

# **AUTOREFERAT**

**Dr inż. Agata Ptak**

**Katedra Hodowli Roślin i Nasiennictwa**

**Wydział Rolniczo – Ekonomiczny**

**Uniwersytet Rolniczy im Hugona Kołłątaja w Krakowie**

**Kraków, styczeń 2014**

1. Imię i Nazwisko.

**AGATA PTAK**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

**Dyplom doktora nauk rolniczych** w zakresie ogrodnictwa, Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, Wydział Ogrodniczy, 12.02.2001 r. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Somatyczna embriogeneza w kulturach pędów i załączni tulipana”

**Dyplom magistra inżyniera** ogrodnictwa, Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, Wydział Ogrodniczy, 1995

**Dyplom Studium Pedagogicznego**, Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki w Krakowie, Uczelniane Studium Pedagogiki i Psychologii, 1995

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

**1.10.2005 – obecnie** – Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja, Wydział Rolniczo – Ekonomiczny, Katedra Hodowli Roślin i Nasiennictwa, stanowisko: adiunkt

**18.02.2002 – 30.09.2005** – Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Wydział Farmaceutyczny, Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, stanowisko: adiunkt

4. Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

**Cykl jednotematycznych publikacji przedstawionych pod tytułem:**

**„Studia nad somatyczną embriogenezą oraz biosyntezą galantaminy i likoryny w kulturach *in vitro* *Leucojum aestivum* L.”**

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),

\* w przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/ prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie

**Ptak A., El Tahchy A., Dupire F., Boisbrun M., Henry M., Chapleur Y., Moś M., Laurain-Mattar D. (2009).** LCMS and GCMS for the screening of alkaloids in natural and *in vitro* extracts of *Leucojum aestivum*. *Journal of Natural Products* 72, 142-147. **IF=3,159 (35 pkt.)** (*udział własny 55 %*)

**Ptak A., El Tahchy A., Wyzgolik G., Henry M., Laurain-Mattar D. (2010).** Effects of ethylene on somatic embryogenesis and galanthamine content in *Leucojum aestivum* L. cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 102, 61-67. **IF=1,243 (35 pkt.)** (*udział własny 70 %*)

**Ptak A., Simlat M., Kwiecień M., Laurain-Mattar D. (2013).** *Leucojum aestivum* plants propagated in *in vitro* bioreactor culture and on solid media containing cytokinins. *Engineering in Life Sciences*, 13 (3), 261–270. **IF=1,633 (20 pkt.)** (*udział własny 60 %*)

**Ptak A., El Tahchy A., Skrzypek E., Wójtowicz T., Laurain-Mattar D. (2013).** Influence of auxins on somatic embryogenesis and alkaloid accumulation in *Leucojum aestivum* callus. *Central European Journal of Biology*, 8 (6), 591-599. **IF=0,818 (20 pkt.)** (*udział własny 65 %*)

*Sumaryczny IF 4 prac = 6,853*

**b) Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

Wiodącym tematem w moich badaniach, po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, była somatyczna embriogeneza oraz biosynteza alkaloidów, głównie galantaminy i likoryny w kulturach *in vitro* śnieżycy letniej (*Leucojum aestivum* L.).

Śnieżycza letnia jest przedstawicielem rodziny amarylkowatych (Amaryllidaceae). Jest ozdobną rośliną cebulową, ma także właściwości lecznicze ze względu na zawartość alkaloidów izochinolinowych. Do najważniejszych z nich należy galantamina, która jest selektywnym, odwracalnym inhibitorem acetylocholinoesterazy i znajduje zastosowanie w leczeniu choroby Alzheimer'a. Galantamina jest dostępna pod handlową nazwą Razadyne® (wcześniej Reminyl®) oraz Nivalin® (Ivanov i in. 2013).

Innym ważnym alkaloidem śnieżycy letniej jest likoryna, która wykazuje działanie antynowotworowe i przeciwzapalne. Aktualnie trwają badania nad możliwością wdrożenia tej substancji do celów leczniczych (Szlavik i in. 2004).

Pierwotnym źródłem, z którego pozyskiwano galantaminę były cebule śnieżycy letniej, pochodzące ze stanowisk naturalnych w Bułgarii. Przyczyniło się to jednak do częściowego wyniszczenia roślin (1 kg galantaminy otrzymywano z 1 tony cebul). Natomiast zapotrzebowanie roczne na galantaminę wynosi ok. 500 ton. Przeprowadzono również syntezę chemiczną galantaminy, ale jest ona ekonomicznie nieopłacalna (koszt: 50 000 USD/kg galantaminy) (Tanimato i in. 2007). Alternatywnym sposobem otrzymywania metabolitów wtórnych może być ich biosynteza w kulturach *in vitro* (Briskin 2007). Główną zaletą kultur *in vitro* jest uniezależnienie od warunków środowiskowych oraz możliwość ciągłej produkcji surowca wysokiej jakości. Z ekonomicznego punktu widzenia zastosowanie kultur *in vitro* do pozyskiwania substancji leczniczych związane jest z zapotrzebowaniem rynku oraz z wydajnością tej techniki. Somatyczna embriogeneza uznawana jest za wydajną metodę mikrorozmnażania roślin, a uzyskany tym sposobem materiał roślinny może służyć jako cenne źródło metabolitów wtórnych (Laurain-Mattar 2008).

Zagadnieniem dotyczącym somatycznej embriogenezy oraz biosyntezy alkaloidów Amaryllidaceae w kulturach *in vitro* śnieżycy letniej zainteresowałam się po raz pierwszy podczas pracy w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum. Problematyka ta nie była wówczas podejmowana w Polsce, była także słabo zbadana na świecie. Nieliczne prace dotyczyły jedynie organogenezy *Leucojum aestivum* oraz somatycznej embriogenezy *Narcissus confusus* i biosyntezy alkaloidów amarylkowatych w uzyskanym tą drogą materiale roślinnym (Stanilova i in. 1994; Sellés i in. 1999). Od 2003 do 2005 r. realizowałam na Wydziale Farmaceutycznym temat Badań Własnych (WŁ/288/P/F): „Opracowanie metody regeneracji śnieżycy (*Leucojum* sp.) w warunkach *in vitro* oraz próba izolacji galantaminy”. Moje wstępne badania, rozpoczęte w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej, rozwinęłam po zatrudnieniu w Katedrze Hodowli Roślin i Nasiennictwa Wydziału Rolniczo – Ekonomicznego Uniwersytetu Rolniczego, prowadząc prace finansowane w ramach Badań Własnych (BW 2170) oraz Działalności Statutowej Katedry (DS 3129). Realizacja tego tematu była również możliwa dzięki współpracy, jaką nawiązałam z Université Henri Poincaré - Nancy 1 z Francji (umowa międzyuczelniana), a otrzymane wyniki dały podstawę do przygotowania cyklu oryginalnych prac twórczych, które uważam za swoje najważniejsze osiągnięcie naukowe, wymagane przy ubieganiu się o stopień doktora habilitowanego.

Badania, których wyniki stanowią osiągnięcie naukowe wnioskodawcy, miały następujące cele:

- A) określenie wpływu warunków prowadzenia kultury *in vitro* na somatyczną embriogenezę *Leucojum aestivum*,
- B) ustalenie działania wybranych czynników na biosyntezę galantaminy i likoryny w kulturach *in vitro* *Leucojum aestivum*,
- C) zbadanie potencjału kultur kalusowych *Leucojum aestivum* w zakresie biosyntezy alkaloidów Amaryllidaceae.

**A) określenie wpływu warunków prowadzenia kultury *in vitro* na somatyczną embriogenezę *Leucojum aestivum***

Somatyczna embriogeneza jest złożonym procesem regeneracyjnym, a poszczególne jej etapy uzależnione są m. in. od kompetencji eksplantatu oraz warunków chemicznych i fizycznych. Moje wcześniejsze badania wykazały, że somatyczna embriogeneza w kulturach *in vitro* śnieżycy letniej zachodziła drogą pośrednią – poprzez kalus, a fragmenty liści izolowane z cebul chłodzonych przez 12 tygodni w temperaturze 5 °C charakteryzowały się największą zdolnością do tworzenia kalusa [B5]. Spośród wielu czynników wpływających na somatyczną embriogenezę, niewątpliwie regulatory wzrostu (głównie auksyny i cytokiny), decydują o przebiegu tego procesu (Jiménez i Thomas 2006).

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach, na etapie indukcji i namnażania kalusa śnieżycy letniej przetestowałam takie auksyny, jak: 2,4-D, pikloram, dikamba w stężeniach 25 i 50  $\mu\text{M}$  z dodatkiem 0,5  $\mu\text{M}$  BA [A1]. Największy procent eksplantatów formujących kalus uzyskałam pod wpływem pikloramu, niezależnie od zastosowanego stężenia. Natomiast kalus otrzymany i namnażany na pożywce wzbogaconej w 2,4-D (50  $\mu\text{M}$ ) cechował się najwyższym współczynnikiem namnażania oraz tworzył najwięcej zarodków somatycznych. Zaobserwowałam również, że kalus śnieżycy letniej uzyskany i namnażany na pożywce zawierającej 25  $\mu\text{M}$  dikamby był wilgotny i wykazywał tendencję do brunatnienia i zamierania. W pozostałych przypadkach kalus był suchy i żółty. Powyższe spostrzeżenia skłoniły mnie do oznaczenia w kalusie zawartości związków fenolowych. Ten etap badań prowadzony był we współpracy z dr hab. Edytą Skrzypek (Zakład Biotechnologii, Instytut Fizjologii Roślin PAN w Krakowie). Produkcja związków fenolowych w kulturach *in vitro* uzależniona jest od wielu czynników, m. in. takich jak: światło, temperatura, składniki pożywki, a także stadium rozwojowe kultury. Wiele związków fenolowych jest nietrwałych ze względu na reakcje chemiczne i biochemiczne zachodzące z ich udziałem. Do

najważniejszych należy reakcja utleniania enzymatycznego, powodująca brązowienie tkanek w kulturach *in vitro*, która najprawdopodobniej jest główną przyczyną słabej regeneracji kalusa (Skrzypek i in. 2007). Przeprowadzone analizy spektrofotometryczne wykazały, że kalus śnieżycy letniej otrzymany i namnażany na pożywce z dodatkiem 25  $\mu\text{M}$  dikamby wytwarzał największą ilość związków fenolowych. Równocześnie zaobserwowałam, że kalus ten brunatniał i charakteryzował się najsłabszymi zdolnościami regeneracyjnymi.

O przydatności somatycznej embriogenezy do masowej produkcji roślin decyduje zarówno ilość, jak i jakość otrzymanych zarodków. Tylko dojrzałe zarodki m. in. o prawidłowej morfologii mogą kiełkować i następnie ulegać konwersji do prawidłowo uformowanych siewek. Dodatek do pożywki glikolu polietylenowego (PEG) przyczynił się do otrzymania przeze mnie największej liczby prawidłowo uformowanych zarodków somatycznych w stadium liścieniowym [A1].

Kolejnym czynnikiem chemicznym, który został zbadany przeze mnie w procesie somatycznej embriogenezy śnieżycy letniej był etylen. Zainteresowanie tym gazowym regulatorem wzrostu, związane było m. in. z tematyką badań, jaką prowadziłam pod kierunkiem dr Geert – Jan de Klerk, w czasie mojego pobytu na stażu w laboratorium kultur tkankowych (Applied Plant Research) w Lisse, w Holandii. Etylen w kulturach *in vitro* traktowany jest najczęściej jako niekorzystny gazowy regulator wzrostu, jednak stwierdzono również jego stymulujące działanie na niektóre procesy morfogenetyczne (de Klerk i in. 1999). W moich badaniach na etapie indukcji kalusa zastosowałam pożywkę wzbogaconą w prekursor syntezy etylenu: ACC oraz inhibitory syntezy etylenu:  $\text{AgNO}_3$  i STS w stężeniach 1 i 10  $\mu\text{M}$ , a także  $\text{KMnO}_4$  w celu absorpcji etylenu wydzielanego przez kulturę. Badania wykazały, że etylen nie wpływał korzystnie na powstawanie kalusa śnieżycy letniej. Zwiększenie syntezy etylenu poprzez dodatek do pożywki ACC hamowało jego indukcję. Natomiast najwyższy stopień intensywności formowania kalusa odnotowałam pod wpływem  $\text{AgNO}_3$  i STS, zastosowanych w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  oraz w obecności  $\text{KMnO}_4$  [A2].

W publikacji [A3] określiłam działanie etylenu również na namnażanie kalusa oraz indukcję i rozwój zarodków somatycznych śnieżycy letniej. Zastosowanie  $\text{KMnO}_4$  spowodowało największe przyrosty suchej masy kalusa (285 % s.m.), podczas gdy pod wpływem ACC przyrosty kalusa były najniższe (189 % s.m.). Z kolei najwięcej zarodków somatycznych tworzyło się oraz przekształcało ze stadium globularnego w liścieniowe pod wpływem ACC. Dodatek do pożywki STS spowodował, że zarodki nie rozwijały się w ogóle. W przeprowadzonych badaniach wykazałam, że etylen hamował indukcję i namnażanie

kalusa śnieżycy letniej natomiast stymulował powstawanie i rozwój zarodków somatycznych [A2 i A3].

W ramach współpracy z dr Gabriellą Wyżgolik z Katedry Fizjologii Roślin UR w Krakowie (aktualnie: Zakład Botaniki i Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii) przy pomocy chromatografu gazowego wykonane zostały pomiary zawartości etylenu w pojemnikach, w których namnażany był kalus oraz rozwijały się zarodki somatyczne. Analiza chromatograficzna wykazała największą ilość etylenu w pojemnikach z kalusem namnażanym na pożywce z dodatkiem ACC. Pożywka ta zawierała także auksynę w dużym stężeniu (25  $\mu\text{M}$  pikloramu), która mogła również indukować syntezę etylenu. ACC stymulowało także powstawanie etylenu w kulturach zarodków somatycznych, ale w mniejszych ilościach niż w kulturach kalusowych. W pożywce, na której rozwijały się zarodki somatyczne znajdowało się 0,5  $\mu\text{M}$  NAA. Natomiast etylen nie występował w ogóle w pojemnikach, w których zastosowałam pożywkę z inhibitorami syntezy etylenu oraz  $\text{KMnO}_4$  zarówno na etapie namnażania kalusa, jak i rozwoju zarodków somatycznych [A3]. Zawarte w publikacjach [A2 i A3] wyniki mogą mieć aspekt praktyczny, ponieważ wskazują na możliwość sterowania poszczególnymi etapami somatycznej embriogenezy śnieżycy letniej, w zależności od zawartości etylenu w naczyniach hodowlanych.

W celu potwierdzenia prawidłowej budowy morfologicznej otrzymanych zarodków somatycznych śnieżycy letniej, wykonałam preparaty i obserwacje w mikroskopie skaningowym, co znalazło odzwierciedlenie w publikacjach [A2 i A3].

Efektem końcowym embriogenezy somatycznej jest kompletna roślina z wykształconym jednym lub dwoma liścieniami, epikotyłem i korzonkiem zarodkowym. W wielu laboratoriach trwają intensywne prace badawcze zmierzające do ulepszenia procedur regeneracji zarodków somatycznych różnych gatunków roślin, tak aby wyeliminować pojawiające się często w kulturach *in vitro* zaburzenia rozwojowe, takie jak: formowanie wielu liścieni, staśmienia, nie wykształcanie korzeni zarodkowych lub brak epikotyli. Publikacja [A4] zawiera szczegółowe dane dotyczące kiełkowania i konwersji zarodków somatycznych śnieżycy letniej oraz ocenę jakości zregenerowanych z nich roślin. Kiełkowanie i konwersja zarodków somatycznych w rośliny ma miejsce na pożywkach bez regulatorów wzrostu lub z dodatkiem cytokinin. W swojej pracy skupiłam się nad zbadaniem działania egzogennych cytokinin: BA, zeatyny, kinetyny, meta-topoliny, tidiazuronu oraz stanu fizycznego pożywki (pożywka stała i płynna w bioreaktorze RITA<sup>®</sup>) na rozwój roślin *Leucojum aestivum*. Najwięcej prawidłowo uformowanych roślin śnieżycy letniej otrzymałam z zarodków somatycznych rosnących na pożywce wzbogaconej w tidiazuron i meta-topolinę

(odpowiednio: 94,8 i 90,6 %). Rośliny zregenerowane na pożywce z dodatkiem meta-topoliny charakteryzowały się również największą masą. Meta-topolina jest stosunkowo nową cytokininą, wykorzystywaną do mikrorozmnażania roślin. Do tej pory nie była stosowana w kulturach *in vitro* roślin cebulowych.

Interesującym dla mnie było również sprawdzenie i porównanie wydajności regeneracji roślin śnieżycy letniej na pożywkach stałych oraz płynnych. Kultury płynne, a zwłaszcza bioreaktorowe, zapewniają równomierny dostęp do składników pożywki, pozwalają na znaczną automatyzację i większą kontrolę nad rozwojem zarodków somatycznych, charakteryzują się także większym współczynnikiem namnażania w porównaniu do kultur prowadzonych na pożywkach stałych. Roślinne kultury bioreaktorowe stosuje się głównie w celu zautomatyzowania mikrorozmnażania na dużą skalę, wytwarzania metabolitów wtórnych i enzymów oraz biotransformacji egzogennych prekursorów. Ostatnio dużym powodzeniem cieszą się bioreaktory RITA<sup>®</sup> o okresowym systemie zalewania pożywką. Bioreaktor RITA<sup>®</sup> pozwala na wzrost materiału roślinnego w warunkach tlenowych oraz czasowy dostęp do składników pożywki. W literaturze istniały przesłanki świadczące o korzystnym wpływie tego sposobu prowadzenia kultury na indukcję i rozwój zarodków somatycznych (Cabasson i in. 1997; Etienne-Barry i in. 1999). Nie było natomiast danych dotyczących wykorzystania bioreaktora RITA<sup>®</sup> w kulturach zarodków somatycznych śnieżycy letniej. Wyniki dotyczące namnażania kalusa i indukcji zarodków somatycznych w bioreaktorze RITA<sup>®</sup> zawarłam w publikacji [B6]. W publikacji [A4] wykazałam natomiast, że dzięki użyciu bioreaktora o okresowym systemie zalewania pożywką możemy uzyskać dwa razy więcej roślin o dwukrotnie większej masie w porównaniu do roślin otrzymanych na pożywce stałej. Zastosowanie bioreaktora RITA<sup>®</sup> może być wykorzystane w dalszych badaniach nad rozmnażaniem tych roślin na większą skalę.

Rośliny pochodzące z kultur *in vitro* powinny być standaryzowane, czyli powinny podlegać ocenie morfologicznej, fizjologicznej, biochemicznej i cytogenetycznej. Taka ocena jest niezwykle istotna przy opracowywaniu protokołów mikrorozmnażania roślin, zwłaszcza leczniczych (Thiem, Kikowska 2008). Oprócz oceny morfologicznej zregenerowanych roślin, na podstawie której określiłam liczbę prawidłowo uformowanych roślin, ważną była także wykonana przeze mnie ocena na poziomie genetycznym. Zmienność somaklonalna, występująca w kulturach *in vitro* jest zjawiskiem niepożądanym, szczególnie w przypadku, gdy mamy do czynienia z roślinami leczniczymi i produkcją substancji leczniczych, gdyż może doprowadzić do obniżenia zawartości metabolitów wtórnych.



Spośród technik molekularnych do analizy stabilności genetycznej wielu gatunków roślin wykorzystywać można metodę RAPD. W przeprowadzonych badaniach w oparciu o markery RAPD określiłam wpływ cytokinin oraz stanu fizycznego pożywki na zróżnicowanie roślin zregenerowanych w warunkach *in vitro*. Analizy te przeprowadziłam we współpracy z dr Magdaleną Simlat z Katedry Hodowli Roślin i Nasiennictwa UR w Krakowie. Do oceny roślin wykorzystałam 15 starterów dekamerowych o losowej sekwencji. Profile elektroforetyczne otrzymane z użyciem 12 starterów posłużyły do dalszych analiz, trzy startery wykazały bowiem słabą efektywność amplifikacji. Otrzymane profile RAPD pozwoliły na obserwację dystrybucji 212 markerów, w tym 140 o charakterze polimorficznym. Występujący polimorfizm markerów był wynikiem zarówno sposobu prowadzenia kultury (pożywka stała lub płynna w bioreaktorze) oraz rodzaju zastosowanej cytokininy. Sporządzona na podstawie analizy obrazów elektroforetycznych macierz binarna posłużyła do obliczenia dystansu genetycznego pomiędzy badanymi próbkami DNA. Rośliny otrzymane w bioreaktorze charakteryzowały się mniejszymi wartościami dystansu genetycznego w odniesieniu do roślin matecznych (wykorzystanych do zakładania kultur *in vitro*) niż rośliny zregenerowane na pożywkach stałych. Wykazano natomiast, że zastosowane cytokininy istotnie wpływały na zróżnicowanie genetyczne roślin w kulturach płynnych. Szczególnie rośliny uzyskane na pożywce z dodatkiem zeatyny i BA wykazywały znaczny dystans w stosunku do roślin powstałych na pożywce bez regulatorów wzrostu (kontrola). Rośliny zregenerowane na pożywkach stałych cechowały się znacznie mniejszym polimorfizmem.

Ocena biochemiczna zregenerowanych roślin śnieżycy letniej zostanie omówiona w podpunkcie B.

#### **B) ustalenie działania wybranych czynników na biosyntezę galantaminy i likoryny w kulturach *in vitro* *Leucojum aestivum***

Współpraca z Uniwersytetem w Nancy z prof. Dominique Laurain-Mattar, nawiązana w czasie mojego pobytu na stażu, a następnie kontynuowana w ramach wyjazdów na zaproszenie Uczelni Francuskiej jako wykładowca zapraszany, pozwoliła mi na opracowanie protokołu oznaczania galantaminy i likoryny metodą LC-MS i GC-MS oraz rozwinięcie badań dotyczących biosyntezy alkaloidów Amaryllidaceae w kulturach *in vitro*. Metodę dotyczącą ekstrakcji materiału roślinnego oraz analiz chromatograficznych: LC-MS i GC-MS zawarłam w publikacji [A2].

Na wydajność biosyntezy alkaloidów w kulturach *in vitro* wpływa wiele czynników biologicznych, chemicznych i fizycznych. Do najważniejszych z nich należy wybór odpowiedniego genotypu, stopień zróżnicowania tkanek i organów, skład chemiczny pożywki (w tym: stężenie i rodzaj źródła energii i węgla, obecność makro- i mikroelementów, regulatorów wzrostu, dodatek prekursorów i elicytorów) oraz warunki fizyczne m. in. światło, temperatura, stan fizyczny pożywki (Bourgaud i in. 2001; Szpitter, Królicka 2005). Zaprezentowane przeze mnie w publikacjach [A1-A4] badania, dotyczące działania auksyn, cytokinin, etylenu oraz stanu fizycznego pożywki na biosyntezę galantaminy i likoryny w materiale roślinnym *Leucojum aestivum* uzyskanym na drodze somatycznej embriogenezy, są pierwszymi doniesieniami opisującymi te zależności. Badania takie są również słabo opracowane dla innych gatunków roślin z rodziny Amaryllidaceae. W publikacji [A1] wykazałam metodą GC-MS obecność galantaminy i likoryny w tkance kalusowej otrzymanej pod wpływem różnych auksyn. Występowanie galantaminy w kalusie uzależnione było od rodzaju zastosowanej auksyny oraz jej stężenia. Galantamina wytwarzana była przez kalus namnażany na pożywce z dodatkiem 2,4-D (25 lub 50  $\mu\text{M}$ ), pikloramu (25  $\mu\text{M}$ ) oraz 50  $\mu\text{M}$  dikamby. Natomiast likoryna powstawała we wszystkich tkankach kalusowych, niezależnie od rodzaju testowanej auksyny.

Komórki niezróżnicowane, takie jak kalus zazwyczaj syntetyzują mniej metabolitów wtórnych niż kultury organów roślinnych, czy rośliny mateczne (Laurain-Mattar 2008). Wykonana przeze mnie analiza LC-MS wykazała, że cebule *Leucojum aestivum*, z których izolowałam eksplantaty inicjalne zawierały galantaminę w ilości: 0,03 % s.m. oraz likorynę: 0,01 % s.m. Natomiast uzyskana z nich, na pożywce wzbogaconej w 25  $\mu\text{M}$  pikloramu i 0,5  $\mu\text{M}$  BA, tkanka kalusowa zawierała tylko śladowe ilości galantaminy i 0,001 % s.m. likoryny. Dobrze dobrane warunki wzrostu mogą przyczynić się do tego, że również komórki kalusowe będą produkować wydajniej metabolity wtórne. Obecność absorbentu etylenu -  $\text{KMnO}_4$  w naczyniach, w których znajdowała się tkanka kalusowa, spowodowała wzrost zawartości galantaminy (z ilości śladowych do 0,002 % s.m.) oraz likoryny (z 0,001 % s.m. do 0,003 % s.m.). Nieco mniej galantaminy i likoryny obserwowałam w kalusie otrzymanym na pożywce wzbogaconej w 10  $\mu\text{M}$  STS. Natomiast dodatek do pożywki 1  $\mu\text{M}$  STS,  $\text{AgNO}_3$ , a także ACC (niezależnie od użytego stężenia) działał hamująco na biosyntezę tych alkaloidów. Wyniki tych badań przedstawiłam w publikacji [A2].

Powyzsze obserwacje sklonily mnie do zbadania wplywu etylenu na biosynteze galantaminy rowniez w kulturach kalusowych, ktore wykazywaly zdolnosc do roznicowania sie oraz w zregenerowanych zarodkach somatycznych. Tylko kalus namnazany na pozywce

wzbogaconej w 10  $\mu\text{M}$  STS oraz w obecności  $\text{KMnO}_4$  zdolny był do syntezy galantaminy w stężeniach odpowiednio: 0,1 % s.m. i 0,08 % s.m. Natomiast wyższe ilości galantaminy, jakie uzyskałam w kalusie różnicującym się w porównaniu do zawartości tego alkaloidu w kalusie niezróżnicowanym, świadczą o tym, że również stopień zróżnicowania tkanek *Leucojum aestivum* może wpływać na ich metabolizm wtórny [A3].

Prezentowane przeze mnie w publikacji [A3] wyniki dowodzą, że etylen odgrywa także istotną rolę w biosyntezie galantaminy w kulturach zarodków somatycznych śnieżycy letniej. Jego działanie jest jednak inne niż w opisywanych wcześniej kulturach kalusowych. Przeprowadzone badania wykazały, że etylen jest niezbędny do biosyntezy galantaminy w kulturach zarodków somatycznych. Dodatek do pożywki, na której rozwijały się zarodki somatyczne, prekursora syntezy etylenu spowodował prawie sześciokrotny wzrost stężenia galantaminy w porównaniu z kontrolną. Natomiast STS,  $\text{AgNO}_3$  i  $\text{KMnO}_4$  wpłynęły hamująco na produkcję galantaminy. Na uwagę zasługuje również fakt, że biosynteza galantaminy w zarodkach somatycznych utrzymywała się na poziomie 2 % s.m. i była znacznie wyższa od wartości, jakie obserwowałam w różnicującej się tkance kalusowej (0,08 – 0,1 % s.m.). Badania te mają istotny aspekt praktyczny, wskazują bowiem na dobór odpowiedniego materiału roślinnego do dalszych badań oraz wykazują, jak można sterować biosyntezą galantaminy poprzez regulowanie poziomem etylenu w naczyniach hodowlanych. Wyniki te mogą być przydatne również do badań nad biosyntezą metabolitów wtórnych u innych gatunków.

W publikacji [A4] określiłam wpływ egzogennych cytokinin, takich jak: BA, zeatyna, kinetyna, mata-topolina, tidiazuron oraz stanu fizycznego pożywki (pożywka stała i płynna w bioreaktorze okresowo-zalewowym RITA<sup>®</sup>) na biosyntezę galantaminy i likoryny w roślinach śnieżycy letniej zregenerowanych z zarodków somatycznych. Dotychczas testowano jedynie działanie BA i kinetyny na produkcję galantaminy w kulturach *in vitro* *Narcissus* sp. (Codina 2002). Natomiast bioreaktor RITA<sup>®</sup> wykorzystywany był do badań nad biosyntezą alkaloidów Amaryllidaceae, ale w kulturach pędowych *Leucojum aestivum* (Ivanov i in. 2012). Zagadnienie, jakie poruszyłam w badaniach jest niezwykle istotne w produkcji metabolitów wtórnych. Kultury bioreaktorowe w najbliższej przyszłości mogą stanowić alternatywę dla innych metod otrzymywania metabolitów wtórnych. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń udało mi się stwierdzić, że najwyższą zawartością galantaminy charakteryzowały się rośliny rosnące w bioreaktorze okresowo-zalewowym RITA<sup>®</sup> na pożywce wzbogaconej w tidiazuron (0,05 % s.m.). Natomiast najwięcej likoryny powstawało w roślinach prowadzonych na pożywce stałej zawierającej kinetynę lub BA

(odpowiednio: 0,0074 i 0,0070 % s.m.). Ciekawą obserwacją było również to, że rośliny, które syntetyzowały najwięcej galantaminy równocześnie produkowały najmniejsze ilości likoryny i odwrotnie. Badania te potwierdziły wcześniejsze doniesienia o konkurencyjności szlaków metabolicznych tych dwóch alkaloidów [A8].

Komórki zazwyczaj nie wydzielają pożądaných substancji do podłoża, lecz gromadzą je w wakuolach czy innych organellach, w wyniku czego potrzebne jest poddanie uzyskanej biomasy procesowi ekstrakcji, co znacznie podraża koszty produkcji. W moich badaniach rośliny prowadzone w bioreaktorze RITA® na pożywce wzbogaconej w tidiazuron wydzielaly galantaminę i likorynę do pożywki. Zawartości te były jednak znacznie mniejsze od tych, jakie obserwowałam w roślinach [A4].

### **C) zbadanie potencjału kultur kalusowych *Leucojum aestivum* w zakresie biosyntezy alkaloidów Amaryllidaceae**

Alkaloidy amarylkowatych należą do grupy alkaloidów izochinolinowych. Ich właściwości lecznicze były znane już w starożytnej Grecji. Główny bohater Odysei Homera, Odyseusz używał wywaru ze śnieżyczki jako środka łagodzącego bóle głowy. Alkaloidy te wykazują m. in. działanie antynowotworowe, antywirusowe, przeciwmalaryczne, przeciwzapalne, stosowane są w leczeniu miopatii oraz przy zaburzeniach funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego. Najważniejszym z medycznego punktu widzenia alkaloidem jest galantamina, znajdująca zastosowanie w leczeniu choroby Alzheimera (Lu i in. 2011; Berkov i in. 2012). Galantamina, jako inhibitor acetylocholinoesterazy powoduje, że po jej podaniu w synapsach cholinergiczných zwiększa się poziom acetylocholino, dzięki czemu ulegają poprawie funkcje poznawcze mózgu. Aktualnie trwają badania nad możliwością wykorzystania innych alkaloidów z rodziny Amaryllidaceae jako potencjalnych inhibitorów acetylocholinoesterazy. W materiale roślinnym, zregenerowanym w kulturach *in vitro* może dochodzić do zmian zawartości syntetyzowanych alkaloidów w porównaniu do roślin matecznych. Warunki kultury *in vitro* mogą regulować zarówno ilość, jak i skład jakościowy alkaloidów. Istotnym było określenie przeze mnie składu jakościowego alkaloidów w materiale roślinnym otrzymanym na drodze somatycznej embriogenezy. Identyfikacja alkaloidów Amaryllidaceae odbywała się metodą GC-MS przy użyciu wzorca galantaminy i likoryny, a także na podstawie danych literaturowych (Berkov i in. 2005) oraz bazy danych (LIB NIST 08). Analizy GC-MS wykazały, że zarówno rodzaj, jak i stężenie zastosowanej w pożywce auksyny może wpływać na skład jakościowy alkaloidów w tkance kalusowej. W kalusie namnażanym na pożywce wzbogaconej w 50 µM pikloramu

występowało najwięcej alkaloidów (4 spośród 9 badanych). Analiza chromatograficzna nie wykazała jednak w nim obecności galantaminy. Ciekawym było natomiast odkrycie, że kalus ten wytwarzał tazetynę i 11-hydroxywitatyne, których obecności nie stwierdziłam w cebulach matecznych, wykorzystanych do indukcji tego kalusa. Kultury *in vitro* śnieżycy letniej mogą być więc źródłem nowych alkaloidów, często innych od występujących w cebulach pochodzących z upraw [A1].

Natomiast w publikacji, dotyczącej wpływu etylenu [A2], wykazałam obecność 7 alkaloidów w cebulach matecznych i 5 w kalusie (w zależności od zastosowanych warunków kultury *in vitro*). Kalus śnieżycy letniej namnażany w obecności  $\text{KMnO}_4$  charakteryzował się największym zróżnicowaniem alkaloidów. Występowały w nim 4 spośród badanych alkaloidów. Natomiast w kalusie namnażanym na pożywce z dodatkiem  $10 \mu\text{M}$  ACC i  $1 \mu\text{M}$  STS nie odnotowałam żadnego z oznaczanych alkaloidów. Warto zaznaczyć również, że w ekstraktach kalusowych występowały również inne alkaloidy, których na chwilę obecną nie udało się zidentyfikować.

Ubiegając się o stopień doktora habilitowanego nauk rolniczych (zgodnie z art. 16 ust. 2 Ustawy z dn. 14 marca 2003 o stopniach naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595, z późn. zm.)), jako swoje najważniejsze osiągnięcie w działalności naukowej, uważam cykl czterech oryginalnych prac twórczych, których problematykę syntetycznie przedstawiłam powyżej. W moich badaniach po raz pierwszy udało się:

- przeprowadzić i opisać proces somatycznej embriogenezy śnieżycy letniej,
- wykazać, że kalus embriogeniczny, zarodki somatyczne i zregenerowane z nich rośliny zdolne są do biosyntezy galantaminy i likoryny,
- zbadać wpływ auksyn, cytokinin, etylenu i stanu fizycznego pożywki na proces somatycznej embriogenezy i biosyntezę galantaminy i likoryny,
- ustalić skład jakościowy alkaloidów Amaryllidaceae w tkance kalusowej śnieżycy letniej.

Przedstawione badania pozwolą na wyjaśnienie niektórych aspektów procesu somatycznej embriogenezy i syntezy alkaloidów w kulturach *in vitro* nie tylko *Leucojum aestivum*, ale także innych gatunków. Ponadto uzyskana wiedza może być wykorzystana do mikrorozmnażania śnieżycy letniej oraz do badań nad opracowaniem wydajnej metody pozyskiwania galantaminy i likoryny dla celów leczniczych.

## Literatura

- Ivanov I., Georgiev V., Pavlov A. (2013) Elicitation of galanthamine biosynthesis by *Leucojum aestivum* liquid shoot cultures. *Journal of Plant Physiology* 170: 1122-1129
- Szlávik L., Gyuris A., Minarovits J., Forgo P., Molnar J., Hohmann J. (2004) Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Medica* 70: 871-873
- Tanimato H., Kato T., Chida N. (2007) Total synthesis of (+)- galanthamine starting from D-glucose. *Tetrahedron Lett.* 48: 6267-6270
- Briskin D. P. (2007) Biotechnological methods for selection of high-yielding cell lines and production of secondary metabolites in medicinal plants, W: Kayser O., Quax W. (Eds.), *Medicinal Plant Biotechnology. From Basic Research to Industrial Applications*, vol. 1, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany
- Laurain-Mattar D. (2008) Production of alkaloids in plant cell and tissue cultures, W: Ramawat K.G., Mérillon J.M. (Eds.), *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- Stanilova M. I., Ilcheva V. P., Zagorska N. A. (1994) Morphogenic potential and *in vitro* micropropagation of endangered plant species *Leucojum aestivum* L. and *Lilium rhodopaeum* Delip. *Plant Cell Reports* 13: 451-453
- Sellés M., Viladomat F., Bastida J., Codina C. (1999) Callus induction, somatic embryogenesis and organogenesis in *Narcissus confusus*: correlation between the state of differentiation and the content of galanthamine and related alkaloids. *Plant Cell Reports* 18: 646-651
- Jiménez V.M., Thomas C. (2006) Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. W: Mujib A., Šamaj J. (Eds.), *Plant Cell Monographs. Somatic Embryogenesis*, 2, Springer, Berlin
- Skrzypek E., Szechynska-Hebda M., Dąbrowska G. (2007) The influence of phenolics accumulation on callus regeneration abilities of chosen plant species. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 523: 203-212
- de Klerk G. J., Van der Krieken W., De Jong J.C. (1999) The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 35:189-199
- Cabasson C., Alvard D., Dambier D., Ollitrault P., Teisson C. (1997) Improvement of *Citrus* somatic embryos development by temporary immersion. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 50: 33-37
- Etienne-Barry D., Bertrand B., Vásquez N., Etienne H. (1999) Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. *Plant Cell Reports* 19: 111-117
- Thiem B., Kikowska M. (2008) Zapewnienie jakości roślin leczniczych rozmnażanych w kulturach *in vitro*. *Herba Polonica* 54: 168-178
- Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gonteur F. (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161: 839-851
- Szpitter A., Królicka A. (2005) Stymulujący wpływ elicytorów biotycznych na produkcję farmakologicznie czynnych metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro*. *Biotechnologia* 4: 82-108
- Codina C. (2002) Production of galanthamine by *Narcissus* tissues *in vitro*. W: Hanks G. (Ed.), *Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles: Narcissus and Daffodil, The Genus Narcissus*. Taylor and Francis, London and New York
- Ivanov I., Georgiev V., Berkov S., Pavlov A. (2012) Alkaloid patterns in *Leucojum aestivum* shoot culture cultivated at temporary immersion conditions. *J Plant Physiology* 169: 206-211

- Lu S. H., Wu J. W., Liu H. L., Zhao J. H., Liu K. T., Chuang C. K., Lin H. Y., Tsai W. B., Ho Y. (2011) The discovery of potential acetylcholinesterase inhibitors: A combination of pharmacophore modeling, virtual screening, and molecular docking studies. *Journal of Biomedical Science* 18: 1-13
- Berkov S., Codina C., Bastida J. (2012) The genus *Galanthus*: a source of bioactive compounds. W: Rao V. (Ed.), *Phytochemicals-a global perspective of their role in nutrition and health*. InTech, Rijeka, Croatia
- Berkov S., Pavlov A., Illieva M., Burrus M., Popov S., Stanilova M. (2005) CGC-MS of alkaloids in *Leucojum aestivum* plants and their *in vitro* cultures. *Phytochem Analysis* 16: 98-103

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

Kierunki mojej pracy badawczej skupiały się wokół roślinnych kultur *in vitro*. Początki moich zainteresowań wiążą się z badaniami, jakie realizowałam w ramach pracy magisterskiej. Pracę zatytułowaną: „Wpływ jakości światła na regenerację *Hippeastrum hybridum* w warunkach *in vitro*” wykonałam w Katedrze Roślin Ozdobnych Wydziału Ogrodniczego Akademii Rolniczej (aktualnie Uniwersytetu Rolniczego) pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Bach. Wyniki mojej pracy magisterskiej opublikowałam w *Zeszytach Naukowych Akademii Rolniczej [B1]*.

Głównym celem mojej pracy doktorskiej pt. „Somatyczna embriogeneza w kulturach *in vitro* pędów i załączni tulipana” było opracowanie wydajnej procedury mikrorozmnażania tulipana z wykorzystaniem eksplantatów pędowych. Podjęłam również próbę przeprowadzenia somatycznej embriogenezy i gynogenezy w kulturach *in vitro* załączni i załączków. Promotorem mojej pracy doktorskiej była prof. dr hab. Anna Bach. Badania te były częściowo finansowane i prowadzone w ramach projektu badawczego przyznanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (dawniej KBN) (numer projektu: 5 PO6C 018 18), w którym byłam głównym wykonawcą.

Zaprezentowana przeze mnie w pracy doktorskiej metoda rozmnażania tulipana była znacznie wydajniejsza od dotychczas poznanych sposobów regeneracji tulipanów *in vitro*. Efektywność somatycznej embriogenezy uzależniona była m. in. od genotypu, chłodzenia materiału wyjściowego, położenia eksplantatu na pędzie, zastosowanych regulatorów wzrostu, stanu fizycznego pożywki oraz jakości światła. Analizy histologiczne, jakie wykonałam wykazały, że w momencie zakładania doświadczenia w załączniach znajdowały się niedojrzałe załączki, a po ich wyłożeniu na pożywkę nie następował dalszy ich rozwój. Dochodziło natomiast do formowania kalusa i zarodków z komórek somatycznych załączni, znacznie efektywniej niż na eksplantatach pędowych. Mikrorozmnażanie tulipana zakończyło się pomyślną aklimatyzacją, a analiza cytometryczna zregenerowanych w warunkach *in vitro*

roślin uzyskanych zarówno z fragmentów pędów, jaki i załężni nie wykazała zmian stopnia ploidalności w porównaniu do roślin kontrolnych.

Rezultatem mojej pracy doktorskiej oraz realizowanego projektu były publikacje [A6, B3, B4, C1] oraz komunikaty na konferencjach, których byłam współautorem. Wyniki zaprezentowałam m. in. na międzynarodowej konferencji w Tampere, w Finlandii (The Fourth International Symposium on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding).

Po uzyskaniu stopnia doktora, badania z zakresu kultur *in vitro* realizowałam w czasie mojego sześciomiesięcznego stażu w laboratorium kultur tkankowych Applied Plant Research w Lisse, w Holandii (stypendium przyznane przez Ministerstwo Rolnictwa Holandii). Moja tematyka badawcza dotyczyła głównie opracowywania protokołów mikrorozmnażania tulipanów, lilii, nerin, jabłoni, róż i gerber. Szczególnie dużo uwagi poświęciłam takim etapom mikrorozmnażania, jak: formowanie cebul, ukorzenianie i aklimatyzacja. Zajmowałam się również problematyką dotyczącą wpływu etylenu na rozwój kultur *in vitro* (badałam m. in. działanie  $\text{AgNO}_3$  i STS na ukorzenianie róż i jabłoni w warunkach *in vitro*). Wyniki tych ostatnich badań zostały przedstawione na międzynarodowym spotkaniu COST 843 (WG1, Developmental Biology of Regeneration) w Hiszpanii [D4].

W latach 2002-2005 byłam zatrudniona w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum. W tym czasie rozszerzyłam swoje zainteresowania kulturami *in vitro* w kierunku syntezy metabolitów wtórnych. Przeprowadziłam wstępne badania dotyczące mikrorozmnażania śnieżycy letniej, a wyniki, jakie uzyskałam na podstawie tych badań, zaprezentowałam na II Krajowym Kongresie Biotechnologii oraz w formie publikacji [D3, B5]. Natomiast wyjazd na staż (stypendium Rządu Francuskiego) na Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu w Amiens (Université de Picardie Jules Verne) pozwolił mi na zdobycie wiedzy dotyczącej analiz chromatograficznych.

Równocześnie uczestniczyłam w badaniach nad biosyntezą związków kumarynowych w kulturach *in vitro* *Ruta graveolens*, *Ruta graveolens* ssp. *divaricata* oraz *Ammi majus*, wchodzących w zakres Badań Statutowych Katedry i Zakładu Botaniki Farmaceutycznej CM UJ. Badane przeze mnie gatunki stanowią cenne źródło połączeń kumarynowych szeroko stosowanych w medycynie, m. in. w leczeniu schorzeń skórnych. Związki takie jak, np. psoralen, bergapten i ksantotoksyna o działaniu fotouczulającym wykorzystywane są w terapii bielactwa i łuszczycy. Kultury *in vitro* mogą być cennym źródłem powyższych związków. Moje badania skupiły się głównie na optymalizacji biosyntezy kumaryn w warunkach *in vitro*. Badałam m. in. wpływ jakości światła (białe, daleka czerwień, czerwone, niebieskie,



promieniowanie UV oraz ciemność) na produkcję kumaryny. Przeprowadzona przeze mnie analiza chromatograficzna wykazała, że kultury *Ruta graveolens* oraz *Ruta graveolens* ssp. *divaricata* rosnące w świetle białym oraz niebieskim charakteryzowały się największą zawartością połączeń kumarynowych. Pod wpływem światła niebieskiego w badanym materiale roślinnym wytwarzana była również największa ilość chlorofilu a i b oraz karotenoidów. Wyniki tych badań eksperymentalnych zostały zaprezentowane przeze mnie m. in. na 2 międzynarodowych konferencjach [D2, D7, D8].

Po zatrudnieniu w Katedrze Hodowli Roślin i Nasiennictwa (od 2005 r.) moje zainteresowania skupiły się wokół zagadnień związanych z somatyczną embriogenezą i biosyntezą galantaminy i likoryny w kulturach *in vitro* *Leucojum aestivum*, co szczegółowo przedstawiłam w pierwszej części autoreferatu. Natomiast współpraca z Uniwersytetem w Nancy pozwoliła mi na poszerzenie tego kierunku badań także o dodatkowe aspekty takie, jak: **transformacja genetyczna, biotransformacje oraz określenie właściwości inhibicyjnych ekstraktów roślinnych, pochodzących z kultur *in vitro* w stosunku do acetylocholinoesterazy (AChE).**

Transformacja genetyczna za pomocą *Agrobacterium rhizogenes*, znajduje zastosowanie w badaniach dotyczących produkcji metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro*. Głównymi zaletami transformacji roślin z udziałem tej bakterii jest tworzenie korzeni włósnikowatych charakteryzujących się szybkim tempem wzrostu na pożywkach bez dodatku regulatorów wzrostu, wykazujących dużą stabilność genetyczną oraz zdolność do syntezy metabolitów wtórnych w ilościach zbliżonych lub wyższych niż w korzeniach roślin matecznych (Chandra, Chandra 2011). W czasie pobytu we Francji współuczestniczyłam w badaniach nad transformacją *Leucojum aestivum*. Były to badania przeprowadzone po raz pierwszy na świecie dla tego gatunku. Do transformacji wykorzystaliśmy szczep *Agrobacterium rhizogenes* LBA 9402. Transformacji poddane zostały fragmenty liści izolowane z cebul matecznych, a także korzenie przybyszowe zregenerowane w kulturach *in vitro*. W wyniku infekcji *Agrobacterium rhizogenes* tylko na eksplantatach liściowych pojawiły się korzenie włósnikowate. Testy PCR potwierdziły obecność sekwencji komplementarnych do genów *rolA*, *rolB* i *rolC* *Agrobacterium rhizogenes* w korzeniach włósnikowatych. Korzenie te nie syntetyzowały jednak galantaminy. Natomiast analiza HPLC wykazała obecność w ekstraktach innych alkaloidów, które obecnie nie zostały jeszcze zidentyfikowane. Wykonane badania mają aspekt poznawczy. Rośliny cebulowe, zaliczane są do tzw. 'gatunków opornych' na transformację przy pomocy *Agrobacterium rhizogenes*.

Otrzymane wyniki, zawarte w publikacji [A7, D14] mogą być więc przydatne do badań prowadzonych również u innych gatunków.

Prekursorem alkaloidów amarylkowatych jest norbelladyna, z której powstaje 4'-*O*-metylonorbelladyna. Związek ten może ulec przekształceniu w trzy zróżnicowane pod względem sprzężenia fenolowego grupy, tworzące układ: pirolofenantrydyny (likoryna), etanofenantrydyny (krynina), i dibenzofuranowy (galantamina) (Kączkowski 1993). Galantamina powstaje w wyniku sprzężenia fenolowego typu *para-orto*. Dokładny przebieg procesu biosyntezy alkaloidów amarylkowatych nie został jeszcze opracowany. Udało się jednak ustalić, że etapem, który przysparza największą trudności w trakcie syntezy chemicznej galantaminy jest wewnątrzcząsteczkowe oksydacyjne sprzężenie *para-orto* pierścieni fenolowych, które wymaga blokowania grup i zapobiegania tworzeniu się łatwiejszych sprzężeń *para-para* w cząsteczce 4'-*O*-metylonorbelladyny (Eichhorn i in. 1998; Herbert 2001). Szczegółowe ustalenie przebiegu reakcji biosyntezy mogłoby umożliwić manipulację tym procesem. Kultury pędowe śnieżycy letniej posłużyły jako obiekt do badań nad biotransformacją znakowanej deuterem 4'-*O*-metylonorbelladyny. Otrzymany materiał roślinny po inkubacji przez 15, 30 i 40 dni w pożywce zawierającej różne stężenia znakowanego prekursora (0,05; 0,10; 0,20 g/L) poddany został analizie LC-MS i GC-MS. Udało się zidentyfikować sześć znakowanych alkaloidów, których prekursorem była 4'-*O*-metyl- $d_3$ -norbelladyna. Alkaloidy te zostały zakwalifikowane do trzech różnych grup, a ich synteza przebiegała według trzech modeli sprzężenia fenolowego: *para-para*, *para-orto* i *orto-para*. Maksymalną zawartość galantaminy (0,16 % s.m.) uzyskaliśmy po 15 dniach kultywacji pędów w pożywce zawierającej 0,10 g/L 4'-*O*-metyl- $d_3$ -norbelladyny. Natomiast bardzo wysoka zawartość likoryny (20,5 % s.m.) została osiągnięta po 40 dniach inkubacji z 0,20 g/L prekursora. Otrzymane wyniki potwierdzają, że wzrost syntezy metabolitów w kulturze *in vitro* można uzyskać poprzez egzogenne podanie prekursora. Natomiast duże zawartości tych cennych alkaloidów, jakie udało się otrzymać, skłaniają do wykorzystania metody biotransformacji w kulturach *in vitro* śnieżycy letniej nie tylko do badań szlaku biosyntezy, ale także do opracowania wydajnej metody pozyskiwania galantaminy i likoryny dla celów komercyjnych. Wyniki tych badań zamieszczone zostały w publikacjach [A8, A10, D17, D19, D23].

Leczenie objawowe w chorobie Alzheimera dotyczy głównie wpływu na układy neuroprzebieżnikowe, a zwłaszcza na układ acetylocholinergiczny. Istnieją różne metody zwiększania przebieżnictwa w układzie cholinergicznym m. in. takie jak: działanie na receptory czy podawanie acetylocholiny. Jednak tylko inhibitorom acetylocholinoesterazy

udowodniono skuteczność przy stosunkowo niewielkich działaniach niepożądanych (Lu i in. 2011). Dlatego też w terapii tej choroby istotną rolę odgrywają leki z grupy inhibitorów acetylocholinoesterazy (AChE), które hamują przez pewien czas rozwój zmian degeneracyjnych, poprawiając tym samym pamięć i jakość życia osób dotkniętych chorobą Alzheimera. Aktualnie najczęściej stosowanym inhibitorem acetylocholinoesterazy jest galantamina. Działanie fizjologiczne galantaminy na organizm człowieka polega przede wszystkim na inhibicji enzymu acetylocholinoesterazy, odpowiadającego za rozpad cząsteczki acetylocholinę do choliny i kwasu octowego. Wskutek wprowadzenia galantaminy do organizmu, poziom acetylocholinę nie zmniejsza się, poprawia się neuroprzekaznictwo, odbiór bodźców ze środowiska zewnętrznego i reakcja na nie (Bastida i in. 2011).

W publikacji [A9] przedstawione zostały m. in. wyniki dotyczące zawartości alkaloidów w ekstraktach pędowych *Leucojum aestivum*, *Galanthus elwesii* oraz *Narcissus pseudonarcissus* oraz ocena właściwości inhibicyjnych tych wyciągów w stosunku do acetylocholinoesterazy (AChE). W badaniach zastosowana została spektrofotometryczna metoda Ellmana, która w prosty sposób pozwala określić aktywność inhibitorów AChE (Ellman i in. 1961). Badania wykazały, że najwyższej ilości galantaminy, jaką obserwowaliśmy w pędach *Narcissus pseudonarcissus* (0,1 % s.m.), *Leucojum aestivum* (0,07 % s.m.) i *Galanthus elwesii* (0,02 % s.m.), towarzyszyła znaczna aktywność inhibicyjna AChE (> 30 %). Na szczególną uwagę zasługuje jednak fakt, że niektóre wyciągi, głównie z roślin matecznych *Galanthus elwesii* i *Narcissus pseudonarcissus* charakteryzowały się niską zawartością galantaminy, natomiast wykazywały bardzo wysoką aktywność inhibicyjną (nawet do 80 %). Najprawdopodobniej związane jest to z występowaniem w tych wyciągach również innych alkaloidów, których obecności nie potwierdziliśmy w pozostałych ekstraktach, a które mogą wykazywać również bardzo wysoką aktywność inhibicyjną AChE. Otrzymane wyniki mogą być przydatne w badaniach nad poszukiwaniem nowych inhibitorów acetylocholinoesterazy.

W 2007 r. otrzymałam stypendium z Rektorskiego Funduszu Stypendialnego na realizację projektu badawczego pt. „Somatyczna embriogeneza w kulturach *in vitro* śnieżycy wiosennej (*Leucojum vernum* L.)”. W ramach tego projektu opracowałam procedurę mikrorozmnażania śnieżycy wiosennej. Były to badania wykonane po raz pierwszy dla tego gatunku. Śnieżycza wiosenna rośnie w Polsce przede wszystkim na obszarach górskich, sporadycznie występuje również na Nizinie Śląskiej i w południowej Wielkopolsce. Jest rośliną podlegającą ścisłej ochronie gatunkowej, co wyklucza możliwość pozyskiwania materiału roślinnego ze stanowisk naturalnych. Kultury *in vitro* tej rośliny mogą być w

przyszłości potencjalnym źródłem ważnych leczniczo alkaloidów. Mogą być także stosowane do długotrwałego zachowywania zasobów genowych tego zagrożonego gatunku.

Do badań wykorzystyłam materiał roślinny otrzymany z Ogródu Botanicznego Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Eksplantaty inicjalne stanowiły fragmenty łusek cebulowych, liści, załączni i niedojrzałych torebek nasiennych. Kalus embriogeniczny utworzony na powierzchni niedojrzałych torebek nasiennych pod wpływem 25  $\mu\text{M}$  pikloramu i 0,5  $\mu\text{M}$  BA charakteryzował się najwyższym współczynnikiem namnażania oraz zdolnością do indukcji zarodków somatycznych. Zarodki somatyczne dojrzewały na pożywce wzbogaconej w ABA lub gdy zastosowałam połączenie ABA z PEG. Zregenerowane z zarodków rośliny wymagały 2-3 tygodniowego chłodzenia w ciemności w temperaturze 5  $^{\circ}\text{C}$ , a następnie przeniesienia do temperatury 25  $^{\circ}\text{C}$  na około 8 tygodni. Po tym okresie rośliny formowały cebule. Podwyższenie w pożywce stężenia sacharozy do 9 % wpłynęło korzystnie na wielkość otrzymanych cebul. Wykonane przeze mnie badania poparte zostały analizami histologicznymi oraz cytologicznymi (przy użyciu cytometru przepływowego). Szczegółową procedurę mikrorozmnażania śnieżycy wiosennej umieściłam w rozdziale książki: „Protocols for *In vitro* Propagation of Ornamental Plants”. Rozdział zatytułowany: „Somatic embryogenesis in *in vitro* culture of *Leucojum vernalis* L.” napisany został przeze mnie na zaproszenie edytora wiodącego wydawnictwa naukowego Springer [C2].

Odrębną tematykę stanowiły badania zawarte w publikacji [A11], której jestem współautorem. Badania te dotyczą oceny podatności nieoplewionych odmian owsa do występowania uszkodzeń mechanicznych w odniesieniu do biometrycznych parametrów ziarna wyznaczonych na podstawie komputerowej analizy obrazu oraz testów wagowych. Tematyka tych badań realizowana jest przez dr Andrzeja Zielińskiego z Katedry Hodowli Roślin i Nasiennictwa. Przeprowadzone badania wykazały, że największą odpornością na mechaniczne uszkodzenia, spośród ośmiu testowanych odmian (zebranych w latach 2008-2010), charakteryzowała się odmiana Bullion, u której odnotowano równocześnie największą całkowitą powierzchnię rzutu ziarniaka, gęstość ziarna, a także MTN (masa tysiąca nasion).

W najbliższym czasie zamierzam rozszerzyć badania o poznanie mechanizmów molekularnych regeneracji roślin oraz biosyntezy alkaloidów Amaryllidaceae w kulturach *in vitro* śnieżycy letniej. Badania te będą przedmiotem przygotowywanego projektu, który zostanie złożony do Narodowego Centrum Nauki w czerwcu 2014 roku.

## Literatura

- Chandra S., Chandra R. (2011) Engineering secondary metabolite production in hairy roots. *Phytochemistry Reviews* 10: 371-395
- Kączkowski J. (1993) *Biochemia roślin. Metabolizm wtórny. Tom II*, PWN, Warszawa
- Eichhorn J., Takada T., Kita Y., Zenk M. H. (1998) Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloid galanthamine. *Phytochemistry* 49: 1037-1047
- Herbert R. B. (2001) The biosynthesis of plant alkaloids and nitrogenous microbial metabolites. *Natural Product Reports* 18: 50-65
- Lu S. H., Wu J. W., Liu H. L., Zhao J. H., Liu K. T., Chuang C. K., Lin H. Y., Tsai W. B., Ho Y. (2011) The discovery of potential acetylcholinesterase inhibitors: A combination of pharmacophore modeling, virtual screening, and molecular docking studies. *Journal of Biomedical Science* 18: 1-13
- Bastida J., Berkov S., Torras L., Belén Pigni N., de Andrade J. P., Martínez V., Codina C., Viladomat F. (2011) Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Recent Advances of Pharmaceutical Sciences* 65-100
- Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V., Featherstone R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of AChE activity. *Biochemical Pharmacology* 7: 88-95

**ZESTAWIENIE LICZBOWE DOTYCZĄCE PUBLIKACJI NAUKOWYCH****(po uzyskaniu stopnia doktora)**

<b>Rodzaj publikacji</b>	<b>Liczba publikacji</b>	<b>Łączna liczba Punktów MNiSW z 2013 r.</b>	<b>Sumaryczny IF (w roku opublikowania)</b>
<b>W czasopismach z bazy JCR</b>	12	310	16,489
<b>W recenzowanych czasopismach spoza JCR</b>	4	21	-
<b>Rozdziały w książkach</b>	2	-	-
<b>Doniesienia konferencyjne:</b>			
-konferencje międzynarodowe,	14	-	-
-konferencje krajowe.	8	-	-
<b>RAZEM</b>	<b>40</b>	<b>331</b>	<b>16,489</b>

**Sumaryczny IF: 16,489****Liczba cytowań publikacji (bez autocytowań) wg bazy WoS: 50****Indeks Hirscha (wg WoS): 5**