowita zawartość chlorofilu dla rośliny kontrolnej wyniosła 1,99 mg/ g s.m. We wszystkich roślinach linii modyfikowanych odnotowano wzrost zawartości całkowitej chlorofilu. Dla linii 4#3, 4#5 oraz 7#1 wzrost był dwukrotny. Linie 4#2, 4#4 oraz 7#2 charakteryzowały się zwiększeniem całkowitej zawartości barwników fotosyntetycznie czynnych o odpowiednio 88,9% (2,47 mg/ g s.m.), 64,3% (3,27 mg/ g s.m.) oraz 56,8% (3,12 mg/ g s.m.). Najmniejszy przyrost zawartości całkowitej chlorofilu zaobserwowano dla roślin z linii 4#1 (wzrost o 23,6%).



Ryc. 22. Zawartość chlorofilu w badanych ekstraktach. Dane przedstawiono jako wartości średnie (n=3) i odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Dla danych istotnych statystycznie zastosowano test Dunnett'a. Na wykresie zaznaczono różnice istotne statystycznie względem grupy kontrolnej (WT) dla *p< 0,05.

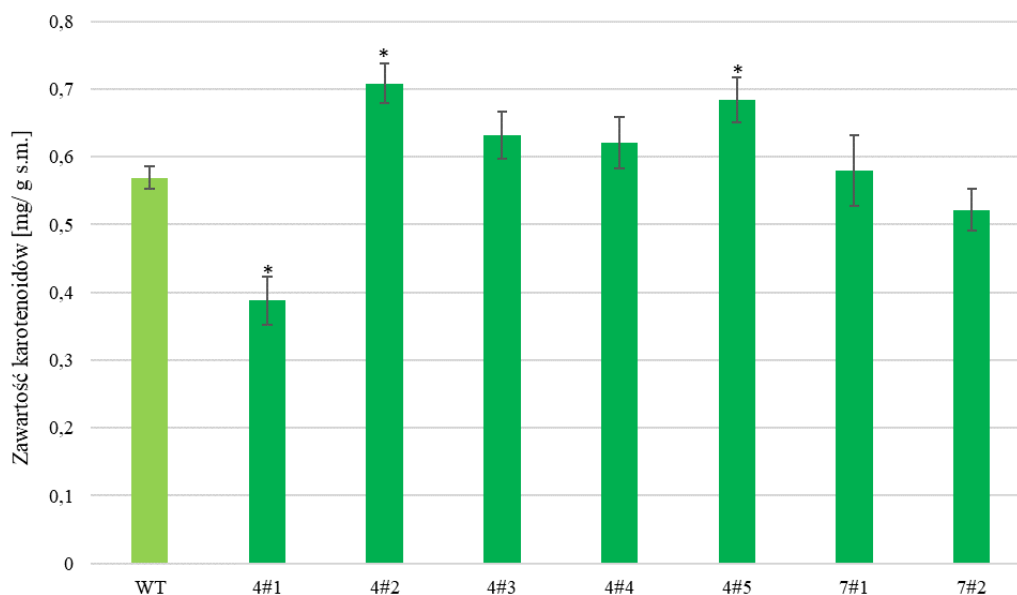
Dla chlorofilu A odnotowano istotny statystycznie wzrost zawartości we wszystkich liniach roślin poddanych transformacji genetycznej w porównaniu z niemodyfikowaną rośliną *Sarracenia purpurea* L. Dla linii 4#1 odnotowano najmniejszy wzrost zawartości chlorofilu A (wzrost o 46,2%). Zaobserwowano ponad dwukrotne zwiększenie ilości chlorofilu A w ekstraktach roślin linii 4#2, 4#3 i 4#5.

W roślinach linii 4#1 odnotowano obniżenie zawartości chlorofilu B o 8,8% (0,73 mg/ g s.m.) w porównaniu do roślin kontrolnych (0,80 mg/ g s.m.), ale zmiana ta nie była istotna statystycznie. W pozostałych sześciu liniach wykazano wzrost zawartości chlorofilu B, notując najwyższe wartości dla linii 4#3 (1,43 mg/ g s.m.), 4#5 (1,22 mg/ g s.m.) i 7#1 (1,09 mg/ g s.m.). Zawartość chlorofilu jest kluczowym parametrem świadczącym o stanie fizjologicznym roślin, a uzyskane dane wskazują, że przeprowadzona transformacja pozytywnie wpłynęła na stan roślin, a zawartość chlorofilu, szczególnie chlorofilu A była znacząco wyższa we wszystkich uzyskanych roślinach.

4.5.4. Oznaczenie zawartości karotenoidów w materiale roślinnym

Karotenoidy stanowią grupę organicznych związków nadających naturalną barwę roślin, należą one do tetraterpenów i wykazują aktywność przeciwutleniającą, zabezpieczając rośliny przed powstającymi podczas fotosyntezy reaktywnymi formami tlenu. Całkowitą zawartość karotenoidów oznaczono w częściach zielonych badanych roślin, wyznaczając jako kontrolę rośliny typu dzikiego. Wykorzystano w tym celu metodę spektrofotometryczną opisaną przez Lichtenthalera (Lichtenthaler, 1987). Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinie 23.

Całkowita zawartość karotenoidów dla roślin typu dzikiego wyniosła 0,57 mg/ g s.m. Dla linii 4#1 i 7#2 odnotowano spadek zawartości badanych związków w porównaniu do roślin kontrolnych o odpowiednio 31,6% (0,39 mg/ g s.m.) i 8,8% (0,52 mg/ g s.m.), w linii 4#1 zmiana ta była istotnie statystyczna. W roślinach z linii 4#2, 4#3, 4#4, 4#5, 7#1 zaobserwowano wzrost zawartości karotenoidów. Dla roślin z linii 4#2 i 4#5 zawartość ta jest 1,2- krotnie większa w porównaniu do roślin niemodyfikowanych, a różnica istotna statystycznie.

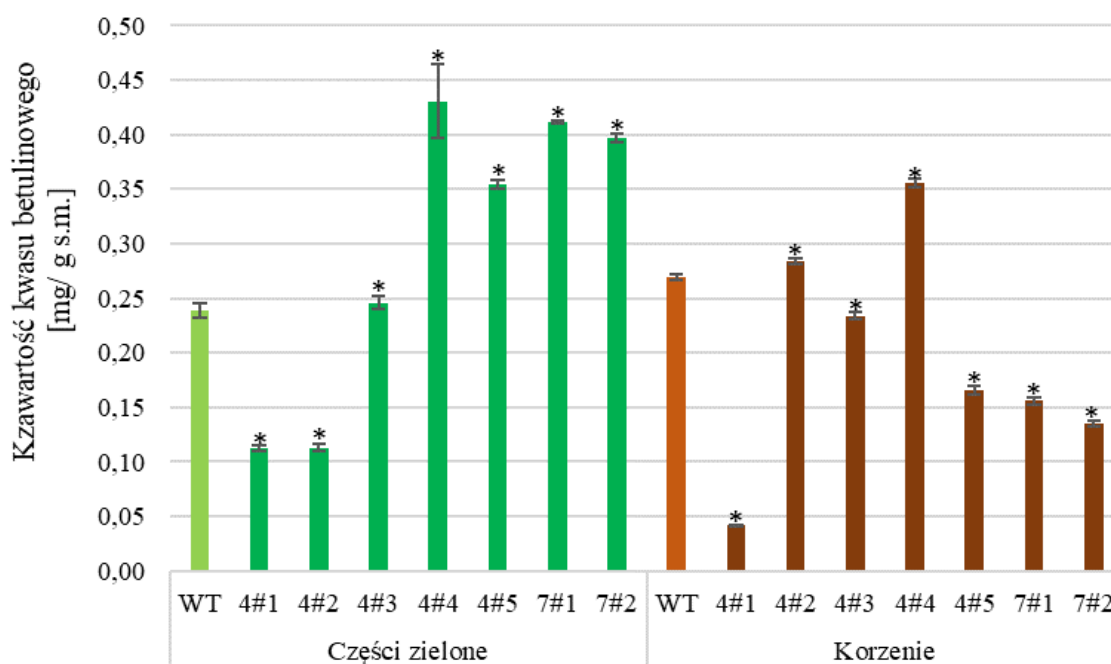


Ryc. 23. Zawartość karotenoidów w badanych ekstraktach. Dane przedstawiono jako wartości średnie ($n=3$) i odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Dla danych istotnych statystycznie zastosowano test Dunnett'a. Na wykresie zaznaczono różnice istotne statystycznie względem grupy kontrolnej (WT) dla $*p < 0,05$.

4.5.5. Oznaczenie zawartości kwasu betulinowego w badanych roślinach

Kwas betulinowy to naturalny związek występujący w tkankach roślin, zwłaszcza drzew, chroniący je przed szkodliwymi czynnikami zewnętrznymi. W opisanym badaniu oznaczono zawartość opisanego związku w ekstraktach z roślin modyfikowanych oraz roślinach typu dzikiego, stanowiących kontrolę. Oznaczenia wykonano w częściach zielonych oraz korzeniach z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC. Wyniki przedstawiono na rycinie 24.

W ekstraktach z pędów roślin kontrolnych odnotowano zawartość kwasu betulinowego na poziomie 0,24 mg/ g s.m. Istotny wzrost jego zawartości odnotowano dla ekstraktów z roślin linii 4#3, 4#4, 4#5, 7#1 i 7#2. Największą zawartość zaobserwowano dla linii 4#4 i 7#1, w których znajdowało się odpowiednio 1,8-krotnie i 7-krotnie więcej badanego związku, w porównaniu do ekstraktów z roślin typu dzikiego. Dla linii 4#3, 4#5 oraz 7#2 wartości te były większe o kolejno 4,2% (0,25 mg/ g s.m.), 45,8% (0,35 mg/ g s.m.) i 66,7% (0,41 mg/ g s.m.). W ekstraktach z roślin linii 4#1 i 4#2 zaobserwowano odwrotną tendencję- ilość kwasu betulinowego spadła o 54,2%. Obserwowane zmiany były istotne statystycznie.



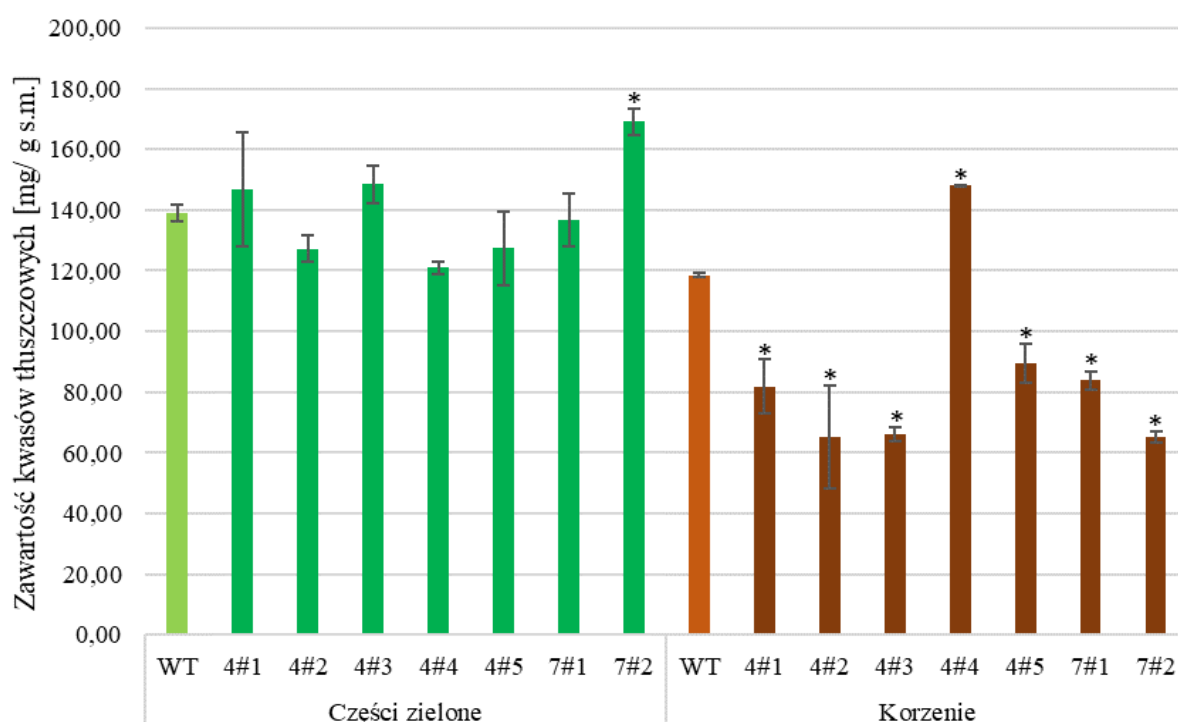
Ryc. 24. Zawartość kwasu betulinowego w badanych ekstraktach. Dane przedstawiono jako wartości średnie (n=3) i odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Dla danych istotnych statystycznie zastosowano test Dunnett'a. Na wykresie zaznaczono różnice istotne statystycznie względem grupy kontrolnej (WT) dla *p< 0,05.

W ekstraktach z korzeni roślin typu dzikiego zawartość kwasu betulinowego wyniosła 0,27 mg/g s.m. Dla ekstraktów z korzeni włósnikowatych nie zaobserwowano podobnej tendencji, jak w przypadku części zielonych. Istotny wzrost zawartości badanego związku odnotowano dla dwóch linii: 4#2 oraz 4#4, a wartości te były wyższe o odpowiednio 3,7% (0,28 mg/ g s.m.) i 33,3% (0,36 mg/ g s.m.) w stosunku do wartości dla roślin kontrolnych. Dla pozostałych ekstraktów z roślin poddanych modyfikacji odnotowano istotny spadek zawartości kwasu betulinowego. Dla ekstraktów z linii 4#1 wskazano mniejszą zawartość badanego związku o 85,2% (0,04 mg/ g s.m.) w porównaniu z wartością odnotowaną dla ekstraktów z korzeni roślin typu dzikiego.

4.5.6. Profil kwasów tłuszczowych badanych roślin

Nienasycone kwasy tłuszczowe występujące w roślinach odgrywają ważne role w ich metabolizmie. Stanowią prekursory wielu związków bioaktywnych i powiązane są z odpowiedzią na stresy biotyczne i abiotyczne. Całkowitą zawartość kwasów tłuszczowych oznaczono dla tkanek zielonych oraz korzeni badanych roślin. Jako grupę kontrolną przyjęto rośliny typu dzikiego. Próbkę analizowano za pomocą chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrią mas GC- MS. Wyniki przedstawiono na rycinie 25.

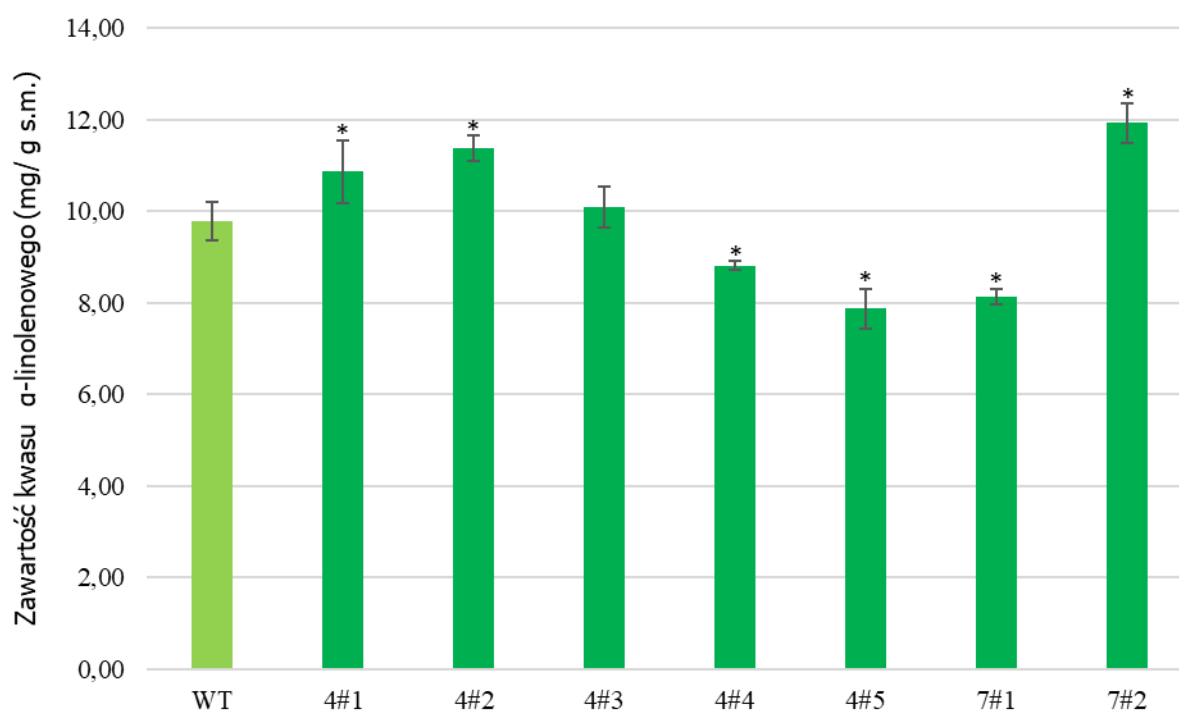
Zaobserwowano, że profil kwasów tłuszczowych pędów roślin modyfikowanych nie różni się znacznie od wartości oznaczonych dla roślin kontrolnych. Największy wzrost zawartości badanych związków odnotowano dla tkanek zielonych roślin z linii 7#2 i stanowił on 121,6% (169,1 mg/ g s.m.) ilości dla kontroli. Wartości niższe o 8,6% (127,2 mg/ g s.m.), 13,0% (121,0 mg/ g s.m.), 8,4% (127,4 mg/ g s.m.) oraz 1,6% (136,9 mg/ g s.m.) wykazano dla roślin z linii odpowiednio 4#2, 4#4, 4#5 i 7#1, nie były jednak to różnice istotne statystycznie.



Ryc. 25. Profil tłuszczowy badanych roślin. Dane przedstawiono jako wartości średnie (n=3) i odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Dla danych istotnych statystycznie zastosowano test Dunnett'a. Na wykresie zaznaczono różnice istotne statystycznie względem grupy kontrolnej (WT) dla *p< 0,05.

W korzeniach roślin kontrolnych zawartość kwasów tłuszczowych określono na poziomie 118,5 mg/ g s.m. Wykazano, że korzenie włośnikowate z linii 4#4 zawierają o 24,9% więcej badanych związków w odniesieniu do korzeni roślin niemodyfikowanych i był to wzrost istotny pod względem statystycznym. Dla pozostałych linii odnotowano 1,4- krotny (linie: 4#1, 4#5, 7#1) i 1,8- krotny (linie: 4#2, 4#3, 7#2) spadek zawartości kwasów tłuszczowych w porównaniu do korzeni typu dzikiego.

Dodatkowo w badanych roślinach oznaczono poziom kwasu alfa-linolenowego (C18:3). W częściach zielonych roślin kontrolnych odnotowano zawartość kwasu α -linolenowego na poziomie 9,78 mg/ g s.m. Istotny wzrost jego zawartości zaobserwowano dla roślin z linii 4#1, 4#2 oraz 7#2 i był on większy o odpowiednio 11,2% (10,86 mg/ g s.m.), 16,3% (11,38 mg/ g s.m.) oraz 21,45% (11,93 mg/ g s.m.) w porównaniu do roślin kontrolnych.

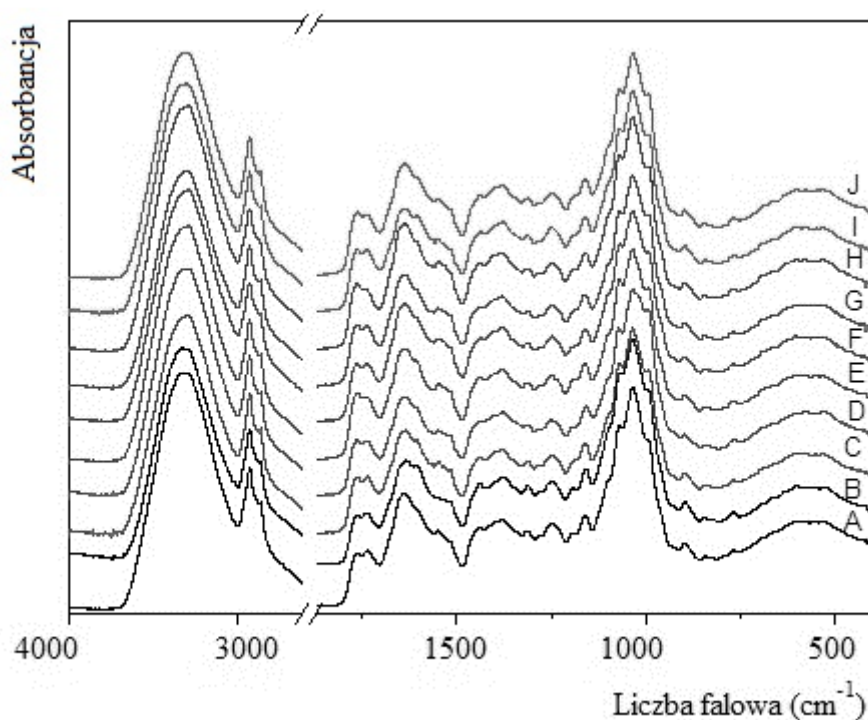


Ryc. 26. Zawartość kwasu α -linolenowego w częściach zielonych badanych roślin. Dane przedstawiono jako wartości średnie (n=3) i odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Dla danych istotnych statystycznie zastosowano test Dunnett'a. Na wykresie zaznaczono różnice istotne statystycznie względem grupy kontrolnej (WT) dla *p< 0,05.

4.5.7. Analiza spektralna FT-IR/ ATR

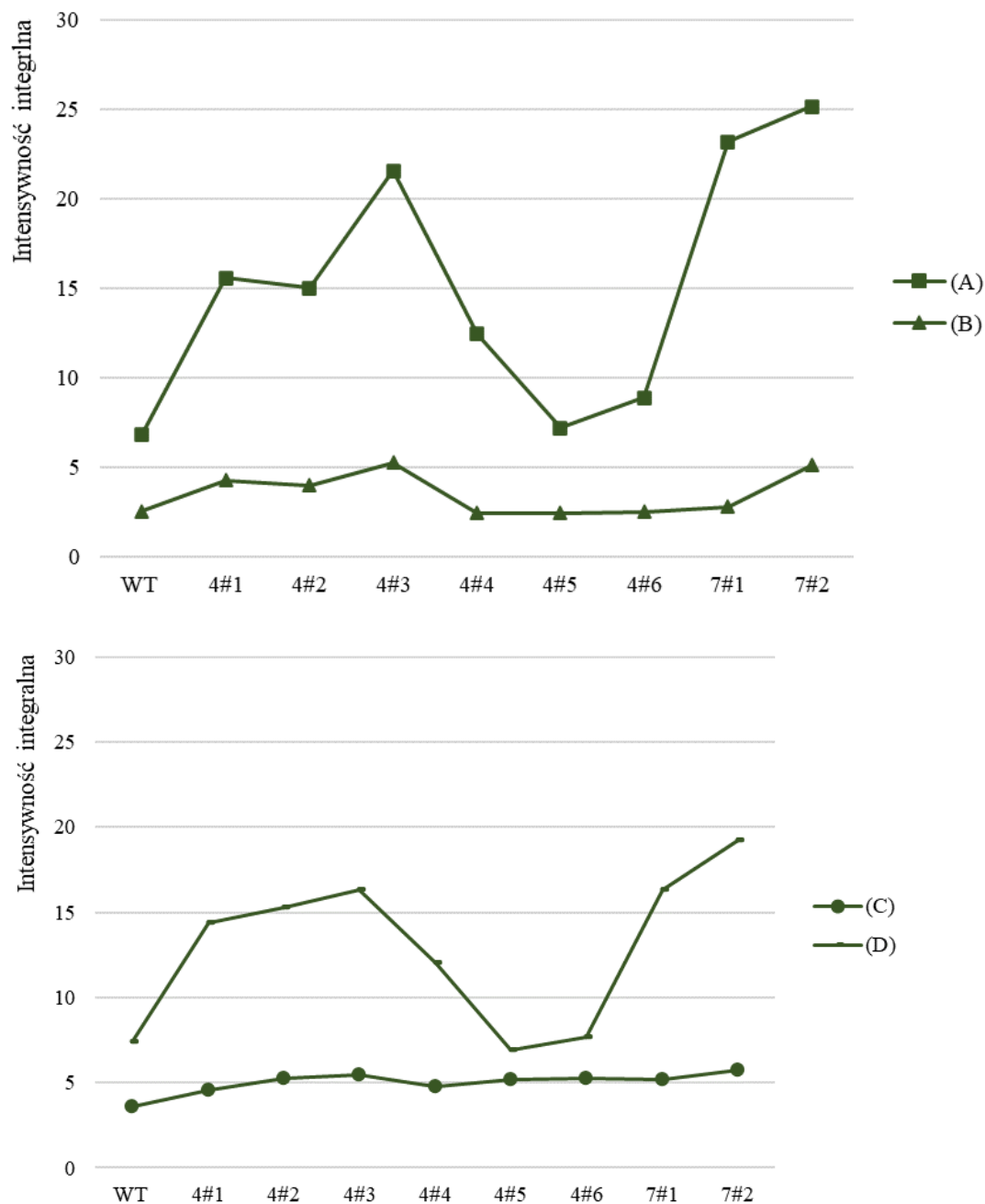
4.5.7.1. Analiza części zielonych roślin

Wyprowadzone linie transgeniczne roślin poddano badaniom strukturalnym FT-IR/ ATR z wykorzystaniem spektroskopii fourierowskiej w podczerwieni. Zmierzone widma IR w zakresie 4000- 400 cm^{-1} części zielonych przedstawiono na rycinie 27. Wyraźnie potwierdzają one obecność głównych składników komórek roślinnych: celulozy, ligniny pektyny.



Ryc. 27. Widma IR badanych roślin: typu dzikiego WT (A) i (B) oraz roślin linii transgenicznych: 4#1 (C), 4#2 (D), 4#3 (E), 4#4 (F), 4#5 (G), 4#6 (H), 7#1 (I), 7#2 (J).

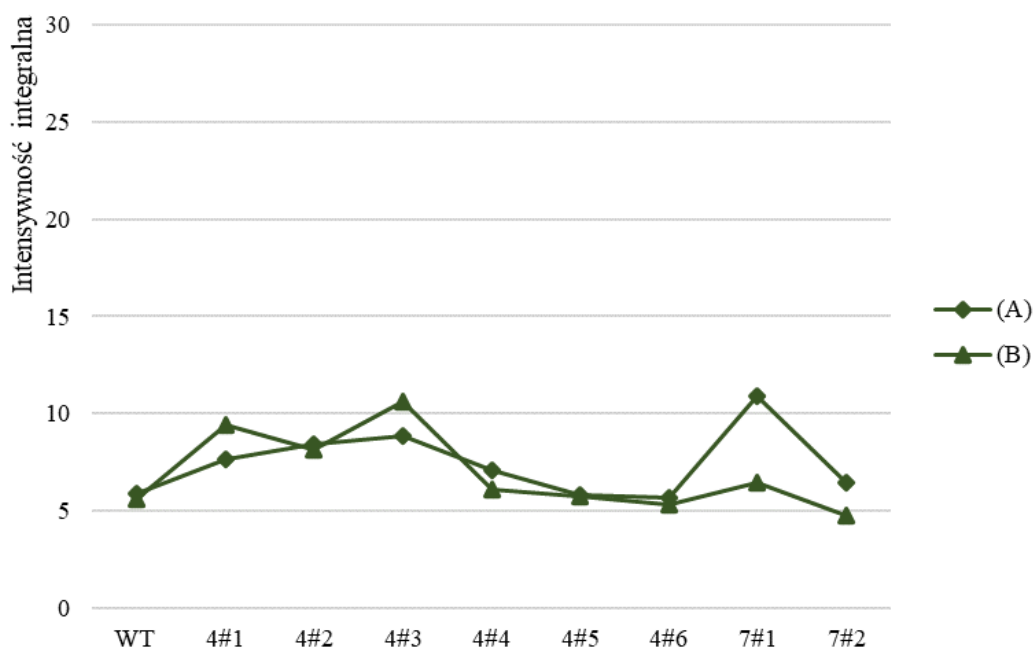
Pasma obserwowane w zakresie 1500- 1300 cm^{-1} odpowiadają drganiom celulozy: $\delta(\text{CH}) + \omega(\text{CH}_2) + \delta(\text{OH}) - 1450 \text{ cm}^{-1}$; $\delta_s(\text{CH}_3, \text{CH}_2) - 1373 \text{ cm}^{-1}$; $\delta(\text{CH}) + \delta(\text{OH}) - 1311 \text{ cm}^{-1}$. Pasma przy 1160 cm^{-1} pochodzą od drgań $\nu(\text{COC})$ łańcuchów celulozy, zaś pasmo przy około 1228 cm^{-1} odpowiada drganiom zginającym w płaszczyźnie wiązania wodorowego w celulozie $\delta(\text{OH} \cdots \text{O})$. Stosunki intensywności integralnych charakterystycznych dla celulozy wskazują na wzrost jej zawartości w roślinach z linii 7#2, w porównaniu do wszystkich badanych roślin (Ryc. 28).



Ryc. 28. Różnice w intensywności integralnych pasm przy (A) 1450 cm⁻¹, (B) 1311 cm⁻¹, (C) 1160 cm⁻¹ oraz (D) 1228 cm⁻¹ dla części zielonych badanych roślin: WT i linii transgenicznnych 4#1, 4#2, 4#3, 4#4, 4#5, 4#6, 7#1, 7#2.

W celu uzyskania informacji na temat zawartości lignin w badanych próbach, porównano kontury widm z zakresu 1550-1200 cm⁻¹. Pasma przy 1343 cm⁻¹ i 1255 cm⁻¹ (Ryc. 29) pochodzą z drgań składników ligniny (Dymińska i wsp., 2014). Stosunki ich intensywności integralnych po wystandaryzowaniu do intensywności integralnej pasma przy 2923 cm⁻¹

pokazały, że rośliny z linii 4#1, 4#2 oraz 4#3 zawierały więcej lignin w odniesieniu do roślin niemodyfikowanych.



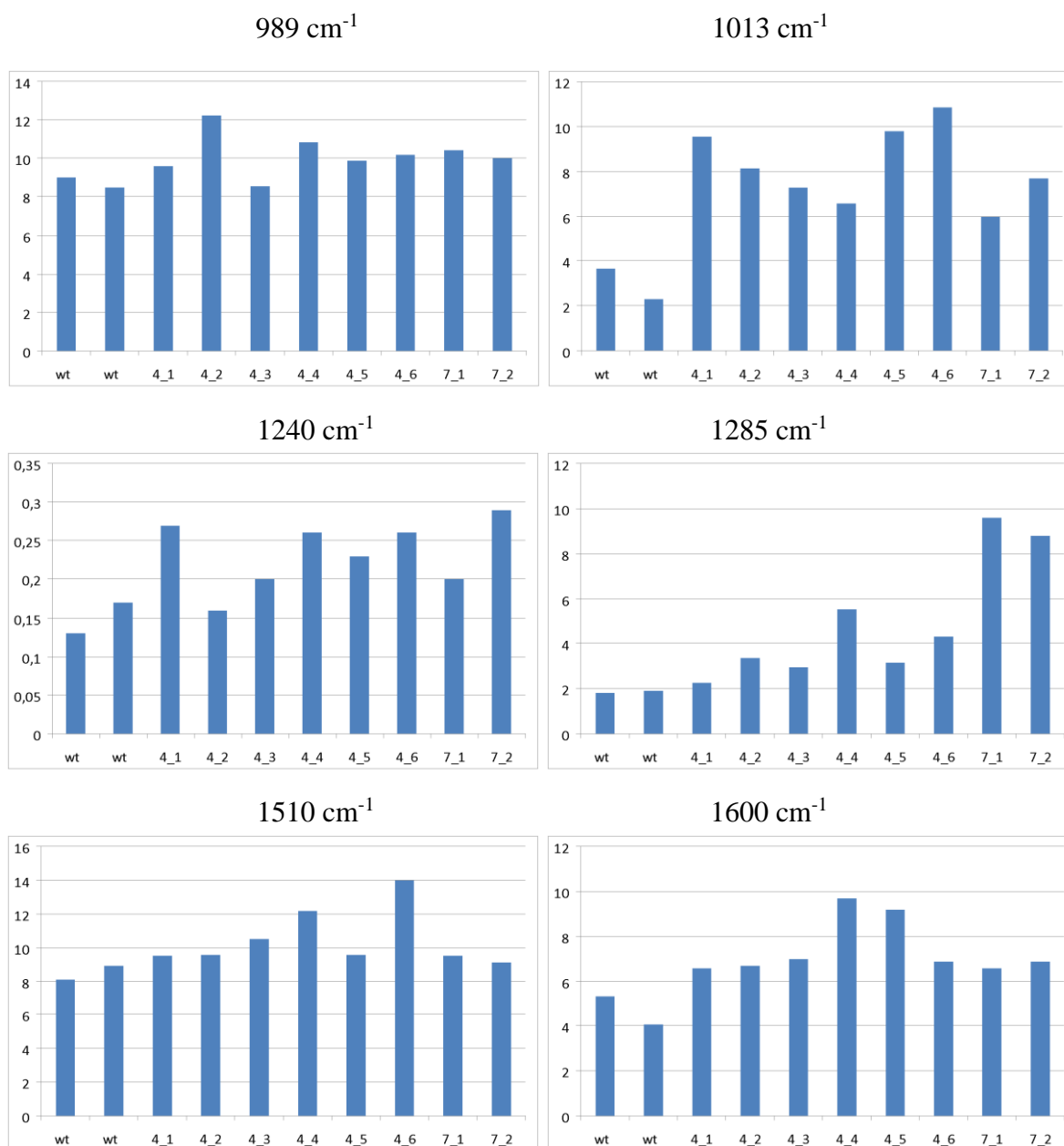
Ryc. 29. Różnice w intensywności integralnych pasm przy (A) 1343 cm⁻¹ oraz (B) 1255 cm⁻¹ dla części zielonych badanych roślin: WT i linii transgenicznych 4#1, 4#2, 4#3, 4#4, 4#5, 4#6, 7#1, 7#2.

Zmierzone widma FT-IR potwierdzają obecność pochodnych triterpenowych, takich jak kwas betulinowy oraz kwas ursolowy ze względu na obecność w nich typowych pasm w widmach tych związków. Najbardziej charakterystyczne pasma należy przypisać do: 986, 1015, 1027 cm⁻¹ δ(φ), 1214, 1240 cm⁻¹ δ(C_φ-H), 1686, 1730 ν(C=O) (Melo i wsp., 2014; Dehelean i wsp., 2007). Przyporządkowanie przeprowadzono poprzez porównanie uzyskanych wyników z danymi literaturowymi.

Uzyskane widma zawierają także silne pasma charakterystyczne dla pochodnych flawanoli: kwercytiny i mirecytiny (Hanuza i wsp., 2017), które przypisać można do: 986, 1092 cm⁻¹ δ(φ), 1140, 1160 cm⁻¹ δ(φ) + δ(CH) + δ(OH), 1198, 1207 cm⁻¹ δ(φ) + δ(C-O), 1295 cm⁻¹ ν(C-O) + ν(φ) + δ(CH), 1309 1345, 1510 cm⁻¹ ν(φ) + δ(OH), 1600 cm⁻¹ ν(φ) + ν(C=O).

Przy wartościach: 1660 cm⁻¹ - ν(C=O), 1600 cm⁻¹ - ν(C=C), 1283 cm⁻¹ - ν(C-O) zaobserwowano pasma charakterystyczne dla pochodnych naftochinonu: ramentaceon oraz plumbagina (Burle i wsp., 1995).

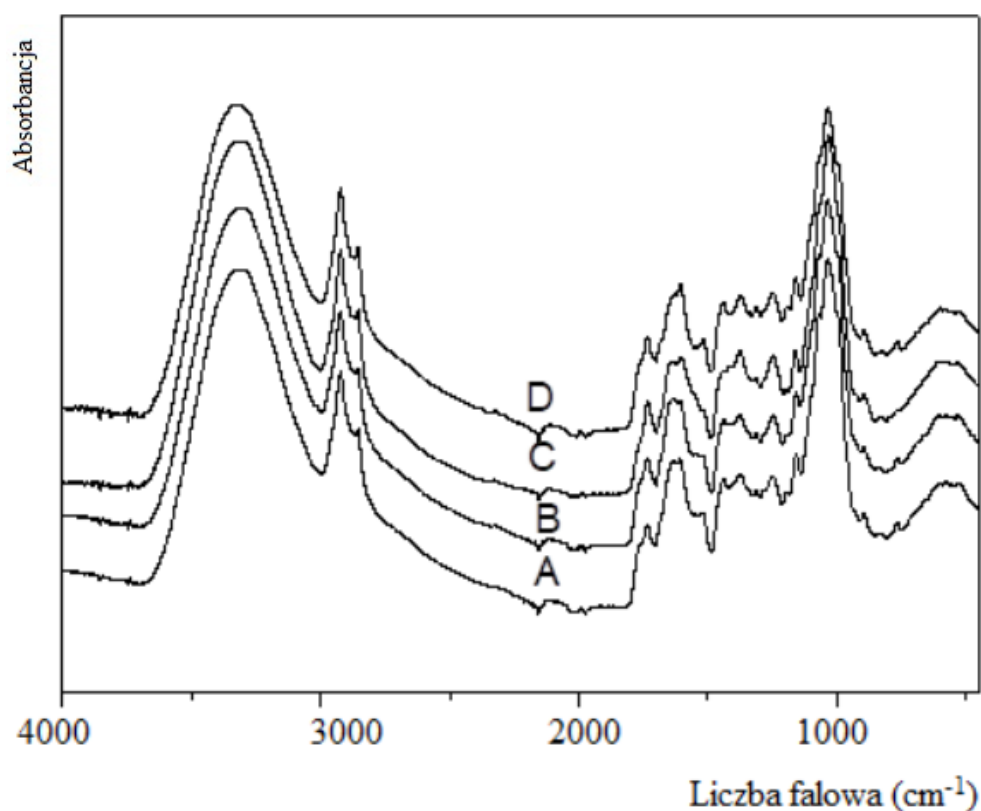
Szerokie kontury widm poddano dekonwolucji na składowe Lorentza, a liczba składowych pasm została określona na podstawie najlepszego dopasowania pomiędzy teoretycznym i eksperymentalnym konturem pasma. Porównano intensywności integralne pasm z uzyskanych dekonwolucji konturów i zauważono, że część składowych ma wyższe intensywności integralne dla roślin z linii 4#1, 4#2, 4#3, 4#4, 4#5, 4#6, 7#1, 7#2 w porównaniu do roślin niemodyfikowanych (wt) (Ryc. 30.).



Ryc. 30. Różnice w intensywności integralnej pasm przy 989 cm⁻¹, 1013 cm⁻¹, 1240 cm⁻¹, 1285 cm⁻¹, 1510 cm⁻¹, 1600 cm⁻¹ dla części zielonych badanych roślin: WT i linii transgenicznych 4#1, 4#2, 4#3, 4#4, 4#5, 4#6, 7#1, 7#2.

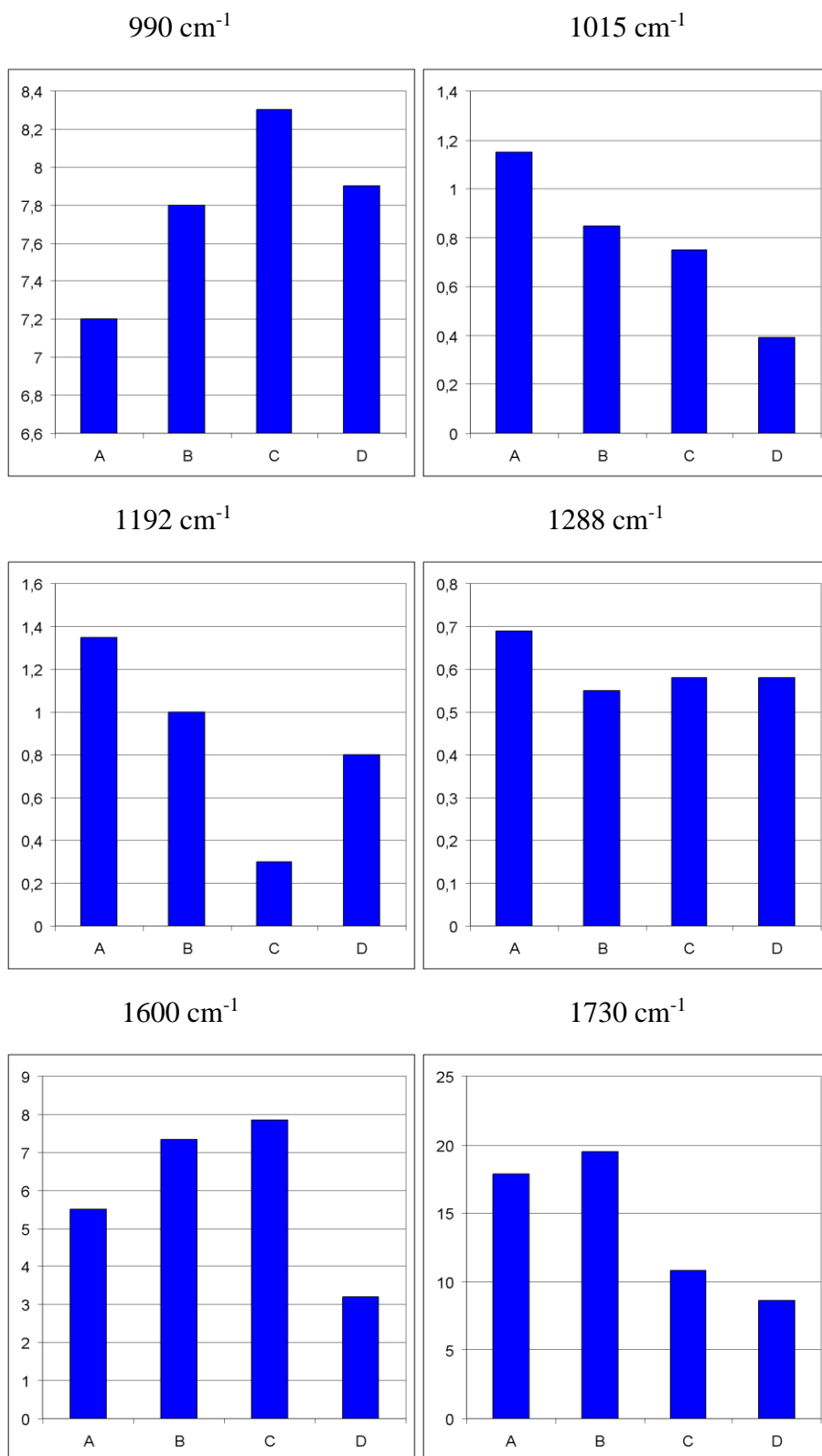
Jak przedstawia Popescu i wsp. (2006) kontur widmowy zakresu widma IR 1600-1800 cm^{-1} pozwala zidentyfikować w badanych próbach zawartość pektyn. Wystandardyzowane intensywności integralne pasm charakterystycznych dla pektyn (1600 cm^{-1} , 1730 cm^{-1}) przyjmują wyraźnie większe wartości we wszystkich roślinach z linii transgenicznych w odniesieniu do roślin niepoddanych modyfikacji.

Badaniom strukturalnym poddano także części zielone roślin pochodzących z podłoży o różnej wartości pH. Ich widma IR przedstawiono na rycinie 31.



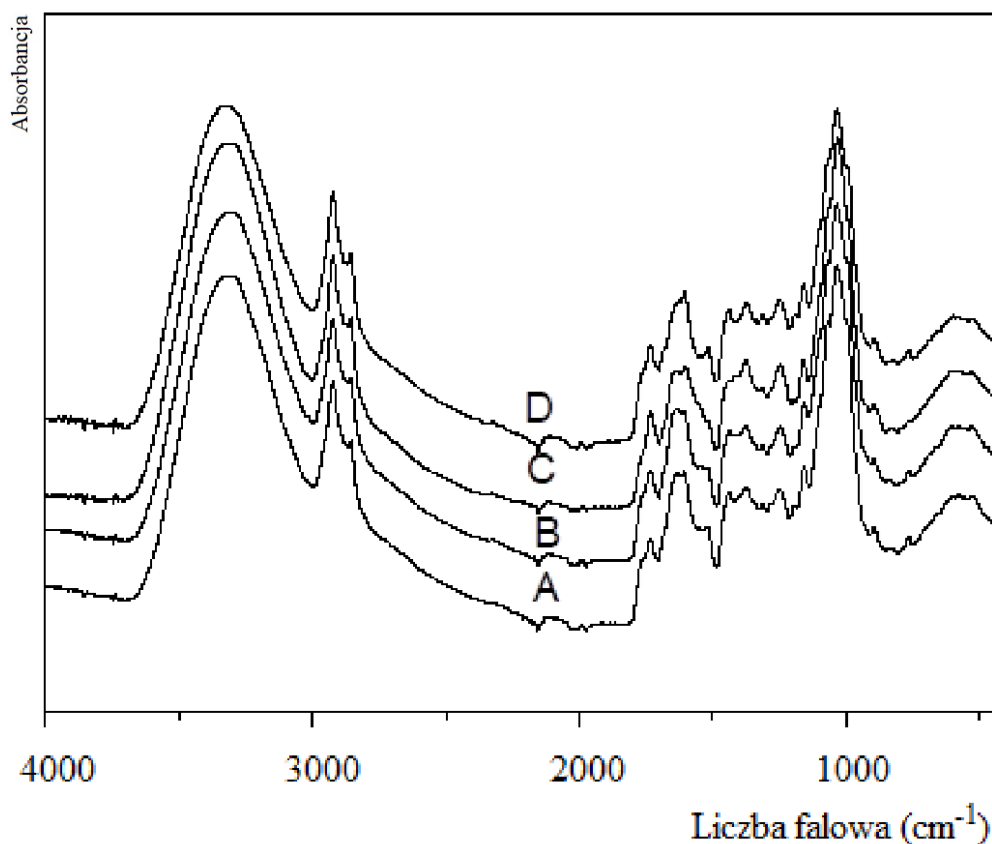
Ryc. 31. Widma IR roślin hodowanych w różnych wariantach pH podłoża: (A) pH=3,6, (B): pH=4,6, (C) pH= 5,6, (D) pH=6,6.

Na podstawie uzyskanych wyników, zaobserwowano w częściach zielonych badanych roślin wyższe wartości zawartości pochodnych triterpenowych dla najniższego pH podłoża (rys. 4.10.). Podobną tendencję zaobserwowano w przypadku ilości pektyn, których wartość spada w najwyższym pH podłoża, a najwyższe ilości prezentuje w pH=4,6 (Ryc. 32).



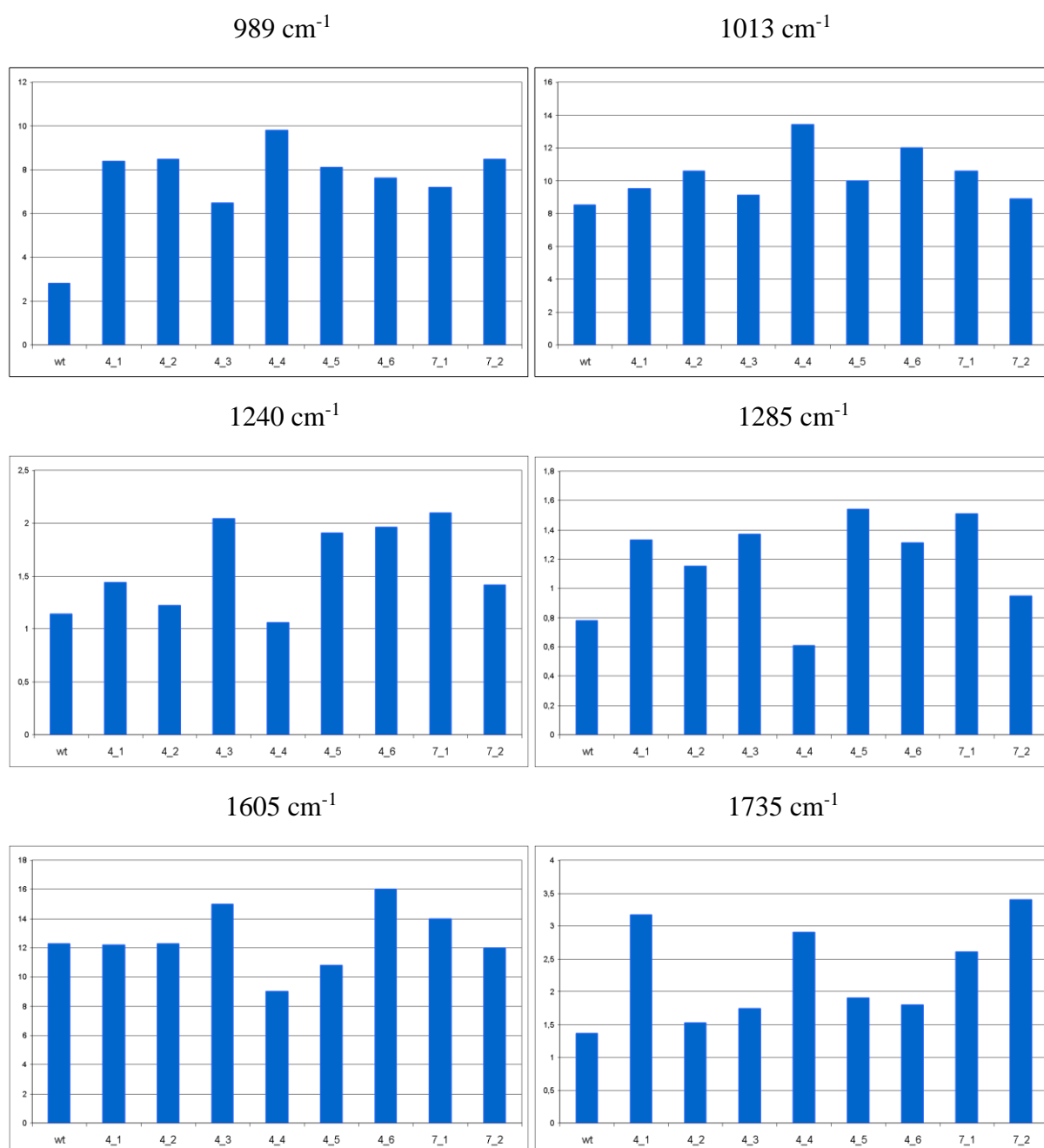
Ryc. 32. Różnice w intensywności integralności pasm przy 990 cm⁻¹, 1015 cm⁻¹, 1192 cm⁻¹, 1288 cm⁻¹, 1600 cm⁻¹, 1730 cm⁻¹ dla roślin hodowanych w różnych wariantach pH podłoża: (A) pH=3,6, (B): pH=4,6, (C) pH= 5,6, (D) pH=6,6.

4.5.7.2. Analiza korzeni transformowanych



Ryc. 33. Widma IR korzeni roślin hodowanych w różnych wariantach pH podłoża: (A) pH=3,6, (B): pH=4,6, (C) pH= 5,6, (D) pH=6,6.

W celu uzyskania informacji na temat grup związków zawartych w korzeniach roślin niemodyfikowanych oraz korzeniach włósnikowatych roślin z linii transgenicznych, porównano ich kontury widmowe z odpowiednich zakresów. Stosunki intensywności integralnych wystandaryzowane do intensywności integralnej pasma 2923 cm⁻¹ pokazały, że korzenie włósnikowate przyjmują wyraźnie wyższe wartości dla pochodnych triterpenowych. Podobny trend zaobserwowano w przypadku pochodnych flawanoli oraz pektyn, a wyjątek stanowiły korzenie roślin z linii 4#4, dla których wartości te były niższe w stosunku do korzeni WT.

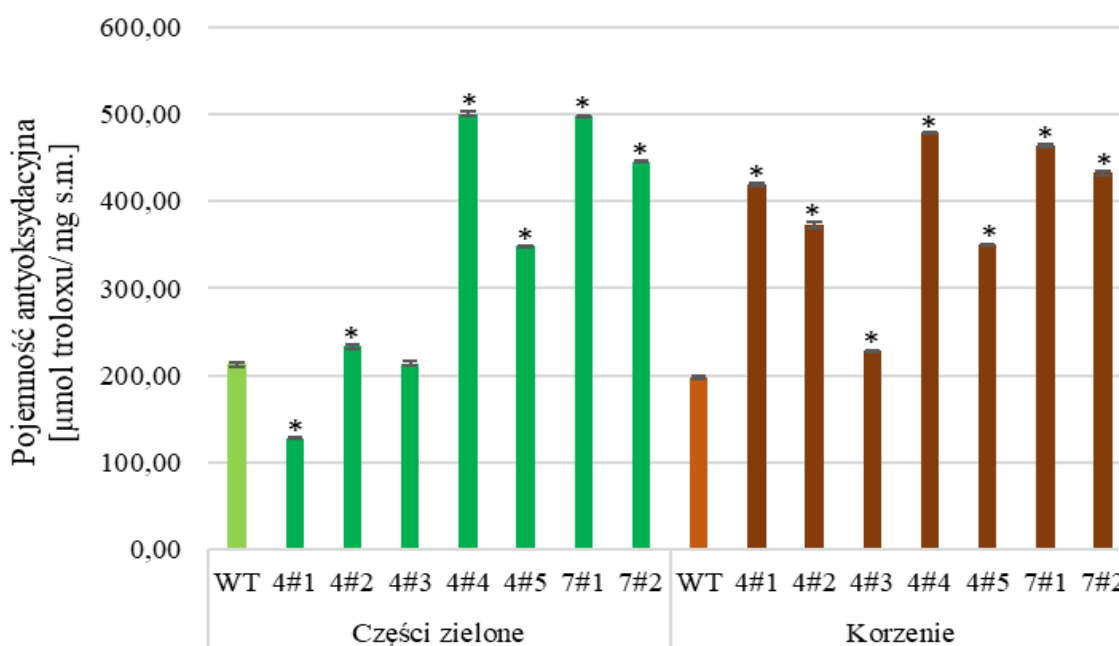


Ryc. 34. Różnice w intensywności integralnej pasm przy 989 cm⁻¹, 1013 cm⁻¹, 1240 cm⁻¹, 1285 cm⁻¹, 1510 cm⁻¹, 1600 cm⁻¹ dla części zielonych badanych roślin: WT i linii transgenicznych 4#1, 4#2, 4#3, 4#4, 4#5, 4#6, 7#1, 7#2.

4.6. Oznaczenie pojemności antyoksydacyjnej materiału roślinnego

Obecność w roślinach związków przeciwutleniających chroni je przed szkodliwymi uszkodzeniami wolnorodnikowymi spowodowanymi czynnikami środowiskowymi. W badanych liniach roślin oznaczono pojemność antyoksydacyjną dla części zielonych oraz

korzeni. Próbę kontrolną stanowiły rośliny nie poddane modyfikacji. W tym celu wykorzystano metodę ORAC opartą na pomiarze sygnału fluorescencji sondy molekularnej, który spada w obecności generatora wolnych rodników (Ninfali i wsp., 2005). Wartości wyrażono jako ekwiwalent troloxu na miligram suchej masy. Wyniki przedstawiono na rycinie 35.



Ryc. 35. Pojemność antyoksydacyjna badanych ekstraktów. Dane przedstawiono jako wartości średnie ($n=3$) i odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Dla danych istotnych statystycznie zastosowano test Dunnett'a. Na wykresie zaznaczono różnice istotne statystycznie względem grupy kontrolnej (WT) dla $*p < 0,05$.

W częściach zielonych roślin typu dzikiego odnotowano wartość pojemności antyoksydacyjnej na poziomie 212,46 $\mu\text{mol troloxu/mg s.m.}$ W porównaniu do tej ilości, zaobserwowano wzrost badanego parametru dla pięciu linii roślin modyfikowanych, z których cztery różniły się istotnie statystycznie od szczepu dzikiego. Dla linii 4#4 oraz 7#1 wartości te były 2,5-krotnie większe w odniesieniu do kontroli. U linii 4#2, 4#5 i 7#2 pojemność antyoksydacyjna wzrosła o odpowiednio 9,6% (213,45 $\mu\text{mol troloxu/g s.m.}$), 63,8% (348,12 $\mu\text{mol troloxu/g s.m.}$) i 109,7% (445,56 $\mu\text{mol troloxu/g s.m.}$) w porównaniu do części zielonych roślin typu dzikiego. Czterdziestoprocentowe obniżenie wartości przeciwutleniających wskazano dla roślin z linii 4#1.

Wartość pojemności antyoksydacyjnej dla korzeni roślin niemodyfikowanych odnotowano na poziomie 197,49 μmol troloxu/ g s.m. W odniesieniu do niej, wykazano istotny wzrost badanego parametru dla korzeni włósnikowatych wszystkich linii. Największy przyrost zaobserwowano dla linii 4#4, 7#1 oraz 7#2, co stanowiło odpowiednio 242,4%, 234,5% i 218,8% wartości wyjściowej dla kontroli.

4.7. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe ekstraktów z *Sarracenia purpurea* L.

Zbadano rośliny z siedmiu linii transgeniczných oraz rośliny typu dzikiego, poddając analizie części zielone oraz korzenie. Analiza miała na celu ocenę działania przeciwdrobnoustrojowego uzyskanych z nich ekstraktów na bakterie wywołujące zatrucia pokarmowe oraz zakażenia ogólnoustrojowe u ludzi i zwierząt. Wykorzystano metodę testu dyfuzyjno-krążkowego opisaną przez Mostafa i wsp. (2017). Zmierzono strefy zahamowania wzrostu badanych szczepów, a wyniki przedstawiono w tabeli 16 i tabeli 17.

Dla badanych części zielonych roślin w pierwszej dobie inkubacji odnotowano zahamowanie wzrostu bakterii z gatunku *Escherichia coli* oraz *Salmonella typhi* przez ekstrakty z roślin typu dzikiego (tabela 16). Po 24 godzinach hodowli wzrost *Staphylococcus aureus* zahamował tylko ekstrakt z roślin z linii 4#4. Strefy przejaśnień dla *Pseudomonas aeruginosa* zaobserwowano w przypadku ekstraktów z roślin linii 4#4, 7#1 i 7#2. W hodowlach bakterii z gatunku *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* i *Salmonella typhi* największe strefy zahamowania wzrostu odnotowano dla roślin z linii 4#4, 7#1 i 7#2.

Po 48 godzinach inkubacji hodowli bakterii i ekstraktów z części zielonych badanych roślin odnotowano zwiększenie obecnych w pierwszej dobie stref zahamowania wzrostu. Dla bakterii z gatunku *Pseudomonas aeruginosa* ponownie nie zaobserwowano powstawania stref przejaśnień wokół krążków nasączonych ekstraktami z roślin linii 4#1, 4#2, 4#3 oraz 4#5. W hodowli *Salmonella typhi* zmierzono strefy dla ekstraktów z wszystkich linii roślin, z wyjątkiem linii 4#5. Dla wszystkich badanych szczepów największe zahamowanie wzrostu odnotowano dla roślin z linii 4#4, 7#1 i 7#2. Rośliny kontrolne wykazały aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec *Bacillus cereus* i *Staphylococcus aureus*.

Powiększenie stref zahamowania wzrostu badanych szczepów bakterii dla wszystkich odczytów było nieznaczne po 72-godzinnej inkubacji. Nie odnotowano powstania żadnych nowych stref przejaśnień

Tabela 16. Test aktywności przeciwdrobnoustrojowych ekstraktów z części zielonych badanych roślin wobec chorobotwórczych szczepów bakterii. Wartości przedstawione w tabeli odpowiadają wartościom średnim i odchyleniom standardowym serii doświadczeń

Czas inkubacji (h)	Próba	Strefy zahamowania wzrostu (mm)				
		Bakterie Gram- dodatnie		Bakterie Gram- ujemne		
		<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
24	Wild type	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000	6,44 ± 0,163	6,14 ± 0,070	0,00 ± 0,000
	4#1	8,25 ± 0,177	0,00 ± 0,000	7,84 ± 0,549	7,52 ± 0,340	0,00 ± 0,000
	4#2	8,30 ± 0,258	0,00 ± 0,000	8,71 ± 0,246	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000
	4#3	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000	8,61 ± 0,265	7,70 ± 0,181	0,00 ± 0,000
	4#4	8,53 ± 0,199	7,27 ± 0,358	8,28 ± 0,222	8,18 ± 0,380	9,59 ± 0,127
	4#5	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000	8,40 ± 0,193	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000
	7#1	9,23 ± 0,282	0,00 ± 0,000	9,65 ± 0,155	7,65 ± 0,086	9,19 ± 0,744
	7#2	9,01 ± 0,295	0,00 ± 0,000	9,46 ± 0,107	7,48 ± 0,272	9,00 ± 0,530
	Cefotaksym (5mg)	20,63 ± 1,390	10,78 ± 0,407	0,00 ± 0,000	28,14 ± 2,073	13,78 ± 0,243
48	Wild type	7,12 ± 0,259	7,18 ± 0,202	6,87 ± 0,045	6,86 ± 0,131	0,00 ± 0,000
	4#1	9,28 ± 0,218	9,84 ± 0,247	9,64 ± 0,500	8,82 ± 0,207	0,00 ± 0,000
	4#2	8,78 ± 0,296	8,32 ± 0,265	9,44 ± 0,591	8,52 ± 0,358	0,00 ± 0,000
	4#3	8,38 ± 0,312	8,74 ± 0,236	9,54 ± 0,359	9,11 ± 0,455	0,00 ± 0,000
	4#4	9,43 ± 0,360	12,13 ± 0,874	9,48 ± 0,421	9,08 ± 0,696	10,24 ± 0,093
	4#5	9,65 ± 0,535	0,00 ± 0,000	8,48 ± 0,550	8,41 ± 0,310	0,00 ± 0,000

	Próba	Strefy zahamowania wzrostu (mm)				
		Bakterie Gram- dodatnie		Bakterie Gram- dodatnie		
		<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	7#1	10,34 ± 0,742	11,63 ± 0,806	10,34 ± 0,320	9,37 ± 0,478	10,80 ± 0,129
	7#2	9,33 ± 0,168	11,04 ± 0,391	10,08 ± 0,226	8,49 ± 0,288	10,43 ± 0,229
	Cefotaksym (5mg)	21,53 ± 0,500	16,31 ± 0,627	0,00 ± 0,000	31,76 ± 1,249	16,79 ± 0,299
72	Wild type	7,17 ± 0,247	7,19 ± 0,208	6,93 ± 0,027	6,90 ± 0,137	0,00 ± 0,000
	4#1	9,30 ± 0,203	9,88 ± 0,225	9,65 ± 0,505	8,83 ± 0,207	0,00 ± 0,000
	4#2	8,81 ± 0,310	8,34 ± 0,270	9,46 ± 0,591	8,52 ± 0,367	0,00 ± 0,000
	4#3	8,40 ± 0,327	8,76 ± 0,248	9,55 ± 0,350	9,12 ± 0,440	0,00 ± 0,000
	4#4	9,46 ± 0,345	12,14 ± 0,880	9,48 ± 0,390	9,11 ± 0,677	10,29 ± 0,119
	4#5	9,51 ± 0,526	0,00 ± 0,000	8,82 ± 0,564	8,40 ± 0,305	0,00 ± 0,000
	7#1	10,36 ± 0,759	11,64 ± 0,811	10,37 ± 0,294	9,38 ± 0,474	10,82 ± 0,119
	7#2	9,37 ± 0,156	11,08 ± 0,421	10,13 ± 0,204	8,50 ± 0,292	10,44 ± 0,227
	Cefotaksym (5mg)	21,57 ± 0,522	16,71 ± 0,590	0,00 ± 0,000	30,96 ± 2,512	17,49 ± 0,474

Badaniu poddano także korzenie uzyskanych roślin (tabela 17). Po 24-godzinnej inkubacji największe strefy zahamowania wzrostu odnotowano we wszystkich badanych szczepach bakterii poddanych działaniu ekstraktów z roślin linii 4#4, 7#1 i 7#2. Korzenie roślin kontrolnych wykazały właściwości przeciwdrobnoustrojowe jedynie wobec bakterii z gatunku *Escherichia coli* i *Salmonella typhi*.

Po 48 godzinach hodowli odnotowano powiększenie stref zahamowania wzrostu dla wykonanych w pierwszej dobie inkubacji odczytów. Zaobserwowano powstanie nowych stref przejaśnień wokół krążków nasączonych ekstraktami z roślin linii 4#1, 4#3 i 4#4 w hodowli *Salmonella typhi* oraz dla ekstraktów z roślin kontrolnych w hodowli *Bacillus cereus* i *Staphylococcus aureus*. Ponownie odnotowano największe rozmiary stref przejaśnień w hodowlach badanych bakterii powstałych pod wpływem działania ekstraktów z roślin linii 4#4, 7#1 i 7#2.

Po 72-godzinnej inkubacji nie odnotowano powstania nowych stref zahamowania wzrostu wokół krążków nasączonych ekstraktami z korzeni badanych roślin. Zmierzone we wcześniejszym odczycie strefy powiększyły się nieznacznie w porównaniu do różnic między odczytami po 24 i 48 godzinach inkubacji.

Zaobserwowano, że powstałe strefy zahamowania wzrostu badanych szczepów bakterii w testach aktywności były większe dla ekstraktów z korzeni uzyskanych roślin w porównaniu do ekstraktów z części zielonych analizowanych roślin *Sarracenia purpurea* L.

Tabela 17. Test aktywności przeciwdrobnoustrojowych ekstraktów z korzeni badanych roślin wobec chorobotwórczych szczepów bakterii.

Wartości przedstawione w tabeli odpowiadają wartościom średnim i odchyleniom standardowym serii doświadczeń

Czas inkubacji (h)	Roślina	Strefy zahamowania wzrostu (mm)				
		Bakterie Gram- dodatnie		Bakterie Gram- ujemne		
		<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
24	Wild type	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000	7,69 ± 0,248	6,47 ± 0,217	0,00 ± 0,000
	4#1	8,95 ± 0,296	1,48 ± 0,129	8,75 ± 0,622	8,02 ± 0,295	0,00 ± 0,000
	4#2	7,48 ± 0,187	0,00 ± 0,000	9,01 ± 0,231	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000
	4#3	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000	8,93 ± 0,247	8,17 ± 0,216	0,00 ± 0,000
	4#4	9,85 ± 0,257	9,25 ± 0,214	9,12 ± 0,148	8,71 ± 0,145	10,63 ± 0,236
	4#5	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000	8,90 ± 0,243	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000
	7#1	11,36 ± 0,349	0,00 ± 0,000	9,91 ± 0,414	7,84 ± 0,136	10,06 ± 0,524
	7#2	9,01 ± 0,295	0,00 ± 0,000	9,78 ± 0,205	7,71 ± 0,248	9,95 ± 0,413
	Cefotaksym (5mg)	21,02 ± 1,482	11,07 ± 0,342	0,00 ± 0,000	29,01 ± 0,987	14,18 ± 0,745
48	Wild type	6,95 ± 0,323	7,24 ± 0,320	7,95 ± 0,277	6,66 ± 0,231	0,00 ± 0,000
	4#1	9,64 ± 0,327	14,27 ± 0,926	9,74 ± 0,421	8,51 ± 0,341	0,00 ± 0,000
	4#2	7,95 ± 0,415	9,12 ± 0,148	10,32 ± 0,618	6,35 ± 0,218	0,00 ± 0,000
	4#3	9,15 ± 0,147	9,24 ± 0,236	10,03 ± 0,256	8,84 ± 0,328	0,00 ± 0,000
	4#4	10,14 ± 0,241	10,84 ± 0,512	10,15 ± 0,532	9,15 ± 0,617	11,56 ± 0,125
	4#5	8,47 ± 0,714	0,00 ± 0,000	8,81 ± 0,556	8,17 ± 0,124	0,00 ± 0,000

	Próba	Strefy zahamowania wzrostu (mm)				
		Bakterie Gram- dodatnie		Bakterie Gram- ujemne		
		<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	7#1	12,04 ± 0,478	13,79 ± 0,715	11,08 ± 0,126	9,42 ± 0,326	10,65 ± 0,263
	7#2	9,54 ± 0,471	13,14 ± 0,458	11,21 ± 0,456	9,10 ± 0,305	10,34 ± 0,359
	Cefotaksym (5mg)	22,13 ± 0,384	17,12 ± 0,541	0,00 ± 0,000	30,24 ± 0,841	15,39 ± 0,347
72	Wild type	7,03 ± 0,347	7,25 ± 0,334	7,99 ± 0,241	6,75 ± 0,237	11,61 ± 0,266
	4#1	9,78 ± 0,195	14,34 ± 0,765	9,77 ± 0,257	8,57 ± 0,245	0,00 ± 0,000
	4#2	8,45 ± 0,141	9,14 ± 0,165	10,37 ± 0,346	6,45 ± 0,254	0,00 ± 0,000
	4#3	9,47 ± 0,428	9,29 ± 0,471	10,07 ± 0,431	8,87 ± 0,248	0,00 ± 0,000
	4#4	11,42 ± 0,536	10,88 ± 0,251	10,19 ± 0,412	9,18 ± 0,522	0,00 ± 0,000
	4#5	8,63 ± 0,450	0,00 ± 0,000	8,82 ± 0,254	8,33 ± 0,298	0,00 ± 0,000
	7#1	12,76 ± 0,542	13,81 ± 0,125	11,18 ± 0,358	9,48 ± 0,228	10,68 ± 0,235
	7#2	11,67 ± 0,413	13,28 ± 0,248	11,24 ± 0,545	9,23 ± 0,541	10,43 ± 0,235
	Cefotaksym (5mg)	22,22 ± 0,147	17,23 ± 0,314	0,00 ± 0,000	30,27 ± 0,997	15,71 ± 0,872

4.8. Analizy dotyczące wyselekcjonowanych linii roślin *Sarracenia purpurea* L. o najlepszych właściwościach

Na podstawie wykonanych oznaczeń związanych z oceną składu biochemicznego oraz potencjału antyoksydacyjnego badanych roślin *Sarracenia purpurea* L. oraz ich właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi wytypowano linie 4#4 i 7#1 jako posiadające najlepsze parametry. Rośliny z tych linii poddano opisanym niżej analizom.

4.8.1. Oznaczenie zawartości aminokwasów w badanych roślinach

Oznaczenia zawartości 18 aminokwasów zostały wykonane dla dwóch wybranych roślin z linii modyfikowanych 4#4 i 7#1, dla których potwierdzono obecność genu *rolB* w genomie korzeni oraz dla rośliny kontrolnej (wild type). Analizy przeprowadzono dla części zielonych, a także korzeni. Analizy wykonano metodami chromatografii jonowymiennej oraz kolorymetryczną.

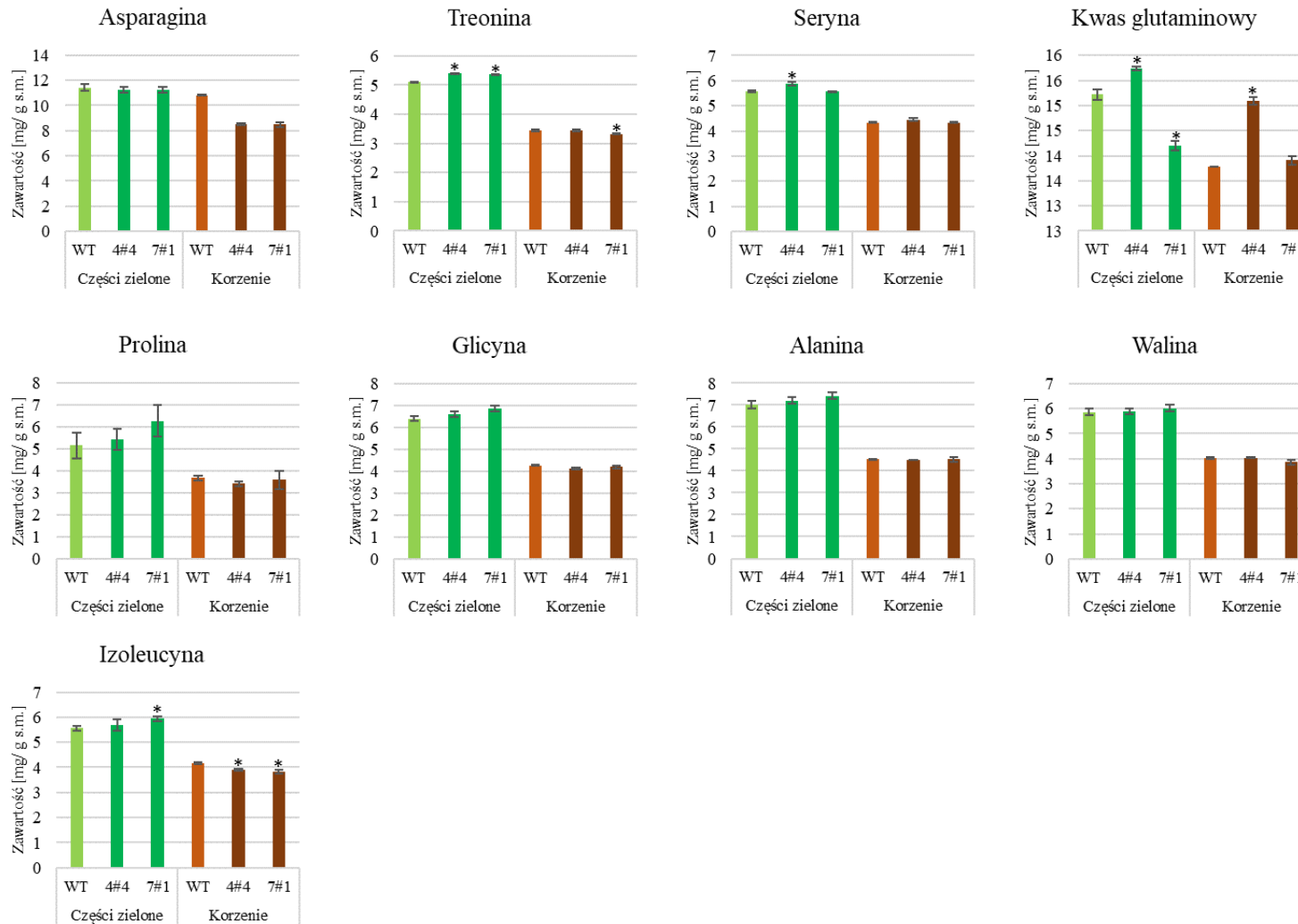
W częściach zielonych zawartość aminokwasów była mniejsza dla roślin z linii 4#4 i 7#1 o odpowiednio 1,2% i 5,7% w porównaniu do roślin kontrolnych. W linii 4#4 największe różnice odnotowano dla metioniny oraz cysteiny, których było odpowiednio o 56,8% i 34,37% mniej niż w kontroli i zmiany te były istotne statystycznie. Dla tej samej linii zaobserwowano także istotne statystycznie zwiększenie ilości fenyloalaniny, której było o 8,2% więcej niż w roślinach typu dzikiego. Istotny statystycznie wzrost odnotowano również dla kwasu glutaminowego, który jest kluczowym metabolitem w przemianach aminokwasów u roślin, stanowi również cząsteczkę sygnałową w procesach wzrostu i rozwoju roślin i bierze udział w odpowiedzi roślin na warunki stresowe (Wróbel-Kwiatkowska i wsp., 2022). Dla linii 7#1 zaobserwowano jeszcze większy spadek zawartości metioniny w porównaniu z linią 4#4- wartość ta była o 61,2% mniejsza względem kontroli i była ona istotna statystycznie, podobnie dla cysteiny, dla której obserwowano istotną statystycznie redukcję zawartości w porównaniu do roślin WT. W przeciwieństwie do linii 4#4, linia 7#1 charakteryzowała się natomiast istotną redukcją w zawartości kwasu glutaminowego, o 9,84 %. Obie linie charakteryzowały się nieznacznym wzrostem zawartości proliny, która jest ważnym osmoprotektantem i odpowiada za adaptację roślin do stresów.

Odmienne profile aminokwasów oznaczono w korzeniach wyselekcjonowanych i badanych linii roślin. Stwierdzono zmniejszenie całkowitej zawartości aminokwasów w roślinach z linii 4#4 i 7#1 o odpowiednio 5,3% i 8,3% w porównaniu do roślin niepoddanych

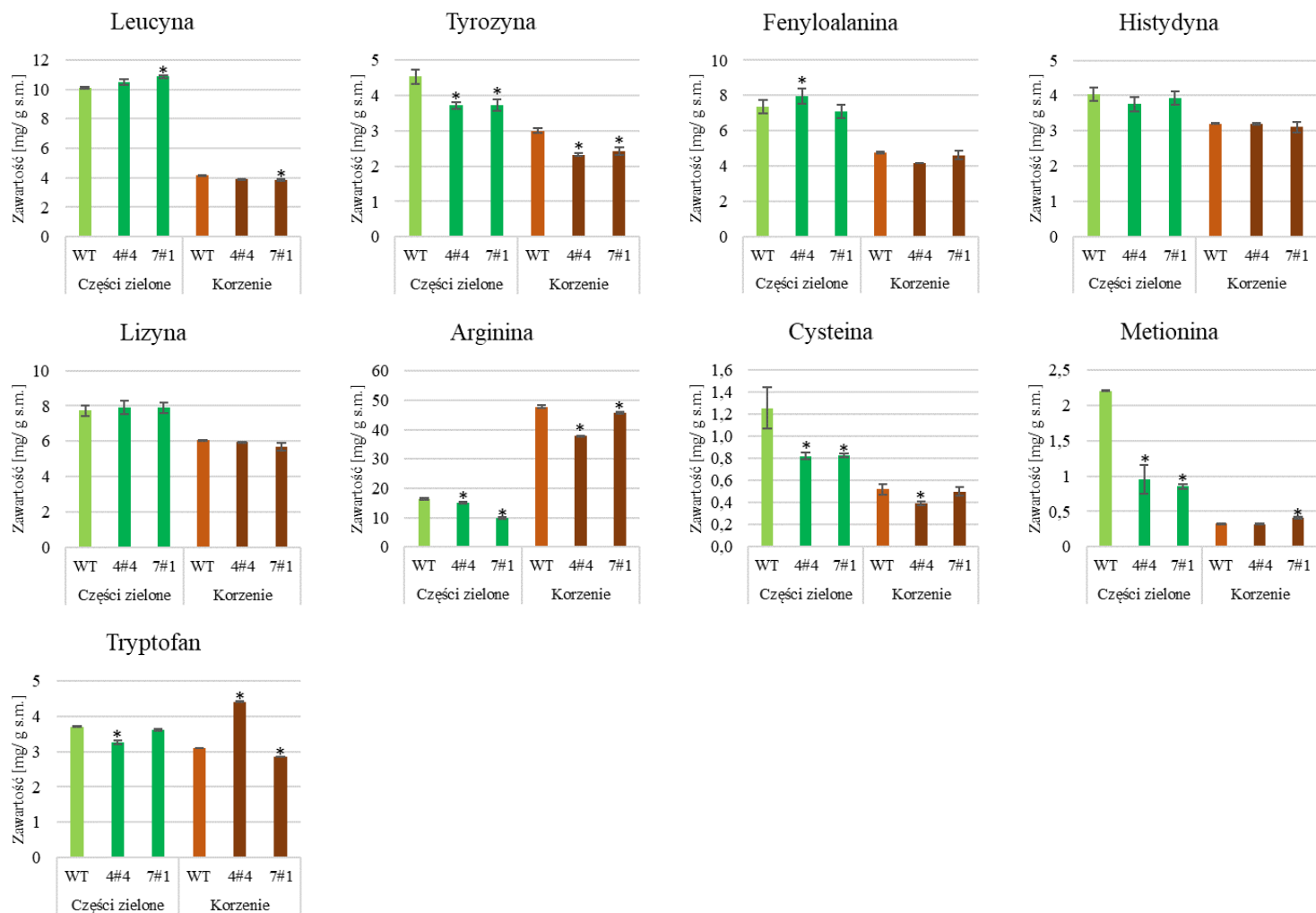
modyfikacji. Obniżenie zawartości 12 z 18 badanych aminokwasów w porównaniu do kontroli odnotowano dla korzeni roślin obu linii modyfikowanych, zaś wzrost jedynie dla kwasu glutaminowego. Treonina, walina oraz tryptofan to aminokwasy, których było więcej w tkankach roślin 4#4 w odniesieniu do WT, natomiast mniej w korzeniach roślin 7#1. Odwrotną tendencję odnotowano w przypadku metioniny. Największe różnice dla roślin z linii 4#4 odnotowano dla cysteiny, której było mniej o 24,1%. Wyraźny spadek zawartości odnotowano również dla tyrozyny (mniej o 22,9%) oraz argininy (mniej o 20,9%). Zaobserwowano znaczny wzrost zawartości tryptofanu, którego było więcej o 42,2% w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Zwiększenie ilości odnotowano także dla seryny, kwasu glutaminowego i waliny. W korzeniach roślin z linii 7#1 największą różnicę w spadku zawartości odnotowano dla kwasu asparaginowego oraz tyrozyny, których było mniej o odpowiednio 21,2% i 19,3%. Wzrost ilości zaobserwowano dla kwasu glutaminowego (więcej o 0,9%) i metioniny (więcej o 26,8%).

Tabela 18. Zawartość procentowa poszczególnych aminokwasów w roślinach poddanych modyfikacji w porównaniu do rośliny kontrolnej. Kolorem zielonym oznaczono wartości wyższe od WT, kolorem czerwonym wartości niższe od WT. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Dla danych istotnych statystycznie zastosowano test Dunnett'a. W tabeli zaznaczono różnice istotne statystycznie względem grupy kontrolnej (WT) dla *p< 0,05. Analizę wykonano osobno dla części zielonych i osobno dla korzeni.

Aminokwas	Części zielone		Korzenie	
	4#4	7#1	4#4	7#1
ASP	98,5	98,4	78,9*	78,5*
THR	105,7*	104,6*	100,0	96,5*
SER	105,5*	99,6	102,7	100,0
GLU	103,5*	93,3*	109,4*	100,9
PRO	105,2	121,7*	93,2	97,7
GLY	103,2	107,1	96,6	98,2
ALA	102,6	105,8	99,1	99,7
VAL	100,2	102,4	100,5	96,0
ILE	102,4	106,9*	93,6*	91,7*
LEU	104,0	107,5*	97,9	95,5*
TYR	82,0*	82,4*	77,1*	80,7*
PHE	108,2*	96,5	87,4*	97,2
HIS	93,0	97,5	99,4	96,8
LYS	102,3	101,9	98,2	93,8
ARG	92,4*	59,9*	79,1*	95,5*
CYS	65,3*	65,7*	75,9*	96,2
MET	43,2*	38,8*	98,1	126,8*
TRP	88,1*	97,7	142,2*	92,0*



Ryc. 36. Zawartość aminokwasów w badanych ekstraktach. Dane przedstawiono jako wartości średnie (n=3) i odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Dla danych istotnych statystycznie zastosowano test Dunnett'a. Na wykresie zaznaczono różnice istotne statystycznie względem grupy kontrolnej (WT) dla *p < 0,05.



Ryc. 37. Zawartość aminokwasów w badanych ekstraktach. Dane przedstawiono jako wartości średnie (n=3) i odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Dla danych istotnych statystycznie zastosowano test Dunnett'a. Na wykresie zaznaczono różnice istotne statystycznie względem grupy kontrolnej (WT) dla *p< 0,05.

4.8.2. Oznaczenie zawartości związków fenolowych w roślinach *Sarracenia purpurea* L.

Wśród głównych związków fenolowych występujących w roślinach *Sarracenia purpurea* L. wyróżnia się mirycetynę i procyjanidyny. W wybranych liniach roślin *Sarracenia purpurea* L. scharakteryzowano ilościową zawartość związków flawonoidowych oraz kwasów fenolowych, przeprowadzając analizę ekstraktów z części zielonych oraz korzeni badanych roślin. Badanie przeprowadzono za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 19.

W korzeniach i pędach badanych roślin odnotowano wzrost zawartości wszystkich oznaczonych dzięki HPLC metabolitów (z wyjątkiem kwasu gallusowego występującego w korzeniach roślin z linii 4#4), co wskazuje na pozytywny efekt przeprowadzonej transformacji. W porównaniu do roślin kontrolnych największy wzrost odnotowano dla: 7-O-glikozydu luteoliny w pędach i korzeniach roślin z linii 4#4 i 7#1; kwasu chlorogenowego w korzeniach roślin linii 4#4 i 7#1; procyjanidyny B4 w korzeniach roślin z linii 4#4 i 7#1 oraz procyjanidyny B4 w pędach i korzeniach obu linii roślin poddanych agroinfekcji. Najmniejszy wzrost, w porównaniu do roślin typu dzikiego, zaobserwowano dla kwasu elagowego i kaempferolu, zawartych w roślinach kompozytowych. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że agroinfekcja pozytywnie wpłynęła na zwiększenie syntezy związków bioaktywnych: flawonoidów i kwasów fenolowych, zarówno w modyfikowanych korzeniach, jak i częściach zielonych uzyskanych roślin *Sarracenia purpurea* L.

Tabela 19. Zawartość zidentyfikowanych w badanych ekstraktach związków (mg g⁻¹ s.m.). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie (n=3) i odchylenia standardowe serii pomiarów

Związek	Grupa związków	Ekstrakty					
		Części zielone WT	Korzenie WT	Części zielone 4#4	Korzenie 4#4	Części zielone 7#1	Korzenie 7#1
7-O-glikozyd luteoliny	Związki flawonoidowe	0,073±0,008	0,054±0,009	0,825±0,097	0,412±0,063	0,647±0,007	0,398±0,087
Epigallokatechnia	Związki flawonoidowe	0,298±0,085	0,417±0,004	0,364±0,074	0,611±0,086	0,624±0,141	0,780±0,041
Kaempferol	Związki flawonoidowe	0,007±0,001	0,010±0,003	0,041±0,002	0,043±0,004	0,038±0,004	0,047±0,012
Katechina	Związki flawonoidowe	0,020±0,001	0,016±0,004	0,087±0,024	0,063±0,009	0,077±0,017	0,051±0,012
Kwas chlorogenowy	Kwasy fenolowe	0,031±0,013	0,114±0,021	0,314±0,078	0,785±0,106	0,264±0,064	0,842±0,102
Kwas elagowy	Kwasy fenolowe	0,035±0,011	0,054±0,005	0,064±0,014	0,092±0,024	0,076±0,017	0,083±0,011
Mirycetyna	Związki flawonoidowe	0,015 0,002	0,011 0,003	0,155±0,034	0,053±0,009	0,171±0,036	0,074 0,008
Procyjanidyna B1	Związki flawonoidowe	0,222±0,011	0,284±0,056	0,347±0,093	0,759±0,101	0,311±0,041	0,561±0,082
Procyjanidyna B4	Związki flawonoidowe	0,026±0,005	0,023±0,008	0,619±0,071	0,514±0,101	0,524±0,079	0,487±0,067
Trihydrat rutyny	Związki flawonoidowe	0,006±0,001	0,006±0,002	0,074±0,012	0,061±0,003	0,046±0,007	0,053±0,010
Kwas galusowy	Kwasy fenolowe	0,296±0,064	0,113±0,023	0,345±0,042	0,203±0,071	0,417±0,026	0,301±0,083

4.8.3. Oznaczenie cytotoksyczności

W celu oceny potencjału farmakologicznego ekstraktów z uzyskanych roślin zbadano ich cytotoksyczność *in vitro* wobec dwóch ludzkich linii komórkowych: prawidłowych fibroblastów skóry ludzkiej, keratynocytów ludzkich, a także linii epitelialnych komórek jajnika chomika chińskiego. Komórki inkubowano z badanymi ekstraktami przez 72 godziny, a wyniki wyrażono za pomocą testu MTT, opierającego się na wykryciu enzymów oksydoredukcyjnych w mitochondriach żywych komórek. Wyniki wyrażono jako procent żywotności badanych komórek, a oceny cytotoksyczności dokonano na podstawie skali opisanej w normie ISO 10993-5: 2009 (ISO, 2009). Określa ona spadek żywotności komórek poniżej 40% jako silną toksyczność. Przedział 40-60% żywotności komórek ujęty został jako toksyczność umiarkowana, 60-80% toksyczność słaba, zaś powyżej 80% jako niewykazujący toksyczności wobec komórek.

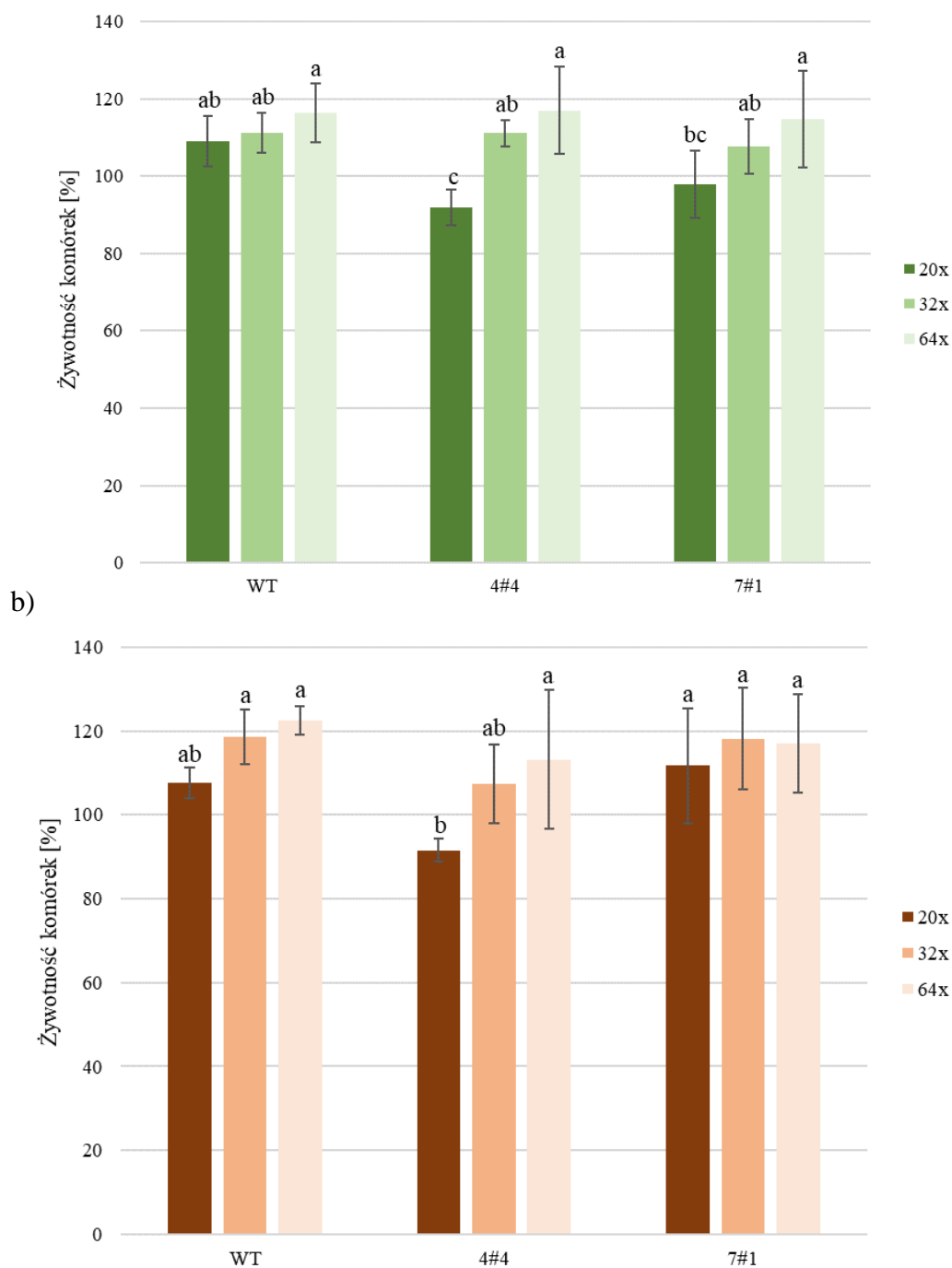
Badania dotyczące żywotności komórek keratynocytów ludzkich przedstawiono na rycinie 38. Przygotowano 3 warianty rozcieńczeń dla każdego badanego ekstraktu etanolowego. Po poddaniu komórek działaniu ekstraktów ich żywotność nie spadła poniżej 90% dla wszystkich rozcieńczeń i próbek. Dla 20-krotnego rozcieńczenia najwyższy poziom żywotności komórek zaobserwowano przy zastosowaniu ekstraktów z WT, zaś najniższy przy zastosowaniu ekstraktów z 4#4, a różnica pomiędzy nimi wyniosła 17,2%. Wartości dla 32-krotnego rozcieńczenia przy zastosowaniu ekstraktów przekroczyły 100% żywotności komórek i nie różniły się między sobą w sposób istotny, tworząc wspólną grupę jednorodną. Dla wyników z 64-krotnego rozcieńczenia również nie odnotowano istotnych różnic. Jak przedstawiono w załączniku 8, wraz ze wzrostem rozcieńczenia nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi liniami. W najmniejszym zastosowanym rozcieńczeniu ekstrakty z WT różniły się istotnie od ekstraktów z pozostałych linii.

Komórki keratynocytów ludzkich poddano również działaniu ekstraktów etanolowych z korzeni badanych roślin. Dla 20-krotnego rozcieńczenia nie odnotowano spadku żywotności komórek poniżej 90% dla wszystkich testowanych linii roślin. Największy wynik zaobserwowano dla linii 7#1 i był on większy o 20,1% od wartości najmniejszej przypisanej dla linii 4#4. W przypadku 32-krotnego rozcieńczenia procent żywotności komórek przy zastosowaniu ekstraktów z linii 4#4 różniły się istotnie od pozostałych linii, jednak wszystkie wyniki przekroczyły 100% żywotności komórek. Wartości odnotowano dla 64-krotnego

rozcieńczenia nie różniły się statystycznie, stanowiąc wspólną grupę jednorodną. Dla testowanych linii roślin wraz ze wzrostem rozcieńczenia zastosowanych ekstraktów zaobserwowano brak istotnych różnic w żywotności badanych komórek.

Na podstawie przedstawionych wyników nie odnotowano cytotoksycznego wpływu testowanych ekstraktów roślinnych na komórki keratynocytów ludzkich. Wzrost żywotności komórek określono jako proporcjonalny do obniżenia stężenia zastosowanych ekstraktów ze wszystkich badanych linii roślin.

a)



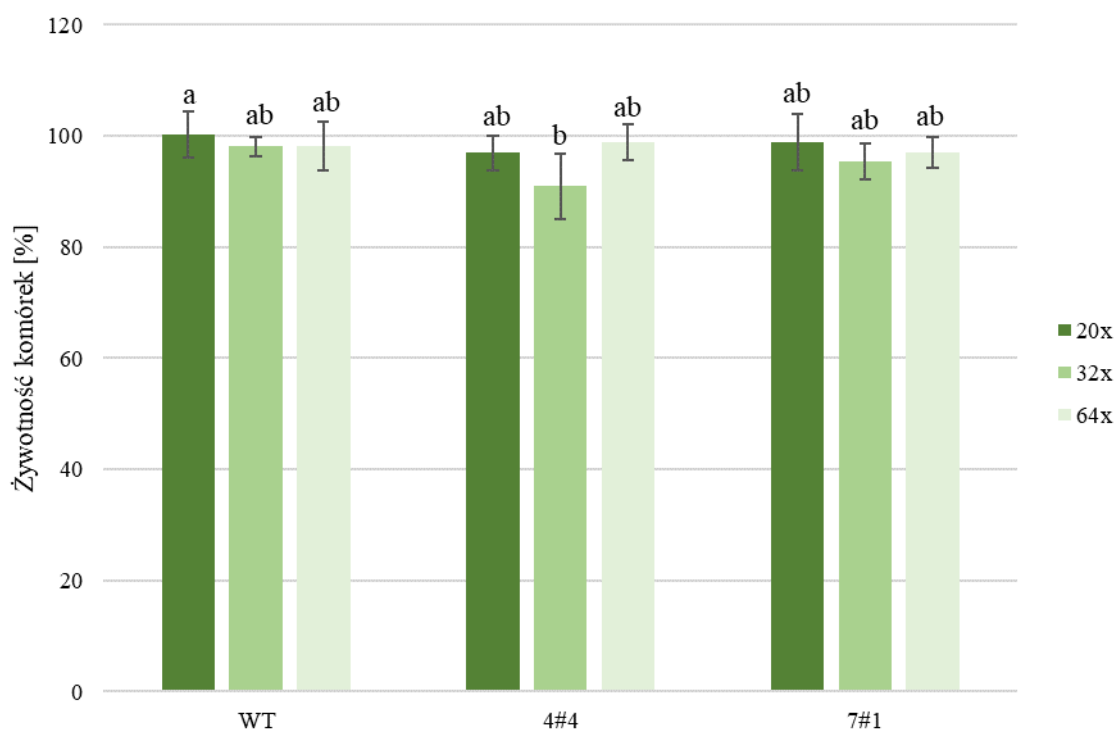
Ryc. 38. Żywotność komórek linii HaCaT poddanych działaniu ekstraktów etanolowych z badanych roślin: (a) części zielone, (b) korzenie. Ekstrakty badano w rozcieńczeniach 20-, 32- i 64-krotnym. Przedstawiono wartości średnie (n=3) oraz odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o dwuczynnikową analizę wariancji. Grupy jednorodne wyznaczono testem NIR i opisano jako a-c.

Ocenę cytotoksyczności ekstraktów etanolowych badanych roślin w 3 rozcieńczeniach przeprowadzono także testując linię komórkową epitelialnych komórek jajnika chomika chińskiego (Ryc. 39). Przy zastosowaniu ekstraktów z części zielonych istotne różnice w każdym z zastosowanych faktorów rozcieńczenia odnotowano dla linii 4#4. Najwyższą wartość dla 20-krotnego rozcieńczenia odnotowano przy zastosowaniu ekstraktów z roślin kontrolnych WT (100,3%), natomiast nie wykazano różnic istotnych statystycznie pomiędzy ekstraktami z roślin linii 4#4 i 7#1. Wartości uzyskane dla 32-krotnego rozcieńczenia w przypadku wszystkich badanych linii odnotowano na poziomie przekraczającym 90%. Żywotność komórek dla linii 7#1 i WT stanowiła grupę jednorodną. Dla 64-krotnego rozcieńczenia wszystkie uzyskane wartości przekroczyły 95% żywotności komórek i nie odnotowano dla nich istotnych statystycznie różnic.

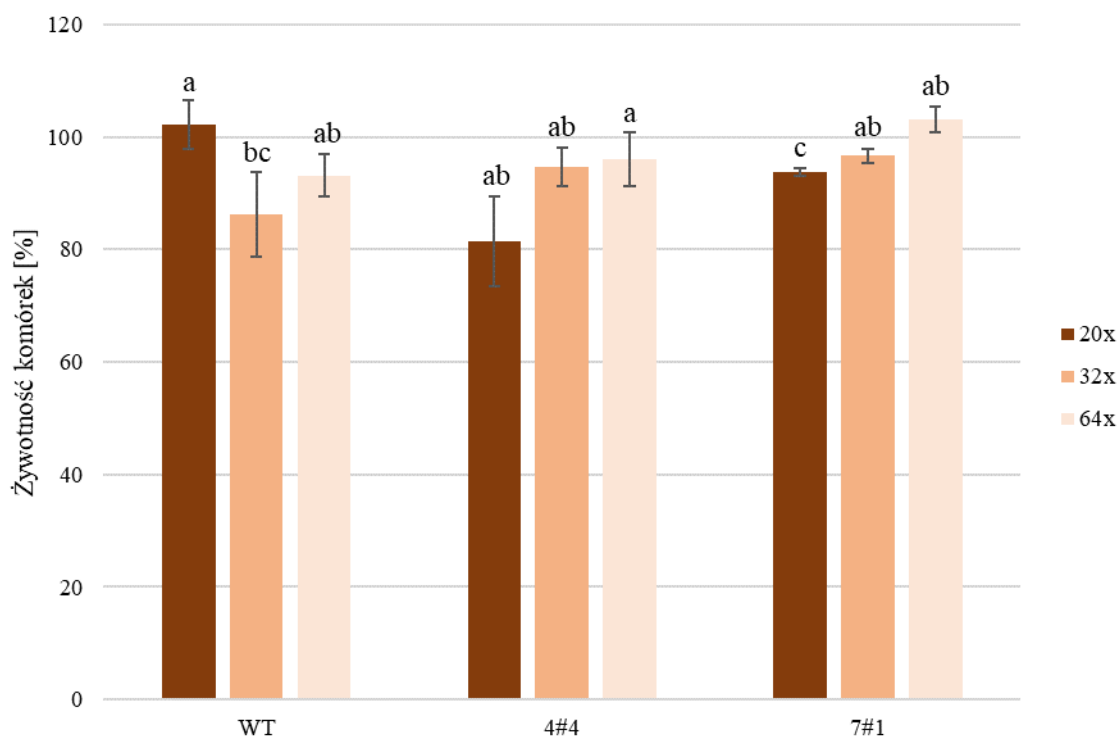
Badaniu poddano także ekstrakty etanolowe z korzeni analizowanych roślin. Największą wartość żywotności komórek uzyskano przy zastosowaniu ekstraktów z roślin kontrolnych (102,1%), zaś najmniejszą przy zastosowaniu ekstraktów z roślin linii 4#4 (81,4%), a różnica wyniosła 20,7%. Przy zastosowaniu 32-krotnego rozcieńczenia ekstraktów najmniejszą wartość odnotowano dla WT (86,2%), największą zaś dla linii 7#1 (96,6%), a każdy wariant stanowił odrębną statystycznie grupę. Żywotność komórek wszystkich analizowanych linii przekroczyła 90% przy zastosowaniu 64-krotnego rozcieńczenia ekstraktów. W każdym wariantcie rozcieńczenia różnice odnotowano dla ekstraktów z roślin linii 4#4 (załącznik 13).

Zgodnie z normą ISO 10993-5: 2009 ustalono brak cytotoksyczności badanych ekstraktów etanolowych w stosunku do epitelialnych komórek jajnika chomika chińskiego.

a)



b)



Ryc. 39. Żywotność komórek linii CHO-K1 poddanych działaniu ekstraktów etanolowych z badanych roślin: (a) części zielone, (b) korzenie. Ekstrakty badano w rozcieńczeniach 20-, 32- i 64-krotnym. Przedstawiono wartości średnie (n=3) oraz odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o dwuczynnikową analizę wariancji. Grupy jednorodnie wyznaczone testem NIR i opisano jako a-c.

4.8.4. Właściwości przeciwnowotworowe wybranych ekstraktów

Ze względu na potencjał farmakologiczny roślin z gatunku *Sarracenia purpurea* L. opisany we wstępie niniejszej pracy, określenie właściwości przeciwnowotworowych ekstraktów z wybranych linii badanych roślin stanowiło istotny etap prowadzonych badań. Ważny aspekt w doborze linii komórkowych wykorzystanych w niniejszej rozprawie stanowił brak skutecznych metod terapii gruczolaka przewodowego trzustki (PDAC), jednego z najbardziej opornych na leczenie i prowadzących do śmierci nowotworów.

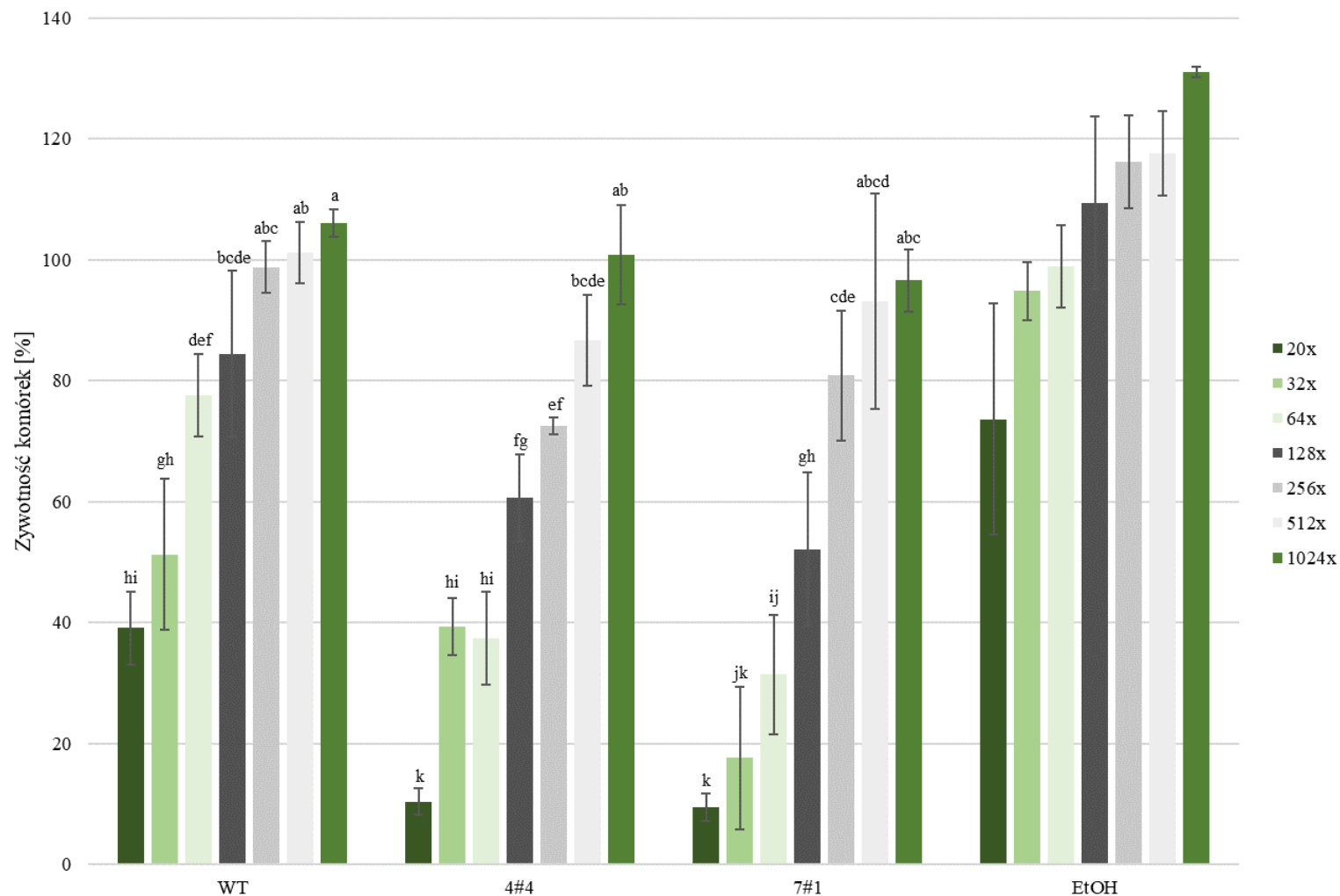
Przygotowano ekstrakty etanolowe z części zielonych oraz korzeni roślin dwóch linii poddanych modyfikacji 4#4 i 7#1 oraz roślin kontrolnych WT. Dla każdej z prób przygotowano 7 rozcieńczeń pozwalających na zbadanie wpływu różnych stężeń ekstraktów na proliferację komórek (20x, 32x, 64x, 128x, 256x, 512x, 1024x).

Po zastosowaniu ekstraktów z części zielonych, przy 20-krotnym rozcieńczeniu odnotowano silną cytotoksyczność wszystkich ekstraktów, a wartości różniły się między sobą w sposób istotny statystycznie. Najmniejszą żywotność komórek zanotowano przy zastosowaniu ekstraktów z roślin linii 7#1 i 4#4 i wynosiła ona odpowiednio 9,5% i 10,3%. Przy 32-krotnym rozcieńczeniu silne właściwości cytotoksyczne zaobserwowano dla zastosowanych ekstraktów z roślin linii 7#1 (18,6%) oraz 4#4 (39,3%). Dla WT cytotoksyczność określono jako umiarkowaną (51,3%). Przy 64-krotnym rozcieńczeniu ponownie odnotowano silne właściwości przeciwnowotworowe badanych ekstraktów z roślin linii 7#1 (31,4%) i 4#4 (37,4%), natomiast dla WT nie zaobserwowano cytotoksyczności względem badanych komórek linii BxPC3. W 128-krotnie rozcieńczonych ekstraktach z linii 7#1 i 4#4 odnotowano cytotoksyczność odpowiednio umiarkowaną i słabą, natomiast przy 256-krotnym rozcieńczeniu zaobserwowano słabą aktywność przeciwnowotworową jedynie dla 4#4. Dla dalszych rozcieńczeń i obniżania stężenia ekstraktów, którymi potraktowano komórki raka trzustki nie odnotowano obniżenia żywotności komórek poniżej 80%.

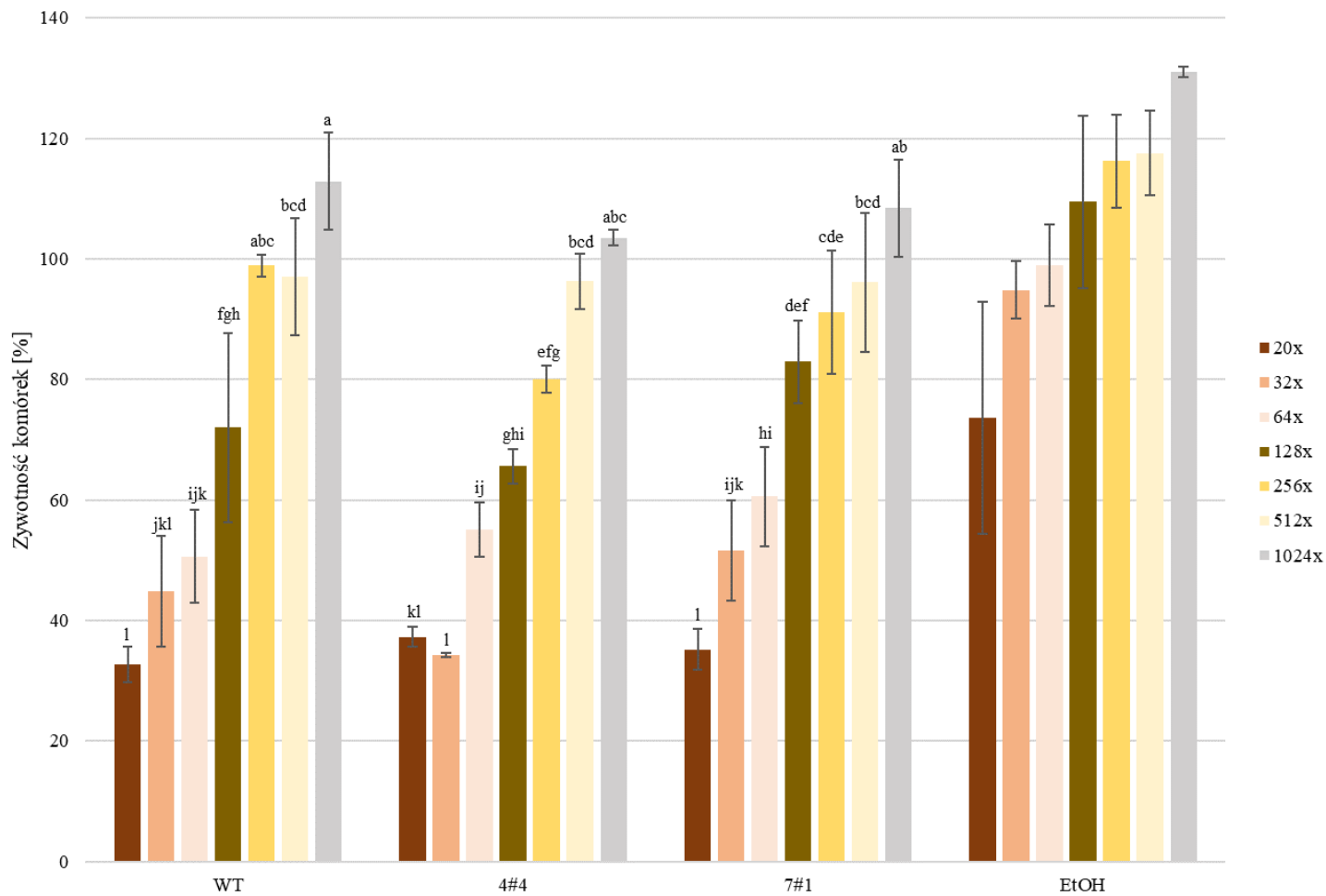
Przy zastosowaniu ekstraktu z korzeni badanych roślin, przy najmniejszym zastosowanym rozcieńczeniu, zaobserwowano silną cytotoksyczność ekstraktów linii 4#4 (37,3%) i 7#1 (35,2%), a także WT (32,7%) w stosunku do komórek BxPC3. Dla 32-krotnego rozcieńczenia próbek ekstraktu 4#4 scharakteryzowano jako silnie toksyczne, zaś z WT i 7#1 jako umiarkowanie toksyczne względem komórek nowotworowych. Przy zastosowaniu kolejnego rozcieńczenia ekstraktów zanotowano spadek żywotności komórek do 50,6%, 55,1% i 60,6% przy zastosowaniu ekstraktów z odpowiednio rośliny typu dzikiego, 4#4 i 7#1. W 128-

krotnym rozcieńczeniu próbek umiarkowaną cytotoksyczność zaobserwowano przy zastosowaniu ekstraktów z roślin WT oraz 4#4. Dla dalszego obniżania stężenia badanych ekstraktów, którymi potraktowano komórki z linii BxPC3, nie odnotowano żywotności komórek przekraczającej 80% w związku z tym próbki określono jako niewykazujące cytotoksyczności względem raka trzustki (załącznik 15).

Na podstawie uzyskanych wyników badań określono ekstrakty z badanych roślin jako cytotoksyczne w stosunku do komórek raka przewodowego trzustki (PDAC). Najbardziej istotne wartości uzyskano dla 20-, 32-, 64 i 128-krotnego rozcieńczenia próbek. Przy zastosowaniu ekstraktów z części zielonych jako najbardziej skuteczne względem obniżania żywotności komórek nowotworowych określono ekstrakty z roślin linii 7#1, zaś w przypadku korzeni ekstraktów z roślin linii 4#4.



Ryc. 40. Żywotność komórek linii BxPC3 poddanych działaniu ekstraktów etanolowych z części zielonych badanych roślin. Ekstrakty badano w rozcieńczeniach 20-, 32-, 64-, 128-, 256-, 512- i 1024-krotnym. Przedstawiono wartości średnie (n=3) oraz odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o dwuczynnikową analizę wariancji. Grupy jednorodnie wyznaczone testem NIR i opisano jako a-h.



Ryc. 41. Żywotność komórek linii BxPC3 poddanych działaniu ekstraktów etanolowych z korzeni badanych roślin. Ekstrakty badano w rozcieńczeniach 20-, 32-, 64-, 128-, 256-, 512- i 1024-krotnym. Przedstawiono wartości średnie (n=3) oraz odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o dwuczynnikową analizę wariancji. Grupy jednorodne wyznaczono testem NIR i opisano jako a-k

Wskutek rozwoju raka trzustki może dochodzić do wytworzenia wodobrzusza, co często wiąże się ze złymi rokowaniami, ponieważ jest informacją o terminalnej fazie choroby. Niestety u wielu pacjentów etap ten oznacza jedynie możliwość leczenia paliatywnego, ze względu na brak skutecznych metod terapeutycznych. W związku z tym w niniejszej pracy zdecydowano się na zbadanie właściwości przeciwnowotworowych dwóch linii transgenicznych oraz rośliny kontrolnej WT w stosunku do linii komórkowej AsPC1. Jest to linia komórek z wodobrzusza pacjenta z rakiem trzustki.

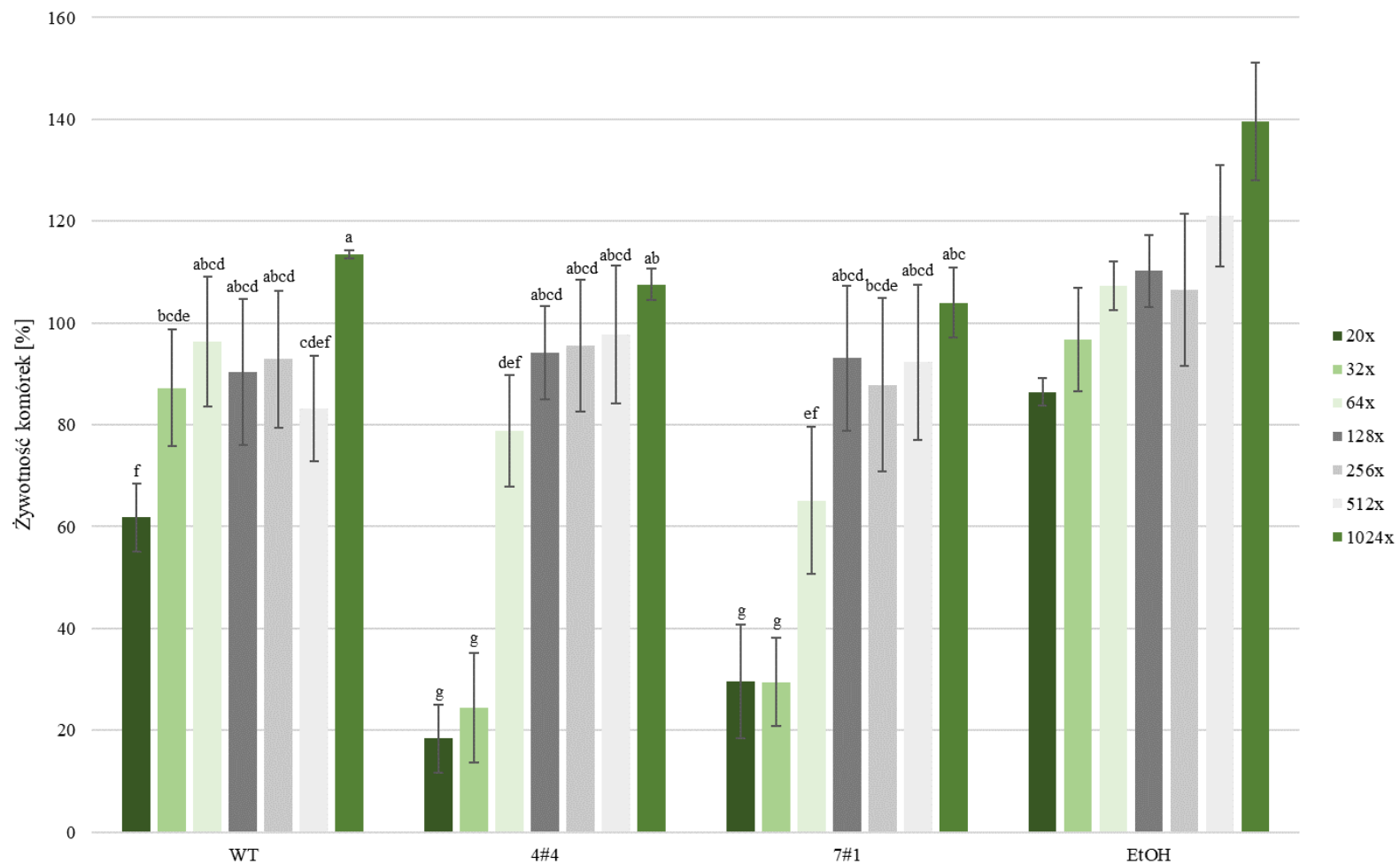
Ekstrakty etanolowe przygotowano z części zielonych i korzeni badanych roślin z linii 4#4 i 7#1 oraz roślin typu dzikiego WT. Każdą z prób wykonano w siedmiu rozcieńczeniach (20x, 32x, 64x, 128x, 256x, 512x, 1024x).

Przy zastosowaniu ekstraktów z części zielonych, przy 20-krotnym rozcieńczeniu odnotowano silną cytotoksyczność ekstraktów z roślin 4#4 i 7#1 względem komórek linii AsPC1, a wartości te wynosiły odpowiednio 18,4% i 29,7%. W tym samym stężeniu dla żywotności komórek potraktowanych ekstraktem z WT zanotowano jedynie słabą aktywność przeciwnowotworową (61,8%). Znaczne zahamowanie wzrostu komórek AsPC1 zaobserwowano przy 32-krotnym rozcieńczeniu przy zastosowaniu ekstraktów z linii 4#4 i 7#1, co pozwoliło określić cytotoksyczność jako silną. Wartości te były wyższe od nietoksycznych ekstraktów WT o odpowiednio 62,7% i 57,7%. Dla 64-krotnego rozcieńczenia oznaczono silną cytotoksyczność przy zastosowaniu ekstraktów z linii 4#4 (78,8%) i 7#1 (65,2%). W przypadku dalszego zmniejszania stężeń badanych ekstraktów nie zaobserwowano żywotności komórek powyżej 87%, co oznacza brak właściwości przeciwnowotworowych tych próbek. Zaobserwowano, że największe rozcieńczenia badanych ekstraktów roślinnych wpływają proproliferacyjnie na testowaną linię komórkową AsPC1. Aktywność ta jest jednak niższa, niż działanie czystego etanolu, badanego jako kontrola.

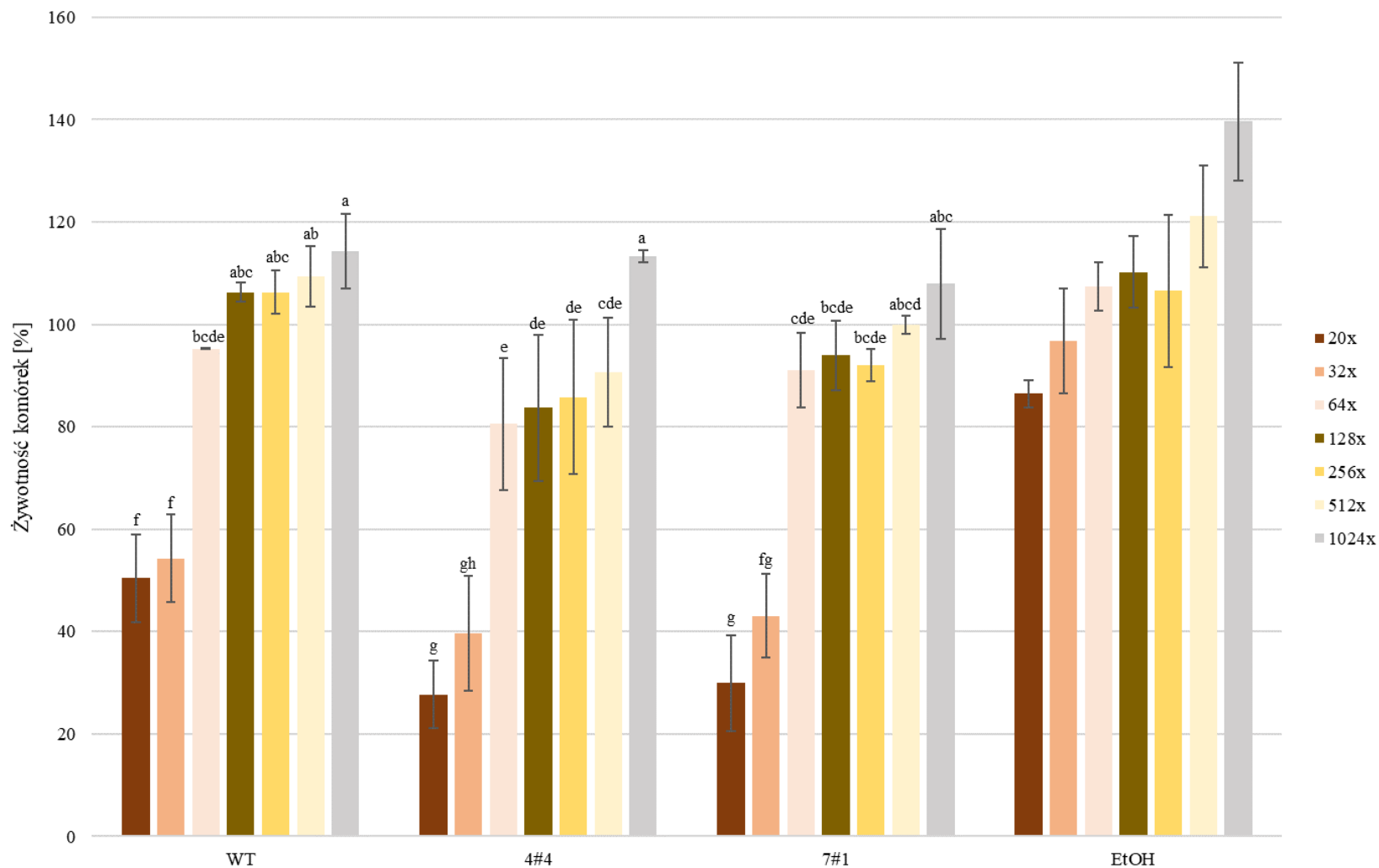
Przy zastosowaniu ekstraktów z korzeni włósnikowatych działanie cytotoksyczne na komórki z wodobrzusza pacjenta z rakiem trzustki odnotowano tylko dla dwóch największych stężeń (20x, 32x). W 20-krotnym rozcieńczeniu, przy zastosowaniu ekstraktów z roślin linii 4#4 i 7#1 zaobserwowano silną cytotoksyczność względem badanych komórek, a wartości te były 1,8-krotnie mniejsze od rezultatu uzyskanego przy zastosowaniu ekstraktów WT. Przy 32-krotnym rozcieńczeniu ekstrakty z linii 4#4 scharakteryzowano jako silnie toksyczne, zaś z linii

7#1 umiarkowanie toksyczne w stosunku do badanych komórek linii AsPC1. Dla kolejno zastosowanych rozcieńczeń ekstraktów z wszystkich analizowanych linii odnotowano wartości żywotności komórek na poziomie powyżej 80% klasyfikowanych jako nietoksyczne (załącznik 16).

Na podstawie uzyskanych wyników określono ekstrakty z roślin linii 4#4 i 7#1 w 20- i 32-krotnym stężeniu jako cytotoksyczne względem komórek przerzutowych raka trzustki. Jako najbardziej skuteczne w hamowaniu proliferacji komórek AsPC1 scharakteryzowano ekstrakty z roślin linii 4#4 zarówno części zielonych, jak i korzeni.



Ryc. 42. Żywotność komórek linii AsPC1 poddanych działaniu ekstraktów etanolowych z części zielonych badanych roślin. Ekstrakty badano w rozcieńczeniach 20-, 32-, 64-, 128-, 256-, 512- i 1024-krotnym. Przedstawiono wartości średnie (n=3) oraz odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o dwuczynnikową analizę wariancji. Grupy jednorodnie wyznaczone testem NIR i opisano jako a-g.

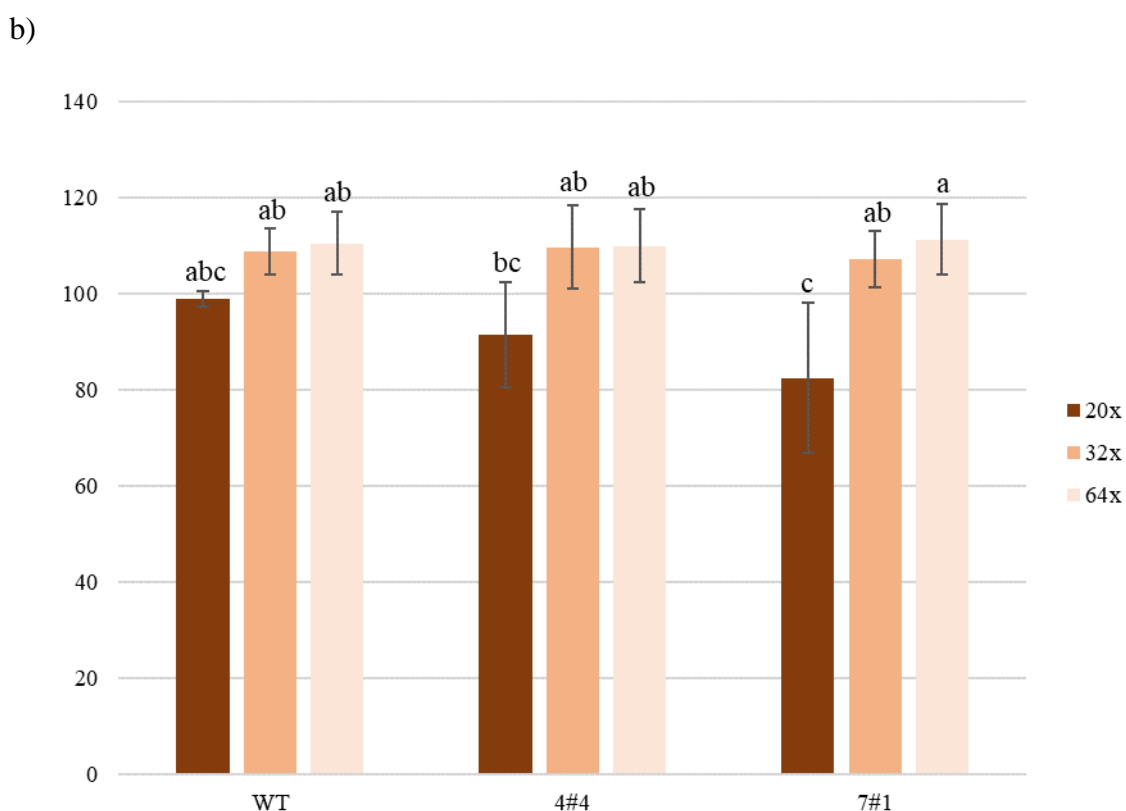
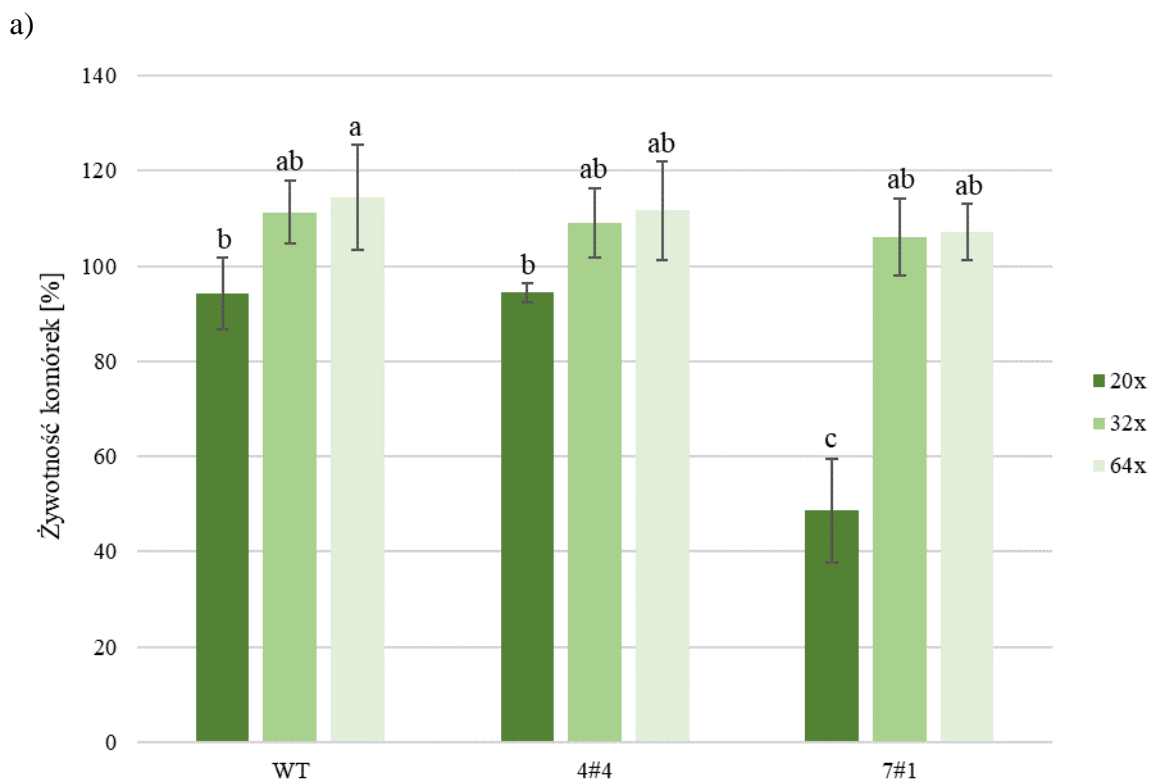


Ryc. 43. Żywotność komórek linii AsPC1 poddanych działaniu ekstraktów etanolowych z korzeni badanych roślin. Ekstrakty badano w rozcieńczeniach 20-, 32-, 64-, 128-, 256-, 512- i 1024-krotnym. Przedstawiono wartości średnie (n=3) oraz odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o dwuczynnikową analizę wariancji. Grupy jednorodne wyznaczono testem NIR i opisano jako a-g.

Zbadano właściwości cytotoksyczne ekstraktów z roślin linii 4#4 i 7#2 oraz z roślin kontrolnych WT względem linii komórek raka szyjki macicy. Oznaczenia wykonano w częściach zielonych oraz korzeniach, a próbki przygotowano w trzech rozcieńczeniach (20x, 32x, 64x).

Przy 20-krotnym rozcieńczeniu ekstraktów z części zielonych odnotowano cytotoksyczność umiarkowaną ekstraktów z roślin linii 7#1 (żywność komórek: 48,6%). Nie zaobserwowano zahamowania żywności komórek raka szyjki macicy pod wpływem działania ekstraktów z roślin linii 4#4 oraz roślin kontrolnych, a wartości te przekroczyły 90%. Dla 32-krotnego rozcieńczenia nie odnotowano istotnych statystycznie różnic przy zastosowaniu wszystkich ekstraktów, a żywność komórek dla każdego z nich przekroczyła 100%. Zaobserwowano zależność pomiędzy wzrostem żywności komórek HeLa, a obniżaniem stężeń badanych ekstraktów.

Nie odnotowano właściwości przeciwnowotworowych w stosunku do komórek raka szyjki macicy żadnego z badanych ekstraktów. Najmniejszą wartość w 20-krotnym rozcieńczeniu zaobserwowano przy zastosowaniu ekstraktów z 7#1 (82,6%), zaś największą dla roślin kontrolnych (99,0%). Dla wyników uzyskanych z 32- i 64-krotnego rozcieńczenia nie odnotowano różnic istotnych statystycznie, a wszystkie wartości przekroczyły 100% żywności komórek linii HeLa.



Ryc. 44. Żywotność komórek linii HeLa poddanych działaniu ekstraktów etanolowych z badanych roślin: (a) części zielone, (b) korzenie. Ekstrakty badano w rozcieńczeniach 20-, 32- i 64-krotnym. Przedstawiono wartości średnie (n=3) oraz odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o dwuczynnikową analizę wariancji. Grupy jednorodnie wyznaczone testem NIR i opisano jako a-c.

4.8.5. Analiza ekstraktów wodnych z *Sarracenia purpurea* L. na liniach komórkowych

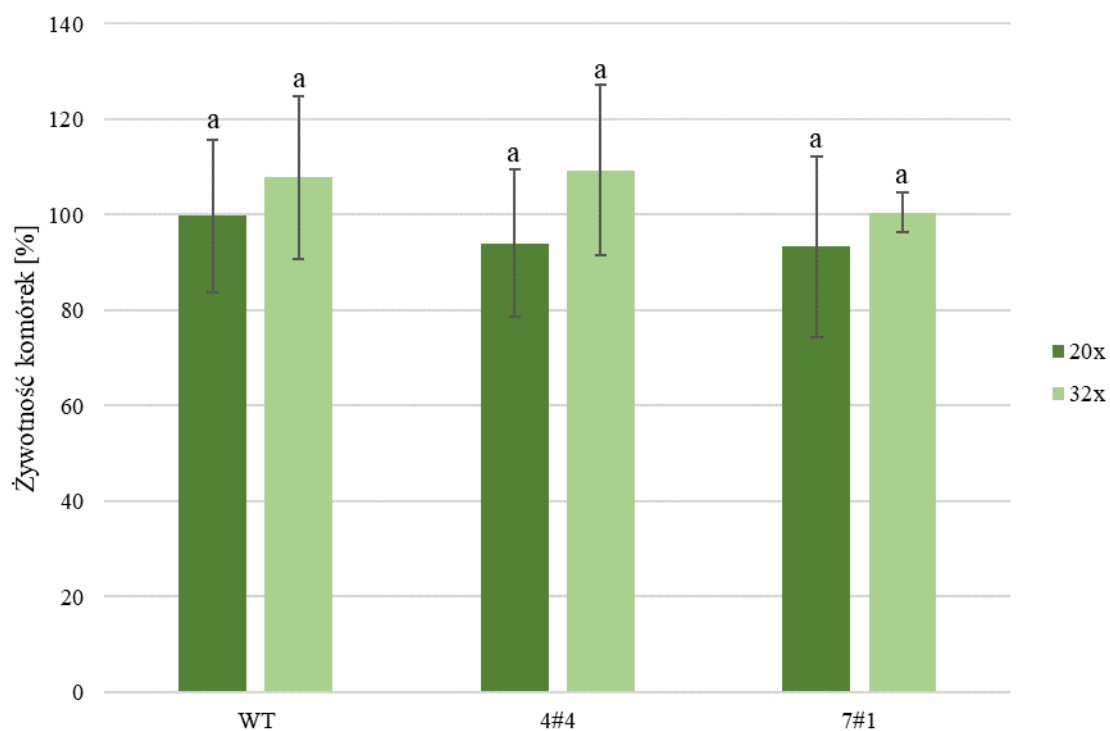
W dostępnych danych literaturowych opisywano wykorzystywanie ekstraktów wodnych w leczeniu dolegliwości związanych z wybroczynami skórnymi powstającymi na skutek ospy oraz chorób dermatologicznych. W związku z tym zbadano wpływ ekstraktów wodnych na keratynocyty skóry ludzkiej. Wykonano 2 warianty rozcieńczeń, a badaniu poddano części zielone oraz korzenie testowanych roślin.

W częściach zielonych dla 20-krotnego rozcieńczenia nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic dla wszystkich zastosowanych ekstraktów, a żywotność komórek dla wszystkich wariantów przekroczyła 90%. Dla zastosowanego 32-krotnego rozcieńczenia dla badanych wariantów odnotowano żywotność komórek powyżej 100%, a wartości te nie wykazywały istotnych różnic.

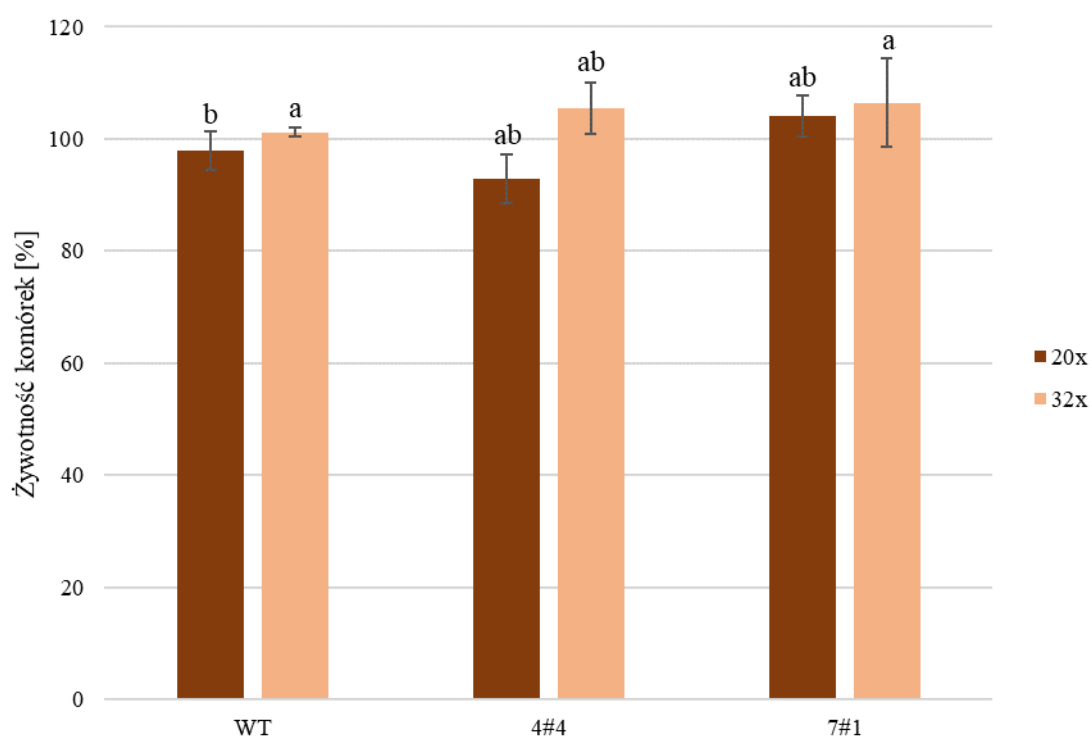
Dla zastosowanych ekstraktów z badanych korzeni odnotowano istotny wpływ typu linii (4#4) dla 20-krotnego rozcieńczenia. Żywotność komórek po poddaniu ich działaniu trzech rodzajów ekstraktów przekroczyła 90% dla każdego z nich, zaś dla 32-krotnego rozcieńczenia wartości te przekroczyły 100%. Zaobserwowano, że obniżenie stężenia badanych ekstraktów wpływa na wzrost żywotności testowanych komórek.

Na podstawie normy ISO 10993-5: 2009, określono badane ekstrakty wodne w obu rozcieńczeniach jako nie wykazujące cytotoksyczności względem keratynocytów ludzkich.

a)



b)



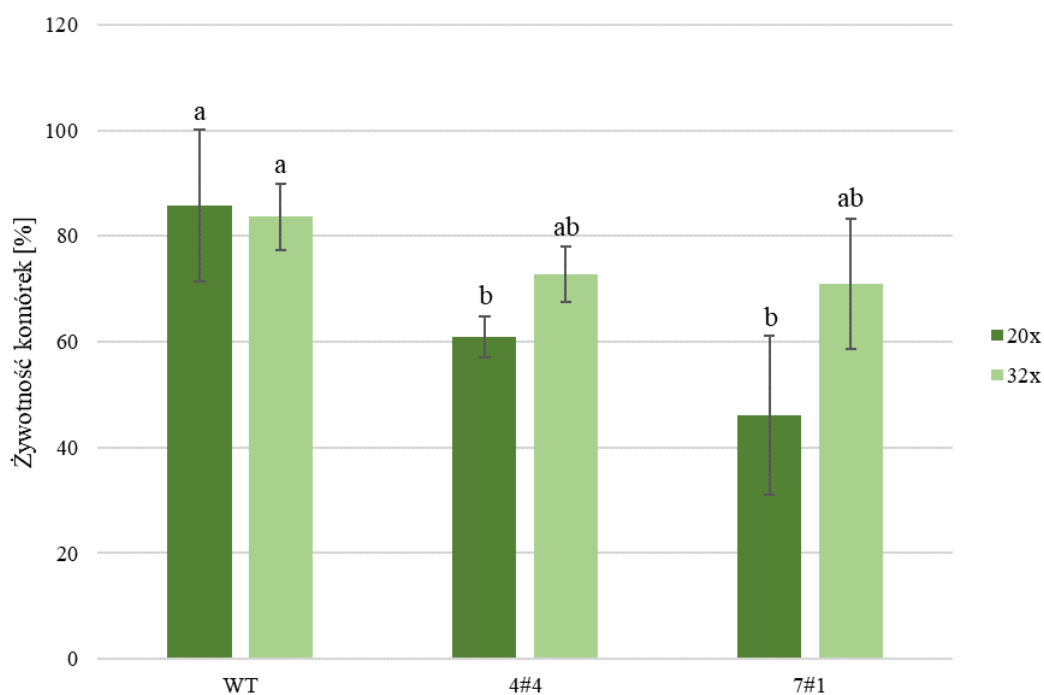
Ryc. 45. Żywotność komórek linii NHDF poddanych działaniu ekstraktów wodnych z badanych roślin: (a) części zielone, (b) korzenie. Ekstrakty badano w rozcieńczeniach 20- i 32-krotnym. Przedstawiono wartości średnie (n=3) oraz odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o dwuczynnikową analizę wariancji. Grupy jednorodnie wyznaczone testem NIR i opisano jako a-c.

W celu określenia właściwości przeciwnowotworowych ekstraktów wodnych z *Sarracenia purpurea* L. zbadano ich wpływ na komórki pierwotnego guza trzustki (linia komórkowa BxPC3). Przygotowano ekstrakty wodne oraz ich 20- i 32-krotne rozcieńczenia, którymi potraktowano testowane komórki.

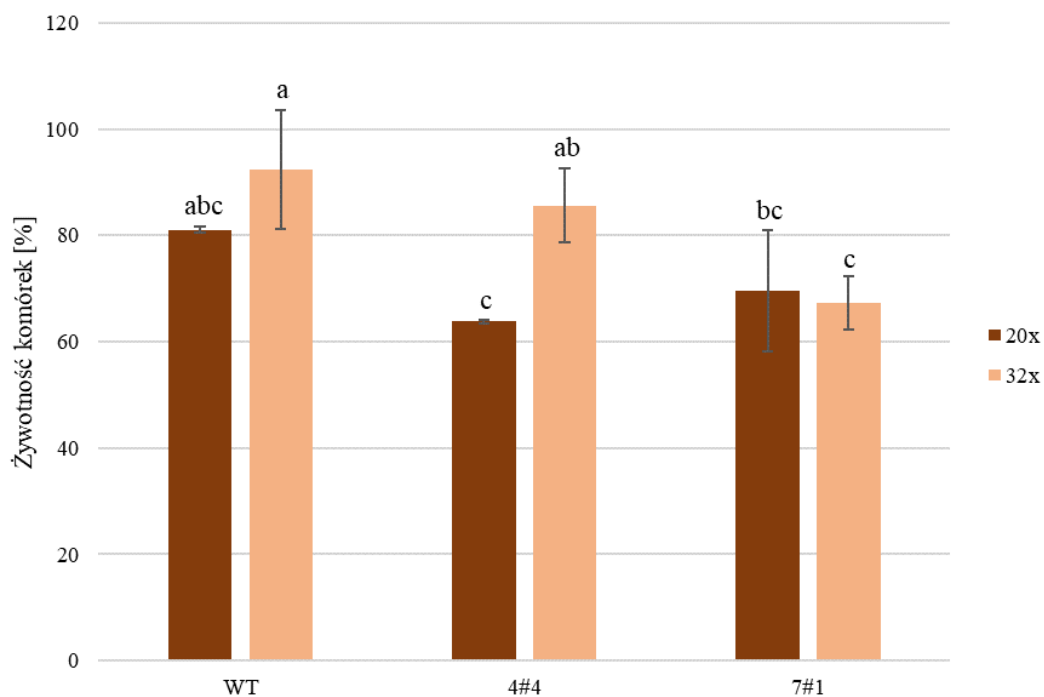
Przy zastosowanych ekstraktach z części zielonych linii 7#1 zanotowano umiarkowaną cytotoksyczność względem badanych komórek (46,1%), natomiast dla linii 4#4 słabą (60,9%). Nie zaobserwowano działania przeciwnowotworowego ekstraktów z roślin kontrolnych (85,8%).

Przy zastosowanych ekstraktach z korzeni pochodzących z linii 4#4 i 7#1, przy 20-krotnym rozcieńczeniu zaobserwowano słabą cytotoksyczność, a żywotność komórek wynosiła odpowiednio 63,8% i 69,5%. Po zastosowaniu ekstraktów wodnych z roślin typu dzikiego nie odnotowano bójkowego działania w stosunku do komórek pierwotnego guza trzustki. Dla 32-krotnego rozcieńczenia słabą cytotoksyczność oznaczono jedynie dla ekstraktów z roślin linii 7#1. Nie odnotowano bójkowego wpływu ekstraktów z 4#4 i WT w stosunku do badanych komórek.

a)



b)



Ryc. 46. Żywotność komórek linii BxPC3 poddanych działaniu ekstraktów wodnych z badanych roślin: (a) części zielone, (b) korzenie. Ekstrakty badano w rozcieńczeniach 20- i 32-krotnym. Przedstawiono wartości średnie (n=3) oraz odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o dwuczynnikową analizę wariancji. Grupy jednorodnie wyznaczone testem NIR i opisano jako a-c.

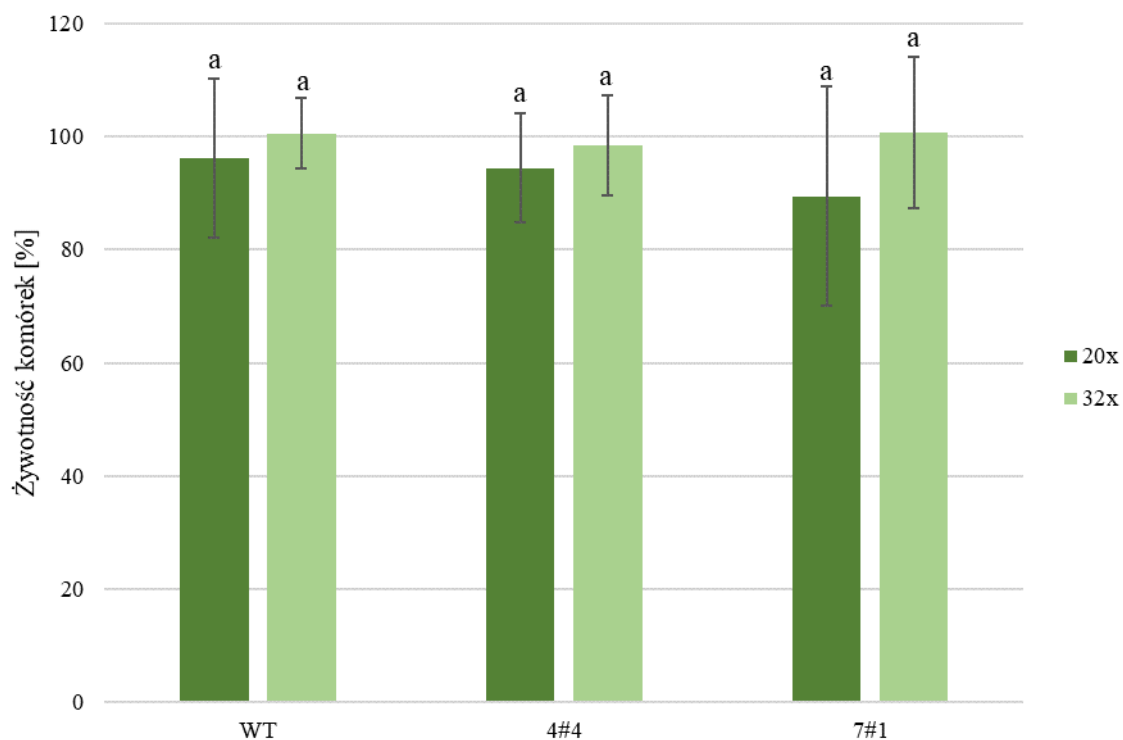
Zbadano także wpływ wodnych ekstraktów z badanych roślin na linię AsPC1 raka trzustki (Ryc. 44). Wykonano dwa rozcieńczenia (20x, 32x) dla części zielonej i korzeni każdej z testowanych linii roślin.

Dla 20-krotnego rozcieńczenia próbek spadek żywotności komórek z linii AsPC1 odnotowano przy zastosowaniu ekstraktów z linii 7#1, jednak nie wykazały one działania toksycznego. Wartości dla linii 4#4 oraz roślin kontrolnych odczytano na poziomie przekraczającym 90%. Dla wyników z 32-krotnego rozcieńczenia dla wszystkich ekstraktów nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie.

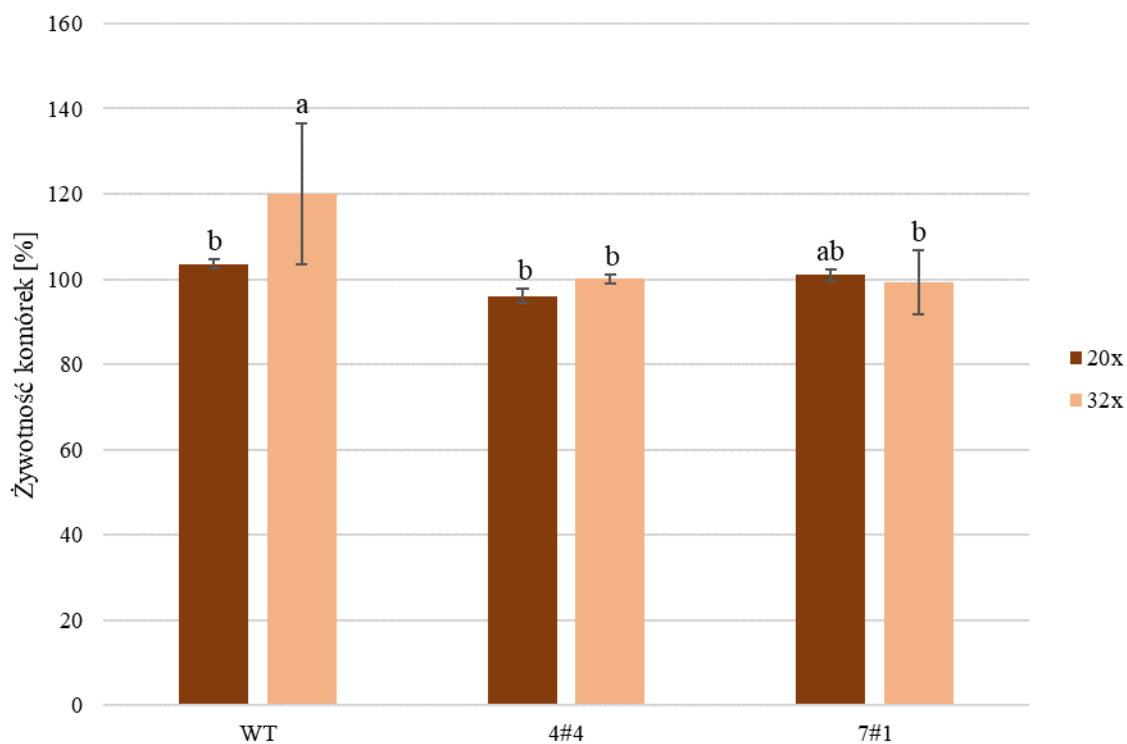
Przy zastosowaniu ekstraktów wodnych z korzeni badanych roślin nie wykazano ich właściwości przeciwnowotworowych. Przy 20-krotnym rozcieńczeniu odnotowano najwyższą wartość dla korzeni roślin nietransformowanych (103,6%), zaś najniższą dla korzeni włósnikowatych z linii 4#4 (96,1%). Zaobserwowano wzrost żywotności komórek poddanych działaniu wszystkich badanych ekstraktów wraz ze spadkiem ich stężenia.

Na podstawie uzyskanych danych nie stwierdzono właściwości przeciwnowotworowych ekstraktów z części zielonych oraz korzeni wszystkich testowanych ekstraktów w stosunku do komórek z wodobrzusza pacjenta z rakiem trzustki (linia komórkowa AsPC1).

a)



b)



Ryc. 47. Żywotność komórek linii AsPC1 poddanych działaniu ekstraktów wodnych z badanych roślin: (a) części zielone, (b) korzenie. Ekstrakty badano w rozcieńczeniach 20- i 32-krotnym. Przedstawiono wartości średnie (n=3) oraz odchylenia standardowe serii pomiarów. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o dwuczynnikową analizę wariancji. Grupy jednorodnie wyznaczono testem NIR i opisano jako a-c.

5. Dyskusja

W dobie szybkiego postępu cywilizacyjnego szczególnie istotne jest wykorzystywanie nowych narzędzi do poszukiwania rozwiązań służących człowiekowi. Szereg ważnych odkryć w wielu dziedzinach umożliwił powstanie terapii dla schorzeń wcześniej uznawanych za nieuleczalne. Niestety, nawet najnowocześniejsza medycyna boryka się z wysokim odsetkiem śmiertelności pacjentów z chorobami, na które wciąż nie ma skutecznych metod leczenia. Dla zdrowia publicznego za jedno z najpoważniejszych zagrożeń uważa się oporność bakterii chorobotwórczych na stosowane antybiotyki (AMR). Znaczącym problemem jest ponadto brak skutecznych metod leczenia określonej grupy nowotworów, w tym nowotworu trzustki. Co minutę 4 osoby na świecie otrzymują informację o zdiagnozowaniu u nich choroby nowotworowej (1), w ostatniej dekadzie odnotowano również 2-krotny wzrost zapadalności na raka trzustki. Jak podaje Orlewska i Kozieł (2021) w latach 1996-2018 zapadalność na raka przewodowego trzustki (PDAC) wzrosła w Polsce o 18%, zaś śmiertelność nim spowodowana o 45%. Jest to związane z wieloma czynnikami, m.in. z brakiem programów badań przesiewowych, co skutkuje wykrywaniem go w bardzo zaawansowanym stadium. Wskaźnik przeżywalności w okresie 5 lat dla PDAC wynosi jedynie 10%, co spowodowane jest głównym problemem związanym z brakiem skutecznej metody leczenia nowotworu trzustki (Orlewska, Kozieł, 2021). W związku z tym, istotnym obszarem działalności badawczej jest nieustanne poszukiwanie nowych, bezpiecznych i skutecznych substancji leczniczych oraz terapii chorób. Z praktycznego punktu widzenia, metody inżynierii genetycznej warto wykorzystywać w kierunku precyzyjnych modyfikacji organizmów pozwalających na osiągnięcie tych celów.

Rośliny stanowią ogromny rezerwuar związków o potencjale farmakologicznym. Najstarsze pisemne dowody na stosowanie ich w celach leczniczych odnaleziono na sumeryjskiej glinianej płytce z Nagpur (Süntar, 2020). Stosowano je w postaci surowej, proszku, naparów czy okładów. Wyizolowanie w 1803 roku przez Serturmer'a morfiny z opium zapoczątkowało izolację czystych związków aktywnych z roślin (Süntar, 2020). Obecnie pozyskuje się z roślin wiele metabolitów wtórnych mających praktyczne zastosowanie w terapii wielu chorób. Wśród najbardziej znanych przykładów wyróżnić można przeciwmalaryczną chininę (*Cinchona ledgeriana* Moens ex. Trimen), przeciwcholinergiczną atropinę (*Atropa belladonna* L.), przeciwbólową kodeinę (*Papaver somniferum* L.) czy przeciwnowotworową kamptotecynę (*Camptotheca acuminata* Decne.) (Süntar, 2020). Wśród roślin o dużych właściwościach farmakologicznych znajdują się także rośliny owadożerne. Jak wskazano we

wstępie niniejszej pracy wykazują one potencjał w leczeniu chorób wirusowych (Arndt i wsp., 2012), bakteryjnych (Kumar, 2017; Moerman, 1998; Ferreina, 2004; Didry i wsp., 1998; Majeed i wsp., 2016), grzybiczych (Etkin, 2008; Shin i wsp., 2007); łagodzeniu stresu oksydacyjnego (Ghate, 2015; Uriah i wsp., 2015); terapii bólu (Etkin, 2008; Divkar i wsp., 2013; Singh, Bajwa, 2017; Shaikh i wsp., 2016); wspomaganiu leczenia cukrzycy (Harris i wsp., 2012; Bournival i wsp., 2012; Muhammad i wsp., 2013); terapiach przeciwnowotworowych (Miles i wsp., 1974; Huang i wsp., 2020; Guan i wsp., 2021; Ghate i wsp., 2016; Asirvatham i Christina, 2013). Obiekt badań w niniejszej pracy- roślina *Sarracenia purpurea* L. również cechuje się zawartością wielu cennych metabolitów wtórnych o możliwym zastosowaniu farmakologicznym takich jak kwas betuliny (Barhelemy i wsp., 2009), aldehyd betuliny (Morrison i wsp., 2016) czy kwas ursolowy (Rosa i wsp., 2008). Rośliny występujące w środowisku naturalnym narażone są jednak na działanie wielu niekorzystnych czynników. Wśród najbardziej stresogennych i mających bezpośredni wpływ na kondycję roślin, wymienia się zmieniające się czynniki klimatyczne (susze, powodzie) oraz zanieczyszczenia środowiska na skutek działalności antropogenicznej. Ekspansja człowieka na coraz większe obszary przyczynia się do całkowitego niszczenia lub znacznego przekształcania siedlisk wielu gatunków roślin, posiadających cenne właściwości farmakologiczne. Na skutek zmian siedliskowych dochodzi do zanikania dużych grup roślin wysoko wyspecjalizowanych, takich jak rośliny owadożerne. W ostatnich latach przybywa gatunków roślin objętych częściową lub całkowitą ochroną, co uniemożliwia wykorzystywanie ich w celach użytkowych i badawczych. Wykorzystanie potencjału farmakologicznego roślin przez człowieka ograniczone jest także względami ekonomicznymi. Pozyskiwanie metabolitów wtórnych z gatunków roślin charakteryzujących się wolnym tempem wzrostu, małym przyrostem biomasy w czasie oraz niską zawartością związków aktywnych biologicznie jest nieopłacalne. Rozwiązaniem tego problemu mogą być techniki stosowane w biotechnologii roślin, pozwalające na zwiększanie akumulacji metabolitów wtórnych czy rozmnażanie roślin na szerszą skalę.

Jedną z najczęściej stosowanych technik modyfikacji genetycznej w biotechnologii roślin jest agrofekcja. Transformacja za pomocą *Rhizobium rhizogenes* charakteryzuje się większą wydajnością w porównaniu do technik bezpośredniego transferu genów, takich jak gene gun, czy mikrowstrzeliwanie. Jej skuteczność zależy od wielu czynników, m.in. wyboru szczepu bakterii, rodzaju i wieku tkanki roślinnej, rodzaju zastosowanej metody (kokultury lub iniekcji), zastosowania regulatorów wzrostu, a także parametrów procesu (Królicka, 2005).

Transformacje za pomocą *Rhizobium rhizogenes* prowadzono już z powodzeniem w przypadku kilku gatunków roślin owadożernych. Królicka i wsp. (2010) opisali udaną transformację rosiczki *Drosera capensis* var. *alba* za pomocą *Rhizobium rhizogenes*., natomiast zespół Makowski i wsp. (2021) otrzymał transgeniczną muchołówkę *Dionea muscipula* J.Ellis. Pomimo udanych prób i wielu zalet metody agroinfekcji, stosowanie tej techniki wciąż stanowi duże wyzwanie, zwłaszcza w przypadku gatunków roślin odpornych na infekcję *Rhizobium rhizogenes*. Często problem stanowią trudności z regeneracją eksplantatów uzyskanych w wyniku transformacji. Dodatkowo nie zawsze ekspresja wprowadzonych przez bakterie genów jest identyczna we wszystkich tkankach roślin (Bandurska i wsp., 2016). W niektórych przypadkach obserwuje się także spadek ekspresji transgenów w czasie. Bardzo istotne jest więc prowadzenie intensywnych badań nad optymalizacją procesów agroinfekcji oraz regeneracji eksplantatów w celu uzyskiwania roślin o wysokim potencjale leczniczym. W niniejszej pracy, w wyniku przeprowadzonej agroinfekcji, uzyskano rośliny kompozytowe *Sarracenia purpurea* L., które składają się z nietransgenicznych pędów oraz transgenicznych korzeni włośnikowatych. System roślin kompozytowych został po raz pierwszy opisany przez grupę naukowców Hansen i wsp. (1989), a rozszerzona przez badania Torregrosa i Bouquet (1997). Mianem systemu roślin kompozytowych określa się rośliny złożone z pędu typu dzikiego, z którego zaindukowany, za pomocą *Rhizobium rhizogenes*, został rozwój korzeni transgenicznych (Hansen i wsp., 1989; Akasaka i wsp., 1998; Boisson-Dernier i wsp., 2001). Opisano protokoły uzyskiwania roślin kompozytowych, takich jak: *Medicago truncatula* Gaertn. (Mrosk i wsp., 2009), *Arachis hypogaea* L. (Geng i wsp., 2012), czy *Glycine max* (L.) Merr. (Fan i wsp., 2020). Protokoły uzyskiwania roślin kompozytowych za pomocą bakterii *Rhizobium rhizogenes*, powstały w dużej mierze dla roślin, które charakteryzowały się opornością na stosowane techniki transformacji (Pilarska i wsp., 2022). Jak wykazano w badaniach Foti i Pavli (2020), fenotyp transgenicznego systemu korzeni włośnikowatych różni się od korzeni typu dzikiego pod względem struktury oraz akumulacji biomasy. Korzenie włośnikowate charakteryzują się obfitością włośników i zwiększoną ich długością oraz znacznie bardziej rozgałęzionym systemem korzeniowym. Cechą charakterystyczną korzeni roślin kompozytowych jest także zdolność do plagiotropizmu (Foti i Pavli, 2020). Według Venna i Taylor (2007) główną zaletą roślin kompozytowych, hodowanych w kulturach *in vitro*, jest możliwość generowania nowych informacji na poziomie całej rośliny. Pozwala to na hodowanie tak uzyskanych roślin w systemach hydroponicznych oraz w glebie, lepiej oddających warunki środowiska naturalnego. Rao i Ravishankar (2002) za kluczową zaletę roślin kompozytowych uznają zaś ich wyjątkową zdolność do wzrostu w kulturach *in vitro* przy

braku egzogennych regulatorów wzrostu. Rośliny kompozytowe mogą umożliwić testowanie funkcji genów (Venna i Taylor, 2007), oferując kompletny system do badania funkcji genów korzeni w warunkach fizjologicznych całych roślin (Bosselut i wsp., 2011). Opisano m.in. możliwość wykorzystywania roślin kompozytowych do wyciszania genów w nadziemnych częściach roślin (Kumagai i Kouchi, 2003). Wykorzystanie roślin kompozytowych w procesach fitoremediacji może mieć przewagę nad izolowanymi korzeniami, ponieważ pozwala wyeliminować problemy związane ze zranieniem lub zmianami poziomu hormonów w wycinanych korzeniach (Talano i wsp., 2003, 2006).

Analiza składu aminokwasów w częściach zielonych roślin poddanych agroinfekcji wykazała, że ich sumaryczna zawartość jest mniejsza niż w roślinach kontrolnych (o 1,2% dla roślin z linii 4#4 i 5,7% dla roślin z linii 7#1). Największe różnice stwierdzono dla metioniny, której zawartość w roślinach z 4#4 i 7#1 była mniejsza o odpowiednio 56,8% i 61,2% względem roślin typu dzikiego. W badanych roślinach odnotowano wzrost zawartości kwasu glutaminowego, który jest podstawowym składnikiem tkanek roślinnych i bierze udział w odpowiedzi na stres środowiskowy (Wróbel-Kwiatkowska i wsp., 2022). Aminokwas ten bierze także udział w powstawaniu chlorofilu, dlatego wskazano na korelację jego syntezy ze wzrostem ilości chlorofilu w liniach roślin poddanych modyfikacji. Analizę profilu aminokwasów przeprowadzono także dla indukowanych korzeni i wykazała ona obniżenie ich sumarycznej zawartości u roślin poddanych agroinfekcji w porównaniu do roślin kontrolnych (o 5,3% dla linii 4#4 oraz 8,3% dla linii 7#1). Przyrost ilości tryptofanu w korzeniach linii 4#4 o 42,3% w odniesieniu do korzeni roślin niepoddanych modyfikacji może świadczyć o znacznych zmianach w metabolizmie związanym ze szklakiem szikimowym. Jego zintensyfikowana synteza może być skorelowana z wytwarzaniem metabolitów wtórnych koordynujących odpowiedź na stres (Ishihara i wsp., 2008). Infekcja roślin bakteriami *Rhizobium rhizogenes* wpływa na modyfikację metabolizmu roślin, co w efekcie prowadzi do wzrostu wydłużeniowego korzeni.

Wykonano analizy zawartości składników ściany komórkowej badanych roślin za pomocą FT-IR/ATR i określono w nich zawartość lignin, pektyn oraz celulozy. Zaobserwowano wyraźne różnice w ilości lignin, których wzrost w odniesieniu do roślin kontrolnych odnotowano jedynie dla roślin z linii 4#1, 4#2 i 4#3. Obniżenie zawartości lignin w pozostałych liniach roślin poddanych agroinfekcji może wiązać się ze wzrostem elastyczności tych roślin w odniesieniu do kontroli (Wojtasik i wsp., 2013), w niniejszej pracy nie analizowano jednak parametrów biomechanicznych. Jak podają Szopa, Kostyń (2006)

określono przepływ metabolitów wtórnych roślin pomiędzy różnymi gałęziami szlaku metabolizmu fenylopropanoidów, a obniżenie syntezy lignin towarzyszyć może intensyfikacji syntezy polifenoli. Mechanizm ten może przekładać się na wzrost pojemności antyoksydacyjnej w badanych liniach roślin modyfikowanych opisanych w niniejszej pracy. Pektyny to podstawowe elementy strukturalne roślin, które wpływają na aktywację pracy ich systemu odpornościowego (Voragen i wsp., 2009; Yapo, 2011). Jak podaje Pińkowska i Złocińska (2014) biorą one udział w akumulacji związków przeciwdrobnoustrojowych. W niniejszej pracy odnotowano wzrost zawartości pektyn w roślinach poddanych agroinfekcji w odniesieniu do roślin typu dzikiego. Oprócz funkcji strukturalnych odpowiadających za kondycję roślin, wzrost odkładania celulozy w ich ścianie komórkowej świadczyć może o utrudnieniu dostępu mikroorganizmów do tkanek roślinnych (Nafsim i wsp., 2015). W badaniach strukturalnych FT-IR zaobserwowano zwiększoną zawartość lignin, pektyn, pochodnych triterpenowych i flawanoli w roślinach z linii 4#6, dla których nie potwierdzono integracji T-DNA genów *Rhizobium rhizogenes* z genomem roślin, po przeprowadzonej agroinfekcji. Przyczyn tego zjawiska należy poszukiwać w czynnikach epigenetycznych. Prawdopodobnym jest, że na skutek infekcji, która wywołała u roślin stres, doszło u nich do zmian w metylacji DNA lub modyfikacji histonów (Sahu i wsp., 2013; Ding i Wang, 2015). Na skutek wywołanego stresu mogło dojść do zaburzenia w syntezie hormonów roślinnych, czego efektem stała się zwiększona biosynteza metabolitów wtórnych.

W pracy podjęto również próbę określenia zawartości najważniejszych związków bioaktywnych z uzyskanych roślin *Sarracenia purpurea* L., celem określenia potencjału farmakologicznego uzyskanych linii roślin. Zmierzone widma FT-IR potwierdziły obecność dwóch cennych związków z grupy terpenoidów: kwasu ursolowego oraz kwasu betulinowego. Kwas ursolowy jest naturalnym związkiem występującym w roślinach zarówno w postaci wolnej, jak i pochodnych. Posiada szereg cennych, z punktu widzenia farmakologicznego, właściwości wśród których najszerzej opisywane są działanie przeciwdrobnoustrojowe, przeciwcukrzycowe, przeciwzapalne, kardioprotekcyjne czy przeciwbólowe (Khwazo i wsp., 2020). Ze względu na intensywne poszukiwania nowych terapii nowotworów, najcenniejsze okazuje się jednak szerokie spektrum działania przeciwnowotworowego kwasu ursolowego. Związane jest ono z bezpośrednim działaniem cytotoksycznym na komórki raka, działaniem przeciwprzerzutowym i chemoprewencyjnym, dzięki regulacji proliferacji komórek, apoptozy, angiogenezy i autofagii (Kassi i wsp., 2009; Shanmugam i wsp., 2013; Angeles i wsp., 2016). Badania prowadzone przez zespół Markowski i wsp. (2022) wykazały, że kwas ursolowy

posiada duży potencjał w leczeniu jednego z najbardziej śmiertelnych nowotworów jakim jest gruczolakorak przewodowy trzustki (PDAC). Obecność kwasu ursolowego w roślinach poddanych agroinfekcji przedstawionych w niniejszej pracy może mieć bezpośredni wpływ na działanie cytotoksyczne przygotowanych z nich ekstraktów na linię komórkową pierwotnego guza trzustki oraz linię komórek z wodobrzusza pacjenta z rakiem trzustki. W roślinach owadożernych występują także naftochinony takie jak plumbagina w *Nepenthes khasiana* Hook. f. (Eilenberg i wsp., 2016) i ramentaceon z *Nepenthes insignis* Danser (Risner i wsp., 2002). Badania strukturalne FT-IR w niniejszej pracy wykazały także obecność pasm charakterystycznych dla pochodnych naftochinonu: ramentaceonu i plumbaginy w badanych roślinach *Sarracenia purpurea* L. poddanych transformacji za pomocą bakterii *Rhizobium rhizogenes*.

Innym naturalnie występującym związkiem bioaktywnym w kaptownicy jest kwas betulinowy. Po raz pierwszy dokładny opis jego potencjalnych właściwości opisano niemal 30 lat temu, a wśród nich wyróżniono: przeciwbólowe (Kinoshita i wsp., 1998), przeciwwirusowe (Fujioka i wsp., 1994), przeciwbakteryjne (Chandramu i wsp., 2003), przeciwmalaryczne (Bringman i wsp., 1997) czy przeciwzapalne (Huget i wsp., 2000). W ostatnich latach swoją popularność kwas betulinowy zawdzięcza jednak najbardziej swoim działaniem przeciwnowotworowym. Badania *in vitro* Liu i wsp. (2004) prowadzone na linii komórkowej K562 dowiodły, że związek ten posiada zdolność indukcji apoptozy komórek nowotworowych. Jego cechą charakterystyczną jest możliwość uruchamiania mitochondrialnego szlaku apoptozy w komórkach nowotworowych (Fulda, 2008). Dowiedziono, że kwas betulinowy jest także zaangażowany w regulację procesów angiogenezy dzięki hamowaniu działania enzymu aminopeptydazy N (Kwan i wsp., 2002; Sjostrom i wsp., 2000). Ponadto wykazano, że posiada on zdolność do hamowania katalitycznej aktywności topoizomerazy I (Chowdhury i wsp., 2002). W pracy zmierzono zawartość kwasu betulinowego w uzyskanych roślinach z gatunku *Sarracenia purpurea* L. W ekstraktach z pędów roślin linii 4#4 i 7#1 odnotowano odpowiednio 1,8- oraz 7-krotnie większą jego zawartość w porównaniu do roślin kontrolnych. Także w korzeniach włośnikowatych z linii 4#2 i 4#4 obserwowano wzrost syntezy kwasu betulinowego w porównaniu do korzeni roślin niemodyfikowanych (o odpowiednio 3,7% i 33,3%). Zawartość w badanych roślinach tego cennego związku może mieć bezpośredni wpływ na oznaczone w niniejszej pracy właściwości cytotoksyczne w stosunku do komórek raka trzustki.

W pracy określono również ogólną zawartość triterpenów w roślinach *Sarracenia purpurea* L. Stanowią one dużą grupę związków o interesujących właściwościach prozdrowotnych, wykazano, że posiadają szerokie spektrum działania farmakologicznego w tym immunomodulującego, przeciwdrobnoustrojowego, przeciwzapalnego, przeciwutleniającego czy hepatoprotekcyjnego (Battineni i wsp., 2018; Ghiulai i wsp., 2020). W badaniach Harun i wsp. (2020) oraz Rios (2010) wykazano, że niektóre z tych właściwości wynikają ze zdolności triterpenów do immunomodulacji układu odpornościowego. W roślinach owadożernih zidentyfikowano terpeny takie jak kwas betulinowy i aldehyd betulinowy w *Sarracenia purpurea* L. (Morrison i wsp., 2016) oraz kwas ursolowy w *Sarracenia flava* L. (Miclea, 2022). Jak opisano wyżej, w prowadzonych badaniach również zidentyfikowano te związki. Odnotowano także wzrost ogólnej zawartości triterpenów w częściach zielonych roślin linii 4#4, 4#5, 7#1 i 7#2 w stosunku do roślin kontrolnych o odpowiednio 9,4%, 5,7%, 57,3% i 14%. Ze względu na fakt, iż badane *Sarracenia purpurea* L. są roślinami kompozytowymi, wzrost zawartości tych związków w częściach zielonych może wynikać ze zmian epigenetycznych wywołanych stresem na skutek kontaktu roślin z *Rhizobium rhizogenes* podczas agrofekcji. Epigenotyp roślin coraz częściej wiązany jest z odpowiedzią roślin na niekorzystne czynniki. Stresy abiotyczne wywołują u roślin strategie obronne polegające na zmianach w metylacji DNA (Sahu i wsp., 2013) oraz modyfikacji histonów (Alvarez i wsp., 2012; Ding i Wang, 2015). Korelacje pomiędzy zmianami w metylacji DNA, a reakcją na infekcje wirusowe i bakteryjne zaobserwowano u roślin *Arabidopsis thaliana* (Sahu i wsp., 2013; Gutzat i Scheid, 2012) czy ryżu (Sha i wsp., 2005). Większość z modyfikacji epigenetycznych wywoływanych stresem zanika po ustąpieniu niekorzystnego czynnika, jednak niektóre wykazują na tyle dużą stabilność, że dziedziczone są jako tzw. „pamięć stresu” (Chinnusamy i Zhu, 2009). Dla tych samych linii (4#4, 4#5, 7#1, 7#2) w korzeniach włóśnikowatych również zaobserwowano wzrost syntezy tych związków na poziomie znacznie wyższym niż w przypadku pędów tj. odpowiednio o 27,1%, 221,5%, 319,0% i 220,8%. Triterpeny są związkami pośredniczącymi w interakcjach roślina-patogen (Cárdenas i wsp., 2019), a wymienione linie roślin najsilniej wykazują tzw. fenotyp korzeni włóśnikowatych. Wang i wsp. (2014) wykazali także, że triterpeny uczestniczą w zjawisku allelopatii, w związku z czym można przypuszczać, że transformacja i wbudowanie genów bakterii *Rhizobium rhizogenes* do genomu kapturonic mogła spowodować zwiększoną syntezę związków triterpenoidowych.

Związki fenolowe stanowią dużą grupę związków powszechnie występujących w produktach pochodzenia roślinnego. Pełnią w roślinach funkcje związane m.in. z ochroną przed niekorzystnym działaniem mikroorganizmów, szkodników, promieniowania UV czy stresogennych czynników środowiska. Dla ludzi cenne są ich właściwości wykorzystywane w medycynie, a wśród nich wyróżnić można właściwości przeciwdzapalne, przeciwdrobnoustrojowe, przeciwcukrzycowe, neuroprotektoryjne czy przeciwutleniające. Wpływają korzystnie na układ krwionośny oraz narząd wzroku. W roślinach owadożernych wyizolowano flawonoidy takie jak kwercetyna z *Nepenthes anamensis* Macfarlane (Kováčik i wsp., 2012), kaempferol z *Drosera capensis* L. (Kováčik i wsp., 2012) czy mirycetyna z *Drosera muscipula* J.Ellis (Królicka i wsp., 2008). Oznaczono także antocyjany: cyjanidynę z *Sarracenia leucophylla* Raf. (Sheridan i Griesbach, 2001), cyjanidyno-3-O-glukozyd z *Drosera muscipula* J. Ellis (Hearejos-Escudero, 2018) czy cyjanidyno-3-O-galaktozyd z *Nepenthes x ventrata* (Dávila-Lara i wsp., 2021). W niniejszej pracy w badaniach strukturalnych FT-IR zaobserwowano silne pasma od pochodnych flawanoli takich jak kwercetyna i mirycetyna. W roślinach *Sarracenia purpurea* L. wybranych linii 4#4 i 7#1 odnotowano wzrost ogólnej zawartości związków fenolowych. Zintensyfikowanie syntezy tych związków było znacznie bardziej wydajne w przypadku indukowanych korzeni włósnikowatych w porównaniu do części zielonych. Fenyloalanina i tyrozyna stanowią prekursorzy dla syntezy związków fenolowych, a w badanych liniach zaobserwowano obniżenie ich zawartości. Może to być związane z przekierowaniem tych aminokwasów do syntezy związków fenolowych. Wzrost zawartości związków fenolowych odnotowano także w roślinach *Cucumis anguria* L. poddanych agroinfekcji (Sahayarayan i wsp., 2020). Transformowane rośliny *Dracocephalum moldavica* L. również charakteryzowały się zwiększoną syntezą związków fenolowych (Weremczuk-Jeżyńska i wsp., 2013). Ich zawartość wynosiła od 105 mg GAE/ g ekstraktu w roślinach kontrolnych i do 217 mg GAE/ g ekstraktu w roślinach transformowanych (Weremczuk-Jeżyńska i wsp., 2013). Wykazano, że transformacja roślin *Artemisia tilesii* Ledeb. za pośrednictwem *Rhizobium rhizogenes* wzmocniła biosyntezę flawonoidów na poziomie 2-krotnie wyższym niż w roślinach z grupy kontrolnej (Matvieieva i wsp., 2020). Gabr i wsp. (2018) wykazali 3,5-krotnie wyższy poziom kwasów fenolowych w transformowanych korzeniach *Linum usitatissimum* L. Wzrost poziomu flawonoidów takich jak katechina, mirycetyna i kwercetyna oraz kwasów fenolowych jak kwas galusowy czy kwas chlorogenowy obserwowany był także w korzeniach transformowanych roślin *Momordica charantia* L. w stosunku do roślin kontrolnych (Thiruvengadam i wsp., 2014). W badaniach prowadzonych przez zespół Makowski i wsp. (2021) odnotowano

zwiększoną ilość związków fenolowych i kwasów fenolowych w mucholówce *Dionea muscipula* J. Ellis. poddanej agroinfekcji. Omówione dane skłaniają do stwierdzenia, że transformacja roślin za pośrednictwem bakterii *Rhizobium rhizogenes* zapewnia dość prostą i skuteczną metodę zwiększania zawartości związków fenolowych w tych roślinach. Tak uzyskane tkanki roślinne mogą być dobrym źródłem naturalnych przeciwutleniaczy, a także interesującą platformą do prowadzenia podstawowych badań nad metabolitami wtórnymi wytwarzanymi przez tkanki roślinne.

Chlorofile stanowią grupę barwników lipidowych występujących powszechnie w roślinach. Wyróżnia się dwie główne grupy, tj. niebieskozielony chlorofil A i zielonożółty chlorofil B. Stanowią one dla roślin cząsteczki niezbędne do przeprowadzania procesów fotosyntezy. W prowadzonych badaniach odnotowano wzrost całkowitej zawartości chlorofilu we wszystkich roślinach poddanych agroinfekcji w odniesieniu do roślin kontrolnych. W liniach 4#3, 4#5 i 7#1 wzrost ten był dwukrotny. W roślinach tych zaobserwowano również istotny wzrost ilości chlorofilu A i chlorofilu B. W literaturze istnieje kilka doniesień według których wprowadzony przez bakterie *Rhizobium rhizogenes* gen *rolB* jest odpowiedzialny za adaptację roślin do warunków środowiska oraz utrzymanie ich w dobrej kondycji. Transformowane tkanki wykazują odporność na niekorzystne działanie czynników takich jak stres świetlny, temperatura czy infekcje wywołane przez patogeny (Bulgakov i wsp. 2012, 2013; Arshad i wsp., 2014). W roślinach *Stevia rebaudiana* Bertoni transformowanych za pomocą bakterii *Rhizobium rhizogenes* autorzy wykazali wzrost zawartości chlorofilu o 24% w stosunku do roślin niemodyfikowanych (Sánchez-Cordova i wsp., 2019). Bettini i wsp. (2020) wykazali natomiast w badaniach nad pomidorem, rolę genu *rolB* w modulacji syntezy chlorofilu. Autorzy wykazali, że transformowane pomidory charakteryzowały się także znacznie wyższą zawartością chlorofilu A i B w odniesieniu do kontroli (Bettini i wsp., 2020), co potwierdza wyniki uzyskane w niniejszej pracy. Dodatkowo, jak odnotowano wcześniej, flawonoidy pełnią w roślinach rolę ochronną przed szkodliwym działaniem promieniowania UV. Posiadają one zdolność redukcji transmisji promieniowania przez komórki epidermy, przy zachowanej możliwości przepuszczania promieniowania fotosyntetycznie czynnego (Pilarski i wsp., 2012). Mechanizm ten pozwala chronić materiał genetyczny rośliny uszkodzeń, a także aparat fotosyntetyczny. W niniejszej pracy w liniach *Sarracenia purpurea* L. poddanych agroinfekcji zaobserwowano zarówno wzrost zawartości chlorofilu, jak i związków fenolowych, co może świadczyć o włączeniu opisanych mechanizmów ochronnych u roślin z wbudowanym genomem bakterii *Rhizobium rhizogenes*.

Karotenoidy należą do grupy barwników, a zbudowane są z jednostek izoprenoidowych. Podobnie, jak chlorofile, powszechnie występują w tkankach roślin, wspomagając procesy fotosyntezy i chroniąc rośliny przed szkodliwym działaniem procesów fotooksydacyjnych. Szczególnie istotną funkcją karotenoidów jest ochrona aparatu fotosyntetycznego. Ich potencjał farmakologiczny opiera się na właściwościach przeciwutleniających i immunomodulacyjnych. Są powszechnie wykorzystywane w zapobieganiu chorobom oczu i chorobom układu naczyniowo-sercowego oraz w produkcji kosmetyków fotoprotekcyjnych, a w ostatnich latach bada się możliwości wykorzystania ich w prewencji chorób cywilizacyjnych. W roślinach *Sarracenia purpurea* L. poddanych agroinfekcji odnotowano wzrost zawartości karotenoidów w liniach 4#2, 4#3, 4#4, 4#5 i 7#1 w odniesieniu do roślin kontrolnych. Podobną tendencję wykazali Sánchez-Cordova i wsp. (2019) dla transformowanej *Rhizobium rhizogenes* stewi, u której zawartość karotenów wzrosła o 33% w porównaniu do roślin typu dzikiego.

W badaniach własnych wykazano istotny wzrost masy indukowanych korzeni włósnikowatych z linii 4#3, 4#4, 4#5, 7#1 i 7#2 i był on większy o odpowiednio 79,1% i 176,9% większy w odniesieniu do korzeni roślin niemodyfikowanych. Oprócz przyrostu biomasy, zmieniony fenotyp uzyskanych roślin przejawiał się w zmianach strukturalnych i zdolnościach do wykazywania geotropizmu. Różnice w akumulacji biomasy w korzeniach roślin nietransformowanych oraz korzeniach włósnikowatych opisano już w 1986 roku (Mano i wsp., 1986) w badaniach nad roślinami *Scopolia japonica* Maxim. poddanymi agroinfekcji. Podobne wnioski przedstawiono także dla *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Batra i wsp., 2004). Tendencję tę zaobserwowano w transformowanych za pomocą *Rhizobium rhizogenes* roślinach *Stevia rebaudiana* Bertoni, w których biomasa korzeni była większa o 43% niż w korzeniach roślin kontrolnych (Sánchez-Cordova i wsp., 2019). W badaniach Sahayarayan i wsp. (2020) prowadzonych na roślinach *Cucumis anguria* L. transformowanych przez *Rhizobium rhizogenes* odnotowano różnice w grubości i długości wierzchołków korzeni włósnikowatych. Akumulacja biomasy korzeni w *Cucumis anguria* L. była 2-krotnie większa w porównaniu do korzeni roślin niemodyfikowanych (Sahayarayan i wsp., 2020). Waremczuk-Jeżyna i wsp. (2013) wykazali wzrost akumulacji biomasy korzeni w roślinach *Dracocephalum moldavica* L. w porównaniu do roślin matecznych. Agroinfekcja roślin *Stevia rebaudiana* Bertoni (Sánchez-Cordova i wsp., 2019) oraz *Sarracenia purpurea* L. nie wpłynęła negatywnie na ich parametry wzrostu, co sugeruje, że jest to właściwa strategia dla zastosowań, w których cechą pożądaną jest produkcja biomasy korzeni.

Przeciwutleniacze posiadają zdolność do pochłaniania reaktywnych form tlenu, które mają destrukcyjny wpływ na komórki organizmów żywych. Preparaty z roślin owadożernych posiadają właściwości przeciwutleniające, czego dowodem są badania prowadzone z wykorzystaniem *Drosera burmannii* Vahl. (Ghate, 2015) oraz *Nepenthes khasiana* Hook. f. (Uriah i wsp., 2015). W niniejszej pracy oceniono właściwości przeciwutleniające roślin z gatunku *Sarracenia purpurea* L. W porównaniu do części zielonych roślin kontrolnych pojemność antyoksydacyjna w liniach 4#4, 7#1 i 7#2 wzrosła o odpowiednio 135,4%, 133,9% i 109,7%. Istotny wzrost pojemności antyoksydacyjnej wykazano także dla korzeni włósnikowatych wszystkich uzyskanych linii. Dla linii 4#4, 7#1 i 7#2 był on ponad 2-krotny. Poprawę właściwości przeciwutleniających w roślinach *Dracocephalum moldavica* L. poddanych agroinfekcji odnotowano także w badaniach Weremczuk-Jeżyna i wsp. (2013). Można stwierdzić, że wysoki potencjał antyoksydacyjny tkanek poddanych agroinfekcji powiązany jest ze zwiększoną akumulacją związków fenolowych. Potwierdzają to badania Matwieieva i wsp. (2020), w których wykazano bezpośrednią korelację pomiędzy wzrostem pojemności antyoksydacyjnej, a zwiększoną syntezą flawonoidów w transformowanych roślinach *Artemisia tilesii* Ledeb. Również Gabr i wsp. (2018) wykazali 2,9- i 1,76-krotnie wyższą aktywność przeciwutleniającą w kulturach transformowanych korzeni *Linum usitatissimum* L. w porównaniu do roślin kontrolnych. Lepsze właściwości przeciwutleniające zaobserwowano także u roślin *Momordica charantia* L. poddanych agroinfekcji (Thiruvengadam i wsp., 2014).

W ostatnich latach szczególną uwagę zwraca się na problem lekooporności wśród bakteryjnych szczepów szpitalnych, a coraz częściej także u pacjentów przychodni lekarzy pierwszego kontaktu. Według raportu WHO w 2020 roku 4,95 miliona pacjentów przegrało walkę z zakażeniami bakteriami antybiotykoopornymi (WHO Report, 2022). Dodatkowo Światowa Organizacja Zdrowia zaprezentowała dane, według których pandemia wirusa Covid-19 przyczyniła się do zwiększonej lekooporności szczepów bakterii odpowiedzialnych za zakażenia krwi. Dane te są alarmujące i skłaniają do poszukiwania nowych związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Rośliny owadożerne stanowią potencjalne źródło nowych związków przeciwdrobnoustrojowych. Rośliny z rodzaju *Sarracenia* wykorzystywano w leczeniu zakażeń bakteriami *Mycobacterium tuberculosis* (Moerman, 1998). Wykazano duży potencjał roślin z rodzaju *Drosera* w leczeniu infekcji wywoływanych przez *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* i *Enterococcus faecium* (Ferreina, 2004), zaś roślin z rodzaju *Nepenthes* do hamowania wzrostu bakterii *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*

i *Escherichia coli* (Majeed i wsp., 2016). W niniejszej pracy wykazano właściwości przeciwbakteryjne ekstraktów z części zielonych oraz indukowanych korzeni włośnikowatych *Sarracenia purpurea* L. linii 4#4, 7#1 i 7#2 w stosunku do chorobotwórczych szczepów *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Bacillus cereus*. W porównaniu z roślinami kontrolnymi właściwości te były poprawione. Badania Sahayarayan i wsp. (2020) wykazały wyższą aktywność przeciwbakteryjną transformowanych roślin *Cucumis anguria* L. w odniesieniu do roślin kontrolnych. Miały zdolność do hamowania wzrostu bakterii z gatunku *Escherichia coli*, *Aeromonas salmonicida*, *Cronobacter sakazakii*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus haemolyticus*, a właściwości te były silniejsze w stosunku do bakterii Gram-dodatnich niż Gram-ujemnych. Zaobserwowano zwiększoną aktywność przeciwdrobnoustrojową transformowanych roślin *Momordica charantia* L. w stosunku do bakterii *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* oraz dobrą aktywność przeciwgrzybiczą dla *Aspergillus niger* i *Fusarium oxysporum* (Thiruvengadam i wsp., 2014). W przypadku muchołówki *Dionea muscipula* J. Ellis. wykazano, że transformacja za pomocą *Rhizobium rhizogenes* wpłynęła na zwiększenie właściwości przeciwbakteryjnych, które wzrosły o 33% w stosunku do *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* oraz o 7% w stosunku do *Pseudomonas aeruginosa*, w porównaniu do roślin kontrolnych (Makowski i wsp., 2021).

Rośliny owadożerne stanowią dobry rezerwuar związków o potencjale przeciwnowotworowym. Badania wykazały właściwości cytotoksyczne w stosunku do komórek nowotworowych ekstraktów z dzbanecznika *Nepenthes miranda* (Huang i wsp., 2020) oraz *Drosera indica* L. (Asirvatham i Christina, 2013). Doświadczenia prowadzone przez Ghate i wsp. (2016) udowodniły, że ekstrakty z *Drosera burmanni* Vahl. posiadają duży potencjał do stosowania ich w leczeniu raka piersi. W badaniach własnych podjęto się oceny właściwości przeciwnowotworowych ekstraktów z roślin *Sarracenia purpurea* L. w stosunku do komórek raka przewodowego trzustki. Pomimo wielu badań na całym świecie jest to wciąż nowotwór, który każdego roku jest przyczyną śmierci coraz większej liczby pacjentów. Charakteryzuje się niską wykrywalnością na wczesnych etapach progresji, przy jednocześnie wczesnej i szybkiej zdolności do przerzutowania (Orth i wsp., 2019). Gruczolakorak trzustki, ze względu na wysoki nieprawidłowy rozrost tkanki łącznej, jest jednym z najbardziej chemioopornych rodzajów raka, dlatego powszechnie stosowane metody leczenia są wysoce nieskuteczne, a chorym oferuje się głównie leczenie objawowe i paliatywne (Principe, 2021). Według Orth i wsp. (2019) występuje bezpośrednia korelacja między zachorowalnością na

PDAC, a utrzymywaniem zdrowego trybu życia. Póki co jedyną możliwością walki z nim wydaje się więc być przestrzeganie zasad prawidłowego odżywiania się, zachowywanie higieny snu, aktywność fizyczna i systematyczne wykonywanie badań profilaktycznych. Zwiększa to szanse na wczesne wykrywanie raka trzustki na etapach, na których próby leczenia są jeszcze możliwe. Tak alarmujące dane skłaniają do pilnego opracowywania nowych związków i terapii leczenia pacjentów na każdym etapie progresji PDAC. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują na wysoką toksyczność ekstraktów z *Sarracenia purpurea* L. poddanych agroinfekcji w stosunku do komórek zarówno pierwotnego guza trzustki (linia komórkowa BxPC3), jak i komórek z wodobrzusza pacjenta z rakiem trzustki (linia komórkowa AsPC1). Prawdopodobnie zdolności przeciwnowotworowe wynikają z obecności w tkankach tych roślin związków takich jak związki fenolowe i terpenoidy. Jak wskazują badania Markowski i wsp. (2022) kwas ursolowy posiada duży potencjał w leczeniu gruczolakoraka trzustki. Jednocześnie w badaniach własnych ekstrakty z *Sarracenia purpurea* L. przetestowano na normalnej linii keratynocytów ludzkich (HaCaT) i nie wykazano ich toksycznego wpływu, co jest bardzo dobrym wynikiem ze względu na możliwości stosowania takich preparatów. W przeprowadzonych, jako badania wstępne, testach ekstraktów wodnych badanych roślin na liniach komórkowych, nie zaobserwowano oczekiwanych właściwości przeciwnowotworowych. Celowym jest więc stosowanie ekstraktów etanolowych roślin kompozytowych *Sarracenia purpurea* L. w przyszłych etapach badań.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań wskazują na duży potencjał farmakologiczny *Sarracenia purpurea* L. poddanych agroinfekcji za pomocą bakterii *Rhizobium rhizogenes* szczep 15834. Aplikacyjny potencjał uzyskanych roślin związany jest z jednej strony z możliwością izolowania z nich czystych związków bioaktywnych takich jak kwas betulinowy, czy kwercetyna, z drugiej strony z możliwością stosowania ich ekstraktów w terapii nowotworu trzustki i zakażeń bakteryjnych. Prezentowane badania stanowią punkt wyjścia dla przyszłych badań *in vitro* oraz *in vivo* nad bezpieczeństwem preparatów powstałych z wykorzystaniem *Sarracenia purpurea* L. Ze względu na wykazany potencjał badanych roślin istotnym będzie przeprowadzenie rozszerzonych analiz cytotoksyczności ekstraktów *S.purpurea* L. z wykorzystaniem zdrowych komórek trzustki, które mogłyby potwierdzić wyniki niniejszej pracy sugerujące bezpieczeństwo ich stosowania. Dobrym kierunkiem byłoby określenie aktywności przeciwnowotworowej badanych ekstraktów w stosunku do linii komórkowych innych organów w obrębie układu pokarmowego, np. linii komórkowej raka żołądka, jelita cienkiego lub okrężnicy. Istotnym aspektem byłoby dokładne zbadanie

mechanizmów działania ekstraktów z roślin kompozytowych *S.purpurea* L., a także poszczególnych ich komponentów na funkcjonowanie komórek badanych linii komórkowych. Ważnym, z punktu widzenia właściwości przeciwnowotworowych ekstraktów *S.purpurea* L. w stosunku do PDAC, byłoby określenie parametrów farmakokinetyki o biodostępności. Ponadto celowe wydają się być również rozszerzone badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej, w tym testy z uwzględnieniem patogennych szczepów grzybów strzępkowych i wirusów oraz odpornych na antybiotyki szczepów bakterii chorobotwórczych. Ekstrakty roślinne mogą działać synergistycznie z powszechnie stosowanymi antybiotykami, co może mieć potencjał w leczeniu antybiotykoopornych szczepów klinicznych, w związku z tym istotnym kierunkiem przyszłych badań nad uzyskanymi roślinami, byłoby zbadanie synergii z antybiotykami ostatniej szansy stosowanymi w leczeniu najgroźniejszych szczepów szpitalnych. Ze względu na potencjał antyoksydacyjnych ekstraktów opisanych w niniejszej rozprawie, warto poddać je analizie z zastosowaniem zdrowych komórek skóry oraz przeprowadzić badania na modelach skóry, co pomoże określić możliwość stosowania uzyskanych roślin do produkcji kosmetyków i nutraceutyków.

6. Wnioski końcowe

1. Transformacja genetyczna roślin owadożernych z gatunku *Sarracenia purpurea* L. możliwa jest dzięki wykorzystaniu Gram-ujemnych bakterii glebowych szczepu *Rhizobium rhizogenes* ATCC 15834. Koniecznym jest zastosowanie metody iniekcji eksplantatów roślinnych zawiesiną bakterii.
2. Zaobserwowano, że przeprowadzona agroinfekcja wpłynęła pozytywnie na wzrost masy indukowanych korzeni.
3. Optymalne warunki wzrostu i produkcji metabolitów drugorzędowych *Sarracenia purpurea* L. w kulturach *in vitro* obejmują następujące parametry: pH pożywki 6,6; zawartość MS 1,46 g/L; zawartość agaru 0,8%; fotoperiod o stosunku dnia do nocy 16h: 8h; wilgotność 65%; natężenie światła białego 40 $\mu\text{mol/s/m}^2$.
4. Największą wydajność ekstrakcji związków bioaktywnych z *Sarracenia purpurea* L. pochodzących z kultur *in vitro* osiągnięto przy zastosowaniu następujących parametrów procesu: temperatura: 60°C; czas ekstrakcji: 10 minut; stężenie etanolu: 64%, fale ultradźwiękowe.
5. Rośliny z gatunku *Sarracenia purpurea* L. stanowią bogaty rezerwuar związków biologicznie czynnych. Należą do nich m.in. związki polifenolowe, triterpeny oraz pochodne naftochinonu. Transformacja *S.purpurea* L. za pomocą *Rhizobium rhizogenes* spowodowała zwiększoną syntezę związków bioaktywnych i wpłynęła na poprawę potencjału antyoksydacyjnego ekstraktów pochodzących z roślin modyfikowanych.
6. Zaobserwowano, że całkowita zawartość 12 z 18 badanych aminokwasów w indukowanych korzeniach włosnikowatych była mniejsza w porównaniu do korzeni roślin kontrolnych.
7. Wykazano, że zawartość pektyn w ścianach komórkowych roślin poddanych agroinfekcji była większa w porównaniu do roślin typu dzikiego.
8. Zaobserwowano pozytywny wpływ transformacji na stan fizjologiczny roślin, co szczególnie uwidoczniło się przez zwiększenie zawartości barwników fotosyntetycznie czynnych w uzyskanych liniach *S.purpurea* L. w porównaniu do roślin kontrolnych, nie poddanych modyfikacji.
9. W pracy wykazano, że ekstrakty z modyfikowanych roślin *Sarracenia purpurea* L., poddanych agroinfekcji, posiadają poprawione właściwości przeciwdrobnoustrojowe w stosunku do chorobotwórczych szczepów bakterii *Escherichia coli*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi* oraz *Staphylococcus aureus* w porównaniu do ekstraktów z roślin niemodyfikowanych.

10. Nie odnotowano cytotoksyczności ekstraktów etanolowych z roślin kompozytowych *Sarracenia purpurea* L. w stosunku do zdrowych komórek keratynocytów ludzkich oraz epitelialnych komórek jajnika chomika chińskiego.
11. Obserwowano wysoką cytotoksyczność ekstraktów etanolowych z roślin kompozytowych *S.purpurea* L. w stosunku do dwóch linii komórkowych gruczolakoraka trzustki (PDAC)- pierwotnego BxPC3 i przerzutowego AsPC1.

7. Literatura

1. Adamec, L. (2010). Dark respiration of leaves and traps of terrestrial carnivorous plants: are there greater energetic costs in traps? *Central European Journal of Biology*, 5(1), 121–124.
2. Adlassing, W., Peroutka, M., Lambers, H., Lichtscheidl, I. K. (2005). The roots of carnivorous plants. *Plant and Soil*, 274, 127-140.
3. Adlassing, W., Peroutka, M., Lambert, H., Lichtscheidl, I. K. (2005). The roots of carnivorous plants. *Plant Soil*, 2: 201-203.
4. Adlassnig, W., Peroutka, M., Lendl, T. (2011). Traps of carnivorous pitcher plants as a habitat: composition of the fluid, biodiversity and mutualistic activities. *Annals of Botany*, 107(2), 181-194.
5. Agostini, E., Talano, M. A., González, P. S., Oller A. L. W., Medina, M. I. (2013). Application of hairy roots for phytoremediation: what makes them an interesting tool for this purpose? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(3), 1017-1030.
6. Ahlawat, S., Saxena, P., Ram, M., Alam, P., Nafis, T., Mohd, A., Abdin, M. Z. (2012). Influence of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots for enhanced production of artemisinin in *Artemisia annua* L. plants. *African Journal of Biotechnology*, 11(5), 8684–8691.
7. Ahmadi Moghadam, Y., Piri, K., Bahramnejad, B., Ghiasvand, T. (2014). Dopamine production in hairy root cultures of *Portulaca oleracea* (Purslane) using *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 16(2), 409–420.
8. Akasaka, Y., Mii, M., Daimon, H. (1998). Morphological alterations and root nodule formation in *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transgenic hairy roots of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Annals of Botany*, 81(2), 355-362.
9. Alberto, D. L., Reichelt, M., Wang, D., Vogel, H., Mithöfer, A. (2021). Proof of anthocyanins in the carnivorous plant genus *Nepenthes*. *FEBS Open Bio*, 11(9), 2576-2585.
10. Alpizar, E., Dechamp, E., Espeout, S., Royer, M., Lecouls, A. C., Nicole, M., Bertrand, B., Lashermes, P., Etienne, H. (2006). Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. *Plant Cell Reports*, 25, 959-967.

11. Álvarez, S., Gómez-Bellot, M. J., Castillo, M., Banon, S., Sánchez-Blanco, M. J. (2012). Osmotic and saline effect on growth, water relations, and ion uptake and translocation in *Phlomis purpurea* plants. *Environmental and Experimental Botany*, 78, 138-145.
12. Annis, J. (2016). Seeing red in a sea of green: Anthocyanin production in a carnivorous plant, *Pinguicula planifolia*.
13. Arndt, W., Mitnik, C., Denzler, K.L., White, S., Waters, R., Jacobs, B.L., Rochon, Y., Olson, V.A., Damon, I.K., Langland, J.O. (2012). *In vitro* characterization in nineteenth-century therapy for smallpox. *PLoS One*, 3(7), 32610.
14. Arshad, W., Haq, I. U., Waheed, M. T., Mysore, K. S., Mirza, B. (2014). *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato with *rolB* gene results in enhancement of fruit quality and foliar resistance against fungal pathogens. *PLoS one*, 9(5), e96979.
15. Atanasov, A.G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, A.M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E.H., Rollinger, J.M., Schuster, D., Breuss, J.M., Bochkov, V., Mihovilovic, M.D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V.M., Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1582–1614.
16. Bandurska, K., Berdowska, A., Król, M. (2016). Transformacja roślin leczniczych za pomocą *Agrobacterium tumefaciens*. *Advances in Hygiene & Experimental Medicine/Postepy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 70.
17. Bandurska, K., Berdowska, A., Król, M. (2016). Transformacja roślin leczniczych za pomocą *Agrobacterium tumefaciens*. *Advances in Hygiene & Experimental Medicine/Postepy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 70.
18. Batra, J., Dutta, A., Singh, D., Kumar, S., Sen, J. (2004). Growth and terpenoid indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy root clones in relation to left-and right-termini-linked *Ri* T-DNA gene integration. *Plant Cell Reports*, 23, 148-154.
19. Battineni, J. K., Koneti, P. K., Bakshi, V., Boggula, N. (2018). Triterpenoids: A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(2), 91-9.
20. Bauer, U., Grafe, T. U., Federle, W. (2011). Evidence for alternative trapping strategies in two forms of the pitcher plant, *Nepenthes rafflesiana*. *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3683-3692.
21. Beaulieu, L.P., Harris, C.S., Saleem, A., Cuerrier, A., Haddad, P.S., Martineau, L.C., Bennett, S.A., Arnason, J.T. (2009). Inhibitory effect of the Cree traditional medicine

- wiishichimanaanh (*Vaccinium vitis-idaea*) on advanced glycation endproduct formation: Identification of active principles. *Phytotherapy Research*, 24(5), 741–747.
22. Benlioglu, B., Tuna, D. E., Birsin, M. A., Ozgen, A. M. (2015). Effect of growth regulators on tissue culture parameters in rice (*Oryza sativa* L.). *Ekin Journal of Crop Breeding and Genetics*, 1(2), 43–46.
 23. Bettini, P. P., Lazzara, L., Massi, L., Fani, F., Mauro, M. L. (2020). Effect of far-red light exposure on photosynthesis and photoprotection in tomato plants transgenic for the *Agrobacterium rhizogenes rolB* gene. *Journal of plant physiology*, 245, 153095.
 24. Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Bécard, G., Rosenberg, C., & Barker, D. G. (2001). *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(6), 695-700.
 25. Bosselut, N., Van Ghelder, C., Claverie, M., Voisin, R., Onesto, J.P., Rosso, M.N., Esmenjaud, D. (2011). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Prunus* as an alternative for gene functional analysis in hairy-roots and composite plants. *Plant Cell Reports*, 30(7), 1313–1326.
 26. Bosselut, N., Van Ghelder, C., Claverie, M., Voisin, R., Onesto, J. P., Rosso, M. N., & Esmenjaud, D. (2011). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Prunus* as an alternative for gene functional analysis in hairy-roots and composite plants. *Plant cell reports*, 30(7), 1313-1326.
 27. Bott, T., Meyer, G. A., & Young, E. B. (2008). Nutrient limitation and morphological plasticity of the carnivorous pitcher plant *Sarracenia purpurea* in contrasting wetland environments. *New Phytologist*, 180(3), 631-641.
 28. Bournival, J., Francoer, M.A., Renaud, J., Martinoli, M.G. (2012). Quercetin and sesamin protect neuronal PC12 cells from high-glucose-induced oxidation, nitrosative stress, and apoptosis. *Rejuvenation Research*, 15(3), 322-333.
 29. Bringmann, G., Saeb, W., Assi, L. A., Francois, G., Narayanan, A. S., Peters, K., Peters, E. M. (1997). Betulinic acid: isolation from *Triphyophyllum peltatum* and *Ancistrocladus heyneanus*, antimalarial activity, and crystal structure of the benzyl ester. *Planta medica*, 63(03), 255-257.
 30. Bubalo, M.C., Ćurko, N., Tomašević, M., Ganić, K.K., Redovniković, I.R. (2016). Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 200, 159–166.

31. Bulgakov, V. P., Gorpenchenko, T. Y., Veremeichik, G. N., Shkryl, Y. N., Tchernoded, G. K., Bulgakov, D. V., Aminin, D. L., Zhuravlev, Y. N. (2012). The *rolB* gene suppresses reactive oxygen species in transformed plant cells through the sustained activation of antioxidant defense. *Plant Physiology*, 158(3), 1371-1381.
32. Bulgakov, V. P., Shkryl, Y. N., Veremeichik, G. N., Gorpenchenko, T. Y., Vereshchagina, Y. V. (2013). Recent advances in the understanding of *Agrobacterium rhizogenes*-derived genes and their effects on stress resistance and plant metabolism. *Biotechnology of hairy root systems*, 1-22.
33. Burle, J.R., Boussac, A., Bouallais, C., Berger, G., Mattioli, T., Mioskowski, C., Nabedryk, E., Breton, J. (1995). FTIR Spectroscopy of UV-Generated Quinone Radicals: Evidence for an Intramolecular Hydrogen Atom Transfer in Ubiquinone, Naphthoquinone, and Plastoquinone. *Journal of Physical Chemistry*, 99(12), 4059-4070.
34. Campos, G.J., Chacon, T.C., Cova, F.J., Flores, S.A., Rojas, J.A., Risso, A.J., Zerpa Gonzalez, H.A. (2013). Evaluation of the local analgesic effects of a commercial aqueous extract of *Sarracenia purpurea* and ammonium sulfate in equine abaxial sesamoid block model. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(11), 1004–1007.
35. Cárdenas, P.D., Almeida, A., Bak, S. (2019). Evolution of structural diversity of triterpenoids. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1523.
36. Chandramu, C., Manohar, R. D., Krupadanam, D. G., Dashavantha, R. V. (2003). Isolation, characterization and biological activity of betulinic acid and ursolic acid from *Vitex negundo* L. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 17(2), 129-134.
37. Chang, M. (2011). Protease production and *in vitro* growth of *Sarracenia purpurea* (Doctoral dissertation).
38. Chen, L., Zhang, Z., Liang, H., Liu, H., Du, L., Xu, H., et al. (2008). Overexpression of TiERF1 enhances resistance to sharp eyespot in transgenic wheat. *Journal of Experimental Botany*; 59(15), 4195–4204.
39. Chinnusamy, V., Zhu, J. K. (2009). Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current opinion in plant biology*, 12(2), 133-139.
40. Chowdhury, A. R., Mandal, S., Mitra, B., Sharma, S., Mukhopadhyay, S., Majumder, H. K. (2002). Betulinic acid, a potent inhibitor of eukaryotic topoisomerase I:

- identification of the inhibitory step, the major functional group responsible and development of more potent derivatives. *Medical Science Monitor*, 8(7), 254-260.
41. Cichewicz, R.H., Kouzi, S.A. (2004). Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Medicinal Research Reviews*, 24(1), 90–114.
 42. Cieniak, C., Walshe- Rouseel, B., Liu R., Muhammad, A., Saleem, A., Haddad, P.S., Cuerrier, A., Foster, B.C., Arnason, J.T. (2015). Phytochemical comparison of the water and ethanol leaf extracts of the Cree medicinal plant, *Sarracenia purpurea* L. (*Sarraceniaceae*). *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 18(4), 484-493.
 43. Clarke, C., Cross, A., Rice, B. (2018). Conservation of carnivorous plants. *In Carnivorous plants: physiology, ecology, and evolution*, 375-388.
 44. Contardo-Jara, V., Schwanemann, T., Esterhuizen-Londt, M., Pflugmacher, S. (2018). Protein association of β -N-methylamino-L-alanine in *Triticum aestivum* via irrigation. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35 (4), 732–740.
 45. Corson, T.W., Crews, C.M. (2007). Molecular understanding and modern application of traditional medicines: triumphs and trials. *Cell*, 130(5), 769–774.
 46. Crouch, I. J., Finnie, J. F., Van Staden, J. (1990). Studies on the isolation of plumbagin from in vitro and in vivo grown *Drosera species*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 21, 79-82.
 47. Dabetić, N., Todorović, V., Panić, M., Radojčić Redovniković, I., Šobajić, S. (2020). Impact of deep eutectic solvents on extraction of polyphenols from grape seeds and skin. *Applied Sciences*, 10(14), 4830.
 48. Darwin, Ch. (1875). Insectivorous plants. *John Murray*, London.
 49. Dash, P. K. (2016). Carnivorous plants of Odisha. *Odisha Biodiversity Board, Bhubaneswar*, 1- 40.
 50. Dávila-Lara, A., Reichelt, M., Wang, D., Vogel, H., Mithöfer, A. (2021). Proof of anthocyanins in the carnivorous plant genus *Nepenthes*. *FEBS Open bio*, 11(9), 2576-2585.
 51. Davioud, E., Petit, A., Tate, M. E., Ryder, M. H., Tempé, J. (1988). Cucumopine—a new T-DNA-encoded opine in hairy root and crown gall. *Phytochemistry*, 27(8), 2429-2433.

52. De la Riva, G., Gonzalez- Cabrera, J., Vazquez- Padrón, R., Ayra- Pardo, C. (1998). *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3), 24-25.
53. De los Ángeles Fernández, M., Espino, M., Gomez, F. J. V., Silva, M. F. (2018). Novel approaches mediated by tailor-made green solvents for the extraction of phenolic compounds from agro-food industrial by-products. *Food Chemistry*, 239, 671–678.
54. De Paolis, A., Mauro, H. L., Pompom, M., Cardarelli, M., Spano, L., Constantino, P. (1985). Localization of agropine synthesizing functions in the TR region of the root inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* 1855. *Plasmid*, 13(1), 1-7.
55. Dehelean, C. A., Pinzaru, S. C., Peev, C. I., Antal, D. (2007). Characterization of birch tree leaves, buds and bark dry extracts with antitumor activity. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 9(3), 783-787.
56. Dehghan, E., Häkkinen, S. T., Oksman-Caldentey, K. M., Shahriari Ahmadi, F. (2012). Production of tropane alkaloids in diploid and tetraploid plants and *in vitro* hairy root cultures of Egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 110, 35-44.
57. Deka, N., Devi, N. (2015). Aquatic angiosperm of BTC area, Assam with reference to their traditional uses. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5(5), 9–13.
58. Di Giusto, B., Bessière, J. M., Guérout, M., Lim, L. B., Marshall, D. J., Hossaert-McKey, M., Gaume, L. (2010). Flower-scent mimicry masks a deadly trap in the carnivorous plant *Nepenthes rafflesiana*. *Journal of Ecology*, 98(4), 845-856.
59. Didry, N., Dubreuil, L., Trotin, F., Pinkas, M. (1998). Antimicrobial activity of aerial parts of *Drosera peltata* Smith on oral bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 60(1), 91–96.
60. Ding, B., Wang, G. L. (2015). Chromatin versus pathogens: the function of epigenetics in plant immunity. *Frontiers in plant science*, 6, 675.
61. Divaka, M. C., John, J., Vyshnavidevi, P. (2013). Herbal remedies of Madayipara hillock tribals in Kannur district, Kerala, India. *Journal of Medicinal Plants*, 16, 34–42.
62. Dürrenberger, F., Cramer, A., Hohn, B., Koukoliková-Nicola, Z. (1989). Covalently bound VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* protects the T-DNA from exonucleolytic degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(23), 9154- 9158.

63. Eid, H. M., Martineau, L. C., Saleem, A., Muhammad, A., Vallerand, D., Benhaddou-Andaloussi, A., Nistor, L., Afshar, A., Arnason, J. T., Haddad, P. S. (2010). Stimulation of AMP-activated protein kinase and enhancement of basal glucose uptake in muscle cells by quercetin and quercetin glycosides, active principles of the antidiabetic medicinal plant *Vaccinium vitisidaea*. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54(7), 991–1003.
64. Eilenberg, H., Pnini-Cohen, S., Rahamim, Y., Sionov, E., Segal, E., Carmeli, S., Zilberstein, A. (2010). Induced production of antifungal naphthoquinones in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. *Journal of Experimental Botany*, 61(3), 911–922.
65. Ellison, A. M., Gotelli, N. J. (2002). Nitrogen availability alters the expression of carnivory in the northern pitcher plant, *Sarracenia purpurea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(7), 4409-4412.
66. Espinosa- Leal, C. A., Puente- Garza, C. A., García- Lara, S. (2018). *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248, 1-18.
67. Etkin, N. L. (2008). An ethnobotany of Darwin’s gardens. *Ethnobotany Researche and Applications*, 6, 325–334.
68. Faiss, M., Strnad, M., Redig, P., Doležal, K., Hanuš, J., Van Onckelen, H., Schmülling, T. (1996). Chemically induced expression of the rolC-encoded β -glucosidase in transgenic tobacco plants and analysis of cytokinin metabolism: rolC does not hydrolyze endogenous cytokinin glucosides in planta. *The Plant Journal*, 10(1), 33-46.
69. Fan, Y. L., Zhang, X. H., Zhong, L. J., Wang, X. Y., Jin, L. S., Lyu, S. H. (2020). One-step generation of composite soybean plants with transgenic roots by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. *BMC plant biology*, 20(1), 1-11.
70. Ferreira, D.T., Andrei, C.C., Saridakis, H.O., Faria, T.J., Vinhato, E., Carvalho, K.E., Daniel, J.F.S., Machado, L.S., Saridakis, D.P., Filho, R.B. (2004). Antimicrobial activity and chemical investigation of brazilian *Drosera*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(7): 753–755.
71. Flores, H. E., Dai, J., Cuello, J. L., Maldonado- Mendoza, I. E., Loyola- Vargas, V. M. (1993). Green roots: photosynthesis and photoautotrophy in an underground plant organ. *Plant Physiology*, 101(2), 363- 371.

72. Foo, L. Y., Lu, Y., Molan, A. L., Woodfield, D. R., McNabb, W. C. (2000). The phenols and prodelphinidins of white clover flowers. *Phytochemistry*, 54(5), 539-548.
73. Foot, G., Rice, S. P., Millett, J. (2014). Red trap colour of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia* does not serve a prey attraction or camouflage function. *Biology letters*, 10(4), 20131024.
74. Foti, C., Pavli, O. I. (2020). High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transgenic hairy root induction of *Lens culinaris*. *Agronomy*, 10(8), 1170.
75. Foti, C., Pavli, O. I. (2020). High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transgenic hairy root induction of *Lens culinaris*. *Agronomy*, 10(8), 1170.
76. Frighetto, R. T., Welendorf, R. M., Nigro, E. N., Frighetto, N., Siani, A. C. (2008). Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography. *Food Chemistry*, 106(2), 767-771.
77. Fujioka, T., Kashiwada, Y., Kilkuskie, R. E., Cosentino, L. M., Ballas, L. M., Jiang, J. B., Janzen, W. P., Chen, I. S., Lee, K. H. (1994). Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. *Journal of natural products*, 57(2), 243-247.
78. Fulda, S. (2008). Betulinic acid for cancer treatment and prevention. *International journal of molecular sciences*, 9(6), 1096-1107.
79. Gabr, A. M., Mabrok, H. B., Abdel-Rahim, E. A., El-Bahr, M. K., Smetanska, I. (2018). Determination of lignans, phenolic acids and antioxidant capacity in transformed hairy root culture of *Linum usitatissimum*. *Natural product research*, 32(15), 1867-1871.
80. Gai, Q.Y., Jiao, J., Luo, M., Wei, Z.F., Zu, Y.G., Ma, W., Fu, Y.J. (2015). Establishment of Hairy Root Cultures by *Agrobacterium Rhizogenes* mediated transformation of *Isatis tinctoria* L. for the efficient production of flavonoids and evaluation of antioxidant activities. *PLoS ONE*, 10(3), e0119022.
81. Gallie, D. R., Chang, S. C. (1997). Signal transduction in the carnivorous plant *Sarracenia purpurea* (Regulation of secretory hydrolase expression during development and in response to resources). *Plant Physiology*, 115(4), 1461-1471.
82. Gaume, A., Komarnytsky, S., Borisjuk, N., Raskin, I. (2003). Rhizosecretion of recombinant proteins from plant hairy roots. *Plant Cell Reports*, 21, 1188-1193.

83. Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16-37.
84. Geng, L., Niu, L., Gresshoff, P. M., Shu, C., Song, F., Huang, D., Zhang, J. (2012). Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 109, 491-500.
85. Geng, L., Niu, L., Gresshoff, P. M., Shu, C., Song, F., Huang, D., Zhang, J. (2012). Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 109, 491-500.
86. Geng, L., Niu, L., Gresshoff, P. M., Shu, C., Song, F., Huang, D., Zhang, J. (2012). Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 109, 491-500.
87. Ghate, N. B., Chaudhuri, D., Das, A., Panja, S., Mandal, N. (2015). An antioxidant extract of the insectivorous plant *Drosera burmannii* Vahl. alleviates iron-induced oxidative stress and hepatic injury in mice. *PLoS ONE*, 10 (5), e0128221.
88. Ghiulai, R., Roșca, O. J., Antal, D. S., Mioc, M., Mioc, A., Racoviceanu, R., Macașoi, I., Olariu, T., Dehelean, C., Crețu, O. M., Voicu, M., Șoica, C. (2020). Tetracyclic and pentacyclic triterpenes with high therapeutic efficiency in wound healing approaches. *Molecules*, 25(23), 5557.
89. Głobińska, A., Kowalski, M. L. (2013). Interferon alfa: perspektywy zastosowania w leczeniu wirusowych zakażeń dróg oddechowych. *Alergia Astma Immunologia*, 18(2): 97-103.
90. Goldblatt, J. A. C. K. (1988). Type I Gaucher disease. *Journal of medical genetics*, 25(6), 415.
91. Gołąb, J., Jakóbisiak, M., Zagożdżon, R., & Obłąkowski, P. (2004). Cytokiny. W: Gołąb J., Jakóbisiak M., Lasek W.(red.): *Immunologia. Wydawnictwo Naukowe PWN*, Warszawa, 198-248.
92. Gołąb, J., Jakóbisiak, M., Zagożdżon, R., Obłąkowski, P. (2004). Cytokiny. W: *Immunologia, Wydawnictwo Naukowe PWN*, Warszawa, 108-153.

93. Gomes, C., Dupas, A., Pagano, A., Grima-Pettenati, J., Paiba, J. A. P. (2019). Hairy root transformation: a useful tool to explore gene function and expression in *Salix* spp. recalcitrant to transformation. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1427.
94. Gotelli, N. J., Ellison, A. M. (2006). Food-web models predict species abundances in response to habitat change. *PLOS Biology*, 4(10), 324.
95. Grabowski, G. A., Golembo, M., Shaaltiel, Y. (2014). Taliglucerase alfa: an enzyme replacement therapy using plant cell expression technology. *Molecular Genetics and Metabolism*, 112(1), 1-8.
96. Guerineau, F., Mai, N. T. P., Boitel-Conti, M. (2020). *Arabidopsis* hairy roots producing high level of active human gastric lipase. *Molecular Biotechnology*, 62, 168–176.
97. Gurusamy, P. D., Schäfer, H., Ramamoorthy, S., Wink, M. (2017). Biologically active recombinant human erythropoietin expressed in hairy root cultures and regenerated plantlets of *Nicotiana tabacum* L. *PloS One*, 12(8), e0182367.
98. 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. *Frontiers in plant science*, 11, 33.
99. Gutzat, R., Scheid, O. M. (2012). Epigenetic responses to stress: triple defense? *Current opinion in plant biology*, 15(5), 568-573.
100. Haberlandt, G. (1902). Experiments on the culture of isolated plant cells. *The Botanical Review*, 35, 68-85.
101. Häkkinen, S. T., Raven, N., Henquet, M., Laukkanen, M. L., Anderlei, T., Pitkänen, J. P., Twyman, R. M., Bosch, D., Oksman-Caldentey, K.M., Schillberg, S., Ritala, A. (2014). Molecular farming in tobacco hairy roots by triggering the secretion of a pharmaceutical antibody. *Biotechnology and bioengineering*, 111(2), 336-346.
102. Hansen, G., Wright, M. S. (1999). Recent advances in the transformation of plants. *Trends in plant science*, 4(6), 226-231.
103. Hansen, J., Jørgensen, J. E., Stougaard, J., Marcker, K. A. (1989). Hairy roots—a short cut to transgenic root nodules. *Plant Cell Reports*, 8, 12-15.
104. Hanuza, J., Godlewska, P., Kucharska, E., Ptak, M., Kopacz, M., Mączka, M., Hermanowicz, K., Macalik, L. (2017). Molecular structure and vibrational spectra of quercetin and quercetin-5'-sulfonic acid -DFT quantum chemical calculations. *Vibrational Spectroscopy*, 88, 94-105.

105. Harris, C. S., Asim, M., Saleem, A., Haddad, P. S., Arnason, J. T., Bennett, S. A. (2012). Characterizing the cytoprotective activity of *Sarracenia purpurea* L., a medicinal plant that inhibits glucotoxicity in PC12 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 1-10.
106. Harris, C.S., Beaulieu, L.P., Fraser, M.H., McIntyre, K.L., Owen, P.L., Martineau, L.C., Cuerrier, A., Johns, T., Haddad, P.S., Bennett, S.A., Arnason, J.T. (2011). Inhibition of advanced glycation end product formation by medicinal plant extracts correlates with phenolic metabolites and antioxidant activity. *Planta Medica*, 77(02), 196–204.
107. Harun, N. H., Septama, A. W., Ahmad, W. A. N. W., Suppian, R. (2020). Immunomodulatory effects and structure-activity relationship of botanical pentacyclic triterpenes: A review. *Chinese Herbal Medicines*, 12(2), 118-124.
108. Hashemi, S. M., Naghavi, M. R. (2016). Production and gene expression of morphinan alkaloids in hairy root culture of *Papaver orientale* L. using abiotic elicitors. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 125, 31–41.
109. Hatcher, C. R., Ryves, D. B., Millett, J. (2020). The function of secondary metabolites in plant carnivory. *Annals of Botany*, 125(3), 399-411.
110. Hema, B., Bhupendra, S., Mohamed Saleem, T. S., Gauthaman, K. (2009). Anticonvulsant effect of *Drosera burmannii* Vahl. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 2(3), 1-4.
111. Henarejos-Escudero, P., Guadarrama-Flores, B., García-Carmona, F., Gandía-Herrero, F. (2018). Digestive glands extraction and precise pigment analysis support the exclusion of the carnivorous plant *Dionaea muscipula* Ellis from the Caryophyllales order. *Plant Science*, 274, 342–348.
112. Hnatuszko-Konka, K., Łuchniak, P., Wiktorek-Smagur, A., Gerszberg, A., Kowalczyk, T., Kononowicz, A. K. (2009). Transformacja roślin za pośrednictwem *Agrobacterium rhizogenes*. *Postępy Biologii Komórki. Suplement*, 25, 189–200.
113. Hogan, D. M., Walbridge, M. R. (2007). Urbanization and nutrient retention in freshwater riparian wetlands. *Ecological Applications*, 17(4), 1142-1155.
114. Hooykaas, P. J. J., Schilperoort, R. A. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *10 Years Molecular Biology*, 15- 38.
115. Hu, J. F., Starks, C. M., Williams, R. B., Rice, S. M., Norman, V. L., Olson, K. M., Hough, G. W., Goering, M. G., O’Neil-Johnson, M., Eldrige, G. R. (2009). Secoiridoid

- glycosides from the Pitcher Plant *Sarracenia alata*. *Helvetica Chimica Acta*, 92(2), 273–280.
116. Huang, Y. H., Lien, Y., Chen, J. H., Lin, E. S., Huang, C.Y. (2020). Identification and characterization of dihydropyrimidinase inhibited by plumbagin isolated from *Nepenthes miranda* extract. *Biochimie*, 171, 124–135.
 117. Huguet, A. I., del Carmen Recio, M., Máñez, S., Giner, R. M., Ríos, J. L. (2000). Effect of triterpenoids on the inflammation induced by protein kinase C activators, neuronally acting irritants and other agents. *European Journal of Pharmacology*, 410(1), 69-81.
 118. ISO 10993-5:2009 Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for *in vitro* Cytotoxicity; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2009.
 119. Jalalipour Parizi, K., Rahpeyma, S. A., Pourseyedi, S. (2020). The novel paclitaxel-producing system: establishment of *Corylus avellana* L. hairy root culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 56, 290-297.
 120. Jarman, S. J., Crowden, R. K. (1977). The occurrence of flavonol arabinosides in the *Epacridaceae*. *Phytochemistry*, 16(7), 929-930.
 121. Joyeux, M., Lobstein, A., Anton, R., Mortier, F. (1995). Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from *Ginkgo* and some flavonoids. *Planta medica*, 61(02), 126-129.
 122. Juniper, B. E., Robins, R. J., Joel, D. M. (1989). The carnivorous plants. *Academic Press*, London.
 123. Kaiser, J. (2008). Is the drought over for pharming? *Science*, 320(5875), 473- 475.
 124. Kannan, L., Kumar, A., Kumar, A., Jacobs, B., Langland, J. (2020). Anti-herpes virus activity of the carnivorous botanical, *Sarracenia purpurea*. *Scientific Reports*, 10(1), 18953.
 125. Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13), 1222–1239.
 126. Kassi, E., Sourlingas, T. G., Spiliotaki, M., Papoutsis, Z., Pratsinis, H., Aligiannis, N., Moutsatsou, P. (2009). Ursolic acid triggers apoptosis and Bcl-2 downregulation in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer investigation*, 27(7), 723-733.
 127. Khwaza, V., Oyedeji, O. O., Aderibigbe, B. A. (2020). Ursolic acid-based derivatives as potential anti-cancer agents: An update. *International journal of molecular sciences*, 21(16), 5920.

128. Kim, S.R., Sim, J.S., Ajjappala, H., Kim, Y.H., Hahn, B.S. (2012). Expression and large-scale production of the biochemically active human tissue-plasminogen activator in hairy roots of Oriental melon (*Cucumis melo*). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113(1), 106–111.
129. Kinoshita, K., Akiba, M., Saitoh, M., Ye, Y., Koyama, K., Takahashi, K., Kondo, N., Yuasa, H. (1998). Antinociceptive effect of triterpenes from cacti. *Pharmaceutical biology*, 36(1), 50-55.
130. Kołodziejcki, D., Skrzypczak, A., Gilgenast, E., Królicka A., Kamiński, M. (2011). Porównanie efektywności wybranych technik ekstrakcji/ ługowania metabolitów wtórnych z suchego materiału roślin owadożernych z hodowli *in vitro*. *Camera Separatoria*, 3(1), 185-199.
131. Kováčik, J., Klejdus, B., Repčáková, K. (2012). Phenolic metabolites in carnivorous plants: inter-specific comparison and physiological studies. *Plant Physiology and Biochemistry*, 52, 21-27.
132. Kowalczyk, K. (2013). Agrobiotechnologia. *Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie*, Lublin.
133. Kowalczyk, T., Łucka, M., Szemraj, J., Sakowicz, T. (2016). Kultury korzeni włósnikowatych źródłem cennych biofarmaceutyków. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 70, 1-9.
134. Krasuska, U., Dzierżyńska, A., Ciącka, K., Andrzejczak, O., Staszek, P., Gniazdowska, A. (2015). Rośliny mięsożerne jako przykład adaptacji do niesprzyjających warunków środowiska naturalnego. *W: Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosystemu Funkcjonowanie roślin i grzybów. Środowisko – eksperyment – edukacja*, 77-88.
135. Kreuzweiser, J., Scheerer, U., Kruse, J., Burzlaff, T., Honsel, A., Alfarraj, S., Georgiev, P., Schnitzler, J. P., Ghirardo, A., Kreuzer, I., Hedrich, R., Rennenberg, H. (2014). The *Venus flytrap* attracts insects by the release of volatile organic compounds. *Journal of Experimental Botany*, 65(2), 755–766.
136. Krolicka, A., Szpitter, A., Stawujak, K., Baranski, R., Gwizdek-Wisniewska, A., Skrzypczak, A., Kaminski, M., Lojkowska, E. (2010). Teratomas of *Drosera capensis* var. *alba* as a source of naphthoquinone: ramentaceone. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 103, 285-292.
137. Królicka, A., Szpitter, E., Gilgenast, E., Romanik, G., Kamiński, M., Łojkowska, E. (2008). Stimulation of antibacterial naphthoquinones and flavonoids accumulation in

- in vitro carnivorous plants by addition of elicitors. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(3), 216- 221.
138. Kumagai, H., Kouchi, H. (2003). Gene silencing by expression of hairpin RNA in *Lotus japonicus* roots and root nodules. *Molecular plant-microbe interactions*, 16(8), 663-668.
139. Kumar, S., Das, G., Shin, S.H., Patra, J. K. (2017). *Dioscorea* spp. (a wild edible tuber): a study on its ethnopharmacological potential and traditional use by the local people of Similipal Biosphere Reserve, India. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 52.
140. Kumar, S., Thorat, S. S., Labala, R. K., Patra, J. K. (2018). Insectivorous plants of India: sources of bioactive compounds to fight against antimicrobial resistance. *Microbial Biotechnology: Volume 2. Application in Food and Pharmacology*, 305-318.
141. Kuzovkina, I. N., Schneider, B. (2006). Genetically transformed root cultures-generation, properties and application in plant sciences. *Progress in Botany*, 275-314.
142. Kwon, H. J., Shim, J. S., Kim, J. H., Cho, H. Y., Yum, Y. N., Kim, S. H., Yu, J. (2002). Betulinic acid inhibits growth factor-induced *in vitro* angiogenesis via the modulation of mitochondrial function in endothelial cells. *Japanese journal of cancer research*, 93(4), 417-425.
143. Le Flem-Bonhomme, V., Laurain-Mattar, D., Fliniaux, M. A. (2004). Hairy root induction of *Papaver somniferum* var. album, a difficult-to-transform plant, by *A. rhizogenes* LBA 9402. *Planta*, 218, 890–893.
144. Le, A.V., Parks, S. E., Nguyen, M. H., Roach, P. D. (2018). Improving the vanillin-sulphuric acid method for quantifying total saponins. *Technologies*, 6(3), 84.
145. Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, Academic Press, 148, 350-382.
146. Liu, H., Wang, S., Cai, B., Yao, X. (2004). Anticancer activity of compounds isolated from *Engelhardtia serrata* stem bark. *Pharmaceutical biology*, 42(7), 475-477.
147. Liu, Y., Zhu, A., Tan, H., Cao, L., Zhang, R. (2019). Engineering banana endosphere microbiome to improve *Fusarium* wilt resistance in banana. *Microbiome*, 7(1), 1–15.
148. Majeed, S., Mahmud, A. (2016). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Nepenthes* spp. and its bactericidal effect. *Der Pharma Chemica*, 8(19): 279–282.
149. Makowski, W., Królicka, A., Nowicka, A., Zwyrteková, J., Tokarz, B., Pecinka, A., Banasiuk, R., Tokarz, K. M. (2021). Transformed tissue of *Dionaea muscipula* J. Ellis

- as a source of biologically active phenolic compounds with bactericidal properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 1215-1226.
150. Malepszy, S. (2014). *Biotechnologia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
 151. Manchikanti, L., Pampati, V., Rivera, J. J., McManus, C. D., Damron, K. S., Barnhill, R. (2001). Caudal epidural injections with Sarapin or steroids in chronic low back pain. *Pain Physician*, 4(4), 322.
 152. Mano, Y., Nabeshima, S., Matsui, C., Ohkawa, H. (1986). Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica*. *Agricultural and biological chemistry*, 50(11), 2715-2722.
 153. Markowski, A., Jaromin, A., Migdał, P., Olczak, E., Zygmunt, A., Zaremba-Czogalla, M., Pawlik, K., Gubernator, J. (2022). Design and development of a new type of hybrid PLGA/lipid nanoparticle as an ursolic acid delivery system against pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5536.
 154. Marson, J. F. (1863). Report of the trial of *Sarracenia purpurea*, or pitcher plant, in small-pox. *The Lancet*, 82(2079), 6-7.
 155. Marwani, E., Pratiwi, D., Wardhani, K., Esyanti, R. (2015). Development of hairy root culture of *Andrographis paniculata* for in vitro andrographolide production. *Journal of Medicinal and Bioengineering*, 4(6), 446–450.
 156. Matvieieva, N. A., Morgun, B. V., Lakhneko, O. R., Duplij, V. P., Shakhovskiy, A. M., Ratushnyak, Y. I., Sidorenko, M., Mickevicius, S., Yevtushenko, D. P. (2020). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation enhances the antioxidant potential of *Artemisia tilesii* Ledeb. *Plant physiology and biochemistry*, 152, 177-183.
 157. Maxmen, A. (2012). Drug- making plant blooms. *Nature*, 485(7397), 160.
 158. Maxmen, A. (2012). First plant-made drug on the market. *Nature's News Blog*.
 159. Melo, I. R. S., Teixeira, A. M. R., Sena Junior, D. M., Santos, H. S., Albuquerque, M. R. J. R., Bandeira, P. N., Rodrigues, A. S., Braz-Filho, R., Gusmão, G. O. M., Silva, J. H., Faria, J. L. B., Bento, R. R. F. (2014). FT-Raman and FTIR-ATR spectroscopies and DFT calculations of triterpene acetyl aleuritolic acid. *Journal of Molecular Structure*, 1058, 221-227.
 160. Miclea, I. (2022). Secondary metabolites with biomedical applications from plants of the *Sarraceniaceae* family. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 9877.
 161. Miclea, I., Bernat, R. (2018). *In vitro* multiplication of the pitcher plant *Sarracenia purpurea*. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science & Biotechnologies*, 75(2).

162. Mikhaylova, E., Artyukhin, A., Musin, K., Panfilova, M., Gumerova, G., Kuluev, B. (2021). The first report on the induction of hairy roots in *Trapa natans*, a unique aquatic plant with photosynthesizing roots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 144(2), 485–490.
163. Miles, D. H., Kokpol, U., Zalkow, L. H., Steindel, S. J., Nabors, J. B. (1974). Tumor inhibitors I: Preliminary investigation of antitumor activity of *Sarracenia flava*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 63(4), 613–615.
164. Miles, H. Ch. (1862). On the employment of the *Sarracenia purpurea*, or Indian Pitcher Plant, as a remedy for smallpox. *The Lancet*, 80(2042), 430-431.
165. Mitra, S., Mukherjee, S. K. (2010). Ethnomedicinal uses of some wild plants of North Bengal plain for gastro-intestinal problems. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 9(4), 705–712.
166. Moerman, D. E. (1999). Native american ethnobotany. *Edinburgh Journal of Botany*, 56(2), 317-318.
167. Morrison, S. A., Li, H., Webster, D., Johanson, J. A., Gray, C. A. (2016). Antimycobacterial triterpenes from the Canadian medicinal plant *Sarracenia purpurea*. *Journal of Ethnopharmacology*, 188, 200–203.
168. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
169. Mrosk, C., Forner, S., Hause, G., Küster, H., Kopka, J., Hause, B. (2009). Composite *Medicago truncatula* plants harbouring *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots reveal normal mycorrhization by *Glomus intraradices*. *Journal of experimental botany*, 60(13), 3797-3807.
170. Muhammad, A., Haddad, P. S., Durst, T., Anason, J. T. (2013). Phytochemical constituents of *Sarracenia purpurea* L. (pitcher plant). *Phytochemistry*, 94, 238- 242.
171. Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.
172. Nachar, A., Vallerand, D., Musallam, L., Lavoie, L., Badawi, A., Arnason, J., Haddad, P. S. (2013). The action of antidiabetic plants of the canadian james bay cree traditional pharmacopeia on key enzymes of hepatic glucose homeostasis. *Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.

173. Nafisi, M., Fimognari, L., Sakuragi, Y. (2015). Interplays between the cell wall and phytohormones in interaction between plants and necrotrophic pathogens. *Phytochemistry*, 112, 63-71.
174. Navin, R., Kim, S. M. (2016). Therapeutic interventions using ursolic acid for cancer treatment. *Medicinal Chemistry*, 6, 339-344.
175. Nester, E. W., Gordon, M. P., Amasino, R. M., Yanofsky, M. F. (1984). Crown gall: a molecular and physiological analysis. *Annual Review Plant Physiology*, 35(1), 387-413.
176. Nyasse, B., Nono, J. J., Nganso, Y., Ngantchou, I., Schneider, B. (2009). *Uapaca* genus (*Euphorbiaceae*), a good source of betulinic acid. *Fitoterapia*, 80(1), 32-34.
177. Oleszek, W. (2009). Roślinne substancje biologicznie aktywne i ich biosynteza w kulturach *in vitro*. *Biotechnologia roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa*, 122-171.
178. Orlewska, K., Koziel, D. Pancreatic cancer in Poland: an analysis of incidence, mortality and years of life lost over a period of 22 years. *Medical Studies/Studia Medyczne*, 37(4), 300-305.
179. Pandey, P., Kaur, R., Singh, S., Chattopadhyay, S. K., Srivastava, S. K., Banerjee, S. (2014). Long-term stability in biomass and production of terpene indole alkaloids by hairy root culture of *Rauvolfia serpentina* and cost approximation to endorse commercial realism. *Biotechnology letters*, 36, 1523-1528.
180. Panić, M., Gunjević, V., Cravotto, G., Redovniković, I. R. (2019). Enabling technologies for the extraction of grape-pomace anthocyanins using natural deep eutectic solvents in up-to-half-litre batches extraction of grape-pomace anthocyanins using NADES. *Food Chemistry*, 300, 125185.
181. Parizi, K. J., Rahpeyma, S. A., Pourseyedi, S. (2020). The novel paclitaxel-producing system: establishment of *Corylus avellana* L. hairy root culture. *In Vitro Cellular & Development Biology—Plant*, 56, 290–297.
182. Pavlovič, A., Singerová, L., Demko, V., Hudák, D. (2009). Feeding enhances photosynthetic efficiency in the carnivorous pitcher plant *Nepenthes talangensis*. *Annals of Botany*, 104(2), 307-314.
183. Phillips, R., Rix, M. (2002). The botanical garden: perennials and annuals. *Willowdale, Ont.: Firefly Books*.

184. Pickens, L. B., Tang, Y., Chooi, Y. H. (2011). Metabolic engineering for the production of natural products. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2, 211–236
185. Pilarska, K. M., Panić, M., Redovniković, I. R., Wróbel-Kwiatkowska, M. (2022). Characterization of Carnivorous Plants *Sarracenia purpurea* L. Transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Applied Sciences*, 12(20), 10289.
186. Pilarski, J., Tokarz, K., Kocurek, M. (2012). Adaptacja roślin do składu spektralnego i intensywności promieniowania. *Prace Instytutu Elektrotechniki* (256), 223-236.
187. Pińkowska, H., Złocińska, A. (2014). Pektyny–występowanie, budowa chemiczna i właściwości. *Wiadomości chemiczne*.
188. Pollex, R. L., Hanley, A. J., Zinman, B., Harris, S. B., Khan, H. M., Hegele, R. A. (2006). Metabolic syndrome in aboriginal Canadians: prevalence and genetic associations. *Atherosclerosis*. 184(1), 121-129.
189. Rana, M. M., Abdullah, M., Shamalla, F. L., Wei, S. (2017). Wild-type *Agrobacterium rhizogenes*-mediated gene transfer in plants: *Agrobacterium* virulence and selection of Transformants. *Journal of Plant Science and Phytopathology*, 1, 44–51.
190. Rao, S. R., Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 20(2), 101-153.
191. Ríos, J. L. (2010). Effects of triterpenes on the immune system. *Journal of ethnopharmacology*, 128(1), 1-14.
192. Rischer, H., Hamm, A., Bringmann, G. (2002). *Nepenthes insignis* uses a C2-portion of the carbon skeleton of L-alanine acquired via its carnivorous organs, to build up the allelochemical plumbagin. *Phytochemistry*, 59(6), 603-609.
193. Roy, S. K., Rhaman, M., Hauque, S. (2000). Mass propagation of Pineapple through *in vitro* culture. W *Transplant Production in the 21st Century: Proceedings of the International Symposium on Transplant Production in Closed System for Solving the Global Issues on Environmental Conservation, Food, Resources and Energy. Springer, Niderlandy*, 279-283.
194. Ruggles, D. R., Freyman, R. L., Oxenham, A. J. (2014). Influence of musical training on understanding voiced and whispered speech in noise. *PloS one*, 9(1), e86980.
195. Sahayarayan, J. J., Udayakumar, R., Arun, M., Ganapathi, A., Alwahibi, M. S., Aldosari, N. S., Morgan, A. M. (2020). Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains for *in-vitro* hairy root induction, total phenolic, flavonoids contents,

- antibacterial and antioxidant activity of (*Cucumis anguria* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(11), 2972-2979.
196. Sahu, L., Jena, S., Swain, S. S., Sahoo, S., Chand, P. K. (2013). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of a multi-medicinal herb, *Boerhaavia diffusa* L.: Optimization of the process and anti-microbial activity against bacterial pathogens causing urinary tract infections. *Frontiers in Life Sciences*, 7(3-4), 197–209.
197. Sahu, P. P., Pandey, G., Sharma, N., Puranik, S., Muthamilarasan, M., Prasad, M. (2013). Epigenetic mechanisms of plant stress responses and adaptation. *Plant cell reports*, 32, 1151-1159.
198. Sánchez-Cordova, Á. D. J., Capataz-Tafur, J., Barrera-Figueroa, B. E., López-Torres, A., Sanchez-Ocampo, P. M., García-López, E., Huerta-Heredia, A. A. (2019). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation enhances steviol glycosides production and growth in *Stevia rebaudiana* plantlets. *Sugar Tech*, 21(3), 398-406.
199. Schilcher, H., Elzer, M. *Drosera* (Sundew): a proven antitussive. *Zeitschrift für Phytotherapie*, 14(50), 4.
200. Schlauer, J., Nerz, J., Rischer, H. (2005). Carnivorous plant chemistry. *Acta Botanica Gallica*, 152(2), 187-195.
201. Scholz, I., Bückins, M., Dolge, L., Erlinghagen, T., Weth, A., Hischen, F., Mayer, J., Hoffmann, S., Riederer, M., Riedel, M., Baumgartner, W. (2010). Slippery surfaces of pitcher plants: *Nepenthes* wax crystals minimize insect attachment via microscopic surface roughness. *Journal of Experimental Biology*, 213(7), 1115-1125.
202. Schwab, M. (2008). Encyclopedia of cancer. *Springer Science & Business Media*.
203. Schwab, M. (2012). Encyclopedia of cancer. *Springer & Business Media*, Heidelberg.
204. Schwaegerle, K. E., & Schaal, B. A. (1979). Genetic variability and founder effect in the pitcher plant *Sarracenia purpurea* L. *Evolution*, 1210-1218.
205. Sekrecka, D., Michałowska, D. (2015). Mikrorozmnażanie- technologia wykorzystywana w produkcji zdrowych sadzeniaków ziemniaka. *Ziemniak Polski*, 25(3), 3-7.
206. Sevón, N., Oksman-Caldentey, K.M. (2021). *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation: Root Cultures as a Source of Alkaloids. *Planta Medica*, 68(10), 859–868.
207. Sha, A. H., Lin, X. H., Huang, J. B., Zhang, D. P. (2005). Analysis of DNA methylation related to rice adult plant resistance to bacterial blight based on

- methylation-sensitive AFLP (MSAP) analysis. *Molecular Genetics and Genomics*, 273, 484-490.
208. Shaikh, A. M., Shrivastava, B., Apte, K. G., Navale, S. D. (2016). Medicinal plants as potential source of anticancer agents: a review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(2): 291–295,
209. Shakeran, Z., Keyhanfar, M., Ghanadian, M. (2017). Biotic elicitation for scopolamine production by hairy root cultures of *Datura metel*. *Molecular Biology Research Communications*, 6(4), 169–179.
210. Shanmugam, M. K., Dai, X., Kumar, A. P., Tan, B. K., Sethi, G., Bishayee, A. (2013). Ursolic acid in cancer prevention and treatment: molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies. *Biochemical pharmacology*, 85(11), 1579-1587.
211. Sharp, J. M., Doran, P. M. (1999). Effect of bacitracin on growth and monoclonal antibody production by tobacco hairy roots and cell suspensions. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 4, 253-258.
212. Sheridan, P. M., Griesbach, R. J. (2001). Anthocyanidins of *Sarracenia* L. flowers and leaves. *Hortscience*, 36(2), 384-384.
213. Shin, K. S., Lee, S. K., Cha, B. (2007). Antifungal activity of plumbagin purified from leaves of *Nepenthes ventricosa x maxima* against phytopathogenic fungi. *The Plant Pathology Journal*, 23(2),113–115.
214. Shkryl, Y. N., Veremeichik, G. N., Bulgakov, V.P., Tchernoded, G. K., Mischenko, N. P., Feodreyev, 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. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(1), 118–125.
215. Singh, B., Phukan, S. J., Sinha, B. K., Singh, V. N., Borthakur, S. K. (2011). Conservation strategies for *Nepenthes khasiana* in the Nokrek Biosphere Reserve of Garo hills, Northeast, India. *International Journal of Conservation Science*, 2(1), 55–64.
216. Singh, P. A., Bajwa, N. (2017). Future perspectives of *Drosera magnifica*: the first ever plant discovered on the social media. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 7(4), 12–19.
217. Sjöström, H., Norén, O., Olsen, J. (2002). Structure and function of aminopeptidase N. *Cellular peptidases in immune functions and diseases* 2, 25-34.

218. Srivastava, A., Rogers, W. L., Breton, C. M., Cai, L., Malmberg, R. L. (2011). Transcriptome analysis of *Sarracenia*, an insectivorous plant. *DNA research*, 18(4), 253-261.
219. Stanišić, M., Ćosić, T., Savić, J., Krstić-Milošević, D., Mišić, D., Smigocki, A., Ninković, S., Banjac, N. (2019). Hairy root culture as a valuable tool for allelopathic studies in apple. *Tree Physiology*, 39(5), 888–905.
220. Sudha, C. G., Sherina, T. V., Anu Anand, V. P., Reji, J. V., Padmesh, P., Soniya, E. V. (2013). *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of the medicinal plant *Decalepis arayalpathra* and production of 2-hydroxy-4-methoxy benzaldehyde. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 112, 217-226.
221. Süntar, I. (2020). Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants. *Phytochemistry Reviews*, 19(5), 1199-1209.
222. Swain, S. S., Sahu, L., Pal, A., Barik, D. P., Pradhan, C., Chand, P. K. (2012). Hairy root cultures of butterfly pea (*Clitoria ternatea* L.): *Agrobacterium* x plant factors influencing transformation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 729–739.
223. Szopa, J., Kostyń, K. (2006). Kultury komórkowe i rośliny transgeniczne w biotechnologii. *Biotechnologia*, 4(75), 7-17.
224. Talano, M. A., Agostini, E., Medina, M. I., De Forchetti, S. M., Tigier, H. A. (2003). Tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Pera) hairy root cultures: characterization and changes in peroxidase activity under NaCl treatment. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39, 354-359.
225. Talano, M. A., Agostini, E., Medina, M. I., Reinoso, H., del Carmen Tordable, M., Tigier, H. A., de Forchetti, S. M. (2006). Changes in ligno-suberization of cell walls of tomato hairy roots produced by salt treatment: the relationship with the release of a basic peroxidase. *Journal of plant physiology*, 163(7), 740-749.
226. Taralkar, S. V., Chattopadhyay, S. (2012). A HPLC method for determination of ursolic acid and betulinic acids from their methanolic extracts of *Vitex negundo* Linn. *Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques*, 3(3), 1-6.
227. Tepfer, M., Casse- Delbrat, F. (1987). *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. *Microbiological Sciences*, 4(1), 24-28.
228. Thanh, N. V., Thao, N.P., Huong, P. T. T., Lee, S. H., Jang, H. D., Cuong, N. X., Nam, N. H., Kiem, P. V., Kim, Y. H., Minh, C. V. (2015b). Naphthoquinone and flavonoid

- constituents from the carnivorous plant *Nepenthes mirabilis* and their anti-osteoporotic and antioxidant activities. *Phytochemistry Letters*, 11, 254–259.
229. Thiruvengadam, M., Praveen, N., Maria John, K. M., Yang, Y. S., Kim, S. H., Chung, I. M. (2014). Establishment of *Momordica charantia* hairy root cultures for the production of phenolic compounds and determination of their biological activities. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 118, 545-557.
230. Tian, L. (2015). Using Hairy roots for production of valuable plant secondary metabolites. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 149, 275–324.
231. Tor-Anyiin, T. A., Igoli, J. O., Anyam, J. V., Anyam, J. N. (2015). Isolation and antimicrobial activity of sarracenin from root bark of *Strychnos spinosa*. *Journal of Chemical Society of Nigeria*, 40(1).
232. Torregrosa, L., Bouquet, A. (1997). *Agrobacterium rhizogenes* and *A. tumefaciens* co-transformation to obtain grapevine hairy roots producing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus. *Plant cell, tissue and organ culture (PCTOC)*, 49, 53-62.
233. Uriah, T., Patil, M. B., Kumar, S. (2015). *In vitro* antioxidant and hepatoprotective potential of *Nepenthes khasiana* Hook. F. against ethanol-induced liver injury in rats. *Journal of Pharmacy Research*, 14(4), 81–89.
234. Vaidyanathan, D., Senthilkumar, M. S. S., Basha, M. G. (2013), Studies on ethnomedicinal plants used by Malayali tribals in Kolli hills of Eastern Ghats, Tamil Nadu, India. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 3(6), 29-45.
235. Veena, V., Taylor, C. G. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43, 383-403.
236. Vinkenborg, J., Sampra- Rumantir, N., Uffellie, O. F. (1969). De aanwezigheid van hydroplumbagin glucoside in *Drosera rotundifolia*. *Pharmaceutisch Weekblad-Scientific Edition*, 104, 45–49. W: Immunologia, red.: Jakóbisiak, M., Gołąb, J., Lasek, W, PWN, Warszawa, 198-224.
237. Voragen, A. G., Coenen, G. J., Verhoef, R. P., Schols, H. A. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20, 263-275.
238. Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E. M. (1984). Plant drug analysis. *Heidelberg, New York, Springer- Verlag Berlin*.
239. Wang, C. M., Chen, H. T., Li, T. C., Weng, J. H., Jhan, Y. L., Lin, S. X., Chou, C. H. (2014). The role of pentacyclic triterpenoids in the allelopathic effects of *Alstonia scholaris*. *Journal of Chemical Ecology*, 40, 90–98.

240. Wang, Q., Su, J., Zeng, L. (1998). The isolation and identification of flavonoids from *Drosera burmannii*. *Chinese Medicin Mater*, 21(8), 401–403.
241. Wasilewska, A.; Królicka, A. (2005). Otrzymywanie i charakterystyka kultur korzeni włośnikowatych. *Biotechnologia*, 4(71), 173- 188.
242. Weber, L. A., Meißner, J., Delarocque, J., Kalbitz, J., Feige, K., Kietzmann, M., Michaelis, A., Paschke, R., Michael, J., Pratscher, B., Cavalleri, J. M. V. (2020). Betulinic acid shows anticancer activity against equine melanoma cells and permeates isolated equine skin *in vitro*. *BMC Veterinary Research*, 16, 1-9.
243. Weremczuk-Jeżyna, I., Grzegorzczak-Karolak, I., Frydrych, B., Królicka, A., Wysokińska, H. (2013). Hairy roots of *Dracocephalum moldavica*: rosmarinic acid content and antioxidant potential. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 2095-2103.
244. Wetterauer, B., Wildi, E., Wink, M. (2018). Production of the anticancer compound camptothecin in root and hairy root cultures of *Ophiorrhiza mungos* L. *Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants: Conservation, Genetic Improvement and Utilization*, 303–341.
245. Whitman, R. L., Byers, S. E., Shively, D. A., Ferguson, D. M., Byappanahalli, M. (2005). Occurrence and growth characteristics of *Escherichia coli* and enterococci within the accumulated fluid of the northern pitcher plant (*Sarracenia purpurea* L.). *Canadian journal of microbiology*, 51(12), 1027-1037.
246. Wiart, Ch. (2007). Ethnopharmacology of medicinal plants: Asia and the Pacific. *Springer Science & Business Media*.
247. Wirz, H., Sauer-Budge, A. F., Briggs, J., Sharpe, A., Shu, S., Sharon, A. (2012). Automated production of plant-based vaccines and pharmaceuticals. *Journal of Laboratory Automation*, 17(6), 449-457.
248. Wojtasik, W., Kulma, A., Dymińska, L., Hanuza, J., Żebrowski, J., Szopa, J. (2013). Fibres from flax overproducing β -1, 3-glucanase show increased accumulation of pectin and phenolics and thus higher antioxidant capacity. *BMC biotechnology*, 13(1), 1-16.
249. Wróbel-Kwiatkowska, M., Kropiwnicki, M., Żebrowski, J., Beopoulos, A., Dymińska, L., Hanuza, J., Rymowicz, W. (2019). Effect of mcl-PHA synthesis in flax on plant mechanical properties and cell wall composition. *Transgenic Research*, 28, 77–90.
250. Wróbel-Kwiatkowska, M., Lorenc-Kukula, K., Starzycki, M., Oszmiański, J., Kępczyńska, E., Szopa, J. (2004). Expression of β -1, 3-glucanase in flax causes

- increased resistance to fungi. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65(5), 245-256.
251. Yapo, B. M. (2011). Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model. *Carbohydrate Polymers*, 86(2), 373-385.
252. Yaqoob, U., Jan, B., Kaul, T., Nawachoo, I. A. (2015). Tissue culture of rice: problems, progres and prospect. *International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology*, 3(6), 581-613.
253. Yoshida, K., Ma, D., Constabel, P. (2015). The MYB182 protein down-regulates proanthocyanidin and anthocyanin biosynthesis in *Poplar* by repressing both structural and regulatory flavonoid genes. *Plant Physiology*, 167(3), 693–710.
254. Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martinez- Romero, E., Kerr, A., Sawada, H. (2001). A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(1), 89-103.
255. Zaremba-Czogalla, M., Jaromin, A., Sidoryk, K., Zagórska, A., Cybulski, M., Gubernator, J. (2020). Evaluation of the in vitro cytotoxic activity of caffeic acid derivatives and liposomal formulation against pancreatic cancer cell lines. *Materials*, 13(24), 5813.

Netografia

1. <https://wackswickedplants.co.uk/product/sarracenia-purpurea-ssp-purpurea/> (dostęp: 02.02.2023)
2. <https://gobotany.nativeplanttrust.org/species/sarracenia/purpurea/> (dostęp: 02.02.2023)
3. <https://plants.sc.egov.usda.gov/home/plantProfile?symbol=SAPU4> (dostęp: 03.02.2023 r.)

8. Spis rycin

Ryc. 1. <i>Sarracenia purpurea</i> L.	17
Ryc. 2. Obszary naturalnego występowania roślin z rodzaju <i>Sarracenia</i> L. (4).....	18
Ryc. 3. Rys historyczny technik hodowli roślin.....	22
Ryc. 4. Mechanizm powstawania korzeni włosnikowatych.	25
Ryc. 5. Schemat plazmidu bakterii <i>Rhizobium rhizogenes</i> typu agropinowego.	27
Ryc. 6. Zawartość chlorofilu w roślinach hodowanych na podłożach o różnej wartości pH ..	61
Ryc. 7. Zawartość karotenoidów oraz pojemność antyoksydacyjna oznaczone w roślinach hodowanych na podłożach o różnej wartości pH.....	63
Ryc. 8. Całkowita zawartość związków fenolowych oraz całkowita zawartość triterpenów w roślinach hodowanych na podłożach o różnej wartości pH	65
Ryc. 9. Zawartość chlorofilu w roślinach pochodzących z hodowli <i>in vitro</i> na podłożach o zróżnicowanym składzie	67
Ryc. 10. Zawartość karotenoidów oraz pojemność antyoksydacyjna oznaczone dla roślin pochodzących z kultur <i>in vitro</i> na podłożach o zróżnicowanym składzie	69
Ryc. 11. Całkowita zawartość związków fenolowych oraz całkowita zawartość triterpenów oznaczonych w roślinach hodowanych <i>in vitro</i> na podłożach o zróżnicowanym składzie	71
Ryc. 12. Eksplantaty <i>Sarracenia purpurea</i> L. transformowane metodą kokultury z bakteriami <i>Rhizobium rhizogenes</i>	73
Ryc. 13. Korzenie transformowane roślin <i>Sarracenia purpurea</i> L.....	74
Ryc. 14. Analiza mikroskopowa korzeni badanych roślin.....	75
Ryc. 15. Identyfikacja genu <i>rolB</i> w genomie części zielonych roślin <i>Sarracenia purpurea</i> L. poddanych agroinfekcji	76
Ryc. 16. Identyfikacja genu <i>rolB</i> w genomie korzeni transformowanych <i>Sarracenia purpurea</i> L.	76

Ryc. 17. Sucha masa korzeni	77
Ryc. 18. Krzywe ilustrujące zawartość ekstrahowanych związków w zależności od czasu prowadzonej ekstrakcji mechanicznej.....	79
Ryc. 19. Krzywe ilustrujące zawartość ekstrahowanych związków w zależności od czasu prowadzonej ekstrakcji ultradźwiękowej	81
Ryc. 20. Całkowita zawartość związków fenolowych w badanych ekstraktach.	85
Ryc. 21. Całkowita zawartość triterpenów w badanych ekstraktach.	86
Ryc. 22. Zawartość chlorofilu w badanych ekstraktach.....	87
Ryc. 23. Zawartość karotenoidów w badanych ekstraktach.	89
Ryc. 24. Zawartość kwasu betulinowego w badanych ekstraktach	90
Ryc. 25. Profil tłuszczowy badanych roślin.....	91
Ryc. 26. Zawartość kwasu α -linolenowego w częściach zielonych badanych roślin.	92
Ryc. 27. Widma IR badanych roślin	93
Ryc. 28. Różnice w intensywności integralnych pasm przy (A) 1450 cm^{-1} , (B) 1311 cm^{-1} , (C) 1160 cm^{-1} oraz (D) 1228 cm^{-1} dla części zielonych badanych roślin	94
Ryc. 29. Różnice w intensywności integralnych pasm przy (A) 1343 cm^{-1} oraz (B) 1255 cm^{-1} dla części zielonych badanych roślin	95
Ryc. 30. Różnice w intensywności integralnej pasm przy 989 cm^{-1} , 1013 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} , 1285 cm^{-1} , 1510 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} dla części zielonych badanych roślin.....	96
Ryc. 31. Widma IR roślin hodowanych w różnych wariantach pH podłoża	97
Ryc. 32. Różnice w intensywności integralności pasm przy 990 cm^{-1} , 1015 cm^{-1} , 1192 cm^{-1} , 1288 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} , 1730 cm^{-1} dla roślin hodowanych w różnych wariantach pH podłoża	98
Ryc. 33. Widma IR korzeni roślin hodowanych w różnych wariantach pH podłoża.	99
Ryc. 34. Różnice w intensywności integralnej pasm przy 989 cm^{-1} , 1013 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} , 1285 cm^{-1} , 1510 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} dla części zielonych badanych roślin.....	100

Ryc. 35. Pojemność antyoksydacyjna badanych ekstraktów	101
Ryc. 36. Zawartość aminokwasów w badanych ekstraktach.	111
Ryc. 37. Zawartość aminokwasów w badanych ekstraktach.	112
Ryc. 38. Żywotność komórek linii HaCaT poddanych działaniu ekstraktów etanolowych z badanych roślin	117
Ryc. 39. Żywotność komórek linii CHO-K1 poddanych działaniu ekstraktów etanolowych z badanych roślin.	119
Ryc. 40. Żywotność komórek linii BxPC3 poddanych działaniu ekstraktów etanolowych z części zielonych badanych roślin	122
Ryc. 41. Żywotność komórek linii BxPC3 poddanych działaniu ekstraktów etanolowych z korzeni badanych roślin	123
Ryc. 42. Żywotność komórek linii AsPC1 poddanych działaniu ekstraktów etanolowych z części zielonych badanych roślin	126
Ryc. 43. Żywotność komórek linii AsPC1 poddanych działaniu ekstraktów etanolowych z korzeni badanych roślin.	127
Ryc. 44. Żywotność komórek linii HeLa poddanych działaniu ekstraktów etanolowych z badanych roślin	129
Ryc. 45. Żywotność komórek linii NHDF poddanych działaniu ekstraktów wodnych z badanych roślin.	131
Ryc. 46. Żywotność komórek linii BxPC3 poddanych działaniu ekstraktów wodnych z badanych roślin.	133
Ryc. 47. Żywotność komórek linii AsPC1 poddanych działaniu ekstraktów wodnych z badanych roślin	135

9. Spis tabel

Tabela 1. Przykłady metabolitów wtórnych izolowanych z roślin owadożernych	15
Tabela 2. Przykłady związków terapeutycznych produkowanych w kulturach korzeni włośnikowatych.....	30
Tabela 3. Skład podstawowego podłoża MS	34
Tabela 4. Skład podłoża	35
Tabela 5. Odczynniki organiczne.....	37
Tabela 6. Odczynniki nieorganiczne.....	39
Tabela 7. Komercyjne zestawy i odczynniki do biologii molekularnej.....	40
Tabela 8. Zmienne niezależne dla modelu planowania doświadczenia	42
Tabela 9. Skład roztworów do izolacji DNA plazmidowego z <i>Rhizobium rhizogenes</i>	44
Tabela 10. Sekwencje starterów	45
Tabela 11. Skład mieszaniny reakcji PCR w gradiencie temperatur	45
Tabela 12. Skład mieszaniny reakcji PCR dla korzeni	46
Tabela 13. Zmienne niezależne dla modelu planowania doświadczenia	48
Tabela 14. Skład mieszaniny reakcyjnej dla badania pojemności antoksydacyjnej	53
Tabela 15. Skład wariantów podłoża wyodrębnionych do dalszych etapów badań	66
Tabela 16. Test aktywności przeciwdrobnoustrojowych ekstraktów z części zielonych badanych roślin wobec chorobotwórczych szczepów bakterii.	103
Tabela 17. Test aktywności przeciwdrobnoustrojowych ekstraktów z korzeni badanych roślin wobec chorobotwórczych szczepów bakterii.	106
Tabela 18. Zawartość procentowa poszczególnych aminokwasów w roślinach poddanych modyfikacji w porównaniu do rośliny kontrolnej.....	110
Tabela 19. Zawartość zidentyfikowanych w badanych ekstraktach związków	114

10. Załączniki

Załącznik 1. Projekt eksperymentu optymalizacji składu podłoża do hodowli *Sarracenia purpurea* L. w kulturach *in vitro*.

Eksperyment	Zawartość pożywki MS (g/L)	Stężenie sacharozy (%)	pH podłoża	Ocena organoleptyczna
1	1,47 (0)	1,9 (0)	5,1 (0)	Zeszklenie roślin
2	2,20 (+1)	1,9 (0)	6,6 (+1)	Szybki przyrost, kondycja roślin słaba
3	1,47 (0)	0,8 (-1)	3,6 (-1)	Zahamowane tempo wzrostu, brak turgoru
4	1,47 (0)	3,0 (+1)	6,6 (+1)	Szybki przyrost, kondycja roślin słaba
5	1,47 (0)	0,8 (-1)	6,6 (+1)	Szybki przyrost, kondycja roślin poprawna
6	0,73 (-1)	0,8 (-1)	6,6 (+1)	Poprawne tempo wzrostu, kondycja roślin bardzo dobra
7	0,73 (-1)	3,0 (+1)	3,6 (-1)	Zwolnione tempo wzrostu, kondycja roślin dobra
8	1,47 (0)	3,0 (+1)	3,6 (-1)	Zahamowane tempo wzrostu
9	0,73 (-1)	1,9 (0)	6,6 (+1)	Poprawne tempo wzrostu, kondycja roślin poprawna
10	2,20 (+1)	1,9 (0)	3,6 (-1)	Zahamowane tempo wzrostu
11	0,73 (-1)	1,9 (0)	3,6 (-1)	Zahamowane tempo wzrostu
12	2,20 (+1)	0,8 (-1)	6,6 (-1)	Szybki przyrost, wczesne wytwarzanie kapturów, bardzo zwarte tkanki, rośliny intensywnie zielone
13	1,47 (0)	1,9 (0)	5,1 (0)	Zeszklenie roślin
14	2,20 (+1)	3,0 (+1)	3,6 (+1)	Szybki przyrost, rośliny intensywnie zielone
15	1,47 (0)	1,9 (0)	5,1 (0)	Zeszklenie roślin

Załącznik 2. Projekt eksperymentu oraz zawartość związków fenolowych ogółem i zawartość triterpenów ogółem mierzone po procesie ekstrakcji. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią (N=3) ± odchylenie standardowe. Wartości w nawiasach (+1, 0, -1) przedstawiają zastosowane w projekcie poziomy badanych parametrów.

Eksperyment	Czas (min)	Temperatura (°C)	Stężenie EtOH (%v/v)	Zawartość związków fenolowych ogółem (mg GAE g⁻¹ s.m.)	Zawartość triterpenów ogółem (mg BA g⁻¹ s.m.)
1	35 (0)	42,5 (0)	80 (0)	1,463 ± 0,114	0,226 ± 0,046
2	60 (+1)	42,5 (0)	96 (+1)	9,130 ± 0,297	0,454 ± 0,010
3	35 (0)	25 (-1)	64 (-1)	5,211 ± 0,176	0,042 ± 0,005
4	35 (0)	60 (+1)	96 (+1)	1,944 ± 0,182	0,129 ± 0,006
5	35 (0)	25 (-1)	96 (+1)	7,236 ± 0,287	0,287 ± 0,011
6	10 (-1)	25 (-1)	80 (0)	15,258 ± 0,538	0,236 ± 0,019
7	10 (-1)	60 (+1)	80 (0)	5,154 ± 0,214	0,190 ± 0,007
8	35 (0)	60 (+1)	64 (-1)	6,573 ± 0,288	0,345 ± 0,009
9	10 (-1)	42,5 (0)	96 (+1)	1,261 ± 0,198	0,280 ± 0,009
10	60 (+1)	42,5 (0)	64 (-1)	2,176 ± 0,085	0,184 ± 0,005
11	10 (-1)	42,5 (0)	64 (-1)	11,128 ± 0,298	0,441 ± 0,004
12	60 (+1)	25 (-1)	80 (0)	6,584 ± 0,289	0,102 ± 0,008
13	35 (0)	42,5 (0)	80 (0)	1,282 ± 0,196	0,239 ± 0,008
14	60 (+1)	60 (+1)	80 (0)	12,323 ± 0,265	0,282 ± 0,004
15	35 (0)	42,5 (0)	80 (0)	1,348 ± 0,221	0,272 ± 0,004

Załącznik 3. Analiza wariancji (ANOVA) odpowiedzi modelowych dla związków fenolowych (X_1 : czas (min), X_2 : EtOH (%v/v), X_3 : temperatura (°C)).

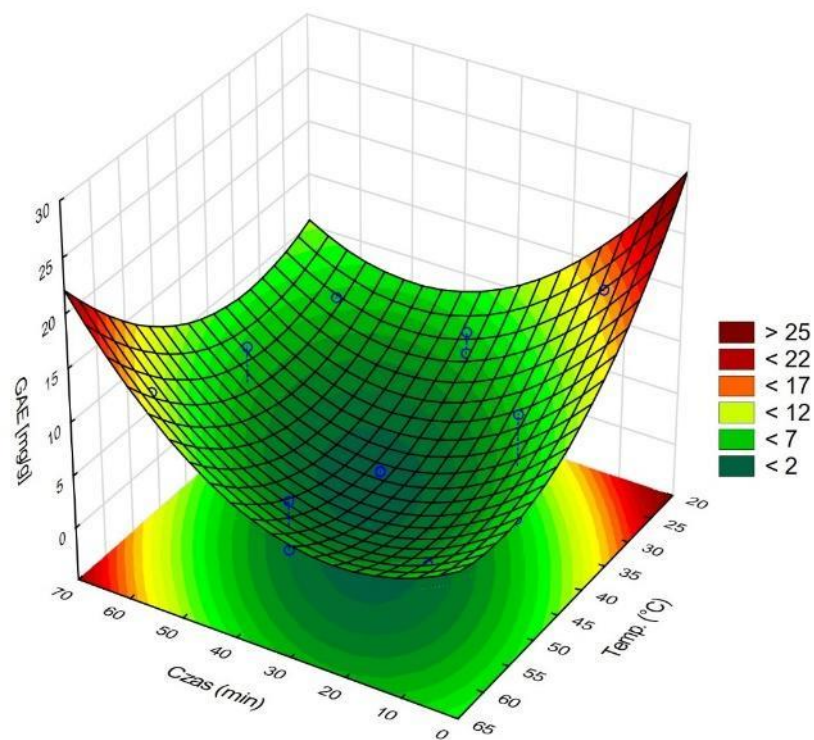
Źródło	Sumy kwadratów	Stopień swobody	Średni kwadrat	F	P
Model	29032,25	9	3225,81	3815,1	<0,0001
X_1	105,38	1	105,38	124,63	0,0001
X_2	385,67	1	385,67	456,12	<0,0001
X_3	893,15	1	893,15	1056,31	<0,0001
X_1X_2	7318,11	1	7318,11	8654,99	<0,0001
X_1X_3	6142,97	1	6142,97	7265,18	<0,0001
X_2X_3	1248,56	1	1248,56	1476,65	<0,0001
X_1^2	7843,11	1	7843,11	9275,89	<0,0001
X_2^2	0,097	1	0,097	0,12	0,7483
X_3^2	5919,01	1	5919,01	7000,3	<0,0001
Pozostałe	4,23	5	0,85		
Brak dopasowania	1,84	3	0,61	0,51	0,7137
Błąd	2,39	2	1,2		
Ogółem	29036,48	14			
R^2	0,9999				

Załącznik 4. Analiza wariancji (ANOVA) odpowiedzi modelowych dla związków triterpenów (X_1 : czas (min), X_2 : EtOH (%v/v), X_3 : temperatura (°C)).

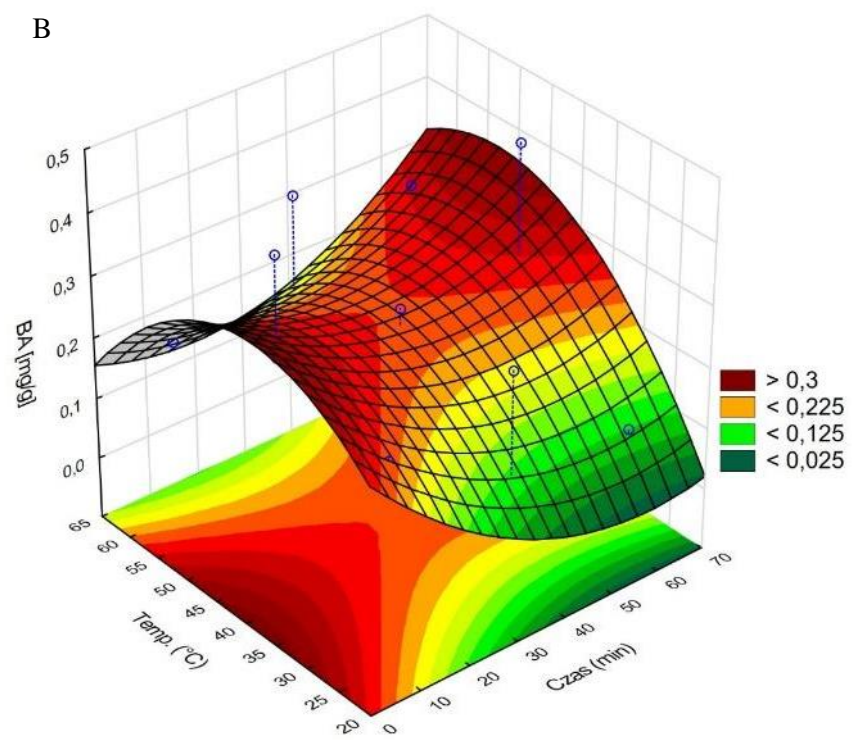
<i>Źródło</i>	<i>Sumy kwadratów</i>	<i>Stopień swobody</i>	<i>Średni kwadrat</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Model	18,23	9	2,03	59,64	0,0001
X_1	0,15	1	0,15	4,36	0,09111
X_2	0,31	1	0,31	9,02	0,03
X_3	1,05	1	1,05	30,98	0,0026
X_1X_2	4,54	1	4,54	133,66	<0,0001
X_1X_3	1,22	1	1,22	36,01	0,0018
X_2X_3	5,69	1	5,69	167,41	<0,0001
X_1^2	0,52	1	0,52	15,41	0,0111
X_2^2	0,63	1	0,63	18,52	0,0077
X_3^2	3,73	1	3,73	109,79	0,0001
Pozostałe	0,17	5	0,034		
Brak dopasowania	0,12	3	0,039	1,48	0,4282
Błąd	0,053	2	0,026		
Ogółem	18,4	14			
R^2	0,9908				

Załącznik 5. Modele powierzchni odpowiedzi obrazujące wpływ temperatury prowadzonej ekstrakcji i stężenia etanolu na wydajność procesu: (a) ogólna zawartość związków fenolowych, (b) ogólna zawartość triterpenów.

A

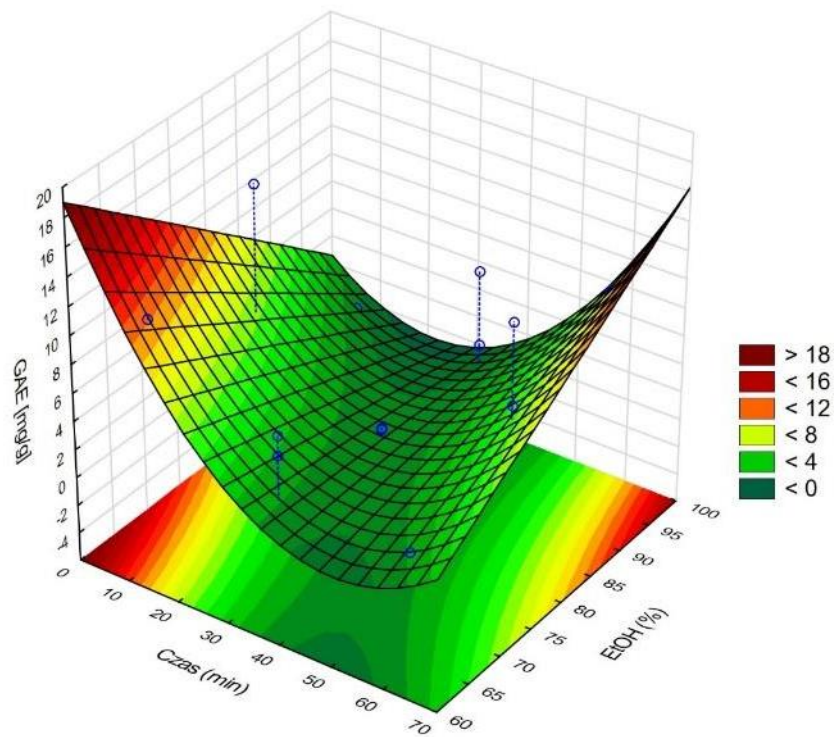


B

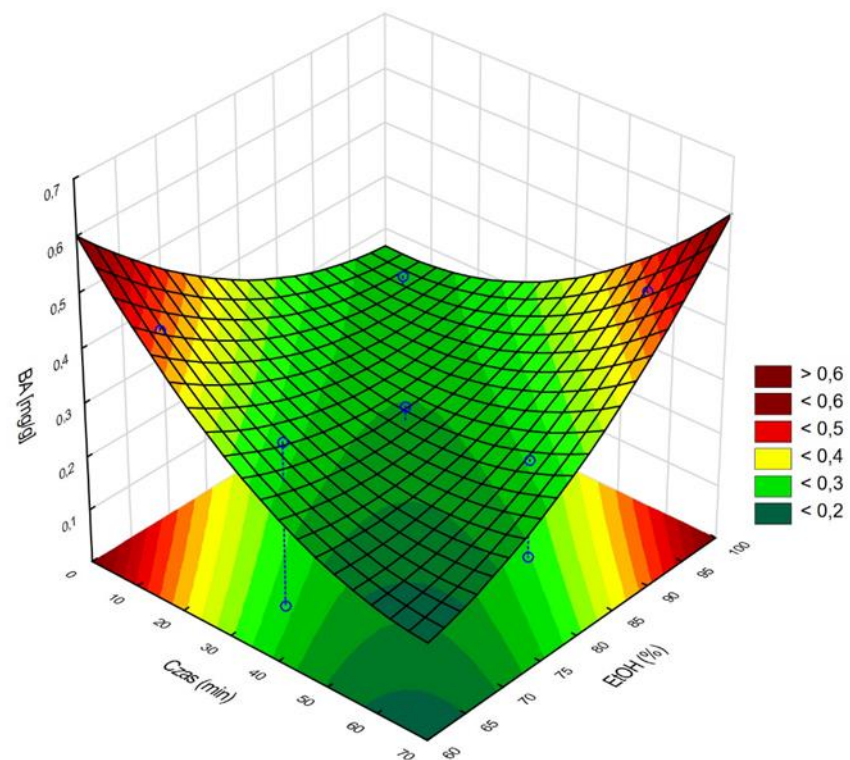


Załącznik 6. Modele powierzchni odpowiedzi obrazujące wpływ czasu prowadzonej ekstrakcji i stężenia etanolu na wydajność procesu: (a) ogólna zawartość związków fenolowych, (b) ogólna zawartość triterpenów.

A

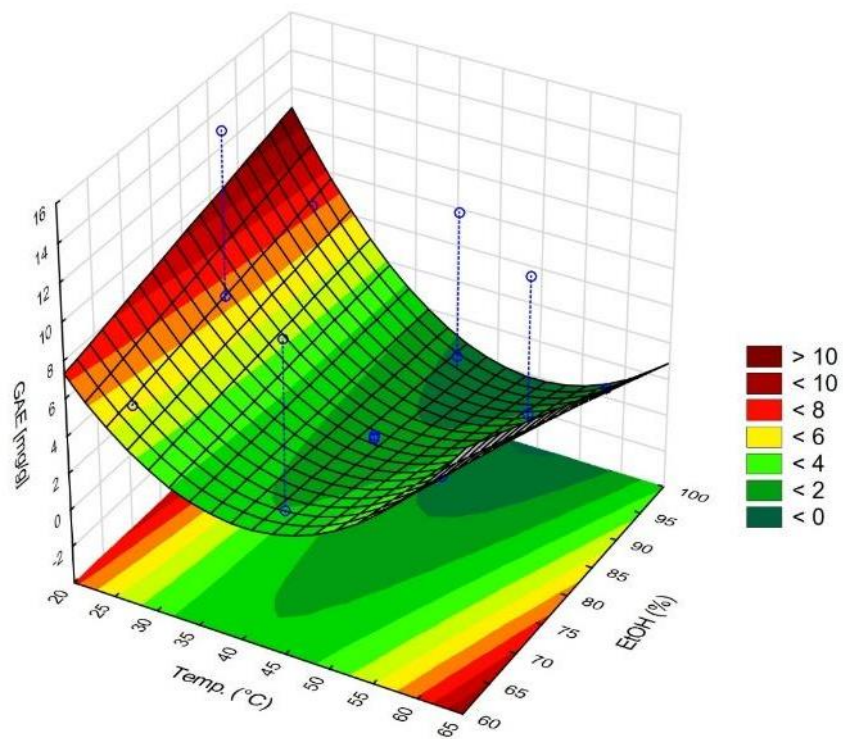


B

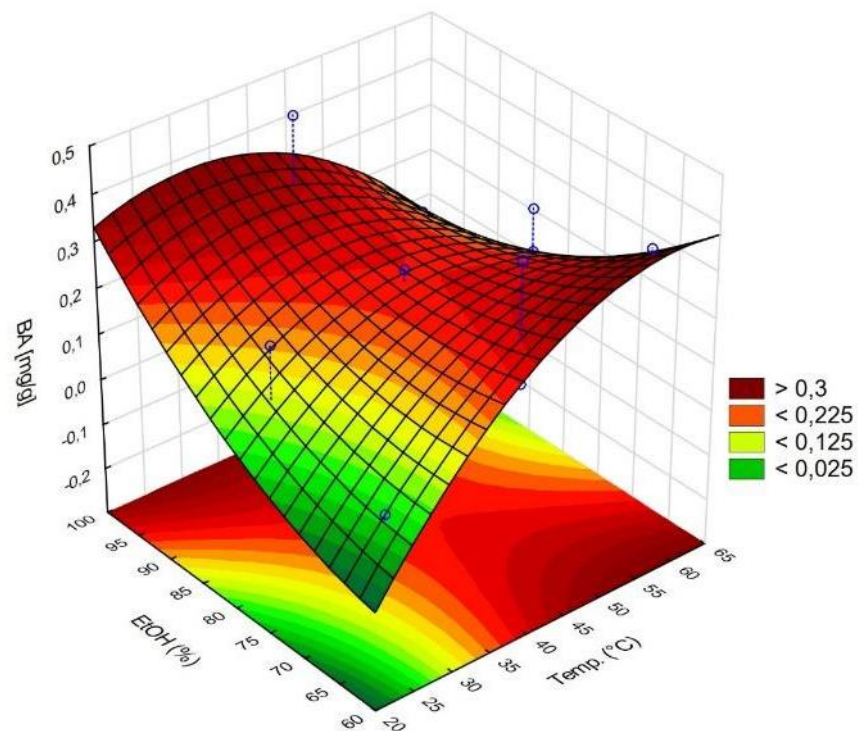


Załącznik 7. Modele powierzchni odpowiedzi obrazujące wpływ czasu i temperatury prowadzonej ekstrakcji na wydajność procesu: (a) ogólna zawartość związków fenolowych, (b) ogólna zawartość triterpenów.

A



B



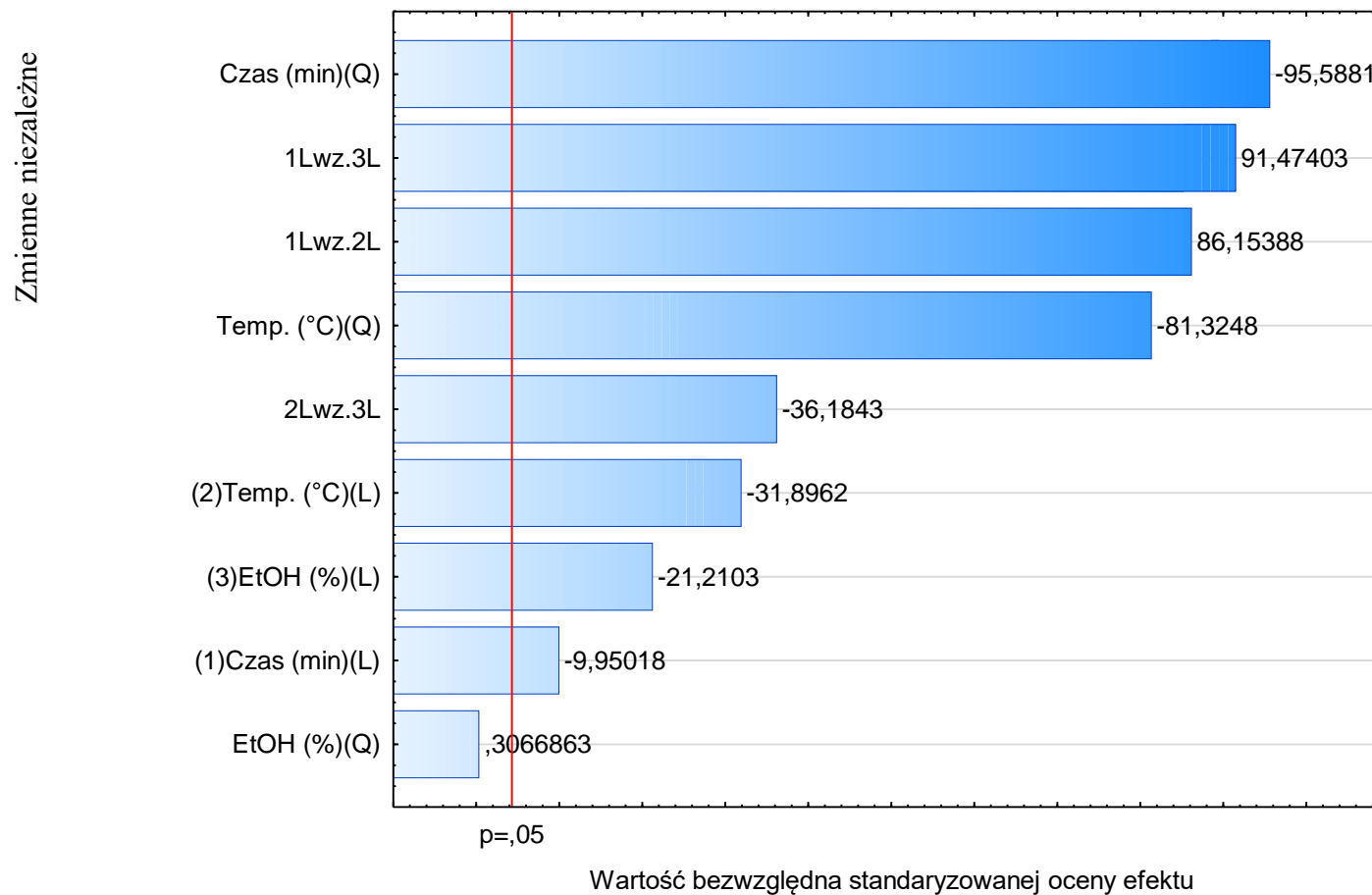
Załącznik 8. Wartości efektów zmiennych zależnych dla zawartości związków fenolowych w badanych ekstraktach.

Wejśc.	Oceny efektów; Zmn.: Zawartość związków fenolowych ogółem [mg GAE/g s.m.]; R ² = ,99974; Popr:99926 (ekstrakcja) 3 Wielk. 3-wart., 1 bloki; Czysty błąd MS=,0084541 ZZ			
	Zwartość związków fenolowych ogółem [mg GAE/ g s.m.]			
	Efekt	Błąd std Czys.bł.	t (2)	p
Średn. /Stała	6,99803	0,026543	263,6536	0,000014
(1) Czas (min)(L)	-0,64692	0,065016	-9,9502	0,009950
Czas (min)(Q)	-4,57391	0,047850	-95,5881	0,000109
(2) Temp. (°C) (L)	-2,07375	0,065016	-31,8962	0,000981
Temp. (°C) (Q)	-3,89141	0,047850	-81,3248	0,000151
(3) EtOH (%) (L)	-1,37900	0,065016	-21,2103	0,002215
EtOH (%) (Q)	0,01468	0,047850	0,3067	0,788066
1L wz.2L	7,92150	0,091946	86,1539	0,000135
1L wz.3L	8,41067	0,091946	91,4740	0,000119
2L wz.3L	-3,32700	0,091946	-36,1843	0,000763

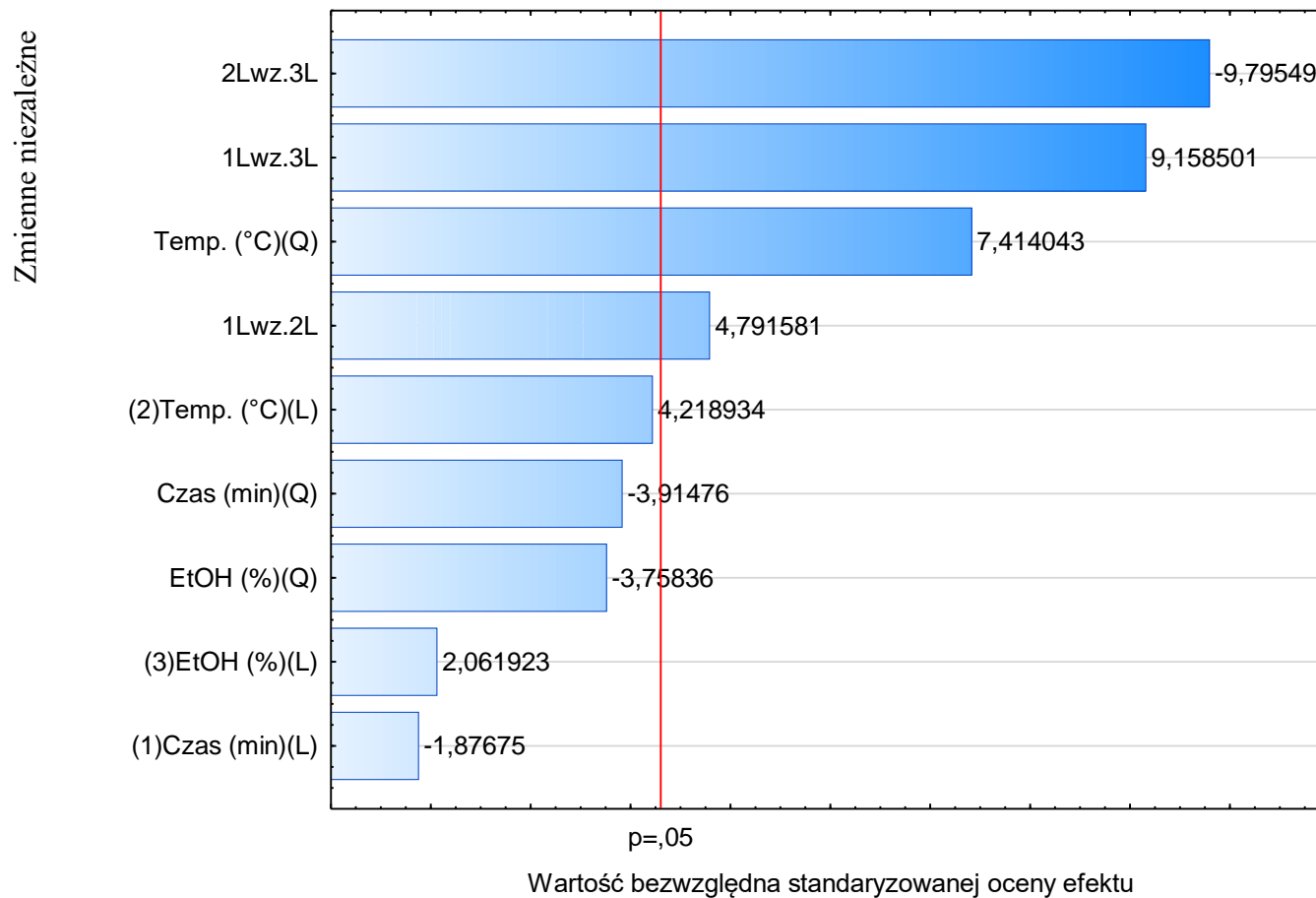
Załącznik 9. Wartości efektów zmiennych zależnych dla zawartości triterpenów w badanych ekstraktach.

Oceny efektów; Zmn.: Zawartość triterpenów ogółem [mg BA/ g s.m.]; R ² = ,98807; Popr:9666 (ekstrakcja) 3 Wielk. 3-wart., 1 bloki; Czysty błąd MS=,0005545 ZZ BA				
Zawartość triterpenów ogółem [mg BA/g s.m.]				
Wejśc.	Efekt	Błąd std Czys.bł.	t (2)	p
(1) Czas (min)(L)	0,247583	0,006798	36,42113	0,000753
Czas (min)(Q)	-0,031250	0,016651	-1,87675	0,201361
(2) Temp. (°C) (L)	-0,047975	0,012255	-3,91476	0,059488
Temp. (°C) (Q)	0,070250	0,016651	4,21893	0,051851
(3) EtOH (%) (L)	0,090858	0,012255	7,41404	0,017711
EtOH (%) (Q)	0,034333	0,016651	2,06192	0,175332
1L wz.2L	-0,046058	0,012255	-3,75836	0,064067
1L wz.3L	0,112833	0,023548	4,79158	0,040902
2L wz.3L	0,215667	0,023548	9,15850	0,011713
2L wz.3L				

Załącznik 10. Wykres Pareto dla zmiennych niezależnych oddziałujących na zawartość związków fenolowych (mg GAE/ g s. m.). Q- efekt kwadratowy, L- efekt liniowy. Wartości zmiennych niezależnych oznaczono jako: (1) czas [min], (2) temperatura [°C], (3) stężenie etanolu [%]. Interakcje: czas i stężenie etanolu (1L wz. 3L); czas i temperatura (1L wz. 2 L); temperatura i stężenie alkoholu (2L wz. 3 L).

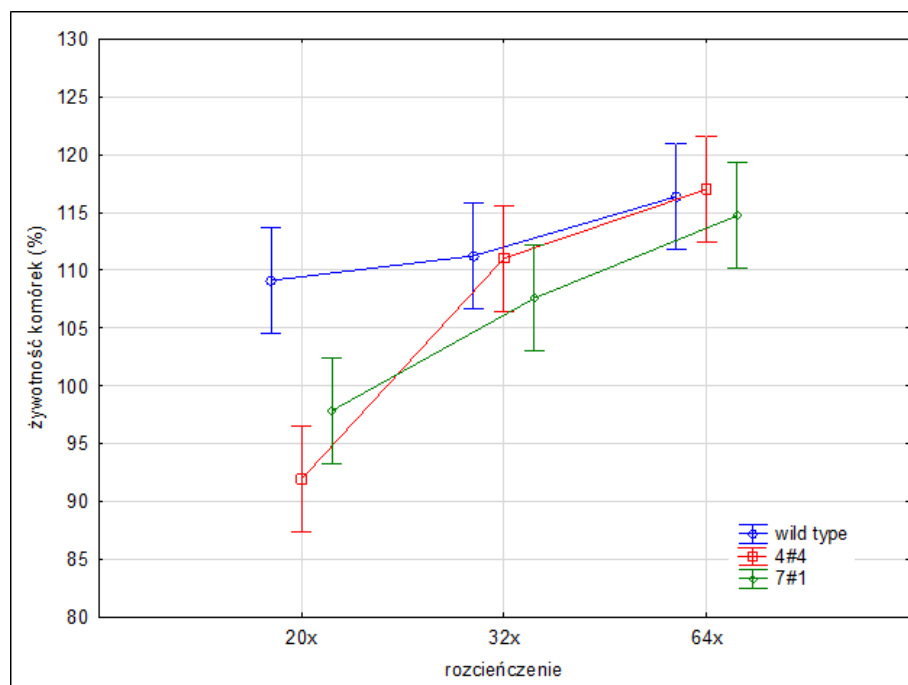


Załącznik 11. Wykres Pareto dla zmiennych niezależnych oddziałujących na zawartość triterpenów (mg BA/ g s. m.). Q- efekt kwadratowy, L- efekt liniowy. Wartości zmiennych niezależnych oznaczono jako: (1) czas [min], (2) temperatura [°C], (3) stężenie etanolu [%]. Interakcje: czas i stężenie etanolu (1L wz. 3L); czas i temperatura (1L wz. 2 L); temperatura i stężenie alkoholu (2L wz. 3 L).

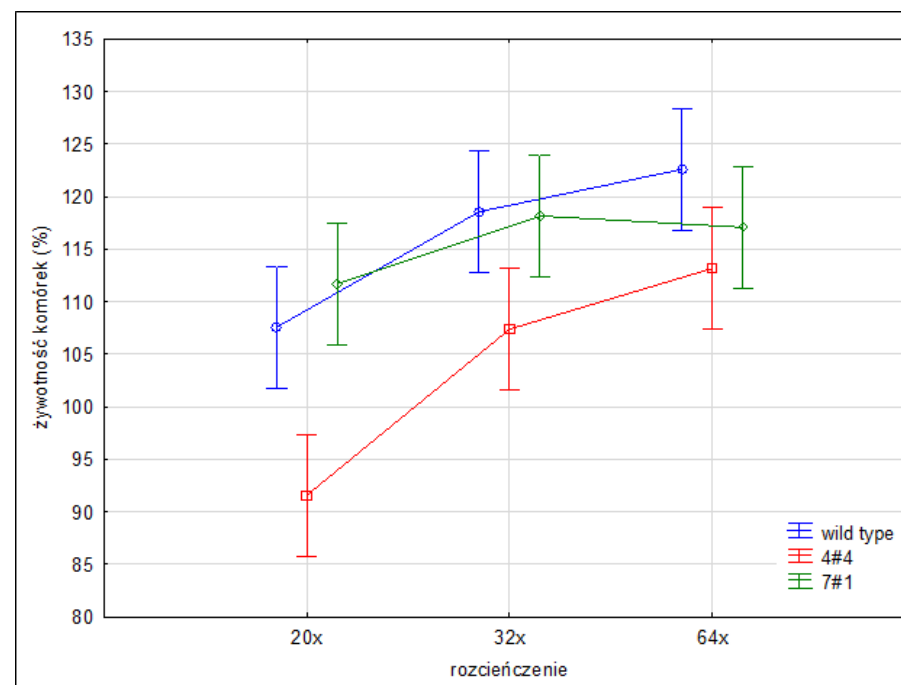


Załącznik 12. Wykres interakcji z dwuczynnikowej analizy wariancji dla żywotności komórek linii HaCaT poddanych działaniu ekstraktów etanolowych z roślin *Sarracenia purpurea* L.: (a) części zielone, (b) korzenie. Przedstawiono wartości średnie (n=3) oraz błąd standardowy.

a)

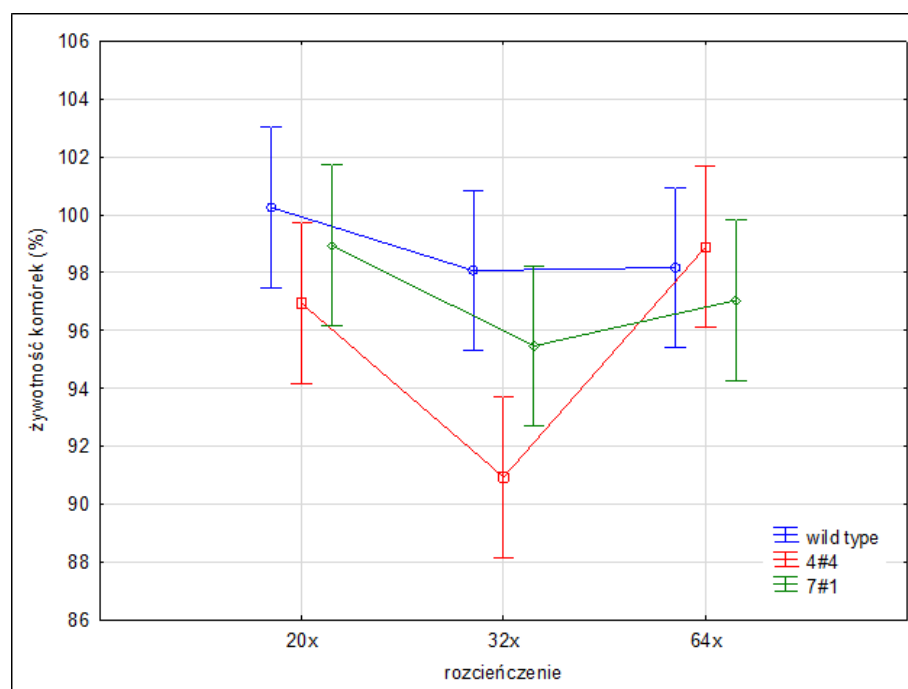


b)

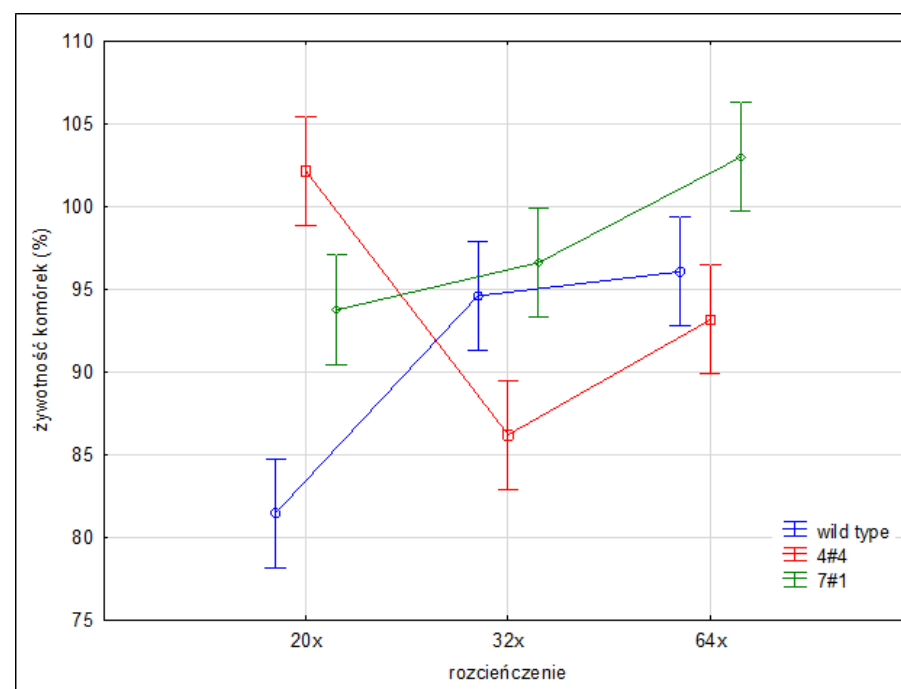


Załącznik 13. Wykres interakcji z dwuczynnikowej analizy wariancji dla żywotności komórek linii CHO-K1 poddanych działaniu ekstraktów etanolowych z roślin *Sarracenia purpurea* L.: (a) części zielone, (b) korzenie. Przedstawiono wartości średnie (n=3) oraz błąd standardowy.

a)

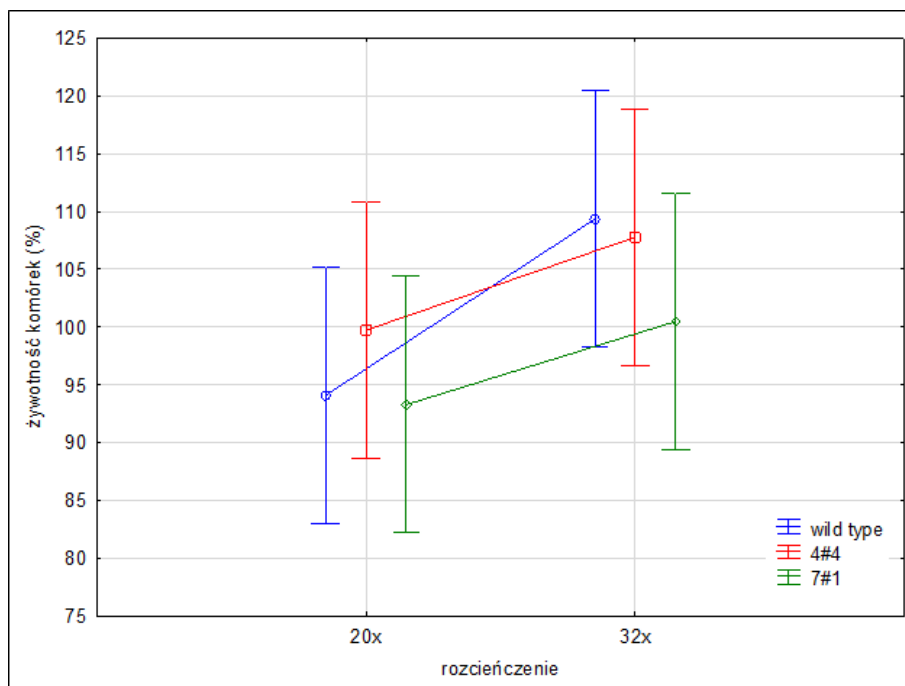


b)

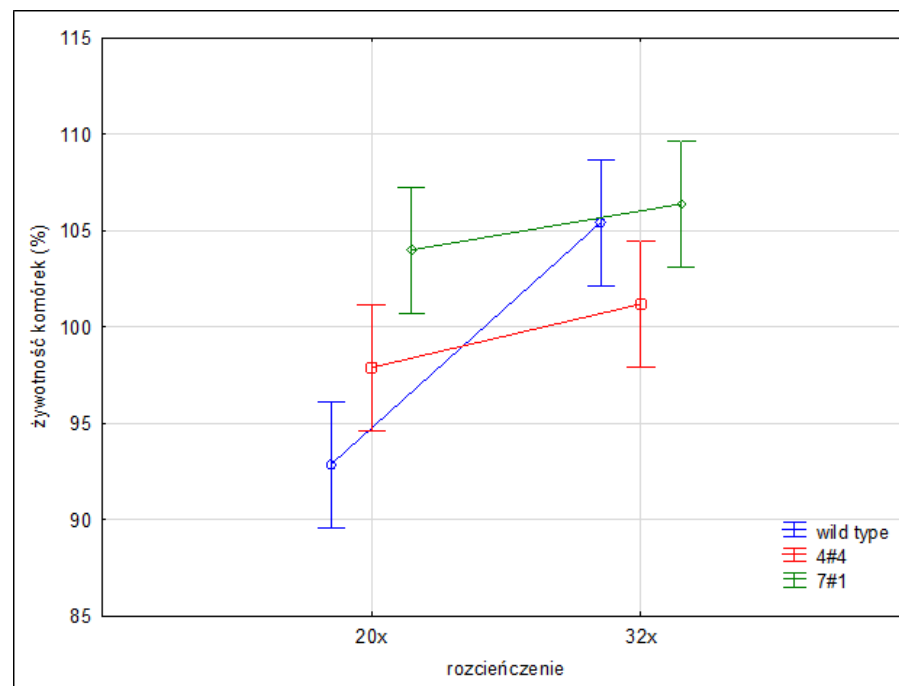


Załącznik 14. Wykres interakcji z dwuczynnikowej analizy wariancji dla żywotności komórek linii NHDF poddanych działaniu ekstraktów wodnych z roślin *Sarracenia purpurea* L.: (a) części zielone, (b) korzenie. Przedstawiono wartości średnie (n=3) oraz błąd standardowy.

a)

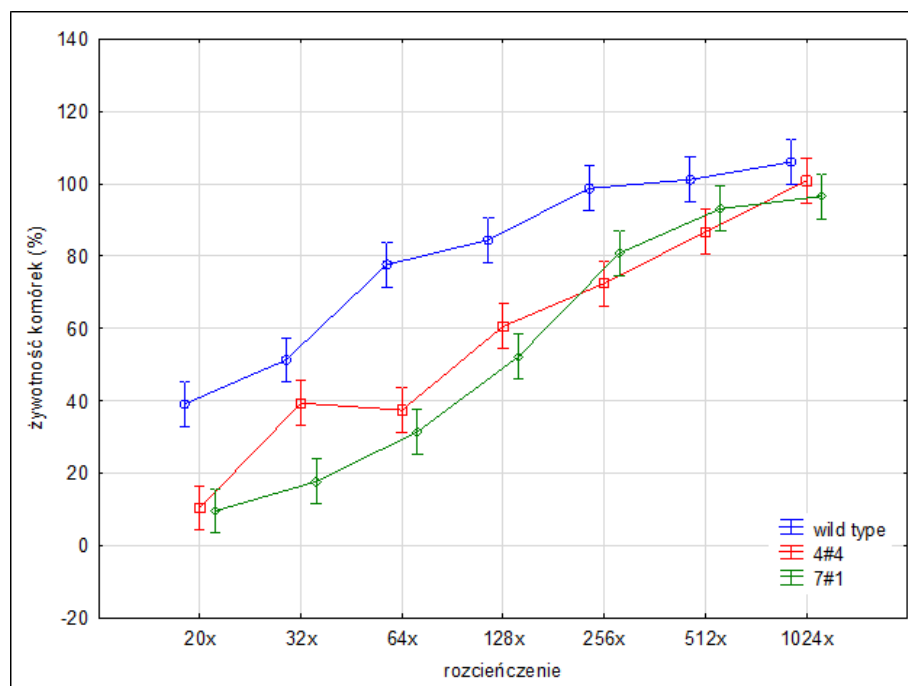


b)

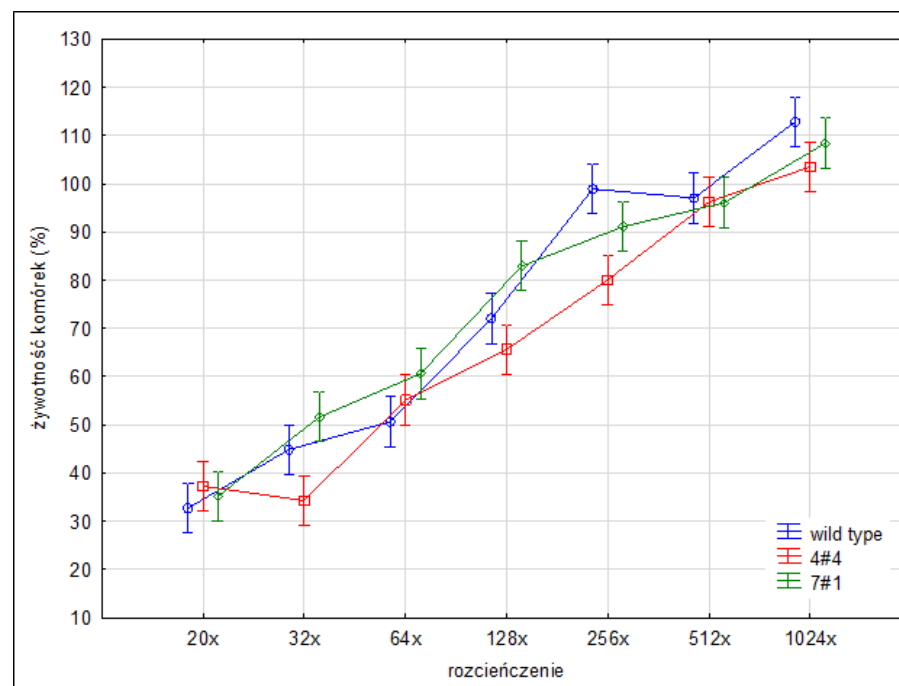


Załącznik 15. Wykres interakcji z dwuczynnikowej analizy wariancji dla żywotności komórek linii BxPC3 poddanych działaniu ekstraktów etanolowych z roślin *Sarracenia purpurea* L.: (a) części zielone, (b) korzenie. Przedstawiono wartości średnie (n=3) oraz błąd standardowy.

a)

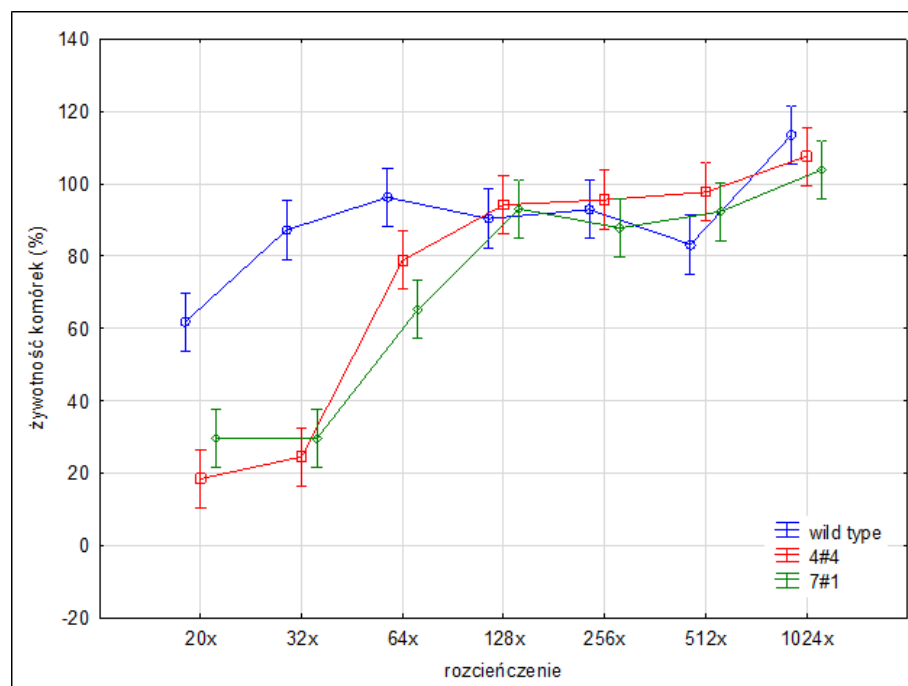


b)

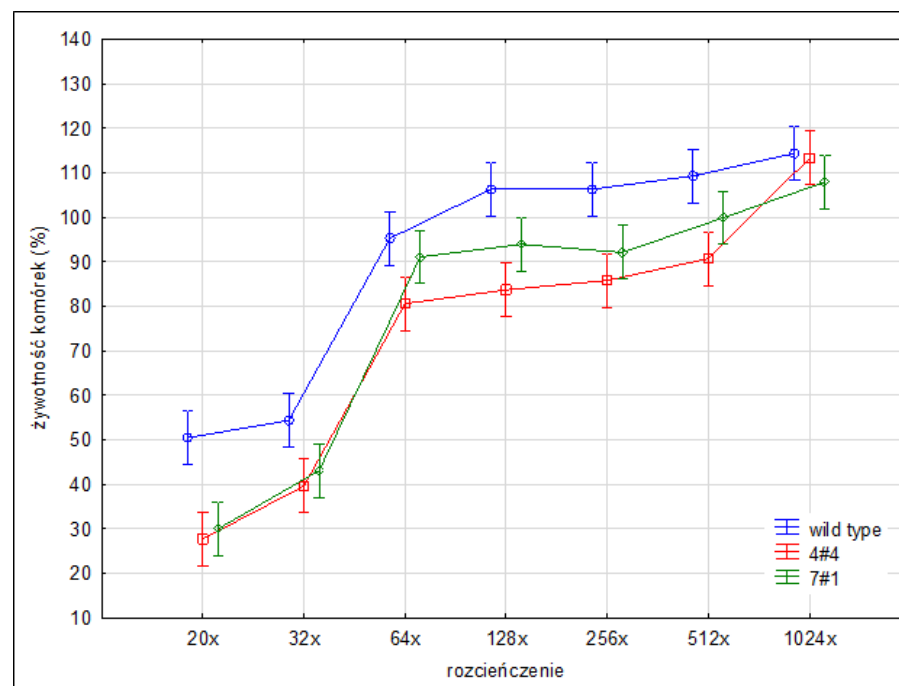


Załącznik 16. Wykres interakcji z dwuczynnikowej analizy wariancji dla żywotności komórek linii AsPC1 poddanych działaniu ekstraktów etanolowych z roślin *Sarracenia purpurea* L.: (a) części zielone, (b) korzenie. Przedstawiono wartości średnie (n=3) oraz błąd standardowy.

a)

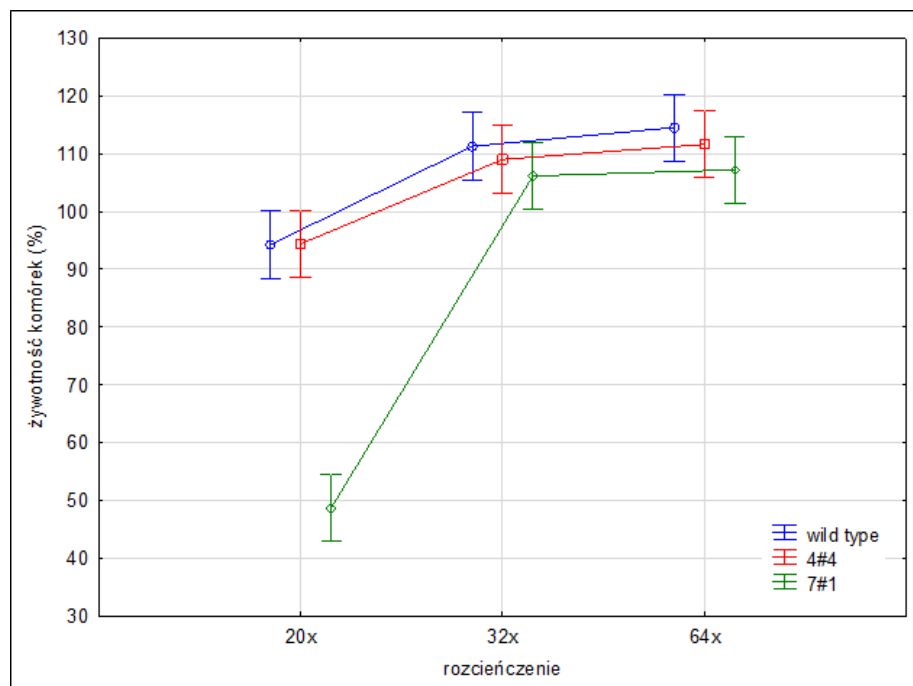


b)

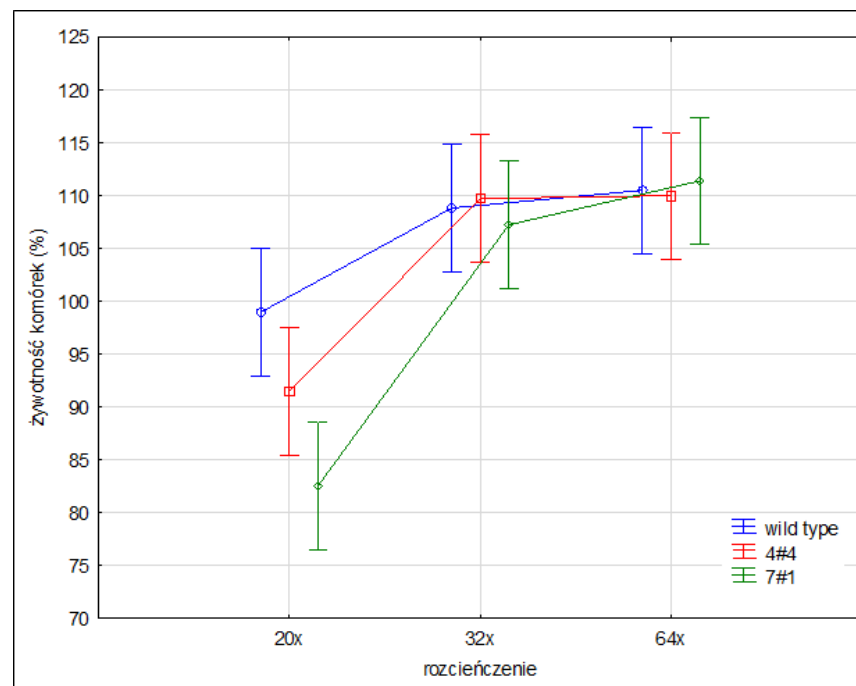


Załącznik 17. Wykres interakcji z dwuczynnikowej analizy wariancji dla żywotności komórek linii HeLa poddanych działaniu ekstraktów etanolowych z roślin *Sarracenia purpurea* L.: (a) części zielone, (b) korzenie. Przedstawiono wartości średnie (n=3) oraz błąd standardowy.

a)

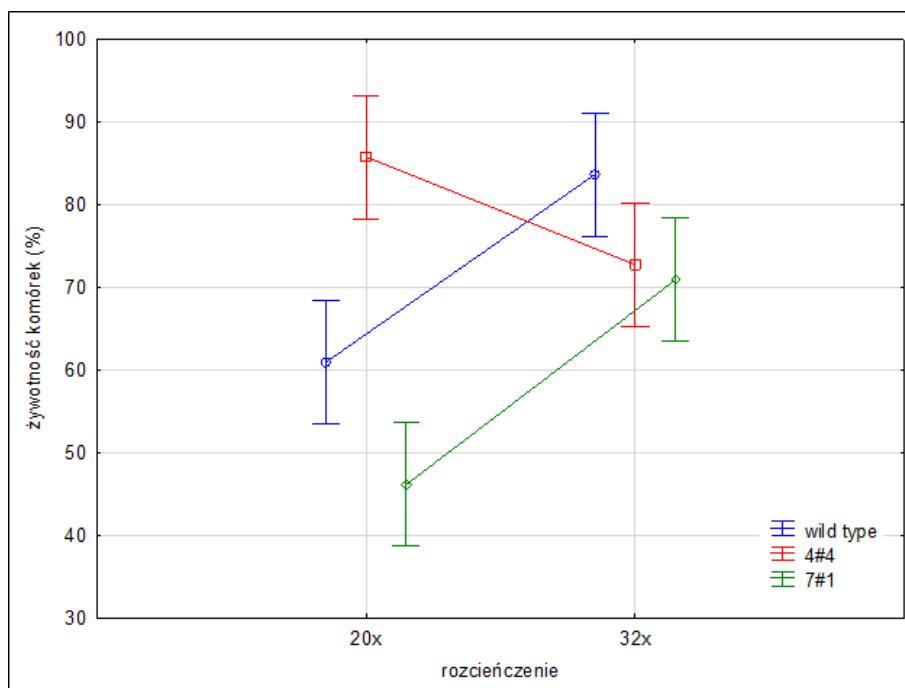


b)

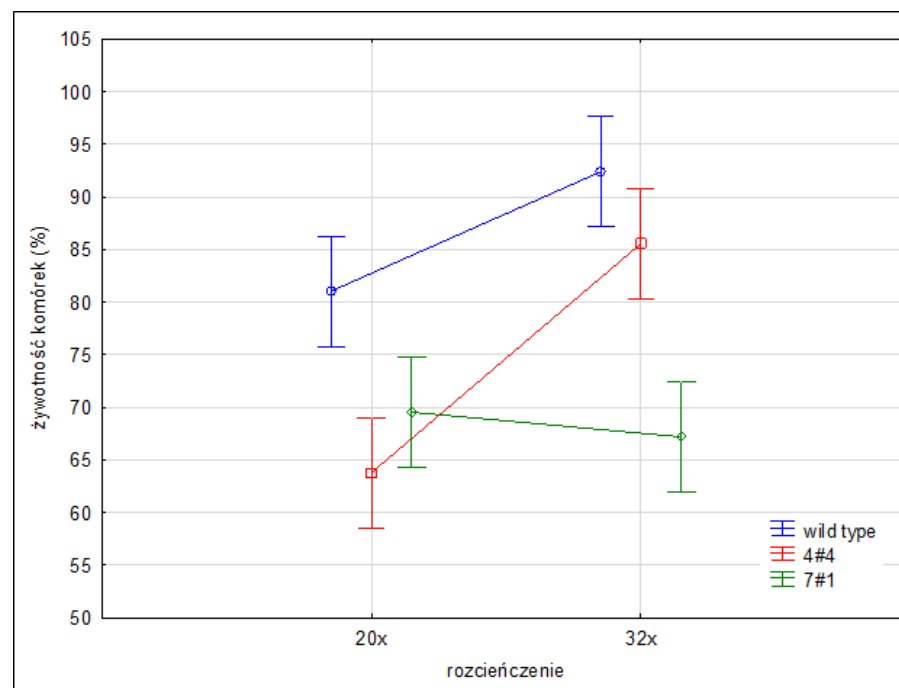


Załącznik 18. Wykres interakcji z dwuczynnikowej analizy wariancji dla żywotności komórek linii BxPC3 poddanych działaniu ekstraktów wodnych z roślin *Sarracenia purpurea* L.: (a) części zielone, (b) korzenie. Przedstawiono wartości średnie (n=3) oraz błąd standardowy.

a)

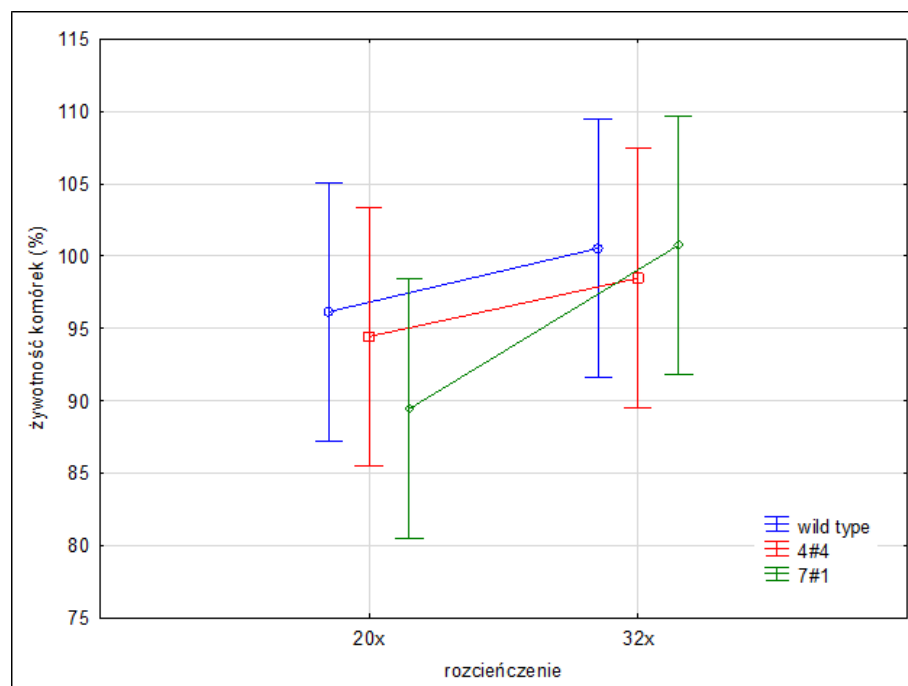


b)



Załącznik 19. Wykres interakcji z dwuczynnikowej analizy wariancji dla żywotności komórek linii AsPC1 poddanych działaniu ekstraktów wodnych z roślin *Sarracenia purpurea* L.: (a) części zielone, (b) korzenie. Przedstawiono wartości średnie (n=3) oraz błąd standardowy.

a)



b)

