

**Rośliny w naukach medycznych  
i przyrodniczych – przegląd i badania**



# **Rośliny w naukach medycznych i przyrodniczych – przegląd i badania**

Redakcja:  
Mariola Janiszewska

Lublin 2020

**Wydawnictwo Naukowe TYGIEL składa serdeczne podziękowania dla zespołu  
Recenzentów za zaangażowanie w dokonane recenzje oraz merytoryczne wskazówki  
dla Autorów.**

**Recenzentami niniejszej monografii byli:**

prof. dr hab. n. farm. Monika Waksmundzka-Hajnos

dr hab. Renata Matraszek-Gawron, prof. UP

dr hab. Agnieszka Zdybicka-Barabas, prof. UMCS

dr hab. Barbara Futa

dr hab. Roman Prażak

dr hab. Zbigniew Wilczek

dr inż. Anna Kiełtyka-Dadasiewicz

dr Kamila Kupisz

dr inż. Agnieszka Malik

dr Ewa Sajnaga

dr Aleksandra Seta-Koselska

dr Dawid Stefaniuk

dr Paweł Radzikowski

Wszystkie opublikowane rozdziały otrzymały pozytywne recenzje.

Skład i łamanie:

Magdalena Śliwa

Projekt okładki:

Marcin Szklarczyk

Korekta:

Agata Maciąg

© Copyright by Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.

ISBN 978-83-66489-18-9

Wydawca:

Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o. ul. Głowackiego 35/341, 20-060 Lublin

[www.wydawnictwo-tygiel.pl](http://www.wydawnictwo-tygiel.pl)

## Spis treści:

Agata Rogowska <i>Transport kadmu w roślinach oraz strategię unikania toksycznego wpływu tego pierwiastka</i> .....	7
Marta Kasabuła, Natalia Grygoruk, Iwona Ciereszko <i>Wpływ deficytu fosforanów na aktywność aparatu fotosyntetycznego w liściach owsa zwyczajnego (Avena sativa L.)</i> .....	21
Magdalena Cieplak, Sylwia Okoń <i>Analiza wirulencji mączniaka prawdziwego wybranych zbóż w Polsce i na świecie</i> .....	37
Zuzanna Łyszcz, Andżelika Drutowska, Ewa Osińska <i>Właściwości lecznicze roślin z rodzaju Plantago L.</i> .....	47
Katarzyna Sutor, Agnieszka Kumorkiewicz-Jamro, Ewa Dziedzic, Michał Antonik, Sławomir Wybraniec <i>Rozdzielanie chromatograficzne acylowanych gomfrenin czerwonego szpinaku malabarskiego</i> .....	56
Agata Rogowska, Aleksandra Burdziej, Anna Szakiel <i>Konkurencyjność biosyntezy steroli i triterpenoidów w roślinach i kulturach in vitro w warunkach stresu biotycznego i abiotycznego</i> .....	66
Olga Długosz-Grochowska, Natalia Stefanik, Kenji Yamada <i>Jak pokonać gryzącego wroga – roślinne glikozydy cyjanogenne jako metabolity obronne</i> .....	81
Mikołaj Krysa, Katarzyna Suśniak, Anna Sroka-Bartnicka <i>Obrazowanie spektrometrią mas MALDI jako skuteczna metoda do analizy metabolitów roślinnych</i> .....	92
Rafał Wawrzyniak, Małgorzata Guzowska, Wiesław Wasiak, Katarzyna Buczkowska-Chmielewska <i>Wady i zalety technik stosowanych do izolacji lotnych metabolitów na przykładzie wątrobowców</i> .....	99
Milena Szalata, Marcin Ożarowski, Mariola Dreger, Grażyna Mańkowska, Karolina Wielgus <i>Wpływ elicytacji konopi na zawartość kannabinoidów oraz aktywność wybranych enzymów</i> .....	116
Elżbieta Mierzejewska, Magdalena Urbaniak <i>Biodegradacja ksenobiotyków – stymulująca aktywność wtórnych metabolitów roślinnych (WMR)</i> .....	128
Katarzyna Sutor, Agnieszka Kumorkiewicz-Jamro, Ewa Dziedzic, Michał Antonik, Sławomir Wybraniec <i>Chromatograficzne otrzymywanie barwników betacyjanin z ekstraktów owoców Basella alba L.</i> .....	137

Mariola Dreger, Milena Szalata, Agnieszka Gryszczyńska, Marcin Ożarowski, Karolina Wielgus <i>Zawartość oenoteiny B i wydajność mikrorozmnażania w zależności od wieku kultur wierzbowki koprzyicy</i> .....	152
Rafał Becker <i>Aktywność przeciwtoksynotwórcza wybranych ekstraktów z kłącza imbiru lekarskiego (Zingiber officinale Rosc.)</i> .....	167
Agata Rogowska <i>Rola chitozanu w stymulacji naturalnych mechanizmów obrony roślin</i> .....	179
Rafał Becker <i>Morfologia, uprawa i charakterystyka fitochemiczna świdośliwy (Amelanchier Medik.)</i> .....	189
Jolanta Kamecka-Krupa <i>Wybrane rośliny lecznicze i przyprawowe stosowane w pielęgnacji i diecie małego dziecka</i> .....	202
Katarzyna Wytyczak <i>Rośliny kosmetyczne w zbiorowiskach nieleśnych Masywu Ochodzitej w Beskidzie Śląskim i możliwości ich wykorzystania</i> .....	237
Michał Styczyński <i>Biosurfaktanty w bioremediacji</i> .....	259
Marlena Sagan, Edyta Kowalczyk-Vasilev <i>Roślinne substancje bioaktywne a profilaktyka i terapia cukrzycy typu 2</i> .....	268
Aleksandra Janusz, Joanna Janusz, Zdzisława Kondera-Anasz, Aleksandra Mielczarek-Palacz, Aleksandra Englisz, Marta Smycz-Kubańska, Patrycja Królewska-Daszczyńska, Dominika Wendlocha <i>Analiza cech morfologicznych i hipoteza dziedziczenia DNA pozajądrowego u hybrydy Passiflora L. z rodziny męczennicowatych</i> .....	285
Marta Koziół, Julia Wojnicka, Monika Janczarek <i>Geograficzne zróżnicowanie roślin z rodziny Fabaceae i ich wybranych mikrosymbiontów wiążących azot</i> .....	302
Indeks autorów .....	317

# Transport kadmu w roślinach oraz strategie unikania toksycznego wpływu tego pierwiastka

## 1. Wstęp

Jony metali są nieodłącznymi elementami umożliwiającymi przebieg procesów fizjologicznych w organizmach żywych. Oprócz makroelementów, takich jak jony  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  czy  $\text{K}^+$ , rośliny wymagają do prawidłowego rozwoju mikroelementów, wśród których występują metale ciężkie. Jony niektórych metali ciężkich odgrywają istotną rolę w procesach biochemicznych zachodzących w komórkach roślinnych. Na przykład jony  $\text{Cu}^{2+}$  są zaangażowane w reakcje transportu elektronów w procesach fotosyntezy i oddychania. Wiele enzymów do prawidłowego funkcjonowania wymaga obecności jonów  $\text{Mn}^{2+}$  lub  $\text{Zn}^{2+}$  [1]. Niektóre jony dwuwartościowe, podobnie jak jony wapnia, mogą funkcjonować również jako przekaźniki II rzędu [2]. Zarówno niedobór niezbędnych metali ciężkich, jak ich nadmiar jest szkodliwy dla roślin, dlatego organizmy te wykształciły mechanizmy transportu jonów metali ciężkich ze środowiska oraz pozbywania się ich nadmiaru w celu uniknięcia takich symptomów jak chloroza, nekroza, zahamowanie wzrostu rośliny, odbarwienie liści czy zahamowanie wzrostu korzeni [1, 3].

Zanieczyszczenie środowiska metalami ciężkimi stanowi zagrożenie dla zdrowia wszystkich organizmów żywych i jest poważnym problemem dla światowych upraw. Występowanie metali ciężkich w środowisku może mieć zarówno źródła antropogeniczne, jak i naturalne, choć te pierwsze obecnie przeważają. Naturalnym źródłem metali ciężkich są występujące na powierzchni ziemi rudy metali, narażone na wietrzenie i degradację. Przykładem naturalnych rud metali ciężkich są np. Pas Miedzionośny w południowej części Afryki (Demokratyczna Republika Kongo i Zambia) [4]. Zawartość kadmu w skorupie ziemskiej jest relatywnie niewielka – waha się od 0,08 do 0,1 ppm i zwykle towarzyszy występowaniu rud cynku, a w mniejszym stopniu również ołowiu i miedzi [5]. Kadm jako pierwiastek chalkofilny jest często spotykany w przyrodzie w postaci siarczków [6]. Antropogeniczne źródła zanieczyszczenia metalami ciężkimi są bardziej różnorodne. Najczęstszym powodem zanieczyszczenia pewnego obszaru kadmem jest występowanie kopalni lub przemysłu rafineryjnego w jego pobliżu, co sprzyja rozprzestrzenianiu się pyłów oraz wyciekowi zanieczyszczonej wody. Innym powodem zanieczyszczenia środowiska kadmem może być stosowanie nawozów mineralnych, w których metal ten często występuje jako zanieczyszczenie. W krajach wysoko rozwiniętych, zanieczyszczenie środowiska metalami ciężkimi w dużym stopniu spowodowane jest ruchem samochodowym. Wycofanie benzyny z dodatkiem ołowiu było jednym z kroków zmniejszenia tego typu zanieczyszczeń. Kadm, który jest metalem bardziej toksycznym od ołowiu, jest nadal realnym zagrożeniem. Uwalnia się wraz ze ścieraniem materiałów opon samochodowych i jego zawartość w pyłach drogowych oraz na poboczach dróg jest bardzo wysoka [4, 7].

---

<sup>1</sup> a.rogowska@biol.uw.edu.pl, Zakład Biochemii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, <http://zbr.uw.edu.pl>.

Wśród zanieczyszczeń spowodowanych metalami ciężkimi, te wywołane kadmem są uważane za najbardziej fitotoksyczne. Sole kadmu są dość dobrze rozpuszczalne w wodzie, przez co jony tego metalu są z łatwością pobierane przez rośliny i w ten sposób trafiają do początkowego ogniwa łańcucha pokarmowego [8, 9]. Toksyczność kadmu polega na zastępowaniu metali biogennych w centrach aktywnych enzymów oraz dużym powinowactwie do grup tiolowych białek, co wpływa hamująco na działanie enzymów [10, 11]. Pobieranie i akumulacja przez rośliny kadmu negatywnie wpływa na asymilację niezbędnych makroelementów oraz hamuje otwieranie aparatów szparkowych poprzez zakłócenie równowagi wodnej rośliny [12], zaburza działanie enzymów, biorących udział w cyklu Calvina, fotosyntezę i metabolizm węglowodanów [13, 14], obniża zawartość chlorofilu i karotenoidów [9]. Akumulacja kadmu wpływa również na metabolizm przeciwutleniaczy [15]. Kadm wywołuje stres oksydacyjny w komórkach roślin w sposób pośredni, ponieważ nie może uczestniczyć bezpośrednio w biologicznych reakcjach utleniania i redukcji. Obecność kadmu w komórkach roślin stymuluje aktywność oksydaz NADPH, czego rezultatem jest akumulacja  $H_2O_2$ , peroksydacja lipidów i wybuch oksydacyjny (ang. *oxidative burst*) [16]. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie strategii roślin narażonych na obecność metali ciężkich oraz charakterystyka niektórych transporterów metali ciężkich zaangażowanych w transport kadmu.

## 2. Krótka charakterystyka kadmu

Kadm jest pierwiastkiem należącym do 12 grupy układu okresowego, przez co jego właściwości fizykochemiczne są podobne do sąsiadujących z nim cynku i ołowiu. Występuje w postaci miękkiego i plastycznego dwuwartościowego metalu o srebrzystobiałej barwie (niekiedy z niebieskim odcieniem). Kadm ma stabilną konfigurację elektronową ( $[Kr] 4d105s2$ ) i może występować na +I stopniu utlenienia, choć w środowisku naturalnym stwierdzono jego występowanie prawie wyłącznie na +II stopniu. Pierwiastek ten charakteryzuje się relatywnie niskimi temperaturami topnienia i wrzenia (odpowiednio  $321,07^{\circ}C$  i  $767^{\circ}C$ ) i gęstością, wynoszącą  $8,64 \text{ g/cm}^3$  w temperaturze  $20^{\circ}C$  (tab. 1) [6]. Masa atomowa kadmu jest wynikiem występowania 8 stabilnych izotopów tego pierwiastka oraz sztucznych radioizotopów. Wilgotne powietrze sprawia, że kadm łatwo utlenia się do brunatnego tlenku kadmu  $CdO$ , który stanowi powłokę zabezpieczającą przed dalszą korozją, dopóki nie zostanie wystawiony na działanie roztworów o bardziej ekstremalnych pH [17, 6]. Kadm w przyrodzie można znaleźć w postaci minerałów takich jak np. grenokit ( $CdS$ ), kadmoselit (selenek kadmu,  $CdSe$ ) czy monteponit ( $CdO$ ). Metal ten występuje również jako zanieczyszczenie siarczków cynku (sfalerytu oraz wurtzytu), rzadziej siarczków ołowiu (galeny) czy siarczków rtęci (cynobru) [6].

Tabela 1. Wybrane właściwości fizyczne i chemiczne kadmu

Gęstość (w $25^{\circ}C$ , $g/cm^3$ )	8,6
Temperatura topnienia ( $^{\circ}C$ )	320,9
Temperatura wrzenia ( $^{\circ}C$ )	767,3
Liczba atomowa	48



Liczba masowa (g/mol)	112,4
Promień atomowy (pm)	155
Promień jonowy Cd <sup>2+</sup> (pm)	95

Źródło: [6]

### 3. Strategie roślin narażonych na toksyczne działanie metali ciężkich

Jak już wcześniej wspomniano, obecność kadmu w komórkach roślinnych powoduje zmiany na wielu płaszczyznach, m.in. zmiany fizjologiczne, biochemiczne oraz strukturalne [18]. Rośliny narażone na wysokie stężenie metali ciężkich wykształciły dwie główne strategie obrony przed ich toksycznym działaniem. Pierwszą z nich jest strategia wykluczenia (ang. *exclusion*), która polega na unikaniu pobierania metali z gleby, aczkolwiek po przekroczeniu progowego stężenia metalu w glebie metale są pobierane i odpowiednio magazynowane. Rośliny, u których zaobserwowano tę strategię, charakteryzują się niską zawartością metali w pędach [19]. Ta strategia może angażować mechanizmy prowadzące do a) modyfikacji pH w ryzosferze, b) wydzielania przez korzenie kwasów organicznych, które wiążą i obniżają dostępność metali, c) wytwarzania barier mechanicznych w postaci śluzów czy też d) stymulacji mikoryzy, w której grzyby wiążą i unieszkodliwiają metale [20]. Korzenie są głównymi organami, dzięki którym jony metali ciężkich dostają się do wnętrza roślin. Analiza lokalizacji metali ciężkich przy użyciu mikroskopu elektronowego wykazała, że w ścianach komórkowych korzeni znajduje się zdecydowanie więcej jonów metali ciężkich, takich jak kadm czy miedź niż w cytoplazmie [9]. Odkładanie metali ciężkich w ścianach komórkowych korzeni jest również uważane za jeden z mechanizmów strategii wykluczenia. Rośliny, które pobierają i wiążą metale ciężkie w korzeniach (ang. *shoot excluders*), utrzymują zawartość danego metalu na stałym, niskim poziomie w pędach. To zjawisko odnotowano u gatunków takich jak: *Silene maritima*, *S. cucubalus*, *S. vulgaris*, *Hordeum murinum*, *Achillea nobilis*, *Erysimum crepidifolium*, *Solanum tuberosum*, *Brassica oleracea*, *Armeria maritima*, *Plantago lanceolata*, *Thlaspi praecox* oraz *Medicago lupulina* [20]. Dodatkowym atutem ścian komórkowych jest ich ujemny ładunek, który ułatwia wiązanie kationów metali i ich przechowywanie [21]. Van Belleghem w badaniach dotyczących lokalizacji kadmu w korzeniach i liściach dzikiego typu *A. thaliana* wykazał, że w skórce korzenia kadm był związany z fosforem w apopląście i z siarką w sympląście, co wskazuje na sekwestrację fosforanów oraz fitochelatyn. Duża ilość wytraconego kadmu w łyku sugeruje, że nastąpił wtórny transport z pędów. Wzmoczone wychwytywanie jonów kadmu w sympląście i apopląście korzenia oraz retranslokacja przez floem potwierdzają, że u *A. thaliana* dominuje strategia wykluczenia [22].

Drugą strategią obserwowaną u roślin jest pobieranie metali i ich akumulacja w nadziemnych częściach. Rośliny u których stwierdzono tę strategię określa się mianem akumulatorów (ang. *accumulators*), a pędy tych roślin charakteryzują się wyższą zawartością metali niż korzenie [19]. Ta strategia jest spotykana u roślin uprawnych, takich jak np. buraki cukrowe i pastewne, marchew, brukiew oraz u innych gatunków, m.in. *Silene armeria*, *Dianthus carthusianorum*, *Biscutella laevigata*.

Pobieranie dużych ilości metali i jednocześnie utrzymanie ich stężenia na niskim poziomie w obszarach aktywnych metabolicznie, takich jak cytoplazma, wymagało od roślin wykształcenia specjalnych mechanizmów na poziomie komórkowym. Przykładem takiego mechanizmu jest kompartmentalizacja w wakuolach, czyli obszarach nieaktywnych metabolicznie [20].

Rośliny, u których zaobserwowano tolerancję na metale ciężkie, często wykazują strategię typu wykluczania, poprzez ograniczanie pobierania metali ciężkich z gleby oraz jeśli jony metali zostały pobrane, zahamowanie ich transportu z korzeni do pędów. Transport pobranych metali ciężkich z korzeni do pędów jest strategią zaobserwowaną u roślin wykazujących fenotyp hiperakumulatorów. Hiperakumulatory łączą ekstremalną tolerancję na jony metali ciężkich oraz magazynowanie ich w częściach nadziemnych [23]. Hiperakumulacja jest aktywnym procesem, który polega na wewnętrznym mechanizmie hipertolerancji na wysokie stężenia cytotoksycznych metali oraz na właściwie działającym mechanizmie oczyszczania z pobranych zanieczyszczeń. Rośliny, posiadające zdolność do hiperakumulacji metali, można wykorzystać do fitoremediacji (zastosowanie roślin w procesach oczyszczania środowiska), fitominingu (ang. *phytomining*) (zastosowanie roślin akumulujących metale, dających dużą biomasę w celu pozyskiwania związanego przez roślinę metalu) czy też biofortyfikacji (zwiększenie wartości odżywczych roślin przez wzbogacenie w konkretne pierwiastki) roślin uprawnych. Do tej pory poznano około 450 gatunków roślin mających zdolności hiperakumulujące metale ciężkie [21]. Większość z nich to hiperakumulatory metali, takich jak cynk i nikiel, jednak odnotowano kilka gatunków hiperakumulujących kadm. Są to m.in.: *Thlaspi praecox*, *T. caerulescens*, *A. halleri* i *Sedum alfredii* [23, 24].

#### 4. Transport kadmu

Odpowiednia koordynacja procesów pobierania, translokacji i przechowywania jonów metali jest niezbędna u roślin, aby utrzymać właściwe stężenie niezbędnych jonów metali w komórkach oraz poradzić sobie z jonami metali ciężkich niepotrzebnych z biologicznego punktu widzenia. Jak już wcześniej zostało wspomniane, jony niektórych metali ciężkich są niezbędnymi mikroelementami do prawidłowego funkcjonowania roślin. Można do nich zaliczyć jony  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  oraz  $\text{Co}^{2+}$ , które biorą udział w procesach metabolicznych komórek roślin. Rośliny musiały wykształcić mechanizmy transportu tych jonów ze środowiska oraz usuwania ich nadmiaru, który szkodzi ich komórkom. Jony metali ciężkich takich jak  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  czy też  $\text{Pb}^{2+}$  nie są potrzebne roślinom, co więcej, wywołują negatywny wpływ na komórki roślinne ze względu na dużą toksyczność. Jony tych metali są transportowane systemami transportu zaangażowanymi w pobieranie mikro- i makroelementów [21]. Dzięki dość dobrej rozpuszczalności w wodzie, jony kadmu wnikają do korzenia i mogą dotrzeć do drewna na drodze symplastycznej lub/i apoplastycznej, przez formowanie kompleksów z kwasami organicznymi lub fitochelatynami [25]. Do walca osiowego docierają na drodze symplastycznej dzięki plazmodesmom [26]. Pomimo identyfikacji licznych genów kodujących potencjalne transportery metali ciężkich, dokładne mechanizmy pozyskiwania przez rośliny tych metali nie zostały określone. Transport metali może się odbywać przy udziale transporterów takich jak: ATPazy metali ciężkich typu CPx (ang. *heavy metal (CPx-type) ATPases*), białek należących

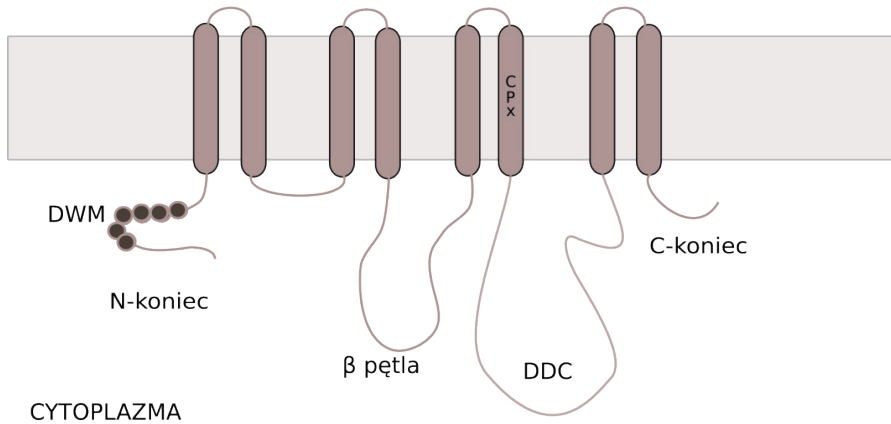
do rodziny Nramp (ang. *natural resistance-associated macrophage protein*), białek należących do rodziny CDF (ang. *cation diffusion facilitator*), białek YSL (ang. *yellow stripe-like transporters*) czy ZIP (ang. *zinc transporter protein*) [3, 27]. Trzy pierwsze klasy transporterów zostały zidentyfikowane w wielu organizmach i zostaną dokładniej opisane w poniższych podrozdziałach.

## **5. ATPazy typu CPx**

ATPazy metali ciężkich typu P to integralne białka błonowe zapewniające transport jonów zarówno metali niezbędnych roślinom, jak i metali toksycznych. Ta klasa transporterów występuje u wielu organizmów żywych, w wielu typach błon i odpowiada za utrzymanie w organizmie homeostazy jonowej. Białka te występują w postaci katalitycznych, pojedynczych monomerów o masie od 70 do 200 kDa oraz charakteryzują się tworzeniem fosforylowanego produktu pośredniego podczas cyklu reakcji [28]. W zależności od typu transportowanego substratu, ATPazy typu P można podzielić na 5 głównych grup (typy I-V) [3]. ATPazy metali ciężkich zostały zaklasyfikowane do typu IB i wraz ze spokrewnionym typem ATPaz IA stanowią monofiletyczną grupę [29].

Soligo i Vulpe wyróżnili specjalną podgrupę ATPaz metali ciężkich typu P, które ze względu na występowanie wewnątrzbłonowego konserwowanego motywu cysteina-prolina-cysteina, cysteina-prolina-histydyna lub cysteina-prolina-seryna (motyw CPx), nazwali ATPazami typu CPx. Motyw CPx jest istotnym elementem w transporcie jonów metali ciężkich, takich jak jony  $Cd^{2+}$ . ATPazy typu CPx wykazują wiele cech wspólnych z ATPazami metali ciężkich typu P, lecz oprócz konserwowanego motywu CPx różnią się od nich trzema dodatkowymi cechami: występowaniem miejsca wiązania metali ciężkich w polarnym regionie N-końca, obecnością locus HP (konserwowanego dipeptydu złożonego z prolina i histydyny) w C-końcu oraz unikalną liczbą i topologią domen przechodzących przez błonę [28]. Locus HP odgrywa rolę prawdopodobnie w przypadku oddziaływań białko-białko. Poza wymienionymi różnicami, struktury ATPaz typu CPx i ATPaz metali ciężkich typu P nie odbiegają od siebie. Oba typy transporterów składają się z małej ( $\beta$  pętla) i dużej domeny cytoplazmatycznej, które są skierowane do cytoplazmy, oraz z różnej liczby domen kotwiczących w błonie plazmatycznej (rys. 1) [3].

## PRZESTRZEŃ ZEWNĄTRZKOMÓRKOWA



Rysunek 1. Schematyczny model budowy ATPazy typu CPx. DWM-Domena Wiążąca Metal, DDC – Duża Domena Cytoplazmatyczna, CPx – wewnętrzblonowy motyw cysteina-prolina-cysteina, cysteina-prolina-histydylna lub cysteina-prolina-seryna. Źródło: Opracowanie własne na podstawie [3]

Badania nad funkcjonalnością ATPaz metali ciężkich typu P pozwoliły wyróżnić 2 klasy, w zależności od metalu, jaki jest przez nie transportowany. Pierwszą klasą tych transporterów jest grupa transportująca jony jednowartościowe, takie jak miedź i srebro (Cu/Ag), natomiast druga klasa ma szerszy zakres substratów o dwudodatnim ładunku, jakimi są cynk, ołów, kadm i kobalt (Zn/Pb/Cd/Co). W *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano 8 transporterów metali ciężkich, z czego cztery (AtHMA1–AtHMA4) należą do klasy Zn/Pb/Cd/Co [30, 31]. Transportery te występują w różnych miejscach w komórkach roślin i pełnią różne funkcje. AtHMA1 zlokalizowany jest w błonach chloroplastów i odpowiada za detoksykację nadmiaru cynku. Wykazuje podobieństwo sekwencji aminokwasów do dwóch innych transporterów, AtHMA2 i AtHMA4, które są zlokalizowane w błonach plazmatycznych i odpowiadają za wypływ cynku i kadmu z komórek [31-33]. Mutacje w genach *hma2* i *hma4* powodowały zwiększoną wrażliwość na kadm mutantów *Arabidopsis* z deficytem fitochelatyn [31]. AtHMA2 i AtHMA4 są uważane za kluczowe białka w transporcie kadmu u *Arabidopsis*, ponieważ u podwójnego mutantu *hma2hma4* została zaburzona translokacja tego metalu z korzenia do pędu [34]. Wyciszenie ekspresji genów AtHMA2 i AtHMA4 spowodowało całkowite zahamowanie translokacji kadmu z korzeni do pędów, co sugeruje, że białka kodowane przez te geny są głównymi kontrolerami transportu kadmu oraz cynku [27]. AtHMA3 znajduje się w błonie wakuoli i bierze udział w detoksykacji cynku i kadmu poprzez sekwestrację wakuolarną [35, 36].

9 genów kodujących ATPazy metali ciężkich typu P zidentyfikowano w genomie ryżu (*Oryza sativa* L.), z czego 3 z nich (OsHMA1–OsHMA3) należą do klasy transporterów Zn/Pb/Cd/Co. OsHMA9 może transportować Zn, Cd, i Pb mimo że filogenicznie należy do klasy transportującej Cu/Ag [30, 37]. OsHMA2 jest białkiem zlokalizowanym w błonie plazmatycznej i bierze udział w transporcie kadmu i cynku. Ekspresja genu OsHMA2 w ryżu była odnotowana głównie w korzeniach, szczególnie

w wiązkach przewodzących. Wyciszenie tego genu powodowało obniżenie zawartości kadmu i cynku w liściach, podczas gdy zawartość cynku wzrastała w korzeniach w porównaniu z typem dzikim. Te wyniki sugerują, że ten transporter bierze udział w załadunku cynku i kadmu do ksylemu oraz w transporcie tych metali z korzeni do pędów, podobnie jak AtHMA2 u *Arabidopsis* [38]. OsHMA3 transportuje tylko kadm i odgrywa rolę w sekwestracji tego metalu do wakuoli w komórkach korzenia [39].

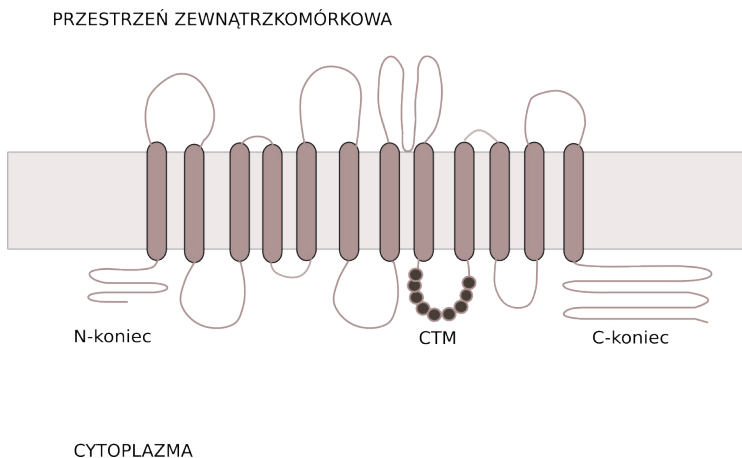
## **6. Rodzina białek Nramp**

Białka, należące do tej rodziny, biorą udział w transporcie jonów metali dwuwartościowych. Podobnie jak w przypadku ATPaz metali ciężkich typu P, białka Nramp i ich homologi zidentyfikowano w wielu różnych organizmach, m.in. bakterjach, drożdżach, owadach, ssakach i roślinach wyższych. Podobieństwo genów kodujących białka z tej rodziny u organizmów niespokrewnionych ze sobą, a wręcz odległych ewolucyjnie sugeruje, że białka te pełnią bardzo podstawowe funkcje fizjologiczne. Pierwszym zidentyfikowanym genem z tej rodziny był ssaczy gen Nramp1 kodujący integralne białko błonowe, znajdujące się w przedziale endosomalno-lizosomalnym makrofaga. Po fagocytozie jest szybko przyłączane do błony fagosomalnej, gdzie najprawdopodobniej reguluje replikację pochłoniętych bakterii poprzez kontrolowanie stężeń jonów dwuwartościowych w tym kompartmentcie. Mutacje w genie Nramp1 powodują zwiększoną podatność na infekcje wywołane patogenami wewnątrzkomórkowymi, takimi jak *Mycobacterium*, *Leishmania* i *Salmonella* [3]. Białka należące do rodziny Nramp scharakteryzowano funkcjonalnie w roślinach modelowych, takich jak *Arabidopsis thaliana* i ryż (łac. *Oryza sativa*). W *Arabidopsis* zidentyfikowano 6 białek należących do tej rodziny transporterów. Białko AtNramp1 jest zlokalizowane w błonie plazmatycznej komórek korzenia i jest zaangażowane w transport manganu. AtNramp3 i AtNramp4 są zlokalizowane w tonoplazmie i biorą udział w transporcie żelaza z wakuoli podczas kiełkowania nasion oraz odpowiadają za utrzymanie homeostazy jonów manganu w późniejszych stadiach rozwoju rośliny [40]. AtNramp6 znajduje się w błonie przedziału wewnątrzkomórkowego o pęcherzykowatym kształcie, gdzie pełni rolę wewnątrzkomórkowego transportera kadmu i prawdopodobnie wpływa na rozmieszczenie oraz dostępność tego pierwiastka w komórce. Badania przeprowadzone na transgenicznym roślinach *Arabidopsis* z nadekspresją genu AtNramp6 wykazały, że rośliny te stały się hiperwrażliwe na kadm, mimo że ogólna zawartość tego pierwiastka w komórkach nie zmieniła się. Mutacja w genie AtNramp6 prowadząca do niefunkcjonalnego allelu (ang. *null allele*) nazwanego nramp6-1 dawała fenotyp o zwiększonej tolerancji na toksyczność kadmu [41]. Funkcje dwóch ostatnich białek należących do tej rodziny, Nramp2 i Nramp5, nie zostały jeszcze scharakteryzowane [40].

W genomie ryżu zidentyfikowano geny kodujące 7 białek należących do rodziny Nramp, ale tylko 4 z nich zostały scharakteryzowane. Wszystkie są zlokalizowane w błonie plazmatycznej, ale pełnią różne funkcje w komórce [40]. Białko OsNramp1 transportuje żelazo i kadm oraz jest zaangażowane w proces pobierania i akumulacji kadmu w komórkach ryżu. Ekspresja OsNramp1 była wyższa w korzeniach odmiany hodowlanej ryżu który akumuluje kadm (Habataki) w porównaniu z odmianą o niskiej zdolności akumulacji tego pierwiastka (Sasanishiki), mimo że analiza sekwencji aminokwasów białek OsNramp1 wykazała 100% podobieństwa między tymi

odmianami. Efektem nadekspresji OsNramp1 była wzmożona akumulacja kadmu w liściach ryżu [42]. Białko OsNramp3 zlokalizowano w tkankach przewodzących znajdujących się w węzłach ryżu, jednak nie bierze ono udziału w transporcie i dystrybucji kadmu, tylko manganu [40]. OsNramp4 transportuje trójwartościowe jony glinu i jego zawartość jest większa u odmian wykazujących zwiększoną tolerancję na jony tego metalu w podłożu [43]. Białko OsNramp5 jest głównym transporterem odpowiedzialnym za pobieranie manganu i kadmu przez korzenie [40]. Wzory ekspresji białek z rodziny Nramp w różnych tkankach u ryżu wskazują na to, że białka te mogą pełnić funkcje w konkretnych środowiskach komórkowych oraz że ich aktywność jest różnie regulowana. Białka te mogą również transportować jony metali wymaganych do konkretnych procesów fizjologicznych w danych tkankach [3]. Funkcje białek OsNramp2, OsNramp6 i OsNramp7 nadal pozostają nieznane [40].

Topologia roślinnych białek z rodziny Nramp nie jest zróżnicowana wśród gatunków roślin. Na przykład, AtNramp6 jest integralnym białkiem błonowym zbudowanym z 12 domen transbłonowych. Zarówno N- jak i C-koniec tego białka znajduje się w cytoplazmie, przy czym C-koniec tworzy długi, charakterystyczny ogon. Między 8. i 9. domeną transbłonową, w czwartej wewnątrzkomórkowej pętli, znajduje się unikalny, silnie konserwowany wśród wszystkich homologów białek Nramp u roślin motyw CTM (ang. *consensus transport motif*) (rys. 2) [3, 41]. Motyw ten wykazuje podobieństwo do regionu białek transporterowych odnotowanych u bakterii, a szczególnie do wysoce konserwowanego fragmentu kanału jonowego występującego u zwierząt, kanału potasowego typu shaker (ang. *shaker-type K<sup>+</sup> channel*). Ze względu na wysoką konserwatywność motywu CTM przypuszcza się, że pełni on ważne funkcje w mechanizmie działania białek Nramp. Przewidywane miejsca N-glikozylacji na zewnątrzkomórkowej pętli pomiędzy transbłonowymi domenami 7 i 8 w białkach OsNramp1 i OsNramp3 nie zostały potwierdzone w homologach Nramp Arabidopsis, lecz są obecne w sekwencji genu AtNramp5. To może sugerować różnice w lokalizacji tych miejsc u różnych homologów [3].

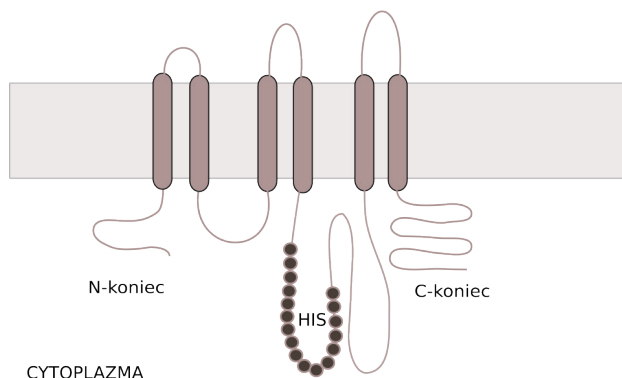


Rysunek 2. Schematyczny model budowy transportera AtNramp1. CTM – silnie konserwowany consensus transport motif. Źródło: Opracowanie własne na podstawie: [3, 41]

## 7. Rodzina białek CDF

Białka należące do rodziny CDF są niezwykle rozpowszechnionymi transporterami, ponieważ zostały zidentyfikowane zarówno w organizmach eukariotycznych, jak i w bakteriach i archeonach [3, 44]. Substratami tych transporterów są jony metali dwuwartościowych, takich jak  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ , oraz  $Mn^{2+}$ . Większość z białek należących do rodziny CDF pełni funkcję antyporterów  $Me^{2+}/H^+$  ( $K^+$ ), które umożliwiają przepływ kationów metali z cytoplazmy na zewnątrz komórki lub przemieszczenie tych jonów do kompartmentów wewnątrzkomórkowych [44]. Białka te mogą być różnie zlokalizowane; część z nich znajduje się w błonach plazmatycznych, podczas gdy pozostałe są identyfikowane w błonach wewnątrzkomórkowych [3]. Ze względu na specyficzność substratu, czyli na główny transportowany metal, białka należące do rodziny CDF można podzielić na 3 grupy: transportery jonów cynku, transportery jonów cynku lub żelaza oraz transportery manganu (Zn-CDFs, Zn/Fe-CDFs i Mn-CDFs). Większość białek należących do rodziny CDF jest zbudowana z sześciu transbłonowych domen, oraz posiada N- i C-koniec znajdujący się w cytoplazmie (rys. 3). Zdarzają się jednak pewne odstępstwa w ilości domen transbłonowych u białek należących do rodziny CDF. Białko Msc2 zidentyfikowane u *Saccharomyces cerevisiae* posiada 12 transbłonowych domen, a ZnT5 występujące u człowieka ma ich 15. Wszystkie białka należące do tej rodziny charakteryzują się domeną wypływu jonów (ang. *cation efflux domain*) obecną w C-końcu. Najsilniej konserwowanymi regionami są domeny transbłonowe I, II, V i VI, które najprawdopodobniej są zaangażowane w transport metali. Wiele białek należących do rodziny CDF posiada między domenami IV i V lub na N- lub C-końcu region bogaty w histydynę (ang. *histidine-rich region*). Regiony te prawdopodobnie funkcjonują jako domeny wiążące metale (takie jak np.  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , oraz  $Cd^{2+}$ ) oraz są swoistymi „sensorami” stężenia jonów metali. Co ciekawe, roślinne białko ShMTP1 zidentyfikowane u *Stylosanthes hamata*, które bierze udział w utrzymaniu homeostazy jonów manganowych, nie posiada tego regionu. U roślin białka należące do rodziny CDF zwykle nazywane są MTP (ang. *Metal Tolerance Proteins*) [44].

WAKUOLA / PRZESTRZEŃ ZEWNĄTRZKOMÓRKOWA



Rysunek 3. Schematyczny model budowy transportera MTP. HIS-region bogaty w histydynę.

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [46, 47]

W *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano 12 białek MTP. Białka AtMTP1 do AtMTP4 tworzą filogeniczną podgrupę oraz charakteryzują się obecnością regionów bogatych w histydyne między domenami transbłonowymi IV i V (rys. 3). Przypuszcza się, że regiony te pełnią funkcje „kieszonek” wiążących Zn oraz „czujników” stężenia jonów tego pierwiastka. AtMTP1 i AtMTP3 są zlokalizowane w błonie wakuoli i biorą udział w transporcie kationów cynku [45, 46]. Mutanty utraty funkcji AtMTP1 wykazują nadwrażliwość na nadmiar Zn, natomiast nadekspresja MTP1 powoduje zwiększenie tolerancji na Zn u roślin. Podobne zjawiska zaobserwowano w przypadku wyciszenia i nadekspresji AtMTP3, co sugeruje, że oba białka odgrywają ważne role w detoksykacji nadmiaru cynku. Białka AtMTP8 do AtMTP11 stanowią odrębną filogeniczną podgrupę, ale ich funkcje nie są do końca poznane. AtMTP11 prawdopodobnie odpowiada za transport kationów manganu. AtMTP12 prawdopodobnie tworzy funkcjonalny kompleks z wariantem splicingowym białka AtMTP5 i razem biorą udział w transporcie Zn do aparatu Golgiego [45].

Białka MTP mogą transportować również jony, takich metali jak kadm, nikiel oraz kobalt. Specyficzność substratu wydaje się być konserwowana w białkach spokrewnionych filogenetycznie [47]. Białko homologiczne do transporterów manganu wyizolowane z ogórka (*Cucumis sativus*), CsMTP9, bierze udział w transporcie zarówno jonów manganu, jak i kadmu. Gen kodujący to białko jest wyrażany tylko w korzeniach. Poziom transkrypcji genu CsMTP9 był znacząco podwyższony w obecności nadmiaru jonów manganu i kadmu. Immunolokalizacja przy użyciu specyficznych przeciwciał wykazała, że CsMTP9 jest białkiem transbłonowym obecnym w komórkach endodermalnych korzenia. Ekspresja genu CsMTP9 w drożdżach o fenotypie nadwrażliwym na mangan i kadm powodowała zmniejszenie nadwrażliwości na jony tych metali, przez wzrost wpływu  $Cd^{2+}$  i  $Mn^{2+}$  z komórek drożdży. Nadekspresja CsMTP9 w *Arabidopsis thaliana* powodowała zwiększenie tolerancji na jony kadmu i manganu, lecz nie powodowała zwiększenia tolerancji na jony innych metali. Mechanizm zwiększenia tolerancji u tych roślin polegał na wzroście translokacji manganu i kadmu z korzeni do pędów [48].

OsMTP1, transporter zidentyfikowany w ryżu (*Oryza sativa*) zlokalizowany w tonoplaście, odpowiada za transport cynku. Ekspresja genu kodującego to białko w mutantach drożdży *ycf1* wrażliwych na obecność kadmu w podłożu powodowała zdolność do wzrostu mutantów *ycf1* w niskich stężeniach kadmu, co sugeruje, że OsMTP1 odpowiada również za transport innych metali niż cynk, aczkolwiek ma do nich mniejsze powinowactwo [49].

W genomie słodkiej pomarańczy (*Citrus sinensis*) zidentyfikowano 12 genów kodujących białka MTP. Geny CitMTP wykazywały duże podobieństwo sekwencji w porównaniu z AtMTP z *Arabidopsis thaliana* oraz kodowały białka posiadające od 4 do 6 przypuszczalnych domen transbłonowych. Ekspresja genów CitMTP1, CitMTP3 i CitMTP4 w korzeniach i liściach była zwiększona w obecności nadmiaru cynku i kadmu. To może wskazywać na rolę tych białek w detoksykacji cynku i kadmu. Ekspresja CitMTP5 i CitMTP12 w korzeniach i liściach wzrosła nie tylko w obecności nadmiaru cynku i kadmu, lecz również manganu, co może świadczyć o roli białek kodowanych przez te geny w detoksykacji cynku, kadmu i manganu. Ekspresja genu CitMTP8 była indukowana tylko obecnością manganu, ale nie miały na nią wpływu metale, takie jak kadm, cynk i miedź [50].



## 8. Podsumowanie

Ze względu na brak możliwości przemieszczania się, rośliny musiały wykształcić mechanizmy przystosowania się do wielu niekorzystnych warunków środowiskowych, w tym do stresu wywołanego obecnością metali ciężkich. Jony niektórych metali ciężkich są niezbędne w procesach fizjologicznych roślin, lecz nawet potrzebne do życia jony po przekroczeniu pewnego stężenia stają się toksyczne dla organizmu. Procesy mające na celu utrzymanie odpowiedniej homeostazy jonów metali u roślin dopiero są poznawane. Na poziomie komórkowym, specyficzne transportery są odpowiedzialne za pobieranie i sekrecję jonów metali, natomiast inne są zaangażowane w sekwestrację metali w organellach [3]. Oprócz rodzin białek opisanych w niniejszej pracy, metale mogą być transportowane w roślinach alternatywnymi drogami, z wykorzystaniem innych białek transporterowych. Wykorzystanie „odwrotnej genetyki” jest kluczowe w celu znalezienia funkcji genów, z kolei systemy ekspresji heterologicznej w organizmach takich jak drożdże pozwalają na określenie mechanizmów działania konkretnych transporterów. Badania dotyczące transportu kadmu są szczególnie istotne, ze względu na dużą toksyczność tego pierwiastka oraz łatwość akumulacji w ogniwach łańcucha pokarmowego. Poznanie dokładnych mechanizmów działania transporterów kadmu oraz regulacji genów, kodujących te białka, jest również kluczowe dla fitoremediacji obszarów skażonych tym metalem i ekologicznego rolnictwa.

## Literatura:

1. Marschner H., *Marschner's mineral nutrition of higher plants*, Academic press, Amsterdam, Netherlands, 2011, s. 165-268.
2. Clarkson D., Lüttge U., *Mineral nutrition: divalent cations, transport and compartmentation*, In: *Progress in botany*, Springer, Berlin, Heidelberg, 1989, s. 93-112.
3. Williams L., Pittman J., Hall J., *Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2000, 1465(1-2), s. 104-126.
4. Andresen E., Küpper H., *Cadmium toxicity in plants*, In: *Cadmium: from toxicity to essentiality*, Springer, Dordrecht, 2013, s. 395-413.
5. Birke M., Reimann C., Rauch U., De Vivo B., Halamić J., Klos V., Ladenberger A., *Distribution of cadmium in European agricultural and grazing land soil*, In: Reimann C., Birke M., Demetriades A., Filzmoser P., O'Connor P. (Eds.), *Chemistry of Europe's Agricultural Soils. Part B: General Background Information and Further Analysis of the GEMAS Data Set*, Schweizerbart Science Publishers, Stuttgart, s. 89-116.
6. Cullen J., Maldonado M., *Biogeochemistry of cadmium and its release to the environment*, In: *Cadmium: from toxicity to essentiality*, Springer, Dordrecht, 2013, s. 31-62.
7. Lagerwerff J., Specht A., *Contamination of roadside soil and vegetation with cadmium, nickel, lead, and zinc*, *Environmental Science & Technology*, 4(7), 1970, s. 583-586.
8. Gill S., Tuteja N., *Cadmium stress tolerance in crop plants: probing the role of sulfur*, *Plant Signaling & Behavior*, 6(2), 2011, s. 215-222.
9. DalCorso G., Farinati S., Furini A., *Regulatory networks of cadmium stress in plants*, *Plant signaling & behavior*, 5(6), 2010, s. 663-667.
10. Vangronsveld J., Clijsters H., *Toxic effects of metals*, In: Farago M.E., ed. *Plants and the chemical elements: biochemistry, uptake, tolerance and toxicity*, 1994, s. 149-177.
11. Benavides M., Gallego S., Tomaro M., *Cadmium toxicity in plants*, *Brazilian journal of plant physiology*, 2005, 17(1), s. 21-34.
12. Hossain M., Hasanuzzaman M., Fujita M., *Up-regulation of antioxidant and glyoxalase systems by exogenous glycinebetaine and proline in mung bean confer tolerance to cadmium stress*, *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16(3), 2010, s. 259-272.
13. Mobin M., Khan N., *Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (Brassica juncea) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress*, *Journal of Plant Physiology*, 164(5), 2007, s. 601-610.

14. Shi G., Liu C., Cai Q., Liu Q., Hou C., *Cadmium accumulation and tolerance of two safflower cultivars in relation to photosynthesis and antioxidative enzymes*, Bulletin of environmental contamination and toxicology, 85(3), 2010, s. 256-263.
15. Khan N., Anjum N., Nazar R., Iqbal N., *Increased activity of ATP-sulfurylase and increased contents of cysteine and glutathione reduce high cadmium-induced oxidative stress in mustard cultivar with high photosynthetic potential*, Russian Journal of Plant Physiology, 56(5), 2009, s. 670-677.
16. Semane B., Dupae J., Cuypers A., Noben J., Tuomainen M., Tervahauta A., Vangronsveld J., *Leaf proteome responses of Arabidopsis thaliana exposed to mild cadmium stress*, Journal of plant physiology, 167(4), 2010, s. 247-254.
17. Moulis J., *Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals*, Biometals, 23(5), 2010, s. 877-896.
18. Nazar R., Iqbal N., Masood A., Khan M., Syeed S., Khan N., *Cadmium toxicity in plants and role of mineral nutrients in its alleviation*, American Journal of Plant Sciences 3, 2012, s. 1476-1489.
19. Baker A., *Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals*, Journal of plant nutrition, 3(1-4), 1981, s. 643-654.
20. Siwek M., *Rośliny w skażonym metalami ciężkimi środowisku przemysłowym. Część II. Mechanizmy detoksyfikacji i strategie przystosowania roślin do wysokich stężeń metali ciężkich*, Wiadomości Botaniczne 52(3/4), 2008, s. 7-23.
21. Gallego S., Pena L., Barcia R., Azpilicueta C., Iannone M., Rosales E., Benavides M., *Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms*, Environmental and Experimental Botany, 83, 2012, s. 33-46.
22. Van Belleghem F., Cuypers A., Semane B., Smeets K., Vangronsveld J., d'Haen J., Valcke R., *Subcellular localization of cadmium in roots and leaves of Arabidopsis thaliana*, New Phytologist, 173(3), 2007, s. 495-508.
23. Verbruggen N., Hermans C., Schat H., *Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants*, Current opinion in plant biology, 12(3), 2009, s. 364-372.
24. van de Mortel J., Schat H., Moerland P., Van Themaat E., Van Der Ent S., Blankestijn H., Aarts M., *Expression differences for genes involved in lignin, glutathione and sulphate metabolism in response to cadmium in Arabidopsis thaliana and the related Zn/Cd-hyper-accumulator Thlaspi caerulescens*, Plant, Cell & Environment, 31(3), 2008, s. 301-324.
25. Salt D., Prince R., Pickering I., Raskin I., *Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard*, Plant physiology, 109(4), 1995, s. 1427-1433.
26. Lux A., Martinka M., Vaculik M., White P., *Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review*, Journal of experimental botany, 62(1), 2011, s. 21-37.
27. Hassan Z., Aarts M., *Opportunities and feasibilities for biotechnological improvement of Zn, Cd or Ni tolerance and accumulation in plants*, Environmental and Experimental Botany, 72(1), 2011, s. 53-63.
28. Solioz M., Vulpe C., *CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals*, Trends in biochemical sciences, 21(7), 1996, s. 237-241.
29. Palmgren M., Axelsen K., *Evolution of P-type ATPases*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1365(1-2), 1998, s. 37-45.
30. Takahashi R., Bashir K., Ishimaru Y., Nishizawa N., Nakanishi H., *The role of heavy-metal ATPases, HMAs, in zinc and cadmium transport in rice*, Plant signaling & behavior, 7(12), 2012, s. 1605-1607.
31. Hussain D., Haydon M., Wang Y., Wong E., Sherson S., Young J., Cobbett C., *P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in Arabidopsis*, The plant cell, 16(5), 2004, s. 1327-1339.
32. Kim Y., Choi H., Segami S., Cho H., Martinoia E., Maeshima M., Lee Y., *AtHMA1 contributes to the detoxification of excess Zn (II) in Arabidopsis*, The Plant Journal, 58(5), 2009, s. 737-753.
33. Mills R., Krijger G., Baccarini P., Hall J., Williams L., *Functional expression of AtHMA4*,

- a PIB-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass*, *The Plant Journal*, 35(2), 2003, s. 164-176.
34. Wong C., Cobbett C., *HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in Arabidopsis thaliana*, *New phytologist*, 181(1), 2009, s. 71-78.
  35. Morel M., Crouzet J., Gravot A., Auroy P., Leonhardt N., Vavasseur A., Richaud P., *AtHMA3, a PIB-ATPase allowing cd/Zn/co/Pb vacuolar storage in Arabidopsis*, *Plant physiology*, 149(2), 2009, s. 894-904.
  36. Gravot A., Lieutaud A., Verret F., Auroy P., Vavasseur A., Richaud P., *AtHMA3, a plant PIB-ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in yeast*, *FEBS letters*, 561(1-3), 2004, s. 22-28.
  37. Lee S., Kim Y., Lee Y., An G., *Rice PIB-type heavy-metal ATPase, OsHMA9, is a metal efflux protein*, *Plant physiology*, 145(3), 2007, s. 831-842.
  38. Takahashi R., Ishimaru Y., Shimo H., Ogo Y., Senoura T., Nishizawa N., Nakanishi H., *The OsHMA2 transporter is involved in root-to-shoot translocation of Zn and Cd in rice*, *Plant, cell & environment*, 35(11), 2012, s. 1948-1957.
  39. Miyadate H., Adachi S., Hiraizumi A., Tezuka K., Nakazawa N., Kawamoto T., Satoh-Nagasawa N., *OsHMA3, a PIB-type of ATPase affects root-to-shoot cadmium translocation in rice by mediating efflux into vacuoles*, *New Phytologist*, 189(1), 2011, s. 190-199.
  40. Wu D., Yamaji N., Yamane M., Kashino-Fujii M., Sato K., Ma J., *The HvNramp5 transporter mediates uptake of cadmium and manganese, but not iron*, *Plant physiology*, 172(3), 2016, s. 1899-1910.
  41. Cailliatte R., Lapeyre B., Briat J., Mari S., Curie C., *The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity*, *Biochemical Journal*, 422(2), 2009, s. 217-228.
  42. Takahashi R., Ishimaru Y., Senoura T., Shimo H., Ishikawa S., Arao T., Nishizawa N., *The OsNRAMP1 iron transporter is involved in Cd accumulation in rice*, *Journal of experimental botany*, 62(14), 2011, s. 4843-4850.
  43. Xia J., Yamaji N., Kasai T., Ma J., *Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(43), 2010, s. 18381-18385.
  44. Montanini B., Blaudez D., Jeandroz S., Sanders D., Chalot M., *Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity*, *BMC genomics*, 8(1), 2007, s. 107.
  45. Fujiwara T., Kawachi M., Sato Y., Mori H., Kutsuna N., Hasezawa S., Maeshima M., *A high molecular mass zinc transporter MTP 12 forms a functional heteromeric complex with MTP 5 in the Golgi in Arabidopsis thaliana*, *The FEBS journal*, 282(10), 2015, s. 1965-1979.
  46. Kobae Y., Uemura T., Sato M., Ohnishi M., Mimura T., Nakagawa T., Maeshima M., *Zinc transporter of Arabidopsis thaliana AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis*, *Plant and Cell Physiology*, 45(12), 2004, s. 1749-1758.
  47. Ricachenevsky F., Menguer P., Sperotto R., Williams L., Fett J., *Roles of plant metal tolerance proteins (MTP) in metal storage and potential use in biofortification strategies*, *Frontiers in plant science*, 4, 2013, s. 144.
  48. Migocka M., Papierniak A., Kosieradzka A., Posyniak E., Maciaszczyk-Dziubinska E., Biskup R., Marchewka T., *Cucumber metal tolerance protein Cs MTP 9 is a plasma membrane H<sup>+</sup> – coupled antiporter involved in the Mn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> efflux from root cells*, *The Plant Journal*, 84(6), 2015, s. 1045-1058.
  49. Menguer P., Farthing E., Peaston K., Ricachenevsky F., Fett J.P., Williams L., *Functional analysis of the rice vacuolar zinc transporter OsMTP1*, *Journal of experimental botany*, 64(10), 2013, s. 2871-2883.
  50. Fu X., Tong Y., Zhou X., Ling L., Chun C., Cao L., Peng L., *Genome-wide identification of sweet orange (Citrus sinensis) metal tolerance proteins and analysis of their expression patterns under zinc, manganese, copper, and cadmium toxicity*, *Gene*, 629, 2017, s. 1-8.

## **Transport kadmu w roślinach oraz strategie unikania toksycznego wpływu tego pierwiastka**

### Streszczenie

Kadm jest metalem ciężkim o wysokiej toksyczności dla organizmów żywych. Zastępuje metale w centrach aktywnych enzymów, hamując tym samym działanie tych białek. Rośliny wykształciły dwie główne strategie obrony przeciwko toksycznemu działaniu tego pierwiastka: strategię wykluczenia (unikania) oraz akumulacji. Transport kadmu w roślinach odbywa się przy pomocy transporterów zaangażowanych w pobieranie i translokację metali niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania roślin. Do transporterów kadmu należą m.in. ATPazy metali ciężkich typu CPx oraz białka należące do rodzin Nramp i CDF.

Słowa kluczowe: kadm, transportery, Nramp, MTP, ATPazy typu CPx

## **Cadmium transport in plants and defense strategies against its toxicity**

### Abstract

Cadmium is a heavy metal, highly toxic for living organisms. It replaces metals in the active sites of enzymes, thereby inhibiting the action of these proteins. Plants have developed two main defense strategies against the toxic effects of this element: the strategy of exclusion and accumulation. In plants, transportation of cadmium is carried out by transporters involved in the uptake and translocation of metals necessary for growth and development of plants. Cadmium transporters include heavy metal CPx-type ATPases and proteins belonging to the Nramp and CDF families.

Keywords: cadmium, transporters, Nramp, MTP, ATPases CPx-type

# Wpływ deficytu fosforanów na aktywność aparatu fotosyntetycznego w liściach owsa zwyczajnego (*Avena sativa L.*)

## 1. Wprowadzenie

Fosfor (P) jest jednym z głównych składników mineralnych, niezbędnych w prawidłowym rozwoju i sprawnym przeprowadzaniu procesów metabolicznych u roślin. Wchodzi w skład wielu związków organicznych między innymi: kwasów nukleinowych, fosfolipidów, fosforanów cukrów, ATP, koenzymów, czy ufosforylowanych białek [1]. Pierwiastek ten reguluje wiele enzymatycznych reakcji np. prowadzących do fosforylacji białek błon tylakoidów czy też enzymów cyklu Calvina [2]. Fosfor pełni funkcje zapasowe, strukturalne i regulatorowe [3] oraz bierze udział w produkcji i transporcie asymilatów przez błony, a także w przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych.

## 2. Występowanie fosforu

Fosfor jest pierwiastkiem, który występuje w glebie w formie organicznej i nieorganicznej. Do form organicznych zalicza się: fosfolipidy, kwasy nukleinowe oraz kwas fitynowy i fitynę. Formy nieorganiczne to głównie fosforany glinu, żelaza i wapnia, często w postaci minerałów skalnych. Wszystkie te formy są niedostępne lub mało dostępne dla roślin. Jony fosforanowe w roztworze glebowym:  $H_2PO_4^-$  i  $HPO_4^{2-}$  to jedyne formy przyswajalne przez rośliny, określane jako Pi [3]. Dodatkowo jony te mogą być pobierane tylko w wąskim zakresie pH, tj 5,0-6,0, gdyż posiadają wysoką reaktywność [4].

### 2.1. Zawartość fosforu w glebie

W glebach występuje bardzo duży niedobór jonów fosforanowych. Stężenie Pi jest niskie i często nie przekracza 10  $\mu M$ . Dostępne roślinom formy fosforu pochodzą z wietrzenia skał osadowych, zmineralizowanych substancji organicznych [5] oraz opadów atmosferycznych i nawozów sztucznych [1]. Skały fosforanowe, głównie fosforyty i apatyty, są najzasobniejsze w ten składnik, dzięki czemu są wykorzystywane do produkcji nawozów sztucznych. Zasoby tych skał na świecie ulegają jednak szybkiemu wyczerpaniu, co stanowi poważny problem rolniczy. Opady atmosferyczne również mogą dostarczać fosforu i uczestniczą w obiegu tego składnika w środowisku. W wyniku erozji wietrznej fosfor zawarty w cząsteczkach pochodzenia glebowego dostaje się do atmosfery [6].

---

<sup>1</sup> minio.marta@gazeta.pl, Katedra Biologii i Ekologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet w Białymstoku, <https://uwb.edu.pl/>.

<sup>2</sup> nataliaa.grygoruk@wpl., Katedra Biologii i Ekologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet w Białymstoku, <https://uwb.edu.pl/>.

<sup>3</sup> icier@uwb.edu.pl, Katedra Biologii i Ekologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet w Białymstoku, <https://uwb.edu.pl/>.

## 2.2. Fityna jako alternatywne źródło fosforu

Rośliny posiadają również substancje zapasowe, które zapewniają rezerwuar rozwijającym się siewkom. Nasiona gromadzą różne związki organiczne, a także sole nieorganiczne. Jedną z ważniejszych jest fityna. To sól magnezowo-potasowo-wapniowa estru fosforanowego cyklicznego alkoholu mezoinozytolu. Bogata jest ona w reszty fosforanowe, które pełnią rolę zapasu organicznego fosforu. Fityna tworzy nierozpuszczalne kompleksy z jonami  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$  i  $Ca^{2+}$ , co powoduje zmniejszenie ich biodostępności, a także w wielu przypadkach zablokowanie wchłaniania tych pierwiastków do organizmu [4-6]. Poza kationami w zależności od pH może wiązać się ze skrobią oraz białkami, powodując obniżenie ich rozpuszczalności. Fityniany występujące w glebie (często w dużych stężeniach) są formą mało dostępną i uważa się, że najczęściej nie są pobierane przez rośliny [4-6].

## 2.3. Znaczenie fotosyntezy u roślin

Fotosynteza jest procesem bioenergetycznym umożliwiającym przekształcenie energii promieniowania świetlnego w energię wiązań chemicznych – w związkach organicznych. W wyniku procesu produkowane są asymilaty, które nieustannie są transportowane i dostarczane do różnych organów roślinnych służąc jako substraty oddechowe i szkielety węglowe umożliwiające syntezę różnych niezbędnych metabolitów, w tym związków biologicznie czynnych [1, 8]. Fotosynteza zachodzi w zielonych tkankach roślin, przede wszystkim w liściach, w chloroplastach. Chloroplasty są organelami skupionymi w tkance mięsistej liści, są otoczone osłonką zbudowaną z podwójnej warstwy białkowo-lipidowej, która otacza płynne wnętrze chloroplastu. Wnętrze organellum zajmuje stroma, w której znajduje się system lamellarny zbudowany z tylakoidów. Niezależna od światła faza fotosyntezy zachodzi w stromie, reakcje zależne od światła zachodzą w błonach tylakoidów gran [8].

Energia słoneczna jest siłą napędową fotosyntezy. Absorpcja światła w procesie fotosyntezy zachodzi dzięki barwnikom fotosyntetycznym. W błonie tylakoidów tworzą one kompleksy barwnikowo-lipidowo-białkowe, które zawierają barwniki antenowe i centrum reakcji fotochemicznej. W fotosyntezie biorą udział głównie chlorofile a i b, jak również karotenoidy, które pełnią funkcję pomocniczą [9]. Rośliny absorbują światło o długościach fali od 400 do 700 nm nazywane promieniowaniem fotosyntetycznie czynnym (PAR). Chlorofile a i b absorbują światło o podobnych długościach fal w zakresie niebieskim i czerwonym. Maksimum absorpcji cząsteczek chlorofilu a to 430 i 660 nm, a cząsteczek chlorofilu b wynosi 455 oraz 640 nm [1, 8]. Karotenoidy absorbują światło w zakresie niebieskim i fioletowym, ich zakres mieści się w przedziale 350-500 nm. Podstawową rolą tych barwników jest zbieranie promieni świetlnych i jako energię stanu wzbudzenia przekazywanie ich na cząsteczkę chlorofilu a, która znajduje się w centrum reakcji fotochemicznej [9, 10]. Ważną rolą jest także ochrona przed procesem fotooksydacji aparatu fotosyntetycznego, związanego z udziałem reaktywnych form tlenu [10]. Cząsteczki karotenoidów wraz z cząsteczkami chlorofili tworzą fotosystemy, które osadzone są w membranie tylakoidu chloroplastu. Wyróżnia się dwa typy fotosystemów: fotoukład I (PSI) oraz fotoukład II (PSII). Kompleks rdzeniowy PSI zbudowany jest z 15 podjednostek białkowych i u roślin wyższych występuje w formie monomerycznej. Maksimum absorpcji światła dla cząsteczek chlorofilu a w tym fotoukładzie wynosi

700 nm. W skład kompleksu rdzeniowego wchodzi cztery duże oraz kilka małych białek transbłonowych, jak również trzy zewnątrzbłonowe podjednostki białkowe. Maksimum absorpcji światła pary chlorofilu a znajdujących się w centrum reakcji PSII to 680 nm, chlorofil a w centrum reakcji PSII przechodzi w stan wzbudzony, staje się silnym reduktorem. Elektron przekazywany jest na pierwotny akceptor, feofitynę, a następnie do innych składników łańcucha transportu elektronów [11]. Podczas powrotu elektronów, wzbudzonych przez fotony światła, do poziomu podstawowego może dochodzić do utraty energii w postaci promieniowania świetlnego, określanego jako fluorescencja chlorofilu [12]. Pomiar fluorescencji chlorofilu a są obecnie powszechną metodą oceny funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego, jak również reakcji roślin na niekorzystne warunki środowiska tj. brak makro- i mikroelementów, w tym także niedobór fosforu [12].

#### **2.4. Fotosynteza w warunkach niedoboru fosforu**

Niedobór fosforu w środowisku istotnie wpływa na przebieg i intensywność procesu fotosyntezy, gdyż powoduje zmiany w strukturze chloroplastów, zawartości chlorofilu, a także oddziałuje na przebieg reakcji jasnej i ciemnej fazy tego anabolicznego procesu oraz syntezę końcowych produktów fotosyntezy, czyli tlenu i glukozy. Niedobór Pi ogranicza także istotnie wzrost i powierzchnię liści – najważniejszych organów przeprowadzających proces fotosyntezy. Wczesne etapy niedoboru fosforu nie wpływają istotnie na obniżenie intensywności fotosyntezy, natomiast długotrwały brak Pi powoduje zahamowanie fotosyntezy. Stwierdzano, że związane jest to głównie ze spadkiem aktywności enzymów cyklu Calvina, zwłaszcza katalizujących procesy odtwarzania RuBP [13]. Uważano przez wiele lat, że reakcje fotosyntetyczne zależne od światła w niewielkim stopniu są modyfikowane w warunkach umiarkowanego deficytu Pi. Jednak najnowsze doniesienia wskazują, że również transport elektronów w fazie świetlnej fotosyntezy może być modyfikowany w warunkach niedoboru fosforanów [16].

### **3. Cel badań**

Celem badań było określenie wpływu deficytu Pi na wzrost owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.) i aktywność fotosyntetyczną liści trzech odmian (Bingo, Elegant i Krezus) hodowanych na pożywkach płynnych: pożywce pełnej (+P, kontrola), bez fosforu (-P) i pożywce z fitynianem, jako organicznym źródłem fosforu (F). Do określenia funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego liści owsa, w zależności od żywienia fosforanowego, zastosowano szybkie i bezinwazyjne techniki: analizę fluorescencji chlorofilu a, pomiary względnej zawartości barwników oraz refleksji liści.

### **4. Charakterystyka materiału doświadczalnego**

Badania zostały prowadzone na owsie zwyczajnym (*Avena sativa* L.), z rodziny wiechlinowatych (*Poaceae*). Rośliny, charakteryzują się łodygą podzieloną na węzły i międzywęzła, a liście zbudowane są z pochwy otaczającej źdźbło oraz równowąskiej blaszki liściowej. Kwiatostan stanowi wiecha (o długości do 30 cm), zaś owocem są ziarniaki, które znajdują się w kilkokwiatowych kłoskach. Korzenie owsa tworzą system wiązkowy [15]. Wyróżnia się dwie formy owsa: ozime i jare, w Polsce uprawia się jedynie odmiany jare [16].

#### 4.1. Znaczenie gospodarcze owsa

Owies zwyczajny do niedawna był uznawany za gatunek typowo pastewny. W Polsce początki uprawy owsa datuje się na VIII-IX wiek. Miał on wtedy ogromne znaczenie gospodarcze jako pożywienie dla koni. Do niedawna na paszę przeznaczano aż 80% zbiorów. Obecnie w krajach Unii Europejskiej do celów spożywczych przeznacza się 9% zebranego ziarna [15].

Ziarniaki owsa są bogate w białka, nienasycone kwasy tłuszczowe, składniki mineralne (w tym fosfor, magnez, potas, wapń, żelazo) i witaminy z grupy B oraz A, D, E i K. Zawiera również wiele związków przeciwutleniających np. polifenole [16]. Te właściwości sprawiają, że roślina ta jest wykorzystywana w wielu sektorach przemysłu. Przede wszystkim wykorzystuje się ją do produkcji paszy dla zwierząt, ale również w przemyśle spożywczym i kosmetycznym. Przykładami są produkty: płatki, owsiane, kasze, otręby. Owies wykorzystywany jest również do produkcji szamponów, odżywek, kremów, maseczek i mydła toaletowego [17].

#### 4.2. Wymagania siedliskowe owsa

Wśród zbóż, owies zwyczajny posiada najmniejsze wymagania glebowe i termiczne. Dzięki małym wymaganiom cieplnym może być on uprawiany zarówno wysoko w górach, jak i na terenach nizinnych. Zaletą jest również możliwość jego wzrostu na glebach kwaśnych i obojętnych, dzięki wysokiej tolerancji na różne pH gleby. Rośliny te mają jednak wysokie wymagania wodne – by owies rósł prawidłowo i dawał wysokie plony potrzeba dobrze nawodnionej gleby. Poziom plonowania tego zboża zależy od miejsca jego siewu: na terenach nizinnych plon będzie znacznie większy niż na terenach górskich, a także od odmiany wysianej w danym rejonie [16].

#### 4.3. Warunki hodowli i metody prowadzonych badań

Nasiona pozyskano z Hodowli Roślin Strzelce sp. z o.o. Grupa IHAR. Do doświadczeń wykorzystano odmiany Bingo (data rejestracji w COBOR: 2009 r.), Elegant (2016) i Krezus (2005).

Kultury roślinne prowadzone były w pomieszczeniu fitotronowym, w którym panowały dogodne warunki do rozwoju i wzrostu. Długość dnia wynosiła 16 h, nocy – 8 h. Temperatura dzień/noc to 23-25°C/18-20°C, wilgotność powietrza wynosiła około 60%, natomiast natężenie promieniowania fotosyntetycznie czynnego (PAR) wynosiło 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Nasiona wysiano w plastikowych pojemnikach na wilgotnej ligninie. Po siedmiodniowym okresie kiełkowania siewki zostały przeniesione na pożywki płynne z fosforem nieorganicznym  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (kontrola, +P), organicznym kwasem fitynowym (F) i bez fosforanu (-P). Pożywka +P zawierała:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  (4,4 mM),  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (2,7 mM),  $\text{KNO}_3$  (1,5 mM),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 mM), Fe-EDTA (76  $\mu\text{M}$ ),  $\text{H}_2\text{BO}_3$  (43  $\mu\text{M}$ ),  $\text{MnCl}_2$  (9  $\mu\text{M}$ ),  $\text{CuSO}_4$  (0,3  $\mu\text{M}$ ),  $\text{ZnSO}_4$  (0,8  $\mu\text{M}$ ),  $\text{H}_2\text{MoO}_4$  (0,1  $\mu\text{M}$ ). Pożywka z kwasem fitynowym (F) zawierała kwas fitynowy (0,1 mM) (zamiast  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ); a pożywka bez fosforu (-P) zawierała KCl (2 mM) (zamiennik  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) [18]. Hodowle płynne prowadzono przez 3 tygodnie. Wszystkie pożywki były napowietrzane za pomocą pompki akwariowych, pH roztworów wynosiło  $5,2 \pm 0,1$ , a pożywki były wymieniane co 7 dni. Analiz dokonywano po 21 dniach od założenia hodowli płynnych na 28 dniowych siewkach. Wszystkie analizy były dokonywane przynajmniej w trzech powtórzeniach.



## **5. Określenie parametrów wzrostowych roślin**

Po upływie 7, 14 i 21 dni mierzono wysokość pędów i długość korzeni, za pomocą linijki, a także po 21 dniach ważono świeżą i suchą masę korzeni i pędów roślin, za pomocą wagi analitycznej RADWAG AG E42S. Suszenie odbywało się w suszarce PREMEDIK G-100/250, w temperaturze 105°C, przez 24 h.

### **5.1. Oznaczenie uwodnienia tkanek**

W tym celu zważono całe rośliny i zapisano świeżą masę. Następnie inkubowano je w zlewce z wodą destylowaną, w ciemności przez 6 h. Po upływie tego czasu, osuszono ręcznikiem papierowym rośliny i ponownie zważono. Kolejno suszono materiał w temperaturze 105°C, przez 48 h i również zważono. Otrzymane wartości podstawiono do wzoru:

$$RWC = [(św.m. - s.m.) / (fsw - s.m.)] \times 100\%$$

gdzie: św.m. – świeża masa rośliny, s.m. – sucha masa rośliny, fsw – masa w pełni uwodnionych tkanek

### **5.2. Określenie wskaźnika NBI, względnej zawartości chlorofili i flawonoidów w pędach za pomocą urządzenia Dualex**

Po upływie 21 dni wzrostu na pożywkach płynnych dokonano pomiaru urządzeniem Dualex 4 (Force A, Francja), w celu określenia zawartości chlorofili, flawonoidów i NBI, czyli stosunku zawartości chlorofilu do zawartości flawonoidów. W tym celu wybrano trzeci liść, w pełni dojrzały, w każdej roślinie, w każdym wariancie i dokonano pomiaru wierzchu pędów. Wykonano 10 pomiarów z każdego wariantu, w 3 kolejnych hodowlach.

### **5.3. Oznaczenie fluorescencji chlorofilu za pomocą urządzenia Pocket Pea**

Po 21 dniach wzrostu na pożywkach płynnych oznaczono fluorescencję chlorofilu a oraz wskaźnik wydajności za pomocą Pocket Pea (Hansatech Instruments, Anglia). Urządzenie to w zestawie posiada klipsy do zaciemniania próbki. Klipsy te zakłada się na trzeci liścień pędów i przysłania się wierzch liścia na 30 min. Po upływie tego czasu dokonuje się pomiaru urządzeniem parametrów fluorescencji chlorofilu a.

### **5.4. Oznaczenie pomiaru odbicia światła przez liście za pomocą miniaturowego spektrometru liściowego CI-710**

Badano drugi liść rośliny, w dziesięciu powtórzeniach każdego wariantu, każdej odmiany. Przykładano spektrometr liściowy CI-710 (CID Bio-Science, USA) do wierzchniej strony liści i analizowano wyniki w programie SpectraSnap (dostarczony z CI-710). Dzięki temu określono współczynnik odbicia antocyjanów (ARI), współczynnik odbicia karotenoidów (CRI), fotochemiczny współczynnik odbicia (PRI) i wskaźnik pasma wody (WBI) [19].

## **6. Analiza wyników**

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu TIBCO Statistica 13.3.0 USA. Wykonano analizę ANOVA oraz test Tukey'a. Prezentowane wyniki stanowią średnią 10 pomiarów w przypadkach wysokości pędów i długości korzeni, analizy względnej zawartości chlorofilu, flawonoidów oraz NBI, analizy fluorescencji chlorofilu a, a także analizy współczynników odbicia światła przez liście. W przypadku suchej i świeżej masy korzeni i pędów oraz uwodnienia tkanek zaprezentowane zostały wyniki średniej z 6 pomiarów.

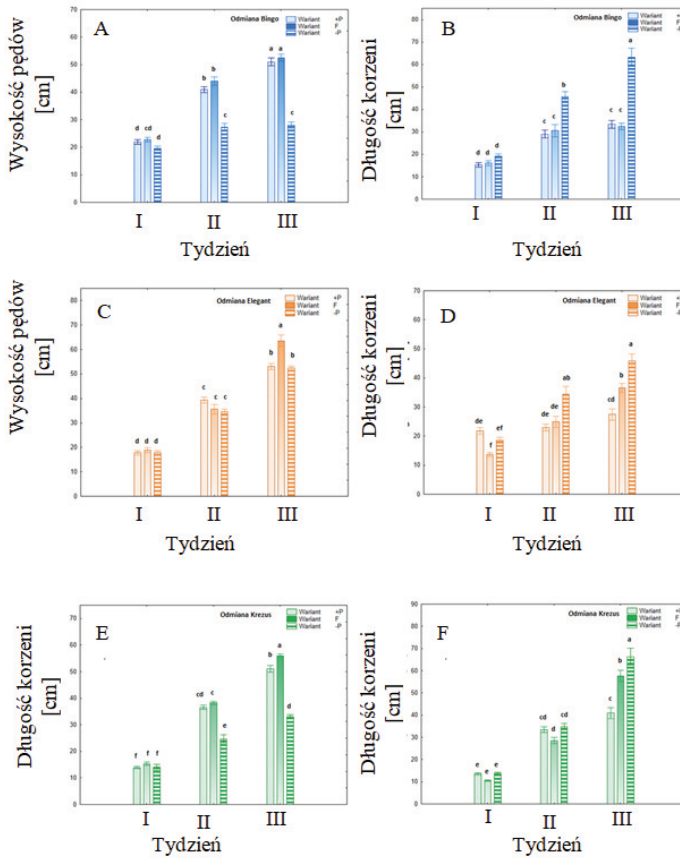
## 7. Analiza parametrów wzrostowych

### 7.1. Analiza wzrostu pędów i długości korzeni

Po 7 dniach na pożywkach płynnych z niedoborem Pi (-P, F) różnice w wysokości pędów owsa zwyczajnego były niewielkie i nieistotne statystycznie w porównaniu z kontrolą (+P), w przypadku wszystkich badanych odmian (wyk. 1A, 1C, 1E). W drugim tygodniu wzrostu zauważono dwukrotny wzrost pędów owsa, rosnących na pożywce z fosforem nieorganicznym (+P) i organicznym (F), głównie u odmiany Bingo (wyk. 1A) i Krezus (wyk. 1E). Najślabszy wzrost pędów w tym tygodniu był u roślin hodowanych na pożywce bez fosforu (-P) u wszystkich odmian (wyk. 1A, 1C, 1E). Wyjątek stanowiła odmiana Elegant, tutaj pędy na wszystkich wariantach rosły bardzo podobnie (wyk. 1C). W 3 tygodniu hodowli wzrost pędów owsa był największy na pożywce +P i F, u wszystkich odmian (wyk. 1A, 1C, 1E). Nawet o połowę mniejszy wzrost w ostatnim tygodniu osiągnęły pędy owsa rosnącego na -P odmiany Bingo (wyk. 1A), zaś największy rośliny rosnące na pożywce F, u wszystkich odmian (wyk. 1A, 1C, 1E).

W przypadku długości korzenia owsa po pierwszym tygodniu zaobserwowano podobnie mały wzrost we wszystkich wariantach, u trzech odmian (wyk. 1B, 1D, 1F). W drugim tygodniu znacznie większy wzrost wykazywały korzenie owsa rosnące na pożywce bez fosforu (-P), głównie u odmiany Bingo (wyk. 1B). W trzecim tygodniu największą długość miały korzenie rosnące na wariacie -P u wszystkich odmian (wyk. 1B, 1D, 1E), natomiast korzenie rosnące na pożywkach +P i F miały nawet czterokrotnie mniejszą długość od wariantu -P w trzecim tygodniu niezależnie od odmiany (wyk. 1B, 1D, 1E).

Po przeanalizowaniu wykresów można zauważyć zahamowanie wzrostu pędu na korzyść wzrostu korzenia u roślin rosnących na pożywce bez fosforu (-P). Rośliny rosnące na wariantach fosforanowych (+P i F) osiągały wysoki wzrost pędu, niezależnie od odmiany. Podobne obserwacje poczyniono już wcześniej, w przypadku innych odmian owsa [20] oraz innych zbóż. Kilkutygodniowy deficyt Pi zawsze wpływał na ograniczenie wzrostu pędu i liści, natomiast wpływał w niewielkim stopniu a nawet stymulował wydłużanie korzeni u pszenicy, jęczmienia oraz innych roślin [20].



Wykres 1. Wysokość pędów (A, C, E) i długość korzeni (B, D, F) owsa po pierwszym, drugim i trzecim tygodniu wzrostu na pożywce pełnej (+P), z kwasem fitynowym (F) oraz bez fosforu (-P) odmiany Bingo (kolor słupków niebieski) (A, B), Elegant (kolor pomarańczowy) (C, D) i Krezus (kolor zielony) (E, F). Litera od a do f wskazują znaczące różnice przy  $P < 0,05$  między wariantami, post hoc – Test Tukey’a. Źródło: [opracowanie własne]

Po 3 tygodniach największą świeżą masę pędów zaobserwowano u roślin odmiany Bingo, rosnących na pożywce pełnej (+P) i pożywce z kwasem fitynowym (F). Odmiany Elegant i Krezus rosnące na tych pożywkach również osiągnęły wysoką masę pędów. Nie zaobserwowano różnic w masie pędów w wariantach +P i F u odmiany Elegant. Czterokrotnie mniejszą masę korzeni owsa obserwujemy u wszystkich odmian roślin, rosnących na pożywce bez fosforu (-P) (wyk. 2A).

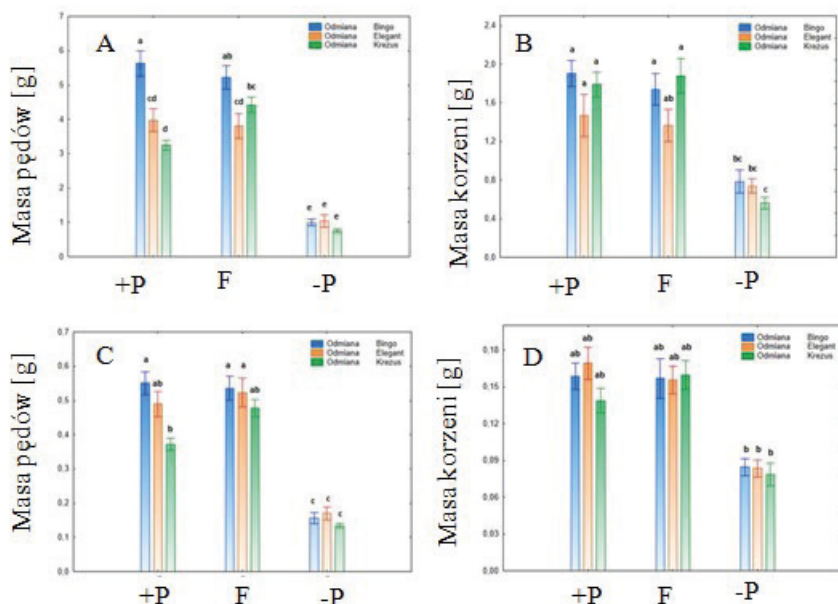
Świeża masa korzeni była największa u roślin rosnących na pożywkach z fosforem nieorganicznym (+P) i organicznym (F) u wszystkich badanych odmian, w tym największą masę osiągnęły rośliny odmiany Bingo. Dwukrotnie mniejszą świeżą masę korzeni odnotowano u wszystkich odmian roślin rosnących na pożywce z deficytem fosforu (-P) (wyk. 2B).

Sucha masa pędów po upływie trzech tygodni, podobnie jak w świeżej masie pędów była największa u roślin rosnących za pożywkach z fosforem. Bardzo zbliżone

wartości osiągnęły rośliny odmiany Bingo rosnące na pożywce +P i F oraz odmiany Elegant i Krezus wariantu F. Cztery razy mniejsze wartości osiągnęły rośliny wszystkich odmian rosnące bez źródła fosforu (-P) (wyk. 2C).

Sucha masa korzeni była zdecydowanie większa u roślin rosnących na wariantach z fosforem (+P i F) a najmniejsza u roślin rosnących na wariantcie -P. Sucha masa korzeni roślin nie różniła się znacząco pomiędzy odmianami (wyk. 2D).

Owies rosnący na pożywkach bez fosforu (-P) osiągnął zdecydowanie mniejszą świeżą i suchą masę pędów oraz korzeni, w porównaniu do roślin hodowanych na wariantach z fosforem (+P i F).



Wykres 2. Świeża i sucha masa pędów (A, C) oraz korzeni (B, D) owsa rosnącego na pożywce pełnej (+P), z kwasem fitynowym (F) oraz bez fosforu (-P) odmian Bingo kolor słupków niebieski), Elegant (kolor pomarańczowy) i Krezus (kolor zielony). Literki od a do e wskazują znaczące różnice przy  $P < 0,05$  między wariantami, post hoc – Test Tukey’a. Źródło: [opracowanie własne]

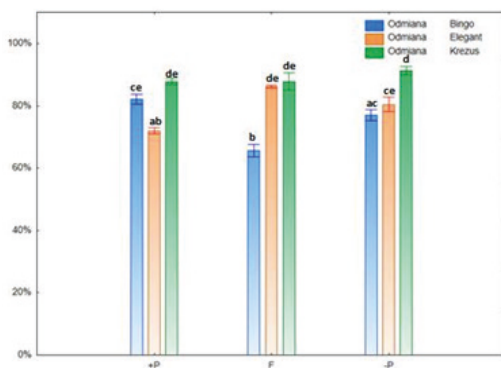
Analizy świeżej i suchej masy części nadziemnych oraz korzeni odmian owsa rosnącego na różnych wariantach żywienia fosforanowego pokazują, że rośliny hodowane na pożywce bez fosforu (-P) osiągają mniejszą masę niż rośliny hodowane na pożywkach ze źródłem fosforu nieorganicznego (+P) bądź organicznego (F). Dotyczy to wszystkich badanych parametrów wzrostowych. W przypadku roślin F wzrost pędu i korzenia był zbliżony do parametrów u roślin na pożywce kontrolnej (+P), co jest dowodem na to, że owies może efektywnie wykorzystywać kwas fitynowy jako źródło fosforu. Zostało to już wcześniej wykazane w badaniach Żebrowska i wsp. [18], także u innych odmian *A. sativa*.

## 7.2. Analiza uwodnienia tkanek

Względna zawartość wody (RWC) określa stosunek zawartości wody w tkance do ilości wody, gdy tkanka jest maksymalnie uwodniona (RWC = 100%). Wskaźnik ten maleje, jeśli bilans wody w roślinie jest ujemny.

We wszystkich wariantach i odmianach RWC utrzymywało się na wysokim poziomie – powyżej 65%. Największą względną zawartość wody zaobserwowano u Krezusa w wariacie -P (ponad 90%), zaś najmniejszą u odmiany Bingo w wariacie z fosforem organicznym (F) (ok.65%). Najbardziej podobną do siebie zawartość procentową miały warianty: Krezus +P i F i Elegant F oraz Bingo +P i Elegant -P (wyk. 3).

Podane wyniki świadczą o umiarkowanym deficycie wody w większości wariantów, gdyż RWC jest u nich obniżone ok. 10%, natomiast silny deficyt wodny występuje u odmian, których obniżenie zawartości wody jest niższe niż 80% tj. owies odmiany Elegant, rosnący na pożywce z fosforem nieorganicznym (+P) oraz owies odmiany Bingo hodowany na pożywce z kwasem fitynowym (F) (wyk. 3).



Wykres 3. Względna zawartość wody w liściach (RWC) owsa odmiany Bingo (kolor słupków niebieski), Elegant (kolor pomarańczowy) i Krezus (kolor zielony), rosnącego na pożywce z fosforem nieorganicznym (+P), z kwasem fitynowy (F) oraz bez fosforu (-P). Litera od a do e wskazują znaczące różnice przy  $P < 0,05$  między wariantami; post hoc – Test Tukey'a. Źródło: [opracowanie własne]

Względna procentowa zawartość wody w tkankach różni się w przypadku badanych odmian owsa, ale poziom żywienia fosforanowego oraz źródło fosforu nie wpływają jednoznacznie istotnie na stopień uwodnienia tkanek. Prawdopodobnie należałoby kontynuować analizy względnej zawartości wody pod wpływem deficytu fosforu w tkankach owsa i uzupełnić o dane z następnych hodowli. Dane literaturowe, ostatnio nieliczne, również nie są jednoznaczne, nie u wszystkich gatunków roślin badacze obserwowali istotny wpływ deficytu Pi na poziom uwodnienia tkanek [22].

## 7.3. Analiza względnej zawartości chlorofilu, flawonoidów i NBI

Względna zawartość chlorofilu w badanych liściach owsa wynosiła od około 35 do 58 jednostek umownych urządzenia Dualex, i mieściła się w granicach normy (5-80 jednostek umownych). Największą i zbliżoną do siebie względną zawartość chlorofilu zaobserwowano w liściach odmian owsa rosnącego na wariacie z fosforem

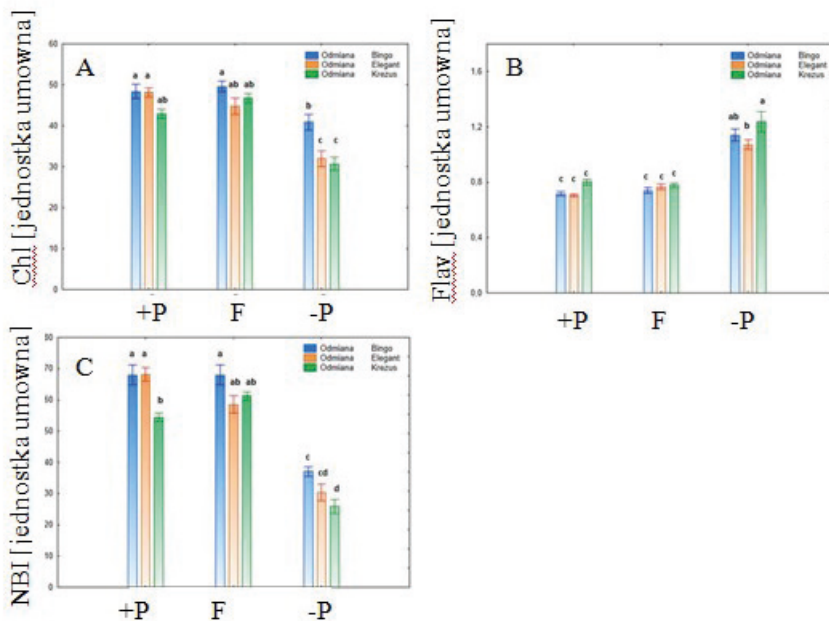
nieorganicznym (+P) i organicznym (F). Najmniejszą natomiast u roślin rosnących na pożywce bez fosforu (-P) (wyk. 4A).

Zawartość flawonoidów również mieściła się w granicach normy: 0,5-2,5 jednostek umownych (j.u.). Najwięcej flawonoidów posiadały pędy hodowanych na pożywce – P i wynosiła około 1,4, zaś najmniej liście odmian z wariantów +P i F (w granicach 0,8 j.u.). Zawartość flawonoidów w liściach nie zależała od odmiany owsa (wyk. 4B).

Stosunek względnej zawartości chlorofili do względnej zawartości flawonoidów (NBI) w badanych wariantach wynosił od ok. 25 jednostek umownych do prawie trzy razy większej wartości – 70 j.u i mieścił się w przyjętych widełkach wielkości (0-300). Największą wartość osiągnęły rośliny wzrastające na pożywkach +P i F, zwłaszcza odmiany Bingo i Elegant. Najmniejszą wartość NBI obserwowano w liściach owsa z deficytem PI (-P), u wszystkich badanych odmian (wyk. 4C).

Wyniki uzyskane z zastosowaniem nieinwazyjnej metody pomiaru barwników wskazały na większą względną zawartość chlorofili u roślin zaopatrzonych w źródło fosforu niż na pożywkach z jego deficytem. Podobne zależności zostały prezentowane w innych pracach, w których badania zawartości chlorofili w liściach były mierzone metodami tradycyjnymi po ekstrakcji barwników rozpuszczalnikami organicznymi [22].

Zawartość flawonoidów była natomiast znacząco wyższa u roślin rosnących na pożywce -P w porównaniu z kontrolą oraz wariantem F. Flawonoidy są metabolitami wtórnymi których istotną rolę jest ochrona liści przed szkodliwym wpływem UV oraz udział w usuwaniu reaktywnych form tlenu [21].



Wykres 4 Względna zawartość chlorofilu (A), flawonoidów (B) oraz stosunek zawartości chlorofilu do zawartości flawonoidów (C) u owsa odmiany Bingo (kolor słupków niebieski), Elegant (kolor pomarańczowy) i Krezus (kolor zielony) rosnącego na pożywce pełnej (+P), pożywce z kwasem fitynowym (F) oraz bez fosforu (-P). Litera od a do d wskazują znaczące różnice przy  $P < 0,05$  między wariantami; post hoc – Test Tukey’*a*. Źródło: [opracowanie własne]

#### **7.4. Analiza fluorescencji chlorofilu a**

Funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego zostało oszacowane za pomocą wybranych wskaźników:  $F_m$  – maksymalna intensywność fluorescencji,  $F_v/F_m$ , określający maksymalną wydajność kwantową fotosystemu II;  $F_v/F_o$ , który jest wskaźnikiem maksymalnej wydajności fotosyntezy (informuje o rozkładzie wody) oraz trzech parametrów dotyczących energii.  $TR_o/RC$  to energia związana przez aktywnym centrum reakcji,  $E_t/RC$  – energia przekazywana z centrum reakcji na łańcuchach przenośników oraz  $D_l/RC$  określający energię rozproszoną w postaci ciepła, niezwiązanej w aktywnym centrum reakcji oraz Area, czyli obszar powyżej krzywej fluorescencji.

Wskaźnik maksymalnej wydajności fotosyntezy jest zmniejszony u owsa odmiany Krezus i Bingo rosnącego na pożywce bez fosforu (wyk. 5A i 5C), w porównaniu do roślin rosnących na pożywce z fosforem, zarówno nieorganicznym (+P) jak i organicznym (F) (wyk. 5A i 5C). Inaczej plasują się wyniki u odmiany Elegant, gdyż są one porównywalne we wszystkich wariantach żywieniowych (wykres 5B). Może to świadczyć o lepszym przystosowaniu tej odmiany do stresu wywołanego deficytem fosforu.

Parametr  $P_i$  inst., informujący o ogólnej wydajności fotosystemu II ma zdecydowanie mniejszą wartość na pożywce bez fosforu (-P) u odmiany Bingo i Krezus. Wartości na pożywkach z innym źródłem fosforu miały bardzo zbliżone wartości (wyk. 5A i 5C). U odmiany Elegant natomiast podobnie układają się wyniki dla wariantu +P i -P, natomiast bardzo wyraźną różnicę obserwujemy dla pożywki F (wyk. 5B). To oznacza, iż u owsa odmiany Elegant rosnącego na pożywce z fosforem organicznym zachodzi intensywniejsza fotosynteza w porównaniu do kontroli (+P).

Maksimum intensywności fluorescencji ( $F_m$ ) oraz wydajności fotosyntezy ( $F_v/F_m$ ) jest równa we wszystkich odmianach i wariantach żywieniowych (wyk. 5 A, B, C).

Wskaźnik energii związanej przez aktywne centrum reakcji ( $TR_o/RC$ ) u odmiany Bingo i Krezus był zwiększony w wariacie -P oraz podobny w wariantach z fosforem +P i F (wyk. 5A i 5C), natomiast u odmiany Elegant parametr ten był taki sam u roślin rosnących na pożywce z fosforem nieorganicznym (+P) oraz bez źródła fosforu (-P), a zmniejszony u rosnących na pożywce z kwasem fitynowym (F) (wyk. B). Otrzymane wyniki sugerują, że rośliny hodowane na pożywce bez źródła fosforu wiążą więcej energii przez aktywne centra reakcji. Wyjątek stanowi odmiana Elegant, u której te wiązanie przy obecności fosforu nieorganicznego oraz bez fosforu było takie same, natomiast mniejsze u roślin rosnących na pożywce z fosforem organicznym.

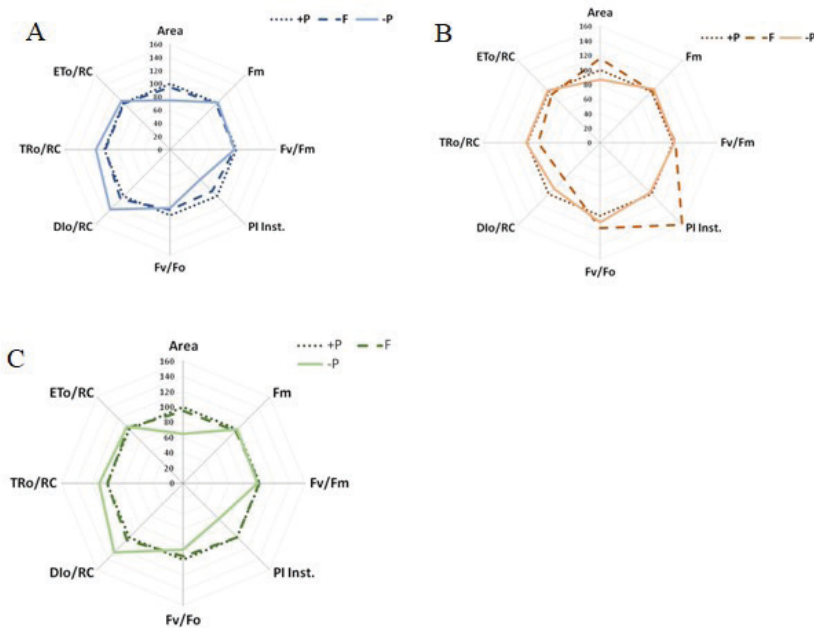
Natomiast energia przekazywania z centrum reakcji na łańcuchach przenośników ( $E_t/RC$ ) nie zmienia się w zależności od wariantu żywienia czy też odmiany (wyk. 5A, 5B, 5C). Oznacza to, że dostępność fosforu nie wpływa na przekazywanie energii na łańcuchach przenośników.

Ostatnim analizowanym parametrem był  $D_l/RC$ , czyli energia rozproszona w postaci ciepła, niezwiązana w aktywnym centrum reakcji. U owsa odmiany Krezus i Bingo nie zaobserwowano zmian w stosunku do kontroli (+P) w wariacie F, natomiast w wariacie bez fosforu (-P) był wzrost tego parametru (wyk. 5A, 5C). U odmiany Elegant wskaźnik mierzony w wariacie F i -P był mniejszy od kontroli (+P) (wyk. 5B). Przy deficycie fosforu obserwujemy zwiększenie rozproszenia energii w postaci

ciepła, co świadczy o osłabieniu działania aparatu fotosyntetycznego. Wyjątek stanowią liście owsa odmiany *Elegant* u którego widać, iż w pożywce z kwasem fitynowym rozproszenie energii ciepła jest mniejsze niż na pożywce pełnej (+P).

Obszar powyżej krzywej fluorescencji jest zmniejszony u roślin hodowanych na pożywce bez fosforu (-P) we wszystkich odmianach owsa (wyk. 5A, B, C).

Analizowane parametry fluorescencji chlorofilu a świadczą o gorszym funkcjonowaniu aparatu fotosyntetycznego w liściach owsa rosnącego na pożywkach z deficytem fosforu. Podobne wyniki uzyskano badając parametry fluorescencji chlorofilu a w liściach jęczmienia z deficytem Pi [14, 16]. Nasze wyniki informują ponadto, iż kwas fitynowy jest dobrym zamiennikiem fosforu nieorganicznego, gdyż jego pobieranie wpływa pozytywnie na wydajność fotosystemu II, zwłaszcza u odmiany *Elegant*. Wczesny i pośredni niedobór fosforu zwykle nie ma wpływu na fotosyntezę, a nawet może prowadzić do zwiększenia intensywności fotosyntezy, jednak już poważny jego niedobór prowadzi do dużego spadku procesów fotosyntetycznych w roślinie, jak stwierdzano już u odmian owsa wcześniej, z zastosowaniem metod pomiarów wymiany gazowej.



Wykres 5. Oznaczenie wskaźnika wydajności fotosyntezy oraz przepływu elektronów u owsa odmiany Bingo (kolor linii niebieski) (A), *Elegant* (kolor pomarańczowy) (B) i *Krezus* (kolor zielony) (C).

Źródło: [opracowanie własne]



## 7.5. Analiza współczynników odbicia światła przez liście

Oznaczono współczynnik odbicia antocyjanów (ARI), karotenoidów (CRI), fotochemiczny współczynnik odbicia (PRI) oraz wskaźnik pasma wody (WBI).

Współczynnik odbicia antocyjanów u owsa rosnącego na pożywkach z fosforem nieorganicznym (+P) i organicznym (F) były do siebie bardzo zbliżone u wszystkich odmian. Natomiast zdecydowanie większe wartości tego wskaźnika zaobserwowano u roślin hodowanych na pożywce bez fosforu (-P). To świadczy o wysokim odbijaniu antocyjanów przez rośliny rosnące na deficycie fosforanowym (tab. 1).

Współczynnik odbicia karotenoidów (CRI) u wszystkich odmian i we wszystkich wariantach jest bardzo zbliżony (tab. 1). Wnioskując obecność fosforu nie wpływa na intensywność odbijania karotenoidów oraz strukturę pigmentu.

PRI (fotochemiczny współczynnik odbicia) jest równy u wszystkich odmian (Bingo, Elegant i Krezus) w wariantach żywieniowych z fosforem (+P i F), natomiast o połowę niższe wartości obserwujemy u roślin rosnących na pożywce z deficytem fosforu, niezależnie od odmiany (tab. 1).

Wskaźnik pasma wody (WBI) we wszystkich odmianach i wariantach oscylował w granicach 1 (tab. 1). Deficyt Pi nie wpływa istotnie na zmianę uwodnienia liści i wskaźnik ten jest zgodny z obliczeniami RWC pokazanymi wcześniej (wyk. 3).

Tabela 1 Współczynniki odbicia antocyjanów (ARI), karotenoidów (CRI), fotochemiczny współczynnik odbicia (PRI) i wskaźnik pasma wody (WBI) u owsa odmiany Bingo, Elegant i Krezus, rosnącego pożywce z fosforem nieorganicznym (+P), organicznym (F) oraz bez fosforu (-P). Litera od a do d wskazują znaczące różnice przy  $P < 0,05$  między wariantami; post hoc – Test Tukey'a

WSPÓŁCZYNNIKI ODBIĘCIA [jedn. osłona umowna]	ODMIANA								
	BINGO			ELEGANT			KREZUS		
	+P	F	-P	+P	F	-P	+P	F	-P
ARI	-0,00873 <sup>ab</sup>	-0,01062 <sup>c</sup>	0,004392 <sup>d</sup>	-0,00685 <sup>cd</sup>	-0,01044 <sup>d</sup>	0,000408 <sup>ab</sup>	-0,00777 <sup>cd</sup>	-0,01036 <sup>cd</sup>	-0,00471 <sup>bc</sup>
CRI	0,055122 <sup>abcd</sup>	0,073735 <sup>c</sup>	0,056872 <sup>abcd</sup>	0,075643 <sup>c</sup>	0,066503 <sup>ab</sup>	0,052254 <sup>cd</sup>	0,063234 <sup>abcd</sup>	0,066608 <sup>abcd</sup>	0,048484 <sup>d</sup>
PRI	0,071411 <sup>a</sup>	0,078884 <sup>a</sup>	0,026224 <sup>b</sup>	0,089114 <sup>a</sup>	0,071351 <sup>a</sup>	0,032468 <sup>b</sup>	0,087854 <sup>a</sup>	0,077701 <sup>a</sup>	0,050651 <sup>b</sup>
WBI	0,910064 <sup>cd</sup>	0,965933 <sup>c</sup>	0,91094 <sup>cd</sup>	0,953267 <sup>c</sup>	0,920535 <sup>bc</sup>	0,881821 <sup>d</sup>	0,941858 <sup>ab</sup>	0,901068 <sup>cd</sup>	0,907338 <sup>cd</sup>

Źródło: [Opracowanie własne]

Po przeanalizowaniu uzyskanych wyników widzimy, że deficyt fosforu nie wpływa istotnie na większość współczynników refleksji liści badanych odmian owsa, w tym na: zawartość karotenoidów, oraz wskaźnik pasma wody. Natomiast obserwowana w tym doświadczeniu zwiększona zawartość antocyjanów manifestuje się często zmianą barwy liści roślin na purpurową lub ciemnobrązową, która następuje przy braku fosforu w pożywce [1]. Współczynniki refleksji liści owsa nie były dotychczas badane, zwłaszcza w warunkach zróżnicowanego żywienia fosforanowego.

## 8. Podsumowanie

Fosfor jest pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin. Bierze udział w wielu reakcjach i procesach metabolicznych zachodzących w komórkach. Deficyt Pi spowodował zahamowanie wzrostu pędu oraz stymulację

wzrostu korzenia u wszystkich odmian owsa, podobnie jak u innych wcześniej badanych roślin. Odmiany owsa rosnące na pożywce z fitynianem charakteryzowały się natomiast podobnym wzrostem do kontroli, co świadczy o efektywnym wykorzystywaniu fitynianu jako źródła fosforu.

Przeprowadzone badania z zastosowaniem nieinwazyjnych technik wykazały, że deficyt Pi obniża względną zawartość chlorofili i wpływa negatywnie na funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego w liściach roślin -P. Rośliny na pożywce F charakteryzowały się natomiast podobną zawartością barwników fotosyntetycznych oraz zbliżoną do wariantu kontrolnego (+P) aktywnością aparatu fotosyntetycznego w liściach.

## Podziękowania

Serdeczne podziękowania dr Anecie Adamczuk i dr Aleksandrze M. Staszak za zaangażowanie i nieocenioną pomoc, podczas przeprowadzania eksperymentu oraz analizy wyników.

Ogromne podziękowania Panu prof. dr hab. Andrzejowi M. Skoczowskiemu za udostępnienie spektrometru liściowego oraz liczne wskazówki podczas opracowywania i analizy wyników doświadczenia

## Literatura:

1. Kozłowska M., Politycka B., *Fotosynteza i aktywność fotosyntetyczna roślin*, [w]: *Fizjologia roślin*, Kozłowska M.(Red), Państwowe Wyd. Rolnicze i Leśne, Warszawa 2007, s. 213-251.
2. Ciereszko I., Rychter A.M., *Zmiany metaboliczne w korzeniach wywołane deficytem fosforu*, *Wiadomości Botaniczne* 39 (1/2) 1995, s. 81-90.
3. Żebrowska E., Ciereszko I., *Pobieranie i transport fosforanów w komórkach roślin*, *Postępy Biologii Komórki* 34 (2) 2007, s. 283-298 .
4. Schachtman D.P., Reid R.J., Ayling S.M., *Phosphorus uptake by plants: from soil to cell.*, *Plant Physiology* 116 1998, s. 447-453.
5. Ciereszko I., *Czy można usprawnić pobieranie fosforanów przez rośliny?*, *Kosmos* 54 2005, s. 391-400.
6. Baca E., Skibniewska K., Baranowski K., Zakrzewski J., Słowik E., Meller D., Karaś M., Mielczar M., *Wpływ warunków technologicznych produkcji chleba pszennego na stopień rozkładu kwasów fitynowych*, *ŻYWNOSĆ Nauka Technologia Jakość* 16 (4), Kraków 2009, s. 122-132.
7. Kopcewicz J., Lewak S., *Fizjologia Roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2016.
8. Garska M., *Strukturalne podstawy reakcji świetlnych fotosyntezy*, *Postępy Biologii Komórki* 34, Warszawa 2007, s. 455-476.
9. Starck Z., *Gospodarka mineralna roślin*, [w:] *Fizjologia roślin*, Red. Kopcewicz J., Lewak S., Polskie Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 2002.
10. Sulkiewicz M., Ciereszko I., *Fluorescencja chlorofilu a – historia badań i zastosowanie w badaniach roślin*, *Kosmos* 65 (1), Warszawa 2016, s. 103-115.
11. Tukendorf A., *Niektóre funkcje karotenoidów w organizmach fotosyntetyzujących*, *Wiadomości Botaniczne* 3, Poznań 1979, s. 171-179.
12. Allakhverdiev S.I., *New Approaches to the Molecular, Cellular and Organismal Levels*, Wiley&Sons, New Jersey 2016.
13. Żebrowska E., Ciereszko I., *Odpowiedź roślin na niedobór fosforanów w podłożu*, [w:] *Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosystemu. Rośliny i grzyby w zmieniających się warunkach środowiska*, Ciereszko I, Bajguz A.(Red.), Polskie Towarzystwo Botaniczne

- Białystok, Agencja Wydawnicza EkoPress Białystok 2013, s. 83-96.
14. Carstensen A., Herdean A., Birkelund A., Schmidt A.S., Spetea C., Pribil M., Husted S., *The Impacts of Phosphorus Deficiency on the Photosynthetic Electron Transport Chain*, Plant Physiology 2018, s. 271-284.
  15. Szweykowska A., Szweykowski J., *Botanika*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1976.
  16. Gąsiorowski H., Kawka A., *Owies chemia i technologia*, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Poznań 1995.
  17. Zarzecka K., Gugąła M., Mystkowska I., Baranowska A., Sikorska A., Zarzecka M., *Odżywcze i prozdrowotne właściwości ziarna owsa i przetworów owsianych*, Kosmos 67 (2), Warszawa 2018, s. 409-414.
  18. Żebrowska E., Milewska M., Ciereszko I., *Mechanisms of oats (Avena sativa L.) acclimation to phosphate deficiency*, Peer J 5:e3989; DOI 10.7717/peerj.3989 2017.
  19. Oliwa J., Skoczowski A., *The high red/far-red ratio supports the acclimation of fern *Platycerium bifurcatum* to high light*, Biol.Fut 70, Budapeszt 2019, s. 185-197.
  20. Zbrzeźna M., *Aktywność aparatu fotosyntetycznego liści owsa zwyczajnego (Avena sativa L.) w warunkach zróżnicowanego żywienia fosforanowego*, Praca magisterska UwB, Białystok 2018.
  21. Nowicka B., Kruk J., *Reaktywne formy tlenu w roślinach – więcej niż trucizna*, Kosmos 4, Warszawa 2013, s. 583-596.
  22. Ciereszko I., *Wzrost i metabolizm roślin w warunkach deficytu fosforu*, Kosmos 49, Warszawa 2000, s. 179-189.
  23. Zarzecka K., Gugąła M., Mystkowska I., Baranowska A., Zarzecka M., Falkowska K., *Owies siewny – wartość odżywcza i prozdrowotna oraz wykorzystanie przemysłowe*, Medycyna rodzinna 4/15, Warszawa 2015, s. 182-185.

## **Wpływ deficytu fosforanów na aktywność aparatu fotosyntetycznego w liściach owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.)**

### Streszczenie

Fosfor jest jednym z głównych składników mineralnych, niezbędnych do prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin. Uczestniczy w regulacji wielu enzymatycznych reakcji, wpływa na przebieg fotosyntezy i oddychania, a także pełni funkcje zapasowe. W glebie występuje głównie w związkach niedostępnych roślinom. Jony fosforanowe w roztworze glebowym, określane jako Pi, są dostępne i pobierane przez korzenie, jednak ich stężenie jest niskie. Celem badań było określenie wpływu deficytu Pi na wzrost owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.) i aktywność fotosyntetyczną liści trzech odmian (Bingo, Elegant i Krezus) hodowanych na pożywkach płynnych: pożywce pełnej (+P, kontrola), bez fosforu (-P) i pożywce z fitynianem, jako organicznym źródłem fosforu (F). Po upływie 3 tygodni analizowano parametry wzrostowe: świeżą i suchą masę korzeni i źdźbła, oznaczano uwodnienie tkanek. Określano także względną zawartość chlorofilu, karotenoidów i flawonoidów, badano zmiany fluorescencji chlorofilu a oraz właściwości optyczne liści. Przy niedoborze Pi obserwowano zahamowanie wzrostu pędu, zmniejszenie masy i powierzchni liści oraz stymulację wzrostu korzenia u wszystkich odmian owsa. Przeprowadzone badania wskazały, że deficyt Pi wpływa negatywnie na funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego w liściach. Rośliny na pożywce F charakteryzowały się natomiast podobnym wzrostem do kontroli, wykazywały podobną zawartość barwników oraz zbliżoną do wariantu +P aktywność aparatu fotosyntetycznego w liściach.

Słowa kluczowe: deficyt, fosfor, owies, aparat fotosyntetyczny

## **Influence of phosphate deficit on the activity of photosynthetic apparatus in common oat leaves (*Avena sativa* L.)**

### Abstract

Phosphorus is one of the main minerals necessary for proper plant growth and development. It participates in the regulation of many enzymatic reactions, influences the intensity of photosynthesis and respiration, has a many other functions. In soil it occurs mainly in compounds not available to plants. Phosphate ions in the soil solution, referred to as  $P_i$ , are available and taken up by the roots, but their concentration is low. The aim of the study was to determine the effect of  $P_i$  deficit on the growth of common oats (*Avena sativa* L.) and the photosynthetic activity of the leaves of 3 cultivars (Bingo, Elegant and Krezus) cultured on liquid media: complete medium (+P, control), phosphorus-free medium (-P) and medium with phytate as an organic source of phosphorus (F). After 3 weeks, growth parameters were analyzed: fresh and dry mass of roots and stems, tissue hydration was determined. The relative content of chlorophyll, carotenoids and flavonoids was also determined. Changes in chlorophyll a fluorescence and optical properties of leaves were examined. In case of  $P_i$  deficiency, inhibition of shoot growth, decrease in leaf mass and surface and root growth stimulation were observed in all oat cultivars. The study showed that  $P_i$  deficiency negatively affects the functioning of photosynthetic apparatus in leaves. On the other hand, the plants on F medium were characterized by a similar growth to control, similar content of pigments and activity of photosynthetic apparatus in leaves similar to the control +P variant.

Keywords: deficit, phosphorus, oats, photosynthetic apparatus

## **Analiza wirulencji mączniaka prawdziwego wybranych zbóż w Polsce i na świecie**

### **1. Wprowadzenie**

Od początku istnienia rolnictwa zboża odgrywają kluczową rolę w żywieniu człowieka. Należą do nich pszenica (*Triticum aestivum* L.), jęczmień (*Hordeum vulgare* L.), jak również owies (*Avena sativa* L.). Zboża, tak jak inne rośliny, są wrażliwe na wiele chorób, które mogą istotnie obniżyć wysokość i jakość plonów. Mączniak prawdziwy jest jedną z groźniejszych chorób grzybowych występujących co roku z różnym nasileniem w rejonach uprawy zbóż na świecie. Powoduje straty w plonach, które w sprzyjających warunkach dla rozwoju choroby mogą wynosić nawet 40% [1-9]. Patogen *Blumeria graminis* (DC.) Speer powodujący mączniaka prawdziwego dzieli się na podgrupy, czyli tzw. formy specjalne (*formae specialis*), które wyspecjalizowały się w infekowaniu tylko danych gatunków zbóż spośród całej gamy gatunków roślin żywicielskich [10].

Odporność na mączniaka prawdziwego jest jednym z głównych czynników warunkujących wysokie plony. Stosowanie środków grzybobójczych oraz odpowiednie zabiegi agrotechniczne to główne metody zwalczania chorób grzybowych roślin. Jednak skuteczność agrotechniki w zwalczaniu patogenów zwłaszcza liściowych jest niewielka, a stosowanie fungicydów zwiększa koszty uprawy oraz prowadzi do wzrostu poziomu odporności patogenów na fungicydy. Aplikowanie fungicydów ulega również ograniczeniom ze względów ekologicznych [11].

Jeden z postulatów integrowanej ochrony roślin określony w załączniku III do dyrektywy 2009/128/WE zakłada, że stosowanie odmian odpornych na choroby jest jedną z metod pozwalających na ograniczanie i kontrolowanie występowania patogenów. Natomiast proces uzyskiwania genotypów odpornych powinien być poprzedzony dokładną charakterystyką populacji patogenu. Charakterystyka ta musi być oparta na analizie zmian wirulencji oraz ocenie zróżnicowania genetycznego [11]. Dane te umożliwiają wybór najbardziej efektywnych genów lub ich kombinacji przeciwko populacji w danym regionie. Uprawa odmian odpornych znacznie obniża nasilenie chorób, w tym mączniaka prawdziwego zbóż, oraz powoduje zwiększenie plonów średnio o 4-10% oraz poprawia stabilność plonowania [3].

Analizy frekwencji zjadliwości patogenu *Blumeria graminis* (DC.) Speer powodujących mączniaka prawdziwego zbóż przeważnie ocenia się na podstawie testów fitopatologicznych żywiciel-patogen, które opierają się na obserwacji wpływu zakażenia grzybem na badaną formę o nieznannej odporności i porównaniu tej reakcji z wpływem pojawiającym się na liniach o znanych genach odporności [12-16].

---

<sup>1</sup> magdalena.cieplak@up.lublin.pl, Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Wydział Agrobiotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie.

<sup>2</sup> sylwia.okon@up.lublin.pl Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Wydział Agrobiotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie.

## 2. Analiza wirulencji *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*

Chorobotwórczość patogenów powodujących mączniaka prawdziwego zbóż i traw została dokładnie opisana u jęczmienia i pszenicy [20-25]. Najwięcej prac do tej pory zostało poświęconych patogenowi *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. Jednym z pierwszych doniesień było to, w którym Gacek i in. (2004) analizowali populację tego patogenu w latach 1993-1996 na terenie Polski [24]. Zaobserwowali oni wzrost frekwencji wirulencji dla genu Mla6 oraz Mla7+k. W latach 1993-1994 liczebność izolatów zjadliwych dla tego genu klasyfikowała się na poziomie około 50%, w roku 1995 wzrosła o 10%, natomiast w ostatnim roku badań wzrosła do 90%. Dla dwóch izolatów *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* zmienność wyniosła 33% w stosunku do genu Mla6 oraz 28% dla Mla7+k. Zwiększenie frekwencji wirulencji notowała się również dla genu odporności Mla7+Ab. W tej sytuacji frekwencja wirulencji w dwóch pierwszych latach sięgnęła 15%, a w 1996 wzrosła do 50% [24] Czembor i in. (2004) stwierdzili spadek liczebności wirulentnych izolatów względem genu Mlg z 80% do 50% [11]. Obniżenie frekwencji wirulencji określili również względem genów Mla1 i Mla3. Ich liczebność wynosiła około 10%. Tylko jeden z izolatów Vo nie zdołał przełamać żadnego genu odporności i jego frekwencja utrzymała się na poziomie 0% [11].

Kolejna analiza chorobotwórczości mączniaka prawdziwego jęczmienia w warunkach Polski została przeprowadzona w latach 1999, 2000 oraz 2001 [3, 25, 26]. W porównaniu do poprzednich lat autorzy wykazali wysoki wzrost frekwencji wirulencji względem genu Ml(La). W roku 1999 wynosiła 98,7%, natomiast w kolejnych latach utrzymywała się na poziomie 100%. Podobnie zwiększyła się liczebność zjadliwych izolatów dla genu Mla7+Ab, gdzie w 1999 roku frekwencja wynosiła 94%, w 2000 roku była na poziomie 99,5%, a w 2001 roku osiągnęła 100%. W latach 1999, 2000, 2001, frekwencja wirulencji względem genu Mlo utrzymywała się na poziomie 0% przez wszystkie lata. Polscy naukowcy wskazali trzy izolaty o frekwencji wirulencji 0% względem genów: Mla23, Mlp, Mlo5, wartość ta utrzymywał się przez cały czas trwania badania [3, 25, 26]

Ocena frekwencji wirulencji *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* została również prowadzona w innych krajach takich jak: Australia, Republika Południowej Afryki, oraz na terenie Czech i Łotwy i Litwy oraz w Kazachstanie [18, 19, 21, 23, 27-31]. Dreiseitl i in. (2013) określili zjadliwość populacji mączniaka prawdziwego jęczmienia skolekcjonowanego na terenie sześciu stanów Australii w latach 2010 i 2011 roku [31]. Przedmiot badań stanowiło trzysta sześćdziesiąt dwa izolaty patogenu zebrane z osiemnastu lokalizacji oraz trzydzieści dwie linie referencyjne jęczmienia z różnymi genami odporności. Częstotliwość wirulencji wobec jedenastu genów była zróżnicowana i mieściła się w przedziale 14,5% do 96,6%. Dreiseitl i in. (2013) wykryli dwadzieścia siedem patotypów patogenu, z czego piętnaście w obu latach i stanowiły one 92,0% wszystkich badanych izolatów. Częstotliwość zjadliwości utrzymała się na poziomie 0% wobec szesnastu genów odporności (Mla1, Mla3, Mla6, Mla7, Mla9, Mla10, Mla12, Mla13, Mla23, MlaN81, Mlh, Ml(La), Mlp1, Ml(IM9), Ml(St), mlo). Australijska populacja była mało zróżnicowana, a jej chorobotwórczość nie zagrażała uprawom tego zboża, natomiast dostępność różnych źródeł odporności była łatwa [31]. Dreiseitl i Kolmer (2013) testowali na zestawie dwudziestu odmian z genami odporności dwieście dwadzieścia cztery izolaty *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*

pochodzących z Południowej Afryki [18]. Próbkę mączniaka pochodziły z ośmiu obszarów pól i gospodarstw zebranych w latach 2004-2007. W tym doświadczeniu autorzy stwierdzili, że frekwencja chorobotwórczości na poziomie 0% wystąpiła w stosunku do ośmiu genów (Mla3, Mla6, Mla7, Mla9, Mla13, Mla23, Mlp1 i MlaN81. Z kolei wszystkie analizowane izolaty charakteryzowały się zjadliwością w stosunku do genów Mla8 i Ml(Ch) [18].

Dreiseitl (2019) oceniał frekwencję wirulencji tego patogenu na terenie Środkowej Europy w latach 2015-2017, wykorzystując 309 izolatów oraz linie referencyjne z trzydziestoma dwoma zidentyfikowanymi genami odporności [32]. Kompleksowość izolatów mieściła się w przedziale od 5 do 17 i 18 genów. Dwieście dwadzieścia sześć izolatów było reprezentowanych przez dwieście dwadzieścia cztery patotypy. Największą frekwencją wynoszącą 56% odznaczały się izolaty, które przełamywały dziewięć genów odporności. Nastąpił stopniowy spadek częstotliwości wirulencji w stosunku do niektórych źródeł odporności, skutkujące zmniejszeniem średniej frekwencji zjadliwości z 11,30 w 2015 r. do 9,26 w 2017 r. Zdaniem Dreiseitl (2019) populacja mączniaka prawdziwego jęczmienia była bardzo zróżnicowana.

Zauważył również stałą frekwencję wirulencji (0%) dla pięciu genów odporności. [32]. Rashal i in. (2004) testowali izolaty zebrane z dwóch różnych części Łotwy w latach 1996-2002 [30]. Wykazali wysoką częstotliwość wirulencji genów Va6, Va7, Va9, Va2, Vk i VIa w obu częściach kraju. Przez wszystkie lata trwania obserwacji nie znaleźli izolatu wirulentnego dla genu Mlo. W latach 1996-2002 zaobserwowali znaczne zmiany częstotliwości wirulencji. Geny wirulencji Val, Va3 i Va3 pojawiły się tylko w środkowej części Łotwy z niskim poziomem częstotliwości, następnie ich częstotliwości wzrosła z 4-14% w 1996 r. do 33-53% w 2000 r. Około 2-3 lata później te geny wirulencji pojawiły się w południowo-wschodniej części Łotwy. Rashal i in. (2004). stwierdzili znaczny wzrost częstotliwości wirulencji genów Val, Va3 i Va3 w latach 2001-2002. Z kolei częstotliwości wirulencji w stosunku do genów Mla1, Mla3 i Mla13 osiągnęły 23-30% [30]. Kokina i in. (2014) wykorzystali osiem izolatów litewskich populacji Bgh, do testowania czternastu odmian jęczmienia z pojedynczymi genami odporności lub w kombinacjach [19]. Geny Mla1, Mla3 i Mla13 straciły swoją skuteczność na terenie Litwy. Autorzy odnotowali wysokie częstotliwości genów wirulencji Va6, Va7, Va8, Va9, Va12, Vk i VIa litewskiej populacji patogenu skierowane przeciwko genom Mla6, Mla7, Mla8, Mla9, Mla12, Mlk oraz Mlla. Jak również zaobserwowali wzrost kompleksowości populacji *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* w 2010 r. w porównaniu z 2000 r. W 2010 r. nie wykryli patotypu przełamującego odporność warunkowaną genami mlo oraz Ml(SI) [19]. Rsaliev i in. (2017) badali sto siedem izolatów Bgh uzyskanych z siedmiu populacji występujących na polach uprawnych jęczmienia w dwóch lokalizacjach w Kazachstanie w latach 2015 i 2016 [21]. Frekwencję wirulencji izolatów oceniali na siedemnastu liniach jęczmienia ze znanymi genami odporności. Wszystkie izolaty okazały się wirulentne wobec genu Mla8 i awirulentne dla ośmiu genów odporności Mla9, Mla1 + MlaA12, Mla6 + Mla14, Mla13 + MlRu3, Mla7 + MlNo3, Mla10 + MlDu2, Mla13 + MlRu3 i Mlo-5. Częstotliwości izolatów przełamujących odporność Mla3, Mla22, Mla1 + MlG + MICP i Mla12 + MlEm<sup>2</sup> wyniosły 0,0-33,33%, a częstości izolatów pokonujących geny Mlra, Mlk, MlLa i Mlh wyniosły od 10,0 do 78,6%. Na podstawie reakcji linii

różnicowych posiadających geny Mla22, Mlra, Mlk, Mlat, MILa i Mlh. Rsaliyiev i in. 2017 zidentyfikowali dwadzieścia trzy patotypy o kompleksowości wirulencji od 1 do 6. Przez oba lata trwania obserwacji we wszystkich populacjach regionu południowego Kazachstanu i Zhambyl przeważały głównie patotypy 24 i 64 [21].

### 3. Częstotliwość zjadliwości *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*

Mączniak prawdziwy zbóż i traw jest również groźną chorobą dla pszenicy. Obserwacje zmian wirulencji populacji tego patogenu przeprowadzono w wielu krajach takich jak: Stany Zjednoczone, Chiny, Maroko, Polska [4, 6, 20, 32, 33]. Czajkowski i Czembor (2017) testowali 656 izolatów Bgt pochodzących z siedmiu województw zebranych w latach 2008-2011 na zestawie linii pszenicy i pszenżyta z różnymi genami odporności [4]. Wykazali, że frekwencja wirulencji w stosunku do genu odporności pszenicy Pm21 klasyfikuje się na poziomie 0%. Niską frekwencję chorobotwórczości opisali dla izolatów w stosunku do genów Pm29. Wirulencję sięgającą 94% określili względem genu Pm2, Pm8 oraz dla kombinacji genów Pm4b+5, Pm4b+6, Pm4b+8, Pm5+8 [4]. Pietrusińska i Czembor (2015) w latach 2012-2013 analizowali pięćdziesiąt izolatów tego patogenu pochodzące z czterech lokalizacji różnych części Polski [35]. na zestawie dwudziestu ośmiu odmianach i liniach o znanych genach odporności. Wszystkie izolaty były awirulentne w stosunku do genów odporności Pm21, Pm36 oraz Pm37. W stosunku do genu Pm29 wirulentny był tylko jeden izolat, a w stosunku do kombinacji genów Pm1+2+4b+9 zjadliwe były tylko dwa izolaty. Udział izolatów wirulentnych w stosunku do kombinacji genów Pm3d+4b, Pm1 nie przekraczał 20% natomiast udział izolatów zjadliwych w stosunku do 19 pozostałych genów lub ich kombinacji przekraczał 30%. Wysokie frekwencje wirulencji dla genów Pm4, Pm3 oraz Pm7 powyżej 80% pokrywały się z pracą Czajkowskiego i Czembora (2017), ponadto 100% frekwencją chorobotwórczości charakteryzowały się geny Pm6, Pm8 oraz kombinacja genów Pm5+Pm8 [4, 35].

Czescy naukowcy Švec i Miklovičová (1998) w latach 1993-1996 badali zjadliwość lokalnych populacji patogenu mączniaka prawdziwego pszenicy na terenie Czech, Austrii, Węgier i Słowacji wobec odmian i linii z trzynastoma zidentyfikowanymi genami odporności [27]. Populacje różniły się przede wszystkim na poziomie regionalnym. Populacje z Czech, głównie z regionów zachodnich, wykazywały wyższe wartości zjadliwości wobec genu Pm4b. Niższą częstotliwość wirulencji przeciwko temu genowi stwierdzono w Austrii, a najniższą wartość zaobserwowano na Węgrzech. Różnice w częstotliwości wirulencji przeciwko Pm4a i Pm4b wykazały podobny wzorzec geograficzny, w czterech krajach: ciągły spadek z zachodu na wschód i z północy na południe. Wirulencja przeciwko Pm2 spadła we wszystkich krajach; wirulencja do Pm5, Pm6, Pm8 i Ml i była wysoka przez cały czas trwania obserwacji. Genami i kombinacjami genów, które mogły zapewnić względnie skuteczną ochronę biologiczną przed tym patogenem w całej Europie Środkowej były Pm3b, Pm2 + Mld i Pm1 + 2 + 9. Kompleksowość wirulencji osiągnęła maksimum na Słowacji i w Czechach w 1994 r. Złożoność populacji mączniaka prawdziwego w Europie Środkowej osiągnęła pośredni poziom reprezentujący optymalną liczbę genów wirulencji [27].

Publikacje na temat frekwencji wirulencji populacji mączniaka prawdziwego pszenicy pochodzące z Chin opisane zostały przez Zeng i in. oraz Liu i in. [6, 36].



Zeng i in. (2014) analizowali tysiąc osiemdziesiąt dwa izolaty pochodzące z upraw pszenicy z ośmiu regionów Chin [6]. Testy fitopatologiczne przeprowadzili na zestawie dwudziestu dwóch linii referencyjnych z różnymi genami odporności. Frekwencja wirulencji wynosiła od 0 do 97,4%. Żaden z 1 082 izolatów nie przełamał odporności warunkowanej genem Pm21, a mniej niż 20,0% było wirulentnych wobec genotypu niosącego Pm13. W przeciwieństwie do tego, częstości zjadliwości każdej populacji notowała się na poziomie ponad 50,0% wobec Pm1a, Pm3b, Pm3c, Pm3f, Pm5a, Pm6 i Pm8. Zeng i in. (2014) wykryli tysiąc dwadzieścia osiem patotypów, tym samym wykazali wysoki poziom różnorodności populacji Bgt na terenie Chin [6]. Liu i in. (2015) testowali sto dziewięć jednozarodnikowych izolatów pochodzących z czterdziestu lokalizacji prowincji Sichuan [36]. Częstotliwość wirulencji była mniejsza niż 20% w stosunku do czterech genów: Pm13, Pm5b, Pm2 + 6 i PmXBD, natomiast większa niż 60% dla genów Pm1, Pm2, Pm3a, Pm3b, Pm3d, Pm3e, Pm3f, Pm4a, Pm4b, Pm5, Pm6, Pm7, Pm9 i Pm19. Pozostałe geny warunkowały pośrednią odporność przy częstotliwościach wirulencji między 20% a 60% [36]. Oba chińskie doświadczenia wykazały częstotliwość zjadliwości na poziomie 0% tylko względem jednego genu Pm21. Zeng i in. (2014) stwierdzili, że aby otrzymać odmiany o skutecznej odporności należy je opracować indywidualnie do regionu uprawy zboża [6]. Badania Liu i in. 2015 i Zeng i in. 2014 potwierdziły, że frekwencja wirulencji jest zróżnicowana względem położenia geograficznego [6, 36].

Imani i in. (2002) testowali izolaty pochodzące z trzech regionów Maroka wykorzystując linie referencyjne pszenicy z trzynastoma różnymi genami odporności [33]. Zaobserwowali wysokie częstotliwości wirulencji w stosunku do genów Pm1, Pm3c, Pm3f, Pm4a, Pm5 i Pm7 w obu latach i we wszystkich regionach. Częstotliwości zjadliwości dla Pm17 i Pm2 osiągnęły średni poziom, podczas gdy częstości zjadliwości dla Pm3a, Pm3b, Pm3d i Pm4b były niskie. Frekwencja wirulencji wobec Pm8 wzrosła, natomiast w przypadku Pm4a zmniejszyła się w na przełomie 1999-2000 roku. Marokańska populacja tego patogenu składa się ze złożonych i bardzo zmiennych patotypów (87% izolatów przełamało pięć lub więcej genów odporności). Populacja *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* była zróżnicowana, a uzyskane wyniki Imani i in. 2002 na temat liczebności zjadliwości we wszystkich analizowanych latach nie były jednoznaczne [33]. Niewoehner i Leath (1998) oceniali populację mączniaka prawdziwego pszenicy pochodzącego z siedemnastu stanów Zachodniej części Stanów Zjednoczonych na zestawie piętnastu linii referencyjnych z różnymi genami odporności na Bgt [34]. Izolaty wirulentne do Pm3c, Pm3f, Pm5, Pm6 i Pm7 były obecne we wszystkich stanach. Od 1990 r. frekwencja wirulencji do Pm3a wzrosła na północnym wschodzie, a w stosunku do Pm1, Pm4b, Pm8 i Pm17 wzrosła na całym badanym obszarze. Geny oporności Pm12 i Pm16 pozostały wysoce skuteczne w południowo-wschodnich Stanach Zjednoczonych i wykazywały najniższą częstotliwość wirulencji. Autorzy zauważyli ogólny wzrost frekwencji wirulencji amerykańskiej populacji patogenu oraz kompleksowości izolatów [34].

#### 4. Analiza wirulencji *Blumeria graminis* f.sp. *aveae*

W przypadku populacji *Blumeria graminis* f.sp. *avenae* dostępna jest tylko jedna publikacja naukowa poruszająca zmianę wirulencji tego patogenu. Doświadczenie to zostało wykonane przez Okoń i Ociepa 2017. Autorzy prowadzili obserwacje w latach

2010-2013 na terenie Polski. Materiał badawczy stanowiły jednozarodnikowe izolaty pochodzące z trzech miejscowości (Choryń, Strzelce, Czesławice) oraz siedem linii i odmianach owsa zawierające różne geny odporności oraz odmiana wrażliwa. Frekwencja wirulencji klasyfikowała się na wysokim poziomie we wszystkich latach w stosunku do genów Pm1, Pm3, Pm6. W roku 2010 częstotliwość w stosunku do genu Pm1 wynosiła 100%, w kolejnych latach wartości te malały o 5%. Okoń i Ociepa 2017 odnotowali wysoką frekwencję chorobotwórczości względem genu Pm3, która wynosiła w 2010 roku 100%, a w każdym kolejnym ponad 90%. Frekwencja wirulencji wobec genu Pm6 była wysoka we wszystkich latach trwania doświadczenia Autorzy ustalili 100% frekwencji wirulencji wobec tego źródła odporności w 2010 r., natomiast w kolejnym roku 20% spadku, w 2012 wzrost o 10%, a w ostatnim liczebność chorobotwórczości klasyfikowała się na poziomie 85%. Najlepszymi źródłami odporności okazały się geny Pm4 i Pm7, ponieważ wszystkie izolaty były awirulente wobec nich [37].

Okoń i Ociepa 2017 określili również kompleksowości, która jest ważnym parametrem do charakteryzacji populacji patogenu. Wykorzystane izolaty *Blumeria graminis* f.sp *avenae* przełamywały głównie trzy z siedmiu genów odporności. Najczęściej przełamanymi odpornościami była odporność warunkowana genami: Pm1, Pm3, Pm6. Spośród testowanych izolatów w 2010 roku ponad 90% z nich przełamywało odporność związaną z tymi genami. W kolejnych latach liczba analizowanych izolatów klasyfikowała się na poziomie 70-80%. Izolaty z 2010 roku przełamały odporność od trzech do czterech genów. W 2011 i 2012 roku izolaty były wirulentne wobec jednego, dwóch, trzech i czterech genów odporności. Natomiast izolaty z 2013 roku okazały się zjadliwe minimalnie od jednego do maksymalnie czterech genów. Liczba izolatów przełamujących odporność jednego, dwóch czy czterech genów nie przekraczała 20%. Liczebność wirulentnych izolatów również nie przekraczała 20%, oprócz zjadliwości w stosunku do czterech genów odporności. Autorzy stwierdzili, że żaden z izolatów nie przełamywał odporności wszystkich pięciu i sześciu genów [37].

Na podstawie modelu porażenia poszczególnych linii kontrolnych przez badane izolaty mączniaka prawdziwego Okoń i Ociepa wskazali patotypy za pomocą kodu opracowanego przez Gilmour 1973, zidentyfikowali łącznie siedem raz fizjologicznych [37, 38]. Najczęściej występującym był 700, który reprezentowany był przez ok. 80% wykorzystanych izolatów mączniaka prawdziwego. W roku 2010 zaobserwowali dwie rasy fizjologiczne Bga, w 2011 pięć, natomiast w 2012 i 2013 wykryto po sześć. Zróżnicowanie izolatów było bardzo niskie ze względu na niewielką ilość badanych form kontrolnych oraz ze względu na fakt, że niemal wszystkie izolaty były wirulentne wobec genów Pm1, Pm3 i Pm6. Jednakże zauważyć można wzrost zróżnicowania populacji w kolejnych latach. Zróżnicowanie populacji mączniaka prawdziwego na terenie kraju w latach 2010-2011 było niewielkie, ale zaobserwować można wzrost poziomu wirulencji w odniesieniu do opisanych do tej pory genów odporności. Zmiany te są jednak na tyle powolne, że można przypuszczać, iż w najbliższych latach nie pojawią się na terenie kraju patotypy, które zdolne będą całkowicie przełamać odporność warunkowaną genami Pm4, Pm5 i Pm7 [37].

## 5. Podsumowanie

Badanie wirulencji i szybkości zmian zjadliwości populacji patogenów pozwala na lepsze planowanie strategii ochrony upraw zbóż i innych roślin poprzez kontrolowanie i ograniczanie występowania czynników infekcyjnych. Dzięki tym analizom możliwe jest wykorzystanie dostępnych źródeł odporności, jak również wybór tych dających trwałą odporność w czasie i w różnych regionach geograficznych. Systematyczne badania struktury populacji i frekwencji wirulencji na danym obszarze zapewni możliwość monitorowania efektywności genów odporności. Ponadto dzięki takim badaniom możemy sprawdzać jak szybko ewoluuje dana populacja patogenu na danym obszarze. Ocena wirulencji patogenu pozwala na określenie dynamiki zmian zachodzących w populacji związanych z możliwością przełamania odporności warunkowanej genami dominującymi. Ważna jest również standaryzacja i ujednolicenie metodyki badania struktury populacji patogenu oraz zmian wirulencji warunkująca możliwość porównywania wyników badań prowadzonych w różnych częściach świata.

### Literatura:

1. Karska K., Strzembicka A., Czajowski G., Czembor P., *Wirulencja populacji Puccinia striiformis sprawcy rdzy żółtej na pszenżycie w Polsce*, Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, 269, 2013, s. 21-8.
2. Czembor H.J., Domeradzka O., Czembor J.H., Mańkowski D.R., *Virulence Structure of the Powdery Mildew (Blumeria graminis) Population Occurring on Triticale (x Triticosecale) in Poland*, Journal of Phytopathology, 162, 2014, 7-8, s. 499-512.
3. Czembor J.H., Czembor H.J., *Chorobotwórczość mączniaka prawdziwego jęczmienia (Blumeria graminis f. sp. hordei) w Polsce w roku 2000*, Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, 2, 2004, 233, s. 107-115.
4. Czajowski G., Czembor P., *Pathogenicity of Blumeria graminis f. sp. tritici and Blumeria graminis f. sp. triticales the causal agents of wheat and triticale powdery mildew*, Progress in Plant Protection, 56, 2016, 3, s. 360-365, <http://doi: 10.14199/ppp-2016-058>.
5. Parks R., Carbone I., Murphy J.P., Marshall D., Cowger C., *Virulence structure of the eastern U.S. wheat powdery mildew population*, Plant Disease, 92, 2008, 7, s. 1074-1082.
6. Zeng F.S., Yang L.J., Gong S.J., Shi W.Q., Zhang X.J., Wang H., *Virulence and diversity of Blumeria graminis f. sp. tritici populations in China*, Journal of Integrated Agriculture, 13, 2014, 11, s. 2424-2437, [http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60669-3](http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60669-3).
7. Klocke B., Flath K., Miedaner T., *Virulence phenotypes in powdery mildew (Blumeria graminis) populations and resistance genes in triticale (x Triticosecale)*, European Journal of Plant Pathology, 137, 2013, 3, s. 463-476.
8. Mwale V.M., Chilembwe E.H.C., Uluko H.C., *Wheat powdery mildew (Blumeria graminis f. sp. tritici): Damage effects and genetic resistance developed in wheat (Triticum aestivum)*, International Research Journal of Plant Science, 5, 2014, 1, s. 1-16, <https://www.interestjournals.org/abstract/wheat-powdery-mildew-blumeria-graminis-f-sp-tritici-rndamage-effects-and-genetic-resistance-developed-in-rnwheat-triticum--1030.html>, [dostęp online 01.03.2020].
9. Oerke E.-C., Dehne H.-W., Schoenbeck F., Weber A., *Crop production and crop protection: estimated losses in major food and cash crops*, Amsterdam (Netherlands) Elsevier, 1994, 51, 4, s. 493-495.
10. Dean R., Van Kan J.A.L., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., Di Pietro A., Spanu P.D., *The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology*, Molecular Plant Pathology, 13, 2012, 4, s. 414-430.
11. Czembor J.H., Czembor H.J., *Chorobotwórczość mączniaka prawdziwego jęczmienia (Blumeria graminis f. sp. hordei) w Polsce w roku 2000*, Biuletyn Instytutu Hodowli

- i Aklimatyzacji Roślin, 2, 2004, 233, s. 107-115.
12. Czembor J.H., Pietrusińska A., Piechota U., Smolińska K., *Wykorzystanie w hodowli jęczmienia źródeł odporności na mączniaka prawdziwego i rdzę karłową*, Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, 283, 2017, s. 87-88.
  13. Hsam S.L.K., Paderina E.V., Gordei S., Zeller F.J., *Genetic studies of powdery mildew resistance in cultivated oat (Avena sativa L.). II. Cultivars and breeding lines grown in Northern and Eastern Europe*, Hereditas, 129, 1998, 3, s. 27-30.
  14. Hsam S.L.K., Peters N., Paderina E.V., Felsenstein F., Oppitz K., Zeller F.J., *Genetic studies of powdery mildew resistance in common oat (avena sativa L.) I. Cultivars and breeding lines grown in Western Europe and North America*, Euphytica, 96, 1997, 3, s. 421-427, <https://doi.org/10.1023/A:1003057505151>.
  15. Okoń S., Kowalczyk K., *Deriving isolates of powdery mildew (Blumeria graminis DC. f.sp. avenae Em. Marchal.) in common oat (Avena sativa L.) and using them to identify selected resistance genes*, Acta Agrobotanica, 65, 2012, 2, s. 155-160.
  16. Okoń S., Ociepa T., Nucza A., *Molecular identification of Pm4 powdery mildew resistant gene in oat*, Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 46, 2018, 2, s. 350-355.
  17. Yu J., Herrmann M., *Inheritance and mapping of a powdery mildew resistance gene introgressed from Avena macrostachya in cultivated oat*, Theoretical and Applied Genetics, 113, 2006, s. 429-437.
  18. Dreiseitl A., Kosman E., *Virulence phenotypes of Blumeria graminis f. sp. hordei in South Africa*, European Journal of Plant Pathology, 136, 2013, 1, s. 113-121.
  19. Kokina I., Statkeviciute G., Leistrumaite A., Rashal I., *The peculiarities of genetic structure of the Blumeria graminis f. sp. hordei population in Lithuania*, Zemdirbyste, 101, 2014, 4, s. 419-424.
  20. Liu N., Lewis Liu Z., Gong G., Zhang M., Wang X., Zhou Y., *Virulence structure of Blumeria graminis f. Sp. Tritici and its genetic diversity by ISSR and SRAP profiling analyses*, PLoS One, 10(6), 2015.
  21. Rsaliyev A., Pahratdinova Z., Rsaliyev S., *Characterizing the pathotype structure of barley powdery mildew and effectiveness of resistance genes to this pathogen in Kazakhstan*, BMC Plant Biology, 17, 2017.
  22. Abdelrhim A., Abd-Alla H.M., Abdou ES., Ismail M.E., Cowger C., *Virulence of egyptian Blumeria graminis f. Sp. tritici population and response of egyptian wheat cultivars*, Plant Disease, 102, 2018, 2, s. 391-397.
  23. Komínková E., Dreiseitl A., Malečková E., Doležel J., Valárik M., *Genetic Diversity of Blumeria graminis f. sp. hordei in Central Europe and Its Comparison with Australian Population*, PLoS One, 11(11), 2016, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27875588>.
  24. Gacek E., Biliński Z., Czembor H.J., Czembor H.J., *Chorobotwórczość mączniaka prawdziwego jęczmienia (Blumeria graminis f. sp. hordei) w Polsce w latach 1993-1996*, Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, 231, 2004, s. 365-376.
  25. Czembor H., Czembor J., *Pathogenicity of barley powdery mildew (Blumeria graminis f. sp. hordei) in Poland in 2001 – Chorobotwórczość mączniaka prawdziwego jęczmienia (Blumeria graminis f. sp. hordei) w Polsce w roku 2001*, Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, 9, 2005, 236, s. 183-192.
  26. Czembor J.H., Pietrusińska A., *Struktura wirulencji populacji Blumeria graminis f. sp. tritici występującej na terenie Polski w latach 2012-2013*, Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, 274, 2014, s. 15-26.
  27. Švec M., Miklovičová M., *Structure of populations of wheat powdery mildew (Erysiphe graminis DC f.sp. tritici Marchal) in central Europe in 1993-1996: I. Dynamics of virulence*, European Journal Plant Pathology, 104, 1998, 6, s. 537-44.
  28. Kolmer J.A., *Molecular polymorphism and virulence phenotypes of the wheat leaf rust fungus Puccinia triticina in Canada*, Canadian Journal of Botany, 79, 2001, 8, s. 917-926.
  29. Sajid A., *Population biology and invasion history of puccinia striiformis f.sp tritici at worldwide and local scale*, Université Paris Sud, 11(2), 2012.

30. Rashall I., Kokina I., Araja I., *Trends of the changes of the virulence genes frequencies in the latvian populations Blumeria graminis f.sp. hordei*, Latvian Journal of Agronomy, 2004;(7), s. 79-83.
31. Dreiseitl A., Fowler R.A., Platz G.J., *Pathogenicity of Blumeria graminis f. sp. hordei in Australia in 2010 and 2011*, Australas Plant Pathology, 42, 2013, 6, s. 713-721, <https://doi.org/10.1007/s13313-013-0227-x>.
32. Dreiseitl A., *Great pathotype diversity and reduced virulence complexity in a Central European population of Blumeria graminis f. sp. hordei in 2015-2017*, European Journal of Plant Pathology, 153, 2019, 3, s. 801-811. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1593-6>.
33. Imani Y., Ouassou A., Griffey C.A., *Virulence of Blumeria graminis f. sp. tritici populations in Morocco*, Plant Disease, 85, 2002, 4, s. 383-8.
34. Niewoehner A.S., Leath S., *Virulence of Blumeria graminis f. sp. tritici on winter wheat in the Eastern United States*, Plant Disease, 82, 1998, 1, s. 64-68.
35. Pietrusińska A., Czembor J.H., *Piramidyzacja genów — powszechne narzędzie używane w programach hodowlanych*, Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, 278, 2015, s. 3-16.
36. Liu N., Lewis Liu Z., Gong G., Zhang M., Wang X., Zhou Y., *Virulence structure of Blumeria graminis f. Sp. Tritici and its genetic diversity by ISSR and SRAP profiling analyses*, PLoS One, 10(6), 2015, <https://doi:10.1371/journal.pone.0130881>.
37. Okoń S.M., Ociepa T., *Virulence structure of the Blumeria graminis DC.f. sp. avenae populations occurring in Poland across 2010-2013*, European Journal of Plant Pathology, 149, 2017, 3, s. 711-8.
38. Gilmour J., *Octal Notation for Designating Physiologic Races of Plant Pathogens*, Nature, 242, 1973, s. 620, <https://doi.org/10.1038/242620a0>.

## **Analiza wirulencji mączniaka prawdziwego wybranych zbóż w Polsce i na świecie**

### Streszczenie

Zboża, do których należą pszenica, jęczmień i owies są wrażliwe na wiele chorób. Jedną z najgroźniejszych infekcji grzybowych jest choroba o nazwie mączniak prawdziwy. Powoduje ona znaczne straty plonów, które mogą wynosić nawet 40% oraz znacząco obniża ich jakość. Patogen *Blumeria graminis* (DC.) Speer powodujący mączniak prawdziwego dzieli się na podgrupy, czyli tzw. formy specjalne, które wyspecjalizowały się w porażaniu tylko określonych gatunków zbóż. Zgodnie z polityką integrowanej ochrony roślin stosowanie odmian odpornych na choroby jest jedną z metod pozwalających na ograniczanie i kontrolowanie występowania patogenów. Proces uzyskiwania genotypów odpornych powinien być poprzedzony szczegółową charakterystyką populacji patogenu. Charakterystyka ta musi być oparta na analizie zmian wirulencji oraz ocenie zróżnicowania genetycznego. Dane te umożliwiają wybór najbardziej efektywnych genów lub ich kombinacji przeciwko populacji w danym regionie. Analizy frekwencji wirulencji patogenów zbóż przeważnie określa się na podstawie testów fitopatologicznych żywiciel-patogen. Celem tej pracy jest przegląd badań nad wirulencją patogenu *Blumeria graminis* (DC.) Speer wywołującego mączniak prawdziwego w jęczmieniu, pszenicy i w owsie na terenie Polski i w innych krajach na świecie

Słowa kluczowe: *Blumeria graminis* (DC.) Speer, mączniak prawdziwy, wirulencja, zboża, patogen

## **The analysis of virulence of powdery mildew in cereals occurring in Poland and in the world**

### Abstract

Cereals such as wheat, barley, and oats are sensitive to many different diseases. One of the most important fungal infections is powdery mildew. It causes significant yield losses, which can be as high as 40%, and reduces crop quality. The pathogen *Blumeria graminis* (DC.) Speer causing powdery mildew is divided into subgroups (*formae specialis*), which have specialized infecting only specific cereal species from the whole range of host plant species. According to the policy of integrated plant protection, the use of disease-resistant cultivars is one of the methods that allow for the reduction and control of pathogens. However, the process of obtaining resistant genotypes should be preceded by the precise characteristics of the pathogen population. This characterization must be based on an analysis of virulence changes and an assessment of genetic diversity. These data enable the selection of the most effective genes or combinations of genes against the population in a given region. The analyses of the frequency of virulence of cereal pathogens are usually determined on the basis of tests of the host-pathogen. The aim of the study was to present the virulence research of *Blumeria graminis* (DC.) Speer causing powdery mildew in barley, wheat and oats in Poland and in other countries in the world.)

Keywords: *Blumeria graminis* (DC.) Speer, powdery mildew, virulence, cereals, pathogen

## Właściwości lecznicze roślin z rodzaju *Plantago* L.

### 1. Wprowadzenie

Rodzaj *Plantago* L. obejmuje około 160 gatunków. Oprócz powszechnie znanej babki lancetowatej, do leczniczych taksonów z tego rodzaju należą: *P. major* L., *P. media* L., *P. arenaria* L., *P. psyllium* L., *P. asiatica*. Gatunki z rodzaju *Plantago* L., od wieków są uważane za cenne rośliny lecznicze ze względu na swoje właściwości prozdrowotne. Wykazują działanie ściągające, przeciwbakteryjne, przeciwzapalne, antyhistaminowe, a także wykrztuśne i diuretyczne. Wiele z nich to gatunki wieloletnie. Ostatnio obserwuje się kurczenie naturalnych zasobów babki lancetowatej, głównie z powodu stosowania herbicydów. W wielu krajach babka ta jest powszechnie uprawiana. Opracowana została również technika mikrorozmnażania *in vitro*, poprzez organogenezę bezpośrednią i pośrednią, z zastosowaniem kultur różnych eksplantatów. Korzysta się też z gotowych merystemów, prowadząc kultury wierzchołków siewek. Praca omawia najbardziej popularne gatunki tego rodzaju a mianowicie: *P. lanceolata* L., *Plantago media* L., *Plantago major* L. [1-10].

Celem niniejszej pracy jest popularyzacja wiedzy na temat roślin z rodzaju *Plantago* L.

### 2. Występowanie roślin z rodzaju *Plantago* L.

#### 2.1. *Plantago major* L.

Gatunek ten należy do rodziny *Plantaginaceae* inaczej babkowatych. Babka większa jest rośliną bardzo pospolitą jej macierzystym obszarem występowania są tereny Europy i Azji. Gatunek ten został z Europy przeniesiony na tereny m.in. Ameryki Północnej. Roślina ta jest rozpowszechniona na obszarze całej Polski. *Plantago major* L. jest uznawana za powszechny ruderalny chwast, który można zaobserwować m.in. na: pastwiskach, suchych łąkach, poboczach dróg, odłogach czy w miejscach cyklicznie wydeptywanych przez przechodniów. *Plantago major* L. nie jest rośliną wybredną, jeśli chodzi o żyzność gleb, ponieważ jest w stanie dostosować się do panujących warunków środowiskowych. Natomiast gatunek ten wykazuje preferencje do gleb wilgotnych (tab. 1) [2, 3, 51].

Tabela 1. Charakterystyka wskaźnikowa występowania *Plantago major* L. [51]

Charakterystyka wskaźnikowa występowania <i>Plantago major</i> L.	
liczebność stanowisk	gatunek pospolity
tendencje dynamiczne	obserwuje się duży wzrost liczebności

<sup>1</sup> zuzialyszcz@gmail.com, Katedra Roślin Warzywnych i Leczniczych, Wydział Ogrodnictwa i Biotechnologii Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

<sup>2</sup> andzelika\_drutowska@sggw.pl, Katedra Roślin Warzywnych i Leczniczych, Wydział Ogrodnictwa i Biotechnologii Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

<sup>3</sup> ewa\_osinska@sggw.pl, Katedra Roślin Warzywnych i Leczniczych, Wydział Ogrodnictwa i Biotechnologii Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

forma życiowa	autotrof, hemikryptofit
wskaźnik świetlny	pełne światło
wskaźnik kontynentalizmu	gatunek neutralny
wskaźnik wilgotności	świeża lub wilgotna
wskaźnik trofizmu	zasobna lub bardzo zasobna
wskaźnik kwasowości	obojętna
wskaźnik granulometryczny	piasek lub gliny piaszczyste i utwory pylaste lub gliny ciężkie i ility
wskaźnik zawartości materii organicznej	gleba mineralno-próchnicza lub gleba bogata w materię organiczną, organogeniczną

## 2.2. *Plantago media* L.

Gatunek tak ja poprzedni wywodzi się z rodziny *Plantaginaceae* czyli babkowatych. Obszar występowania dla tego gatunku obejmuje Azję (od Syberii poprzez Chiny i środkową Azję do Zachodniej Azji) oraz praktycznie prawie całą Europę, *Plantago media* L. jest gatunkiem zawleczonym, który rozprzestrzenił się na wielu rejonach świata. W Polsce jest gatunkiem występującym powszechnie (tab. 2) [2, 3, 7, 51].

Tabela 2. Charakterystyka wskaźnikowa występowania *Plantago media* L. [51]

Charakterystyka wskaźnikowa występowania <i>Plantago media</i> L.	
liczebność stanowisk	gatunek pospolity
tendencje dynamiczne	wzrasta
forma życiowa	autotrof, hemikryptofit
wskaźnik świetlny	umiarkowane światło
wskaźnik kontynentalizmu	gatunek neutralny
wskaźnik wilgotności gleby	sucha <i>lub</i> świeża
wskaźnik trofizmu	uboga <i>lub</i> zasobna
wskaźnik kwasowości	obojętna <i>lub</i> zasadowa
wskaźnik granulometryczny	gliny piaszczyste i utwory pylaste
wskaźnik zawartości materii organicznej	gleba mineralno-próchnicza

## 2.3. *Plantago lanceolata* L.

Bylina należąca do rodziny babkowatych (*Plantaginaceae*). Występuje niemal w całej Europie, w Afryce północnej oraz w Azji zachodniej. Tak jak poprzednie dwa gatunki ten również został zawleczony, po czym rozprzestrzenił się w Ameryce Północnej, Środkowej i Południowej, na Hawajach, w Australii i na Madagaskarze.



Gatunek ten cechuje duża zmienność przystosowawcza. *Plantago lanceolata L.* potrafi przystosować się do różnych warunków. W Polsce jest to gatunek pospolity (tab. 3) [2, 3, 7, 51].

Tabela 3. Charakterystyka wskaźnikowa występowania *Plantago lanceolata L.* [51]

Charakterystyka wskaźnikowa występowania <i>Plantago lanceolata L.</i>	
liczebność stanowisk	gatunek pospolity
tendencje dynamiczne	obserwuje się wzrost liczebności
forma życiowa	autotrof, hemikryptofit
wskaźnik świetlny	umiarkowane światło
wskaźnik kontynentalizmu	gatunek neutralny
wskaźnik wilgotności gleby	sucha <i>lub</i> świeża <i>lub</i> wilgotna
wskaźnik trofizmu	umiarkowanie uboga <i>lub</i> zasobna
wskaźnik kwasowości	obojętna
wskaźnik granulometryczny	gliny piaszczyste i utwory pylaste
wskaźnik zawartości materii organicznej	gleba bogata w materię organiczną, organogeniczną

### 3. Morfologia

#### 3.1. *Plantago major L.*

Babka zwyczajna jest niewysoką byliną osiąga wysokość w przedziale od 5 do 30 cm jest zmienna w zależności do gleby. Łodyga jest silnie skrócona, przez co mamy efekt przyziemnej różyczki.

Prosto wzniesione, bezlistne, obłe i skąpo owłosione nierozgałęzione pędy wyrastają z pachwin liści. Liście są całobrzegie lub skąpo ząbkowane, z równoległymi nerwami u nasady zaokrąglone lub sercowate. Kwiaty są zebrane w szczytowe, walcowate kłosa, które długość mają równą bądź większą długości szypuły. Pojedyncze żółtawozielone kwiaty w kłosie są małe niepozorne a wielkość ich dochodzi do 2 mm długości. Kielich ten złożony jest z czterech, szerokoeliptycznych działek, wolnych do samej nasady. *Plantago major L.*, tak jak wszystkie inne rośliny, wytwarza również owoce, jest to jajowata puszcza, zawierająca zwykle (6) 8 (10) nasion. Nasiona są owalne lub w różny sposób zdeformowane. Mają powierzchnie matową z licznymi zmarszczkami o barwie brunatnej od jasnej do ciemnej, które różnią się stronami ponieważ na stronie

grzbietowej mają układ podłużny, na brzusznej – promienisty z widocznym znaczkim pośrodku [2, 3, 7, 34, 40, 48].

### **3.2. *Plantago media* L.**

Bylina ta wytwarza krótkie kłęczę, dzięki któremu rozmnaża się dość łatwo. Roślina posiada głąbik o wysokości takiej samej, co poprzedni gatunek od 3 do 50 cm. Wszystkie rośliny z rodzaju *Plantago* L. łączy podstawowa cecha dotycząca liści zawsze są one w przyziemnej różyczce. Kształt ich jest eliptyczny, ostro lub tępo zakończony, z 5-9 nerwami, całobrzegie, zwężone u nasady, z krótkim ogonkiem, lub siedzące. Cechą charakterystyczną dla *Plantago media* L. jest ich przeważnie występujące obustronne krótkie owłosienie. W opisie kwiatów prawie nic nie zmienia. Kwiaty również zebrane w krótki, walcowaty kłos natomiast jest on o wiele krótszy niż głąbik. Owocami danego gatunku są czteronasienne torebki z wieczkiem, czarne, zawierające pomarszczone nasiona [2, 3, 7, 34, 40, 48]

### **3.3. *Plantago lanceolata* L.**

Babka lancetowata *Plantago lanceolata* L. jest byliną wytwarzającą krótkie kłęczę podobnie jak pozostałe. Gatunek ten możemy zaliczyć do najwyższych z powyżej wymienionych gdyż pędy wyrastające w czasie kwitnienia osiągające wysokość do 40 cm.

Liście również skupione są w przyziemne rozety, mają 3-7 równoległych nerwów. Błazka liściowa tak samo jak u innych przeważnie całobrzega, rzadko z nielicznymi ząbkami są długie, równowąskie, u nasady zwężone w rynienkowaty owłosiony ogonek. Kwiaty natomiast mają niewielkie delikatne różnice względem poprzednich, z rozetek liściowych wyrasta jedna lub kilka bezlistnych szypułek kwiatostanowych o 5 głębokich bruzdach. Szypuła natomiast jest podnosząca się albo prosto wzniesiona. Tak jak u wszystkich kwiaty są drobne niepozorne, jednak barwy kwiatów oscylują od białych do brunatno-różowych, zebrane są w gęste, kulisty lub walcowaty, brunatny kłos. Kwiaty w kłosie osadzone są w suchobłoniastych przysadkach. *Plantago lanceolata* L. wytwarza owoce, nasiona gładkie, błyszczące, czerwobrunatne w kształcie czółenek [2, 3, 7, 34, 40, 48].

### **3.4. Surowiec zielarski roślin z rodzaju *Plantago* L.**

Surowcem zielarskim pozyskiwanym z babek są w pełni wykształcone liście – *Folium*. Jest to surowiec farmakopealny. Rzadziej stosowane jest kwitnące ziele – *Herba*. Również rzadko stosuje się korzenie czy nasiona.

Liście pozyskuje się zarówno ze stanu naturalnego, jak i z uprawy. Z plantacji ścina się je kosiarkami razem z ogonkami. Zbiór liści ze stanowisk naturalnych prowadzi się ręcznie przy użyciu sekatora. Zbierane są wówczas tylko ładne liście bez ogonka, ponieważ trudno on wysycha i układa luźno w koszach. Surowiec zbiera się gdy roślina kwitnie.

Liście powinno się suszyć w suszarniach ogrzewanych w temperaturze 35-40°C, jednak te pochodzące ze stanu naturalnego mogą być suszone w miejscach przewiewnych i zacienionych. Zaraz po zbiorze układa się je w cienkiej warstwie pamiętając o odwróceniu ich co jakiś czas i uważając, by surowiec nie uległ zaparzeniu i zbrązowieniu (z powodu tworzenia polimerizatów aukubiny), jest to szczególnie ważne, bo takie już nie posiadają właściwości leczniczych. Liście zebrane ostrożnie

i we właściwym czasie oraz prawidłowo wysuszone zachowują swoją zieloną barwę. Surowiec natomiast staje się bezwonny o smaku gorzkim. Sproszkowany surowiec (*Folium*) ma żółtawozielony kolor [1, 4-15, 48].

### 3.5. Skład chemiczny roślin z rodzaju *Plantago* L.

Liście roślin z rodzaju *Plantago* L. zawierają:

- glikozydy irydowe (2-3%): aukubina (0,3-2,5%), katalpol (0,3-1,1%), globularna, asperulozyd, ester metylowy, kwasy deacetyloasperulozydowgo;
- garbniki (6,5%);
- flawonoidy: rutyna i pochodne apigeniny;
- glikozydy fenolowe (fenylopropanoidowe, propionowe);
- kwercetyna i jej glikozydy (hyperozyd);
- flawonole; kamferol;
- fitosterole: sitosterol, stigmasterol, kampesterol;
- kwasy organiczne: cytrynowy, fumarowy, benzoesowy, cynamonowy, wani-  
linowy, askorbinowy, nikotynowy;
- substancje lotne (0,03% ś.m.);
- karetonoidy: ksantofil, loliolid;
- kwas galusowy;
- kumaryny: aeskuletyna;
- polisacharydy;
- pektyny;
- enzymy proteolityczne: inwertynę, emulsynę;
- saponiny triterpenowe: kwas oleanolowy;
- witaminy: C, A, K;
- składniki mineralne: Zn, K, Fe, Mg, Ca, Na i krzemionka;
- glikozydy fenyloetanoloidowe: akeozyd, plantamajozyd;
- fenolokwasy: p-hydroksybenzoesowy, kawowy, p-kumarowy;
- protokatechowy, gentyzynowy, kwas chlorogenowy i neochlorogenowy.

Podsumowując, właściwości lecznicze rośliny te zawdzięczają głównie zawartości glikozydów irydoidowym (aukubinie i katapolowi), glikozydom fenolowym, śluzom, garbnikom oraz flawonoidom. Zgodnie z zaleceniami FP VIII liść babki powinien zawierać w przeliczeniu na aukubinie minimum 1,5% irydoidów [1, 4, 9, 11, 13-17, 19-22, 27, 29, 45].

### 3.6. Działanie lecznicze roślin z rodzaju *Plantago* L.

Liście babek wykazują działanie:

- zmniejszające przekrwienie błony śluzowej i zbytnią przepuszczalność naczyń włosowatych jamy ustnej oraz przewodu pokarmowego (aukubina i garbniki);
- przeciwzapalne na błony śluzowe gardła, jamy ustnej i przewodu pokarmowego (glikozydy irydoidowe – aukubina);
- spazmolityczne, inaczej rozkurczające (glikozydy irydoidowe – aukubina, katapol, fenolokwasy, garbniki, śluzy);
- uszczelniające włosowate naczynia krwionośne;
- bakteriobójcze i bakteriostatyczne (glikozydy irydoidowe – aukubina; glikozydy fenolowe (akeozyd, plantamajozyd); fenolokwasy, garbniki, śluzy);
- odtruwające;

- pobudzające trawienie;
- gojące rany i regenerujące naskórek (sok ze świeżych liści babki lancetowatej albo odwar z liści wysuszonych przyspiesza proces gojenia się ran);
- przeciwwirusowe (aukubina, akteozyd; fenolokwasy i flawonoidy);
- przeciwgrzybicze (akteozyd);
- osłaniające przewód pokarmowy oraz górne drogi oddechowe (glikozydy irydoidowe – aukubina, fenolokwasy, garbniki, śluzy);
- ochraniające wątrobę (aukubina, fenolokwasy, garbniki, śluzy);
- wykrztuśne i rozrzedzające wydzielinę (aukubina i garbniki);
- zwiększające krzepliwość krwi;
- pobudzające łaknienie;
- ściągające i przeciwbiegunkowe (garbniki);
- przeciwstresowe (aukubina);
- słabo moczopędne (katalpol);
- poprawia odporność organizmu – pobudza wydzielanie interferonu;
- antyoksydacyjne i przeciwnowotworowe (akteozyd);
- regulujące poziom cukru we krwi.

Podsumowując, surowiec z babki można wykorzystać w wielu schorzeniach m.in. do przyrządzenia naparu, który pomocny jest w niezżytach jamy ustnej, przewodu pokarmowego czy oddechowego, a także w owrzodzeniach żołądka, zatruciach bakteryjnych, a także biegunkach (często stosowany u dzieci). Napary możemy zastosować również zewnętrźnie w formie okładów, by ułatwić gojenie się ran.

Za istotę tych właściwości odpowiada szereg związków chemicznych m.in. aukubina która posiada właściwości osłaniające wątrobę (antyhepatoksyczne, m.in. w zatruciach czterochlorkiem węgla czy amanityną muchomora sromotnikowego), przeciwzapalne również spazmolityczne, antywirusowe czy przeciwstresowe. W Japonii zostały opatentowane tabletki antystresowe, które zawierają ową aukubinę. Katalpol działa diuretycznie i spazmolitycznie.

Odczuwalną ulgę po zastosowaniu liści babki lancetowatej na miejsca ukąszeń owadów przypisuje się obecności w tych liściach garbników

Wykazano, że wyciągi wodne z liści babki lancetowatej, stosowane doustnie, pobudzają wytwarzanie interferonu i przeciwciał antywirusowych, a więc substancji chroniących organizm ludzki przed inwazją wirusów [2, 3, 23, 24-26, 28, 31, 33, 34, 36, 42, 44].

#### 4. Podsumowanie

Babki powszechnie są niedocenianym przez opinie publiczną chwastem na trawnikach, natomiast posiadają one cenne właściwości lecznicze. Surowiec zielarski występuję głównie w postaci liści, zbiór przypada w czasie kwitnienia a pozyskuje się go z terenów wolnych od zanieczyszczeń [3, 50]. Liście babki są bogatym źródłem wielu cennych składników odżywczych jak np.: glikozydy (aukubinę, katalpol), cholina, adeina, enzymy (inwertynę, emulsynę), kwasy organiczne (min. cytrynowy, fumarowy, benzoesowy, cynamonowy), sole mineralne (magnez, potas, sól), śluzy, witaminy (A, C, K), garbniki, taniny i saponiny (kwas oleanolowy). Substancje te cechuje działanie przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, również ściągające czy powlekające i tamujące krwawienia, dlatego też preparaty z udziałem babki zwyczajnej mają zastosowanie w leczeniu chorób górnych dróg oddechowych oraz chorób układu pokarmowego, a także pomagają łagodzić objawy zapalenia spojówek, brzegów powiek, gardła

a także jamy ustnej [1, 4, 9, 11, 13-17, 19-22, 27, 29, 45]. Wspomniane substancje wspomagają też gojenie się ran oraz wrzodów a na dodatek przyspieszają regenerację uszkodzonego naskórka [33, 34, 36, 42, 44].

### Literatura:

1. Andrzejewska-Golec E., *Składniki chemiczne roślin z rodzaju Plantaginaceae*, Farm. Pol, 1994, 50, s. 711-719.
2. Andrzejewska-Golec E., *Babkowate (Plantaginaceae) – rośliny lecznicze*, Farm. Pol, 1994, 50, s. 899-905.
3. Andrzejewska-Golec E., *Babka lancetowata – tradycja i współczesne zastosowania w lecznictwie*, Panacea, 2008, 3(24), s. 15-17.
4. Bowers M. Deane, Nancy E. Stamp, *Chemical variation within and between individuals of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae)*, Journal of Chemical Ecology, 1992, 18.7, s. 985-995.
5. Bowers M. Deane, Nancy E. Stamp, *Effects of plant age, genotype and herbivory on *Plantago* performance and chemistry*, Ecology, 1993, 74.6, s. 1778-1791.
6. Bräutigam M, Franz G., *Structural features of *P. lanceolata* mucilage*, Planta Med, 1985, 45, s. 291-356.
7. Broda B, Mowszowicz J., *Przewodnik do oznaczania roślin leczniczych, trujących i użytkowych*, Wydanie VI. PZWL, Warszawa 2000.
8. Budzianowska A, Skrzypczak L, Budzianowski J., *Phenylethanoid glucosides from in vitro propagated plants and callus cultures of *Plantago lanceolata* L.*, Planta Medica, 2004, 70, s. 834-40.
9. Chiang Lien-Chai, et al., *Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species*, Planta medica, 2003, 69.07, s. 600-604.
10. Chudnicka A, Matysik G., *Research of enzymatic activities of fresh juice and water infusion from dry herbs*, J Ethnopharm, 2005, 99, s. 281-6.
11. Cometa F, Tomassi M, Nicoletti M., *Phenylpropanoid glycosides. Distribution and pharmacological activity*, Fitoterapia, 1993, 44, s. 195-217.
12. Eisenreich W, Handel A., Zimme U.A., *Rozpoznawanie roślin i zwierząt*, Warszawa, Elipsa, 2005.
13. *Farmakopea Polska, VI*, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa 2002.
14. *Farmakopea Polska VIII Tom I*, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa 2008.
15. *Farmakopea Polska VIII Tom II*, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa 2008.
16. *Farmakopea Polska VIII Tom III*, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa 2008.
17. Feeler H, Verspohl E.J., *Antispasmodic activity of an extract from *Plantago lanceolata* and same isolated compounds*, Phytomed, 2007, 14, s. 404-16.
18. Fleer H., Verspohl E. J., *Antispasmodic activity of an extract from *Plantago lanceolata* L. and some isolated compounds*, Phytomedicine, 2007, 14.6, s. 409-415.
19. Fons, Françoise, et al., *Effects of cinnamic acid on polyphenol production in *Plantago lanceolata**, Phytochemistry, 1998, 49.3, s. 697-702.
20. Fuchs Alexander, M. Deane Bowers, *Patterns of iridoid glycoside production and induction in *Plantago lanceolata* and the importance of plant age*, Journal of Chemical Ecology, 2004, 30.9, s. 1723-1741.
21. Fons F, Tusch D, Rapior S i wsp., *Phenolic profiles of untransformed and hairy root cultures of *Plantago lanceolata**, Plant Physiol Biochem 1999, 37, s. 291-6.
22. Gálvez Marina, et al., *Antioxidant activity of methanol extracts obtained from *Plantago* species*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53.6, s. 1927-1933.
23. Górnicka J., *Apteka natury. Leksykon zdrowia*, Martel, Kalisz 2005, 184-6.
24. Grau J., Jung R., Munker B., *Leksykon przyrodniczy. Ziola i owoce leśne*, Świat Książki, Warszawa 1996, s. 126.
25. Jędrzejko K., Klama H, Żarnowiec J., *Zarys wiedzy o roślinach leczniczych: człowiek, przyroda, rośliny, przegląd systematyczny grup roślinnych, właściwości i wykorzystanie*

- roślin użytkowych, zasoby naturalne roślin leczniczych i ich ochrona, zagadnienia zoologiczne. Atlas, Śląska Akademia Medyczna, 1998.
26. Kalinowska J., *Lecznice babki*, Wiad Ziel, 2002, 44(5), s. 6-7.
  27. Kardošová A., *Polysaccharides from the leaves of Plantago lanceolata L., var. Libor D-glucan*, Chem Papers, 1992, 46, s. 127-30.
  28. Keville K., *Zielona apteka. Rośliny, które leczą i zapobiegają*. Świat Książki, Warszawa 2002, s. 180-1, 286-7 i 343-8.
  29. Khawar K.M., Sarihan E.O., Sevimay C.S. i wsp., *Adventitious shoot regeneration and micropropagation of Plantago lanceolata L.*, Period Biol, 2005, 107, s. 113-6.
  30. Kohlmünzer S.T., *Farmakognozja*, Wyd. V. PZWL, Warszawa 1998.
  31. Kowalska-Wochna E., *Kosmetyki z łąk i pól – Wykorzystanie łąki i pastwiska wszystkie góry i pagórki są aptekami*, Panacea, 2009, 2(27), s. 18-19
  32. Kwaśniewska J., Skulimowski J., Tłumiłowicz H., *Poradnik zbieracza ziół*, Wydawnictwo Przemysłu Lekkiego i Spożywczego, Warszawa 1956, s. 178.
  33. Lamer-Zawarska E., *Fitoterapia w przeziębieniach u dzieci*, Panacea, 2006, 1(14), s. 6-11.
  34. Lewkowicz-Mosiej T., *Leksykon roślin leczniczych*, Świat Książki, Warszawa 2003, 27.
  35. Long C., Moulis C., Stanislas E. i wsp., *L'aucuboside et le catalpol dans les feuilles de Plantago lanceolata L., Plantago major L. et Plantago media L.*, J Pharm Belg, 1995, 50, s. 484-8.
  36. Lutomski J., *Surowce zielarskie w zewnętrznym leczeniu skóry*, Wiad Ziel, 2002, 44(7), s. 4-6.
  37. Makowska M., Alkiewicz J., *Leki roślinne w leczeniu schorzeń dróg oddechowych*, Wiad Ziel, 2001, 43(3).
  38. Mayer S.L., Zasada I.A., Roberts D.P. i wsp., *Plantago lanceolata and Plantago rugelii extracts are toxic to Meloidogyne incognita but not to certain microbes*, J Nematology 2006, 38(3), s. 333-88.
  39. Mordalski R., Kordana S., *Wpływ metody uprawy na plonowanie roślin zielarskich i jakość surowca*, Wiad Ziel, 2002, 44(6), s. 19-21.
  40. Mordalski R., *Babka lancetowata w uprawach produkcyjnych*, Wiad Ziel, 2001, 43(6), s. 21-2.
  41. Mowszowicz J., *Krajowe chwasty polne i ogrodowe*, PWRiL, Warszawa 1975, 432, 34.
  42. Nowak Z.T., *Wzmacnianie odporności organizmu*, Wiad Ziel, 2002, 44(11), s. 7.
  43. Paper D.H., Marcheson M., *Spitzwegerich (Plantago lanceolata L.)*, Inhaltsstoffe-Analitic-Pharmakologie-Standardisierung Zeitsch Phytoth, 1999, 20, s. 231-8.
  44. Podlewski J.K., *Chwalibogowska-Podlewska A. Leki współczesnej terapii*. Wyd. XVII, Split Trading Sp. z o.o., Warszawa 2005.
  45. Ronsted N., Göbel E., Franzyk H. i wsp., *Chemotaxonomy of Plantago. Iridoid glucosides and caffeoyl phenylethanoid glycosides*, Phytochem, 2000, 55, s. 337
  46. Rumińska A., Ożarowski A., *Leksykon roślin leczniczych*, PWRiL, Warszawa 1990.
  47. Skrzypczak L., Budzianowski J., Budzianowska A., *Babka lancetowata w kulturze in vitro*. Panacea 2008, 3, s. 15-17.
  48. Szafer W., Kulczyński S., *Rośliny polskie*, PWN, Warszawa 1953.
  49. Zarzycki K., et al., *Ecological indicator values of vascular plants of Poland. [Ekologiczne liczby wskaźnikowe roślin naczyniowych Polski.]*, Instytut Botaniki im. W. Szafera, Polska Akademia Nauk, Kraków 2002.

## Właściwości lecznicze roślin z rodzaju *Plantago* L.

### Streszczenie

Gatunki z rodzaju *Plantago* L. od wieków są uważane za cenne rośliny lecznicze ze względu na swoje właściwości prozdrowotne. Wykazują działanie ściągające, przeciwbakteryjne, przeciwzapalne, a także wykrztuśne i diuretyczne. Gatunki należące do tego rodzaju to zarówno rośliny jednoroczne, dwuletnie, jak i wieloletnie. Właściwości lecznicze roślin z rodzaju *Plantago* L. związane są z występowaniem różnych grup związków biologicznie aktywnych m.in. glikozydów irydoidowych, flawonoidów, garbników, polisacharydów oraz witamin.

Najbardziej znane i rozpowszechnione na świecie są dwa gatunki – *Plantago lanceolata* L., który ze względu na duże zapotrzebowanie na surowiec wprowadzony został do uprawy oraz *Plantago major* L., który jest najdłużej znaną i stosowaną rośliną leczniczą.

Słowa kluczowe: *Plantago*, flawonoidy, prozdrowotne

## Healing properties of plants of the genus *Plantago* L.

### Abstract

*Plantago* L. species have been considered valuable medicinal plants for centuries due to their health promoting properties. They have astringent, antibacterial, anti-inflammatory, as well as expectorant and diuretic effects. Species belonging to this type for both annual and biennial plants. Healing properties of plants with the trait of *Plantago* L. are associated with the occurrence of various biologically active groups, including iridoid glycosides, flavonoids, tannins, polysaccharides and vitamins.

The most known and widespread in the world are two species – *Plantago lanceolata* L., which is met on high requirements for the raw material, cultivation was introduced, and *Plantago major* L., which is the longest known and used medicinal plant.

Keywords: *Plantago*, flavonoids, pro-health

## Rozdzielanie chromatograficzne acylowanych gomprenin czerwonego szpinaku malabarskiego

### 1. Wstęp

Czerwony szpinak malabarski (*Basella alba* var. *rubra* L.) należy do roślin z rodziny wyćwiklinkowatych, rzędu goździkowców, najszerzej uprawianych w Azji. W literaturze botanicznej istnieje pewne zamieszanie w raportach na temat *Basella alba* i *B. rubra*. Zdarza się, że nazwy te są traktowane jak synonimy, jednak najczęściej przyjmuje się, że *B. rubra* jest najbardziej rozpowszechnioną, stabilną odmianą *B. alba*.

Rośliny *B. alba* var. *rubra* są sukulentami, charakteryzującymi się rozgałęzioną, pnącą łodygą, z naprzemiennie ułożonymi liśćmi. W porze letniej obfitują ciemnognatowymi, niewielkimi owocami [1]. Medycyna tradycyjna, szczególnie w Indiach i Chinach, wykorzystuje różne części wspomnianych roślin w leczeniu wielu chorób [2]. O ich niezwykłości świadczy olbrzymi potencjał prozdrowotny, który wykazują. Oprócz zawartości witamin czy minerałów, ekstraktom z tych roślin można przypisać działanie przeciwdrobnoustrojowe [3], antyzapalne czy antydepresyjne [2]. Poza wartościowymi łodygami i liśćmi, należy wspomnieć o ich owocach, których ekstraktom przypisuje się m.in. silne właściwości przeciwutleniające. Udowodniono również, że ekstrakty z owoców szpinaku malabarskiego wykazują cytotoksyczność przeciwko ludzkim komórkom raka szyjki macicy [4], a także wiele innych prozdrowotnych właściwości. Ekstrakty z owoców *B. rubra* są bogate w betalainy, wśród których dominują betacyjaniny.

Betalainy są barwnikami złożonymi z kwasu betalamowego jako chromoforowego rdzenia, który kondensuje z cyklo-DOPA lub aminokwasami/aminami, tworząc odpowiednio fioletowo-niebieskie betacyjaniny i żółtopomarańczowe betaksantyny. Zaliczane do betacyjanin gompreniny charakteryzują się grupą hydroksylową przyłączoną do węgla C-5 i grupą glukozylową przyłączoną w pozycji C-6 [5].

Występującym w ekstraktach roślinnych betacyjaninom towarzyszą zazwyczaj ich odpowiednie izofomy (izobetacyjaniny). Przykładem może być izobetanina powstająca w wyniku izomeryzacji węgla w pozycji C-15 w strukturze betaniny. Powodem izomeryzacji mogą być czynniki indukowane przez środowisko, np. zmiana odczynu, a także obróbka termiczna. Różne formy betacyjanin zachowują się

<sup>1</sup> Zakład Chemii Analitycznej, Instytut C-1, Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej, Politechnika Krakowska, ul. Warszawska 24, Kraków 31-155 (katarzyna.sutor@doktorant.pk.edu.pl).

<sup>2</sup> Zakład Chemii Analitycznej, Instytut C-1, Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej, Politechnika Krakowska, ul. Warszawska 24, Kraków 31-155.

<sup>3</sup> Katedra Sadownictwa i Pszczelarstwa, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy, al. 29-Listopada 54, Kraków 31-425.

<sup>4</sup> Zakład Chemii Analitycznej, Instytut C-1, Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej, Politechnika Krakowska, ul. Warszawska 24, Kraków 31-155.

<sup>5</sup> Katedra Sadownictwa i Pszczelarstwa, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy, al. 29-Listopada 54, Kraków 31-425.



odmiennie w zależności od warunków, np. obróbka termiczna może przyczyniać się do zwiększenia ilości jednej izoformy, jednocześnie zmniejszając ilość drugiej [6].

Barwniki betalainowe są silnymi antyoksydantami, co jest cenne chociażby ze względu na znany udział reaktywnych form tlenu (RFT) i azotu (RFA) w rozwoju nowotworów i innych chorób, takich jak np. miażdżycy. Stwierdzono również zdolność do hamowania lub opóźniania rozwoju niektórych nowotworów przez związki należące do grupy przeciwutleniaczy [7]. W literaturze można znaleźć doniesienia o zdolności betalain do inhibicji proliferacji komórek raka czerniaka, a także inhibicji rozwoju raka prostaty i piersi, a jednocześnie, dotychczas nie stwierdzono istotnie negatywnego wpływu tych związków na organizm ludzki [8]. Na podstawie powyższych faktów betalainy, w tym betacyjaniny zalicza się do naturalnych związków chemoprewencyjnych, aczkolwiek nie są one jeszcze w pełni zbadane [9].

Poza wspomnianym potencjałem prozdrowotnym, betacyjaniny mogą znaleźć zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu. W porównaniu do syntetycznych barwników betalainy nie są toksyczne ani nie powodują reakcji alergicznych. Ze względu na wysoki współczynnik ekstynkcji molowej, zdolność barwienia przez betalainy jest konkurencyjna w stosunku do barwników syntetycznych [10]. Różnorodność strukturalna betacyjanin i betaksantyn daje możliwość uzyskania szerokiego zakresu odcieni kolorów w wyniku mieszania poszczególnych form [11]. W przeciwieństwie do popularnych w przemyśle antocyjanów stabilnych w kwasach, betalainy dość dobrze zachowują kolor w szerszym zakresie pH (od 3 do 7). Wspomniane właściwości pozwalają na zastosowanie ich jako użytecznej alternatywy dla antocyjanów do barwienia lekkokwaśnych produktów spożywczych [10].

Stabilność betalain jest ściśle związana z ich strukturą chemiczną. Betacyjaniny wykazują większą stabilność niż betaksantyny, zarówno w temperaturze pokojowej, jak i po ogrzaniu. Dodatkowo wskazuje się na poprawę stabilności w wyniku glikozylacji [12]. W literaturze zwraca się również uwagę na małą stabilność niektórych acylowanych betalain [6]. Jak już wspomniano, betalainy wykazują dość dobrą stabilność w zakresie pH od 3 do 7. Jednak, jak wykazały badania, najbardziej optymalnymi dla nich warunkami jest środowisko o pH w zakresie 4-6, a stabilność wzrasta w warunkach beztlenowych [12]. W niższym pH dochodzi do przesunięcia maksimum absorpcji w kierunku krótszych długości fali, natomiast w otoczeniu o pH bardziej zasadowym dochodzi do jej przesunięcia w kierunku fal dłuższych [13].

Profil betalainowy ekstraktu z owoców *B. alba* var. *rubra* bogaty jest głównie w gomfreninę I (6-O- $\beta$ -glukozyd betanidyny) i jej izoformę, a także w mniejszej ilości ich pochodne. Jak już wspomniano, w literaturze często odnosi się do badań bioaktywności ekstraktów, jednocześnie coraz częściej zwraca się uwagę na konieczność przebadania czystych, wyizolowanych związków. Zostało już udowodnione, że aktywność przeciwdrobnoustrojowa acylowanych betacyjanin jest wyższa niż gomfreniny I/izogomfreniny I, a acylowanie kwasami fenolowymi zwiększa aktywność betacyjanin przeciwko grzybom i bakteriom, sugerując synergiczny wpływ acylowanych ugrupowań i układu chromoforowego barwnika na te właściwości [14]. Z tego powodu celem badań było opracowanie chromatograficznej metody izolowania acylowanych gomfrenin z owoców *B. rubra*, która w dalszej perspektywie pozwoli na generowanie ich pochodnych o potencjalnie prozdrowotnych właściwościach.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Reagenty

Kwas solny, kwas mrówkowy i EDTA zostały zakupione z Sigma (St. Louis, MO, USA). Aceton został zakupiony z Avantor Performance Materials Poland S.A. (Gliwice, Polska). Woda dejonizowana do HPLC została otrzymana dzięki Milli-Q system (Millipore Corp., MA, USA).

Ekstrakcja barwników z owoców *Basella alba* var. *rubra* L.

Owoce *B. rubra* zostały zebrane w szklarni Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Ekstrakcję, a także kolejne etapy badań przeprowadzono na podstawie wieloletniego doświadczenia naszego zespołu badawczego [15-17]. Surowiec ekstrahowano wodą destylowaną z dodatkiem nasyconego roztworu EDTA (w ilości 1 ml r-u EDTA na 1 l mieszaniny ekstrakcyjnej).

### 2.2. Oczyszczanie wstępne

W procesie wstępnego oczyszczania, ekstrakty przesączono przez żel krzemionkowy (Merck), zakwaszono do stężenia 0,05 M HCl, a dalej oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej z zastosowaniem złóż: kationitu Lewatit (Lanxess AG) i anionitu Sepra (Phenomenex). Do elucji z anionitu użyto roztworu 5% HCOOH z 50% acetonu, zaś do elucji pozostałości z kationitu roztworu 50% acetonu.

Rozdzielanie betalain z ekstraktu *B. alba* var. *rubra* techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

Betalainy poddano rozdzielaniu i dalszemu oczyszczaniu techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z pompami LC-20AP (Shimadzu Corp., Japonia) i dozownikiem FCV-20AH2 (Shimadzu) działającej na oprogramowaniu LabSolutions 5.51 (Shimadzu). Użyto kolumny Merck C18 (Merck, Niemcy) o dł. 250 mm i śr. wewn. 50 mm. Objętość nastrzyku wynosiła 120 ml, a szybkość przepływu wynosiła 50 ml/min. Detekcja on-line odbywała się w detektorze PDA (UV/Vis) przy długościach fal  $\lambda_1 = 538$  nm i  $\lambda_2 = 470$  nm.

Po etapie pierwszego rozdzielania, z użyciem eluentów z 1% HCOOH oraz kolejno: 6%, 8%, 10% i 12% acetonu, po połączeniu i odparowaniu wybranych frakcji, przeprowadzono rozdzielanie acylowanych gompfenin używając eluentów z 0,5% HCOOH i kolejno 5% acetonu przez 5 min, a następnie od 12 do 17% acetonu.

Odparowywanie pozostałości acetonu dokonywano na wyparkach próżniowych, pod zmniejszonym ciśnieniem, w temperaturze 25°C.

### 2.3. Analizy techniką LC-DAD-ESI-MS

Otrzymane eluaty zostały poddane analizie za pomocą spektrometru mas LCMS-8030 (Shimadzu), sprzężonego z pompami HPLC LC-20ADXR, dozownikiem SIL-20ACXR oraz detektorem PDA SPD-M20A (z matrycą fotodiodową). Układ działa w oparciu o oprogramowanie LabSolution 5.60 SP1 (Shimadzu). Elucja próbek odbywała się na kolumnie Kinetex 5  $\mu$ m C18 100 Å o wymiarach 150 x 4,6 mm, poprzedzonej kolumną ochronną z tego samego materiału (Phenomenex, Kalifornia), kolumnę termostatowano w temperaturze 40°C. Próbkę nastrzykiwano w objętości 20  $\mu$ l, a szybkość przepływu wynosiła 0,5 ml/min. Do rozdzielania analitów wykorzystano gradient binarny, gdzie fazami ruchomymi były: A, 2% roztwór kwasu mrówkowego w wodzie oraz B, czysty metanol. W trakcie analizy rejestrowano widma

mas dla jonów dodatnich w układzie LC-MS kontrolowanym oprogramowaniem LabSolution. Przeprowadzono jonizację w trybie dodatnim (ESI+), gdzie napięcie elektrorozpylania wynosiło 4,5 kV. Elektrorozpylanie prowadzone było w kapilarze z panującą temperaturą 250°C oraz z zastosowaniem azotu jako gazu do rozpylania. Zarejestrowano chromatogramy jonów pełnego skanowania, a także widma mas i chromatogramy jonowe dla wybranych jonów (SIM). Dodatkowo zebrano widma fragmentacyjne.

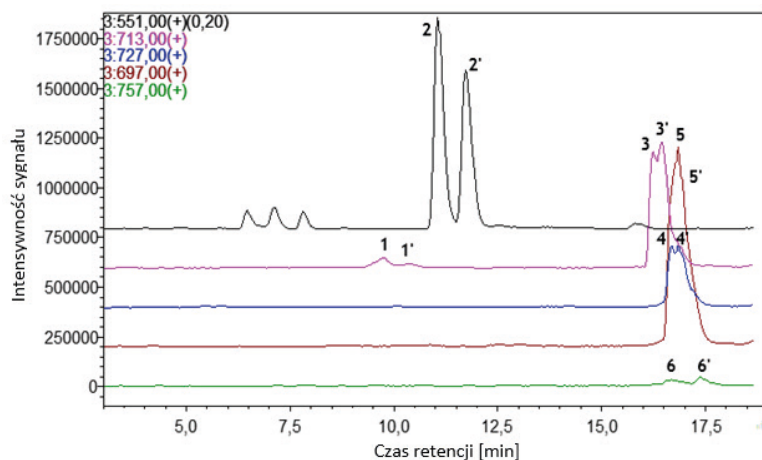
### 3. Wyniki i dyskusja

Jak widać na rysunku 1, przed etapem pierwszego rozdzielania techniką HPLC w ekstrakcie *B. rubra* w największe ilości obecny był 6-O- $\beta$ -glukozyd betanidyny (gomfrenina I) (2) z izoformą (2'). Dalej dominowała mieszanina bardziej hydrofobowych związków gomfreninowych, acylowanych resztami kwasów: kawowego (3/3'); ferulowego (4/4'); kumarowego (5/5') i synapowego (6/6'). Zauważyć można także niewielką ilość dość polarnego 5-O- $\beta$ -soforozydu betanidyny (1) i jego izoformy (1'). Wszystkie zidentyfikowane związki zebrano w tabeli 1 z odpowiadającymi im wartościami m/z, wartościami długości fal dla maksymalnych absorpcji i czasami retencji.

Długości fal odpowiadające maksymalnej absorpcji promieniowania świetlnego w obszarze widzialnym dla związków acylowanych wyniosły od 543 do 544 nm, zaś dla nieacylowanych od 536 do 539 nm (tab. 1), co w przybliżeniu odpowiada wartościom wyników przedstawionych przez Schliemanna i Stracka [18]. Jednak wartości te nieznacznie odbiegają od podanych przez Minale i in. [19]. Zgodnie z możliwymi przewidywaniami acylowane betacyjaniny miały dłuższe czasy retencji niż nieacylowane. Dodatkowo, ze względu na większą interakcję z fazą stacjonarną diastereoizomerów betacyjanin (15R), te tzw. izoformy cechowały się późniejszym wymywaniem niż formy 15S. Wyniki te są podobne do zgłoszonych przez innych naukowców, takich jak Piattelli i Minale [20], Heuer i in. [21], oraz Cai i in. [22].

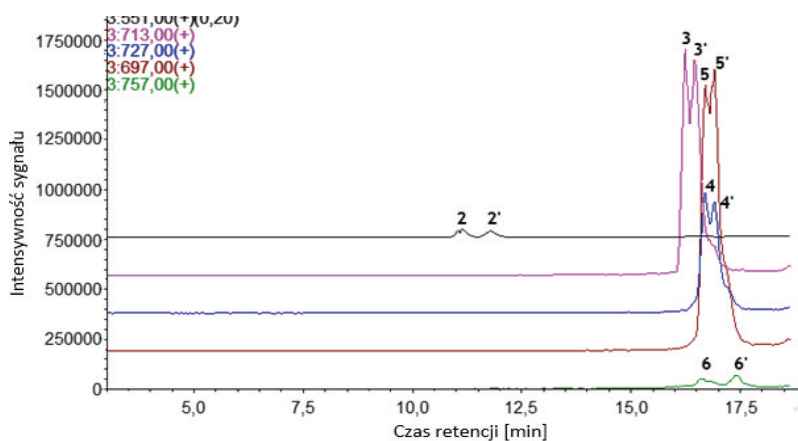
Po etapie pierwszego rozdzielania udało się w znacznym stopniu oddzielić frakcje bardziej hydrofobowych acylowanych pochodnych gomfreninowych od dominujących w ekstraktach omawianych roślin bardziej hydrofilnych betalain, takich jak gomfrenina I [12], a także wspomnianych związków 5-O- $\beta$ -soforozydu betanidyny/izobetanidyny (1/1'). Po pierwszym etapie rozdzielania techniką HPLC, dokonano analizy otrzymanych frakcji techniką LC-MS, w wyniku czego udało się ustalić obecność mieszanin wspomnianych acylowanych pochodnych gomfreniny w wybranych frakcjach (dane nie przedstawione). Frakcje te połączono, zateżono na wyparkach próżniowych (rys. 2) i poddano ponownemu rozdzielaniu techniką HPLC, w gradientowym, mniej polarnym niż poprzednio, układzie elucyjnym.

Przytoczone wyżej izoformy dotyczą trans-izomerów, jednakże w literaturze można znaleźć wzmianki na temat zidentyfikowanych bardziej polarnych cis-pochodnych, wspomnianych związków. Stintzing i in. wskazuje na dodatkową obecność izomerów cis gomfreniny II [6-O-(6'-O-trans-4-kumaro)- $\beta$ -glukozydu betanidyny] i gomfreniny III [6-O-(6'-O-trans-ferulo)- $\beta$ -glukozydu betanidyny] w kwiatostanach *Gomphrena globosa* [23]. W niniejszych badaniach ekstraktów owoców *B. rubra* nie stwierdzono izomerów cis omawianych acylowanych pochodnych gomfreninowych.



Rysunek 1. Chromatogram wybranych jonów dla ekstraktu z czerwonego szpinaku malabarskiego przed etapem pierwszego rozdzielania techniką HPLC, otrzymany techniką LC-DAD-ESI-MS/MS (na aparacie LC-MS firmy Shimadzu). Monitorowana długość fali na detektorze to 540 nm.

Opis sygnałów został zawarty w tabeli 1. Źródło: [opracowanie własne]



Rysunek 2. Chromatogram wybranych jonów dla ekstraktu z czerwonego szpinaku malabarskiego przed etapem drugiego rozdzielania techniką HPLC, otrzymany techniką LC-DAD-ESI-MS/MS (na aparacie LC-MS firmy Shimadzu). Monitorowana długość fali na detektorze to 540 nm.

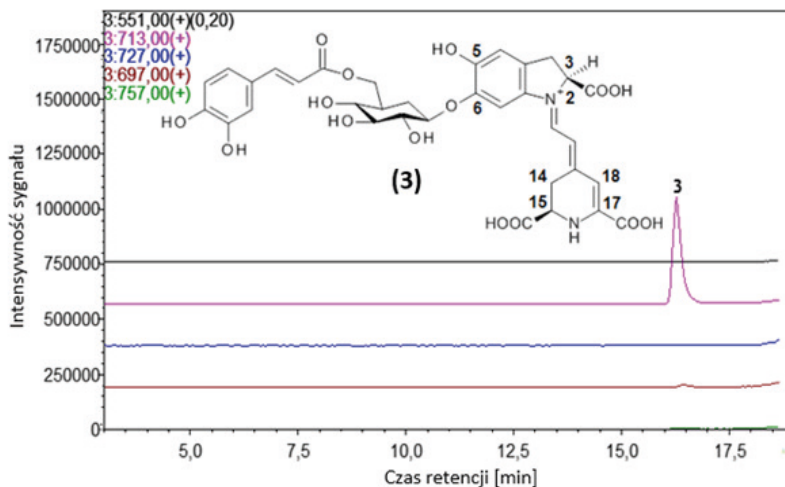
Opis sygnałów został zawarty w tabeli 1. Źródło: [opracowanie własne]

Po etapie pierwszego rozdzielania wszystkie acylowane związki charakteryzowały się zbliżonymi czasami retencji na preparatywnej kolumnie HPLC, wobec czego konieczne było zastosowanie dłuższego niż poprzednio czasu całkowitego rozdzielania, a także gradientowego, bardziej hydrofobowego niż we wcześniejszym etapie programu elucyjnego. Po zmieszaniu wszystkich frakcji zawierających acylowane gomfreniny (chromatogram analityczny na rys. 2) przeprowadzono drugi etap rozdzielania preparatywnego.

Dzięki zastosowaniu metody jonizacji ESI w analizie LC-MS możliwe było uzyskanie wiarygodnych wyników dotyczących mas cząsteczkowych analitów oraz ich fragmentacji, pozwalających z powodzeniem wnioskować o strukturze badanych

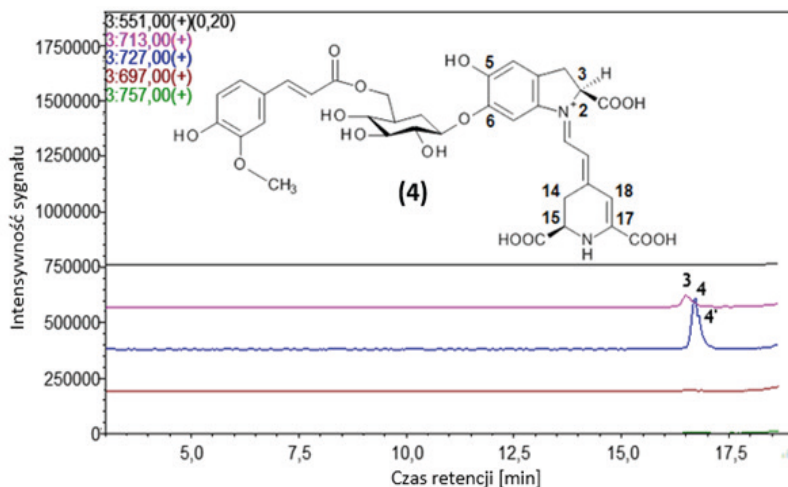
związków, mogących znaleźć potwierdzenie w wielu źródłach literaturowych [21, 24].

W wyniku rozdzielania wyizolowano związki głównych frakcji, którymi są: (3) 6-O-(6'-O-trans-kawo)- $\beta$ -glukozyd betanidyny (m/z 713); (4), nieco zanieczyszczony związkami 3 i 4', 6-O-(6'-O-trans-ferulo)- $\beta$ -glukozyd betanidyny (m/z 727) oraz (5) 6-O-(6'-O-trans-4-kumaro)- $\beta$ -glukozyd betanidyny (m/z 697) (rys. 3-5). Wzbogacono również frakcje acylowanych pochodnych kwasu synapowego oraz bardziej hydrofilnych diglukozylo-wanych gomfrenin, a także izoform wspomnianych związków.

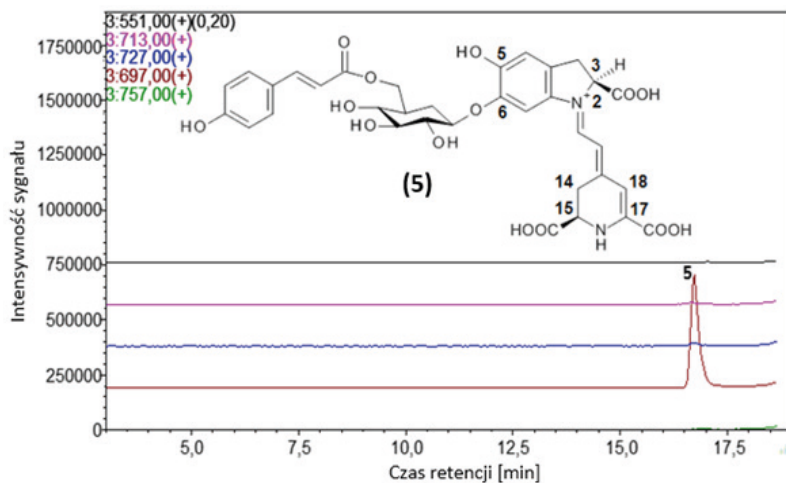


Rysunek 3. Chromatogram wybranych jonów dla frakcji nr 16 z drugiego etapu rozdzielania techniką HPLC ekstraktu z czerwonego szpinaku malabarskiego, otrzymany techniką LC-DAD-ESI-MS/MS (na aparacie LC-MS firmy Shimadzu). Monitorowana długość fali na detektorze to 540 nm.

Opis sygnałów został zawarty w tabeli 1. Źródło: [opracowanie własne]



Rysunek 4. Chromatogram wybranych jonów dla frakcji nr 20 z drugiego etapu rozdzielania techniką HPLC ekstraktu z czerwonego szpinaku malabarskiego, otrzymany techniką LC-DAD-ESI-MS/MS (na aparacie LC-MS firmy Shimadzu). Monitorowana długość fali na detektorze to 540 nm. Opis sygnałów został zawarty w tabeli 1. Źródło: [opracowanie własne]



Rysunek 5. Chromatogram wybranych jonów dla frakcji nr 23 z drugiego etapu rozdzielania techniką HPLC ekstraktu z czerwonego szpinaku malabarskiego, otrzymany techniką LC-DAD-ESI-MS/MS (na aparacie LC-MS firmy Shimadzu). Monitorowana długość fali na detektorze to 540 nm. Opis sygnałów został zawarty w tabeli 1. Źródło: [opracowanie własne]

Tabela 1. Wybrane dane z analiz LC-DAD-ESI-MS związków betacyjanin z ekstraktu *Basella alba* var. *rubra* L. Oznaczenia pików chromatograficznych odnoszą się do informacji zawartych na chromatogramach DAD i MS

Nr pików	Czas retencji [min]	Nazwa związku	$\lambda_{\max}$ [nm]	m/z [M+H] <sup>+</sup>
1'	9,6	5-O- $\beta$ -soforozyd betanidyny	539	713
1'	10,4	5-O- $\beta$ -soforozyd izobetanidyny	539	713
2'	11,1	6-O- $\beta$ -glukozyd betanidyny [gomfrenina I]	536	551
2'	11,8	6-O- $\beta$ -glukozyd izobetanidyny [izogomfrenina I]	537	551
3'	16,3	6-O-(6'-O-trans-kawo)- $\beta$ -glukozyd betanidyny	543	713
3'	16,5	6-O-(6'-O-trans-kawo)- $\beta$ -glukozyd izobetanidyny	543	713
4'	16,6	6-O-(6'-O-trans-ferulo)- $\beta$ -glukozyd betanidyny [gomfrenina III]	544	727
6'	16,6	6-O-(6'-O-trans-synapo)- $\beta$ -glukozyd betanidyny	544	757
5'	16,7	6-O-(6'-O-trans-4-kumaro)- $\beta$ -glukozyd betanidyny [gomfrenina II]	544	697
4'	16,9	6-O-(6'-O-trans-ferulo)- $\beta$ -glukozyd izobetanidyny [izogomfrenina III]	544	727
5'	16,9	6-O-(6'-O-trans-4-kumaro)- $\beta$ -glukozyd izobetanidyny [izogomfrenina II]	544	697
6'	17,5	6-O-(6'-O-trans-synapo)- $\beta$ -glukozyd izobetanidyny	544	757

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [23]

#### 4. Podsumowanie

Ciągły wzrost zainteresowania związkami pochodzenia naturalnego w przemyśle kosmetycznym i spożywczym napędza badania nad pozyskiwaniem i właściwościami betalain. Jednocześnie przyczynia się do tego ważny aspekt ich potencjału prozdrowotnego. Obiecującą grupą betacyjanin są acylowane gomfreniny, w tym pochodne kwasów kawowego i kumarowego, które w dobrym stopniu udało się oczyścić i wyizolować w wyniku przeprowadzonych badań. Pozyskanie czystych, wspomnianych związków stwarza szansę sprecyzowanych badań ich bioaktywności, a szczególnie działania przeciwdrobnoustrojowego i przeciwnowotworowego czy też możliwych modyfikacji chemicznych w celu otrzymania nowych aktywnych substancji.

*B. alba* var. *rubra* jest cennym surowcem acylowanych betacyjanin, których dostępność w królestwie roślin jest ograniczona. Dzięki opracowaniu odpowiednich

metod chromatograficznych, możliwe będzie pozyskiwanie większych ilości acylowanych gomfrenin, które po zliofilizowaniu zostaną przeznaczone m.in. do badań ich aktywności biologicznej i cytotoksycznej.

## Literatura:

1. Cyunel E., *Basella alba L.: In Vitro Culture and the Production of Betalains*, Medicinal and Aromatic Plants II, 7, 1989, s. 47-68.
2. Adhikari R., Kumar N.H., *A Review on Medicinal Importance of Basella alba L.*, International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research, 4, 2012, s. 110-114.
3. Deka J., Borah U., Dash B., Dash S., Kalita L., *Preliminary phytochemical screening and in vitro antimicrobial activity of ethanolic extract of stem of the herb Basella alba L. var rubra (L.) stewart (family-basellaceae)*, International Journal of Current Pharmaceutical Research, 9, 2017, s. 91-94.
4. Kumar S.S., Manoj P., Giridhar P., Shrivastava R., Bharadwaj M., *Fruit extracts of Basella rubra that are rich in bioactives and betalains exhibit antioxidant activity and cytotoxicity against human cervical carcinoma cells*, Journal of Functional Foods, 15, 2015, s. 509-515.
5. Khan M.I., Giridhar P., *Plant betalains: Chemistry and biochemistry*, Phytochemistry, 117, 2015, s. 267-295.
6. Herbach K.M., Stintzing F.C., Carle R., *Betalain stability and degradation – structural and chromatic aspects*, Journal of Food Science, 71, 2006, s. 42-50.
7. Gandia-Herrero F., Escribano J., Garcia-Carmona F., *Biological activities of plant pigments betalains*, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 56, 2016, s. 937-945.
8. Khan M.I., *Plant betalains: safety, antioxidant activity, clinical efficacy, and bioavailability*, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 15, 2015, s. 316-330.
9. Kumorkiewicz A., Szneler E., Wybraniec S., *Conjugation of Oxidized Betanidin and Gomphrenin Pigments from Basella alba L. Fruits with Glutathione*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 66, 2018, s. 12815-12826.
10. Esquivel P., *Betalains*, [w:] Carle R., Schweiggert R., *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Industrial Applications for Improving Food Color*, Woodhead Publishing, 2016, s. 81-99.
11. Strack D., Vogt T., Schliemann W., *Recent advances in betalain research*, Phytochemistry, 62, 2003, s. 247-269.
12. Azerdo H.M.C., *Betalains: properties, sources, applications and stability – a review*, International Journal of Food Science & Technology, 44, 2009, s. 2365-2376.
13. Castellar R., Obon J.M., Alacid M., Fernandez-Lopez J.A., *Color properties and stability of betacyanins from Opuntia fruits*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 2003, s. 2772-2776.
14. Spórna-Kucab A., Bernaś K., Grzegorzczak A., Malm A., Skalicka-Woźniak K., Wybraniec S., *Liquid chromatographic techniques in betacyanin isomers separation from Gomphrena globosa L. flowers for the determination of their antimicrobial activities*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 161, 2018, s. 83-93.
15. Wybraniec S., Starzak K., Skopińska A., Szaleniec M., Słupski J., Mitka K., Kowalski P., Michałowski T., *Effects of Metal Cations on Betanin Stability in Aqueous-organic Solutions*, Food Science and Biotechnology, 22, 2013, s. 353-363.
16. Wybraniec S., Michałowski T., *New Pathways of Betanidin and Betanin Enzymatic Oxidation*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 2011, s. 9612-9622.
17. Kumorkiewicz A., Sutor K., Nemzer B., Pietrkowski Z., Wybraniec S., *Thermal Decarboxylation of Betacyanins in Red Beet Betalain-Rich Extract*, Polish Journal of Food and Nutrition Science, 70, 2020, s. 7-14.
18. Schliemann W., Strack D., *Intramolecular Stabilization of Acylated Betacyanins*, Phytochemistry, 49, 1998, s. 585-588.
19. Minale L., Piattelli M., De Stefano S., *Betacyanins from Gomphrena globosa L.*,



- Phytochemistry, 6, 1967, s. 703-709.
20. Piattelli M., Minale L., *Distribution of Betacyanins*, *Phytochemistry*, 3, 1964, s. 547-557.
  21. Heuer S., Wray V., Metzger J., Strack D., *Betacyanins from Flowers of Gomphrena globosa*, *Phytochemistry*, 5, 1992, s. 1801-1807.
  22. Cai Y., Sun M., Corke H., *Identification and Distribution of Simple and Acylated Betacyanins in the Amaranthaceae*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2001, s. 1971-1978.
  23. Kugler F., Stintzing F.C., Carle R., *Characterisation of betalain patterns of differently coloured inflorescences from Gomphrena globosa L. and Bougainvillea sp. by HPLC-DAD-ESI-MSn*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 2007, s. 637-648.
  24. Schliemann W., Joy R., Komamine A., Metzger J., Nimtz M., Wray V., Strack D., *Betacyanins from Plants and Cell Cultures of Phytolacca americana*, *Phytochemistry*, 42, 1996, s. 1039-1046.

## Rozdzielanie chromatograficzne acylowanych gomfrenin czerwonego szpinaku malabarskiego

### Streszczenie

Czerwony szpinak malabarski (*Basella alba* var. *rubra*) jest rośliną liściastą z rodziny wykwiklinkowatych. Potwierdzone badaniami właściwości prozdrowotne zawdzięcza bogatemu profilowi barwników, takich jak gomfreniny, które gromadzi w owocach. Gomfreniny to betacyjaniny, zaliczane do różowofioletowych betalain, wykazujące duży potencjał prozdrowotny, w tym antyoksydacyjny, zapobieganie hiperlipidemi, działanie chemoprewencyjne czy też udowodnioną aktywność cytotoksyczną przeciwko ludzkim komórkom raka szyjki macicy. Są to związki o potencjalnym zastosowaniu w przemyśle spożywczym, farmacji i medycynie.

Celem badań było opracowanie chromatograficznej metody izolowania acylowanych gomfrenin z owoców *B. rubra* pozwalającej w dalszym etapie na generowanie ich pochodnych o potencjalnych właściwościach prozdrowotnych. Rozdzielanie barwników przeprowadzono techniką chromatografii jonowymiennej i preparatywnej HPLC na kolumnie Merck C18 z elucją układem 0,5% HCOOH/acetone. W rezultacie wyizolowano barwniki, takie jak: 6-*O*-(6'-*O*-trans-kawo)- $\beta$ -glukozyd betanidyny, 6-*O*-(6'-*O*-trans-4-kumaro)- $\beta$ -glukozyd betanidyny. Wzbogacono również frakcje acylowanych pochodnych kwasu ferulowego i synapowego, oraz bardziej hydrofilnych diglukozylowanych-gomfrenin. Przeprowadzone badania pozwolą na efektywne pozyskiwanie acylowanych-gomfrenin w dalszych badaniach.

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr UMO-2017/27/B/NZ9/02831 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

Słowa kluczowe: betalainy, acylowane gomfreniny, *Basella alba* var. *rubra* L., HPLC, LC-MS

## Chromatographic separation of malabar spinach acylated gomphrenins

### Abstract

Red malabar spinach (*Basella alba* var. *rubra*) is a deciduous plant of the *Basellaceae* family. Its health-promoting properties are due to rich profile of dyes such as gomphrenin which accumulates in the fruits. Gomphrenins are betacyanins classified as pink-violet betalains with high health-promoting potential, including antioxidant, prevention of hyperlipidemia, chemopreventive activity as well as proven cytotoxic activity against human cervical cancer cells. Gomphrenins are compounds with potential applications in the food, pharmacy and medicine industries.

The aim of this research was to develop a chromatographic method for isolation of acylated gomphrenins from *B. rubra* fruits which at a later stage shall allow to generate their derivatives with potential health-promoting properties. The compound separation was performed by ion exchange and preparative HPLC on a Merck C18 column eluting with 0.5% HCOOH/acetone. As a result, the following dyes were isolated: betanidin 6-*O*-(6'-*O*-trans-caffeic)- $\beta$ -glucopyranoside, betanidin 6-*O*-(6'-*O*-trans-4-kumaro)- $\beta$ -glucopyranoside. The fractions of acylated ferulic and synapic acid derivatives as well as more hydrophilic diglucosylated gomphrenins were also enriched. Obtained results will enable effective acquisition of acylated-gomphrenins in further research.

This research was financed by Polish National Science Centre (Project No. UMO-2017/27/B/NZ9/02831).

Keywords: betalains, acylated gomphrenins, *Basella alba* var. *rubra* L., HPLC, LC-MS

# Konkurencyjność biosyntezy steroli i triterpenoidów w roślinach i kulturach *in vitro* w warunkach stresu biotycznego i abiotycznego

## 1. Wprowadzenie

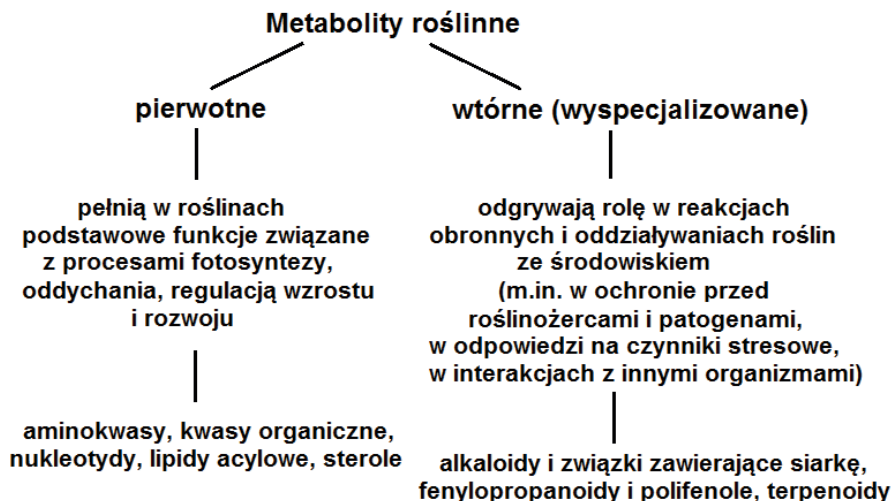
Charakterystyczną cechą roślin jest zdolność do syntezy, magazynowania we własnych tkankach lub wydzielania do środowiska różnorodnych substancji organicznych. Jako organizmy pozbawione możliwości przemieszczania się, a zatem typowych dla zwierząt reakcji agresji lub ucieczki, rośliny wytwarzają wiele z tych substancji w celach obronnych lub wymiany informacji w kontaktach z innymi organizmami w środowisku, czyli w różnych interakcjach ekologicznych. Metabolizm roślin stał się przez to niezwykle złożony i urozmaicony, a jego klasyfikacja trudniejsza i bardziej niejednoznaczna niż w przypadku innych organizmów żywych. Te związki, które pełnią istotne funkcje w procesach wzrostu i rozwoju roślin, są określane jako pierwotne (ang. *primary*), czyli podstawowe, a szlaki metaboliczne, na których powstają są częścią tzw. metabolizmu pierwotnego. Do metabolitów pierwotnych zaliczane są aminokwasy, kwasy organiczne, nukleotydy, lipidy acylowe i sterole, występują one u wszystkich roślin, a ich funkcje są jasno określone. Natomiast związki określane tradycyjnie jako metabolity wtórne (ang. *secondary*), należące do różnych grup chemicznych, nie są bezpośrednio zaangażowane w podstawowe procesy wzrostu i rozwoju, ich funkcje często nie są dobrze poznane i scharakteryzowane, a ich występowanie może być powszechne lub też ograniczone do poszczególnych grup taksonomicznych roślin [1, 2]. Metabolitom wtórnym przypisuje się rolę w obronie roślin przeciw roślinożercom i patogenom oraz wiele funkcji w oddziaływaniach środowiskowych: niektóre działają jako atraktanty dla zapylaczy i zwierząt roznoszących nasiona lub jako związki sygnałowe dla symbiotycznych bakterii tworzących brodawki korzeniowe u roślin motylkowatych (bobowatych); inne – jako czynniki allelopatyczne, czyli zaangażowane w oddziaływania między roślinami, są też takie, które mogą służyć jako ochrona tkanek rośliny przed nadmiernym promieniowaniem UV (rys. 1).

---

<sup>1</sup> a.rogowska@biol.uw.edu.pl, Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, <http://zbr.uw.edu.pl>.

<sup>2</sup> aleksandra.burdziej@biol.uw.edu.pl, Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, <http://zbr.uw.edu.pl>; Unité de Recherche Œnologie, Equipe Molécules d'Intérêt Biologique, Faculté de Sciences Pharmaceutiques, Université de Bordeaux, Villenave d'Ornon, France, <http://www.gesvab.u-bordeaux2.fr>.

<sup>3</sup> szakal@biol.uw.edu.pl, Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, <http://zbr.uw.edu.pl>.



Rysunek 1. Tradycyjny podział metabolitów roślinnych na pierwotne i wtórne ze względu na ich funkcję i budowę chemiczną. Źródło: [opracowanie własne]

Metabolity określane tradycyjnie jako wtórne często charakteryzują się bardzo interesującymi właściwościami fizyczno-chemicznymi i aktywnościami biologicznymi, od wieków były używane przez człowieka jako przyprawy, leki, perfumy, barwniki, oleje, woski, włókna, kleje czy polimery. Współcześnie poszukujemy wśród nich nowych leków do terapii onkologicznych, antybiotyków nowych generacji czy przyjaznych środowisku, biodegradowalnych insektycydów i herbicydów. Rośnie także znaczenie tych związków w diecie człowieka, gdyż przypisuje się im wiele właściwości prozdrowotnych, istotnych w profilaktyce chorób cywilizacyjnych [2].

## 2. Klasyfikacja metabolitów roślinnych

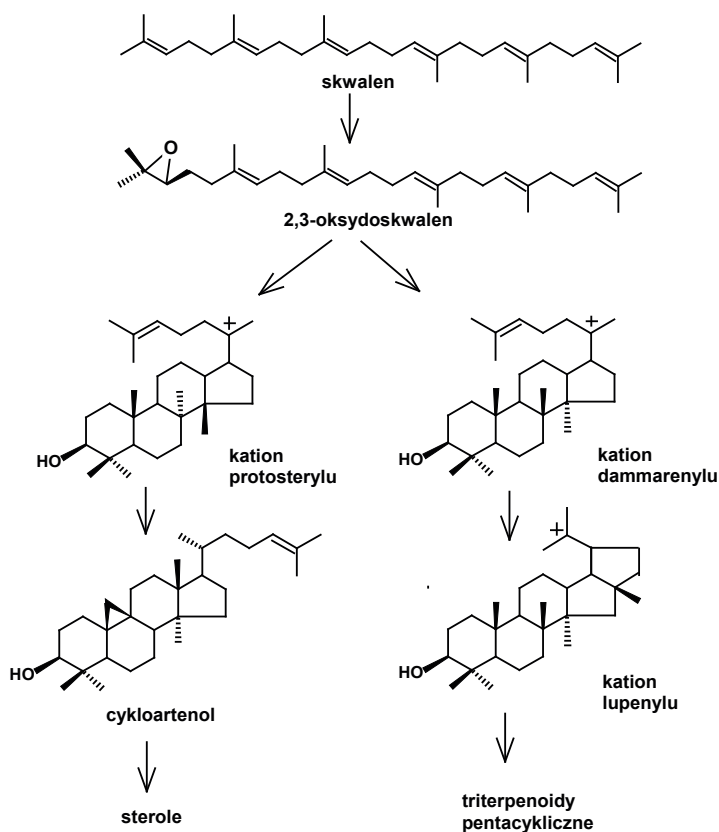
Po raz pierwszy wyraźnego podziału na metabolity pierwotne i wtórne dokonał niemiecki biochemik Albrecht Kossel w 1891 r. [3]. Choć od początku nie traktowano tego podziału jako doskonały i jednoznaczny, zdominował on kategoryzowanie metabolitów roślinnych na co najmniej 130 lat, bo i dziś, w początkach lat 20-tych XXI wieku, wciąż chętnie operujemy tymi pojęciami. Inne terminy, mimo wielu prób ich wprowadzania, akceptowane są niełatwo i wciąż raczej z trudem torują sobie drogę do publikacji i podręczników. Niektóre z proponowanych określeń mających zastąpić termin „metabolity wtórne” przedstawiono w tabeli 1. Nie wszystkie proponowane terminy doczekały się adekwatnych odpowiedników w języku polskim (np. „*ecochemicals*”), z kolei takie określenia jak „produkty naturalne” czy „fitozwiązki” nie kojarzą się jednoznacznie z metabolitami wtórnymi, gdyż mogą odnosić się do znacznie szerszych kategorii pojęciowych. Metabolity stresowe to z kolei pojęcie zbyt wąskie znaczeniowo (nie wszystkie metabolity wtórne mają związek ze stresem u roślin); tak więc jedynie określenia „metabolity specyficzne”, a zwłaszcza „wyspecjalizowane” wydają się oddawać znaczenie, które zwykliśmy przypisywać kategorii „roślinne metabolity wtórne”. W literaturze anglojęzycznej współcześni autorzy proponują stosowanie „specific” („*specialized*”) zamiast „secondary”, a „general” zamiast

„primary” [3]. Obserwując aktualną bibliografię naukową trudno jednak oprzeć się wrażeniu, że podział na metabolity „pierwotne” i wtórne” długo jeszcze pozostanie najpowszechniej używanym, akceptowanym i zrozumiałym sposobem określania substancji roślinnych.

Tabela 1. Niektóre określenia stosowane zamiennie do terminu „metabolity wtórne” [3].

Termin angielski	Termin polski	Autorzy, rok publikacji
<i>Phytochemicals</i>	Fitozwiązki	Harbourne J.B., 1973
<i>Stress metabolites</i>	Metabolity stresowe	Haard N.F., 1983
<i>Specific metabolites</i>	Metabolity specyficzne	Bennett J.W. i Bentley R., 1989; Frank J.M., 1998
<i>Natural products</i>	Produkty naturalne	Zhang L. i Demain A.L., 2005
<i>Ecochemicals</i>	-	Hartmann T., 2007
<i>Specialized metabolites</i>	Metabolity wyspecjalizowane	Chae L. i wsp., 2014

Nie znaczy to jednak, że ten powszechnie akceptowany podział nie nastrocza niejasności i nieścisłości. Problemy z klasyfikacją rozpoczynają się już na etapie biochemicznym, bo nie zawsze można wnioskować o przynależności do kategorii „pierwotny” czy „wtórny” na podstawie prekursorów, struktur chemicznych czy pochodzenia biosyntetycznego. Najczęściej metabolity wtórne dzieli się na trzy główne grupy – (i) fenylopropanoidy, związki fenolowe i polifenolowe, (ii) terpenoidy oraz (iii) alkaloidy (niebiałkowe związki azotowe) i związki zawierające siarkę. Terpenoidy powstają z difosforanu izopentenylu (IPP) na dwóch alternatywnych szlakach: kwasu mewalonowego (MVA) lub fosforanu metylo-erytrytolu (MEP), alkaloidy z aminokwasów lub zasad azotowych, związki fenolowe na szlaku szikimowym lub malonylo/octanowym [1, 2, 4]. Ale nie wszystkie związki należące do tych trzech grup są wyłącznie metabolitami wtórnymi. Klasycznym przykładem są terpenoidy, wśród których znajduje się wiele metabolitów pierwotnych (prekursory niektórych klas hormonów roślinnych, np. giberelin i brassinosteroidów, barwniki karotenoidowe, fragmenty cząsteczek niektórych przenośników elektronów, fitol, sterole). Wspólnym prekursorem „pierwotnych” steroli i pozostałych triterpenoidów (głównie pentacyklicznych), uznawanych z kolei za typowe metabolity wtórne, jest 30-węglowy liniowy węglowodór skwalen, zaś cyklizacja jego utlenionej pochodnej (2,3-oksydoskwalenu) uważana jest za jeden z najbardziej charakterystycznych punktów rozwidlenia (ang. *branch point*) metabolizmu pierwotnego i wtórnego (rys. 2) [5-7].



Rysunek 2. Rozwinięcie szlaków metabolizmu pierwotnego i wtórnego na przykładzie biosyntezy steroli i triterpenoidów. Źródło: [opracowanie własne]

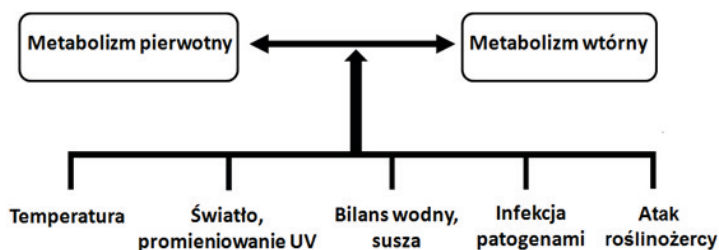
O etapach poprzedzających powstanie skwalenu obszernie pisano już poprzednio [4, 5]. Warto przypomnieć jedynie, że za podstawową cząsteczkę biosyntetyczną uważany jest difosforan izopentenyłu (IPP), ulegający izomeryzacji do difosforanu dimetyloallilu (DMAPP). Choć jest wiele dowodów na współpracę (ang. *cross-talk*) cytoplazmatycznego szlaku kwasu mewalonowego (MVA) i plastydowego szlaku fosforanu metylo-erytrytolu (MEP), uważa się, że w normalnych warunkach fizjologicznych większość IPP do biosyntezy skwalenu pochodzi ze szlaku MVA. Połączenie IPP i DMAPP w orientacji „głowa-ogon” (ang. „*head to tail*”) prowadzi do 10-węglowego difosforanu geranylu (GPP), a jego kondensacja z kolejną cząsteczką IPP umożliwia powstanie 15-węglowego difosforanu farnesyłu (FPP). Dwie cząsteczki difosforanu farnesyłu, łącząc się ze sobą w orientacji „ogon-ogon” (ang. „*tail to tail*”), tworzą alifatyczny związek zbudowany z 30 atomów węgla – skwalen. Ta reakcja jest katalizowana przez syntazę skwalenu SQS (ang. *squalene synthase*). Cyklizację skwalenu poprzedza jego utlenienie do 2,3-oksydoskwalenu przy udziale epoksydazy skwalenowej SQE (ang. *squalene epoxidase*).

Jak wspomniano wcześniej (rys. 2) cyklizacja 2,3-oksydoskwalenu jest punktem rozgałęzienia szlaku, prowadzącym albo do steroli, albo do triterpenoidów. Prekursorem steroli u roślin wyższych jest cykloartenol, powstający z 2,3-oksydoskwalenu przy udziale syntazy cykloartenolu CAS (ang. *cycloartenol synthase*). Z cykloartenolu powstają sterole roślinne, m.in. kampesterol, sitosterol, stigmasterol i wiele innych, gdyż jedna roślina syntetyzuje z reguły dość złożoną mieszaninę steroli [5]. Wspecjalizowane triterpenoidy policykliczne (tri-, tetra-, a najczęściej pentacykliczne) powstają w wyniku cyklizacji oksydoskwalenu katalizowanej przez wiele cyklaz (OSCs, ang. *oxidosqualene cyclases*) o różnej specyficzności i nie zawsze dobrze scharakteryzowanych [4,6].

W ogólnej, klasycznej klasyfikacji terpenoidów zarówno sterole, jak i triterpenoidy zaliczane są tradycyjnie do jednej, wspólnej grupy triterpenoidów, czyli pochodnych 30-węglowego skwalenu. Jednak coraz więcej biochemików zwraca uwagę na potrzebę zdecydowanego rozróżnienia tych związków, argumentując, że za tym podziałem przemawia nie tylko odrębna rola fizjologiczna (czyli dyskutowany w tym artykule podział na metabolity pierwotne i wyspecjalizowane), ale także rozdzielający się szlak biosyntetyczny i odmienny przebieg cyklizacji. Cyklizacja 2,3-oksydoskwalenu do cykloartenolu i pochodnych steroli zachodzi w konformacji pierścieni typu CBCB, czyli krzesło-łódka-krzesło-łódka (ang. *chair-boat-chair-boat*), podczas gdy cyklizacja triterpenoidów wyspecjalizowanych zachodzi w innych konformacjach: np. węglowe szkielety typu oleananu i ursanu powstają w konformacji CCCBB, szkielety typu fermanu w konformacji CCCCCB, a hopanu CCCCC [8].

### 3. Konkurencyjność metabolizmu pierwotnego i wtórnego w odpowiedzi roślin na warunki stresowe

Czynniki zewnętrzne – zarówno abiotyczne (światło, promieniowanie UV, temperatura, dostępność wody, żyzność i zasolenie gleby), jak i biotyczne (atak roślinożercy, infekcja patogenem) – wpływają na procesy związane ze wzrostem i rozwojem rośliny, często w znaczącym stopniu modyfikując jej metabolizm (rys. 3) [9]. Częścią odpowiedzi roślin na czynniki stresowe jest wzrost syntezy i nagromadzenie w tkankach znacznych ilości metabolitów wtórnych o charakterze obronnym. Taka stymulacja szlaków metabolizmu wtórnego często odbywa się kosztem metabolizmu pierwotnego (klasyczny dylemat metaboliczny roślin: „rosnąć czy się bronić”). Następuje zatem przekierowanie przepływu materii i energii w stronę metabolizmu wtórnego, co może skutkować czasowym zahamowaniem wzrostu rośliny połączonym ze wzrostem produkcji substancji bioaktywnych.

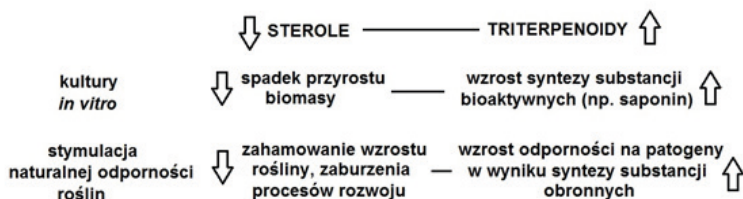


Rysunek 3. Konkurencyjność metabolizmu pierwotnego i wtórnego pod wpływem czynników środowiskowych. Źródło: [opracowanie własne]

Konsekwencje zmian metabolicznych wywołanych w roślinach przez abiotyczne czynniki środowiskowe mogą stać się szczególnie widoczne w warunkach zmieniającego się klimatu. Trudno jest teraz jednoznacznie wyrokować, czy potencjalne przesunięcie aktywności metabolicznej w stronę szlaków metabolizmu wyspecjalizowanego spowoduje trwałe podwyższenie zawartości substancji obronnych w roślinach, jednocześnie wpływając hamująco na ich normalne procesy wzrostu, rozwoju, dojrzewania owoców i nasion. Przeprowadzone dotychczas eksperymenty są na ogół niemiernodajne, gdyż były zbyt krótkotrwałe, a przy tym najczęściej dotyczyły tylko jednego czynnika (podczas gdy w środowisku czynniki abiotyczne działają jednocześnie, np. wzrostowi nasłonecznienia towarzyszy wzrost temperatury i susza). Sieć szlaków metabolizmu pierwotnego i wtórnego, a także ich wzajemnych zależności jest na tyle złożona, że efekty synergicznego działania wielu czynników środowiskowych są trudne do przewidzenia. Przykładowo – oczekiwany wzrost biosyntezy konkretnych substancji bioaktywnych, podnoszący jakość danej rośliny leczniczej jako surowca zielarskiego, może wcale nie nastąpić pod wpływem określonych czynników stresowych, gdyż w wyniku stymulacji innego szlaku metabolicznego nagromadzone będą substancje innego rodzaju niż te pożądane [9].

#### **4. Konkurencyjność biosyntezy steroli i triterpenoidów w warunkach stresu**

Konkurencyjność szlaków biosyntezy „pierwotnych” steroli i „wtórnych” triterpenoidów ujawniająca się w warunkach stresu (a ściślej – podczas metabolicznej odpowiedzi indukowanej w komórkach roślinnych bezpośrednio przez czynniki stresowe lub pośrednio przez mediatory zaangażowane w sygnalizowanie reakcji stresowych) może mieć szczególne znaczenie w próbach stymulacji produktywności kultur *in vitro* czy indukcji naturalnej odporności roślin w rolnictwie ekologicznym. W obu tych przypadkach przekierowanie strumienia metabolitów w stronę metabolizmu „wyspecjalizowanego” może skutkować czasowym zahamowaniem normalnych procesów wzrostu, wymagających syntezy steroli niezbędnych do budowy błon w dzielących się komórkach. W przypadku kultur *in vitro*, potencjalny niewielki spadek przyrostu biomasy przy istotnym wzroście syntezy pożądanych substancji bioaktywnych nie wydaje się jednak zjawiskiem negatywnym. Natomiast w przypadku stymulacji naturalnych reakcji obronnych roślin uprawnych (strategii stosowanej w nowoczesnym rolnictwie ekologicznym, mającej prowadzić do zwiększenia odporności na patogeny i zmniejszenia ilości używanych pestycydów), towarzyszące zwiększeniu syntezy metabolitów wyspecjalizowanych zahamowanie normalnych procesów wzrostu i rozwoju rośliny byłoby zjawiskiem niepożądanym (rys. 4).



Rysunek 4. Konsekwencje współzawodnictwa szlaków biosyntezy steroli i triterpenoidów dla produktywności kultur *in vitro* oraz w strategii stymulacji naturalnej odporności roślin.

Źródło: [opracowanie własne]

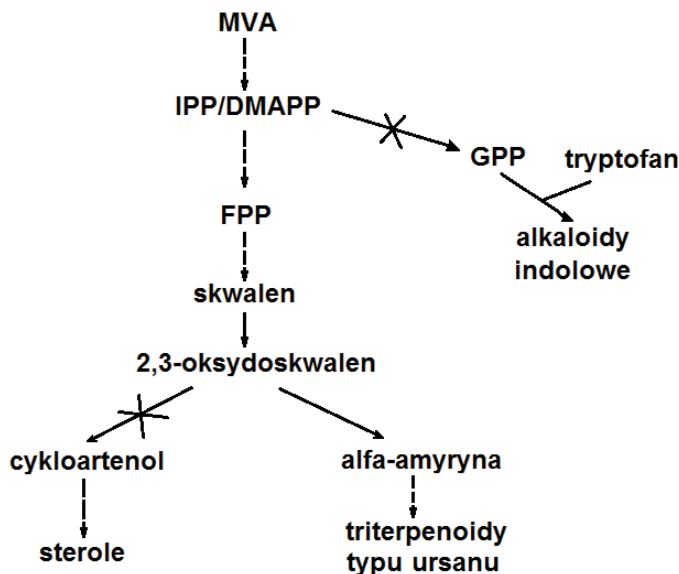
## 5. Współzawodnictwo biosyntezy steroli i triterpenoidów w roślinnych kulturach *in vitro*

Jednym z pierwszych dobrze udokumentowanych doniesień o konkurencyjności szlaków biosyntezy steroli i triterpenoidów – jako zjawisku obserwowanym w kulturach *in vitro* – była opublikowana w roku 1989 r. praca dotycząca kultur zawieszinowych *Tubernaemontana divaricata* (L.) R. Br. ex Ruem. et Schult. [10]. *T. divaricata* jest zimozielonym krzewem występującym naturalnie w Indiach (obecnie uprawianym w wielu rejonach północno-wschodniej Azji), znanym jako roślina lecznicza syntetyzująca monoterpeneoidowe alkaloidy indolowe. Otrzymane linie zawieszinowych kultur *in vitro* tej rośliny poddano działaniu preparatem otrzymanym z *Candida albicans* w celu stymulacji syntezy alkaloidów. Stosowanie abiotycznych i biotycznych czynników zewnętrznych, mające na celu stymulację wytwarzania substancji obronnych jest w biotechnologii znane jako elicytacja [11]. Jest to strategia powszechnie stosowana, gdyż większość roślinnych kultur *in vitro* nie wytwarza pożądaných metabolitów wyspecjalizowanych (lub wytwarza je w zbyt małych ilościach). Ponieważ elicytory to czynniki stresowe lub mediatory reakcji stresowych, mogą one doprowadzić do ujawnienia się konkurencyjności szlaków metabolizmu pierwotnego i wtórnego.

Zastosowanie elicytora grzybowego w kulturach zawieszinowych *T. divaricata* przyniosło niespodziewane rezultaty: zamiast oczekiwanego wzrostu nagromadzenia alkaloidów zaobserwowano stymulację biosyntezy triterpenoidów wyspecjalizowanych (głównie pochodnych  $\alpha$ -amyryny, czyli związków typu ursanu) przy jednoczesnym zahamowaniu przyrostu biomasy kultury o około 50%. Zidentyfikowane w elicytowanej kulturze związki triterpenoidowe nie występowały w kulturach kontrolnych, a zaobserwowanemu pięciokrotnemu wzrostowi aktywności enzymatycznej epoksydazy skwalenowej (SQE) nie towarzyszył wzrost zawartości steroli. W celu potwierdzenia tak zaskakujących wyników wykonano szereg doświadczeń, podając kulturom znakowane radioaktywnymi izotopami prekursorzy szlaku biosyntezy terpenoidów:  $[1-^{14}\text{C}]\text{IPP}$ ,  $[1-^3\text{H}_2]\text{FPP}$  i  $[2-^{14}\text{C}]\text{MVA}$ . Wykazano, że znakowanie z podanych prekursorów włącza się w kulturach kontrolnych (nieelicytowanych) głównie do skwalenu, a następnie w mniejszym stopniu do cykloartenolu i 4-demetylosteroli. W kulturach elicytowanych znakowanie odnajdywano głównie w triterpenoidach pentacyklicznych, zaś radioaktywność włączona do steroli była



znikoma. Badacze stwierdzili, że zastosowanie elicytora grzybowego z *C. albicans* w kulturach *T. divaricata* powoduje znaczącą stymulację syntezy wyspecjalizowanych triterpenoidów pentacyklicznych, przy równoczesnym hamowaniu syntezy zarówno monoterpenoidowych alkaloidów indolowych, jak i steroli, a co za tym idzie – przyrostu biomasy kultury (rys. 5). Zastosowanie tego elicytora ujawniło zatem nie tylko konkurencyjność szlaków biosyntezy steroli i triterpenoidów wyspecjalizowanych, ale także zahamowanie oczekiwanego wytwarzania alkaloidów, potwierdzając tezę, że nie wszystkie czynniki stresowe mogą być użyteczne do stymulowania produkcji określonych metabolitów w roślinach i kulturach *in vitro*.



Rysunek 5. Metaboliczne konsekwencje zastosowania elicytora grzybowego w kulturach zawieszinowych *Tubernaemontana divaricata*: zahamowanie biosyntezy alkaloidów i steroli przy jednoczesnej stymulacji biosyntezy triterpenoidów pentacyklicznych. Objasnienia skrótów w tekście (rodział 2). Źródło: Opracowanie własne na podstawie [10]

Doświadczenia polegające na śledzeniu konkurencyjnych szlaków biosyntezy steroli i triterpenoidów po podaniu znakowanych prekursorów przeprowadzono także na kulturach *in vitro* lukrecji gładkiej *Glycyrrhiza glabra*, uzyskiwanych w celu wytwarzania znanej saponiny o wielu właściwościach farmakologicznych – glicyryzyny [12]. Glizyryzyna jest gromadzona w korzeniach lukrecji, tak więc bylina ta została w znacznym stopniu wytępiona w swoich naturalnych siedliskach w środkowej i zachodniej Azji. Stosując znakowanie przy użyciu prekursorów: [1-<sup>14</sup>C]octanu i [2-<sup>14</sup>C]MVA zbadano włączanie radioaktywności do metabolitów powstających na obu konkurencyjnych szlakach: zwłaszcza do cykloartenolu jako prekursora steroli i β-amyriny jako prekursora triterpenoidów typu oleananu. Wykazano, że dynamika włączania znakowania [<sup>14</sup>C] z prekursorów zależała w dużym stopniu od rodzaju kultury – w kulturach kalusowych lepiej były znakowane sterole,

a w korzeniach włośnikowatych – triterpenoidy pentacykliczne, głównie  $\beta$ -amyryna. Badacze stwierdzili, że gen kodujący enzym katalizujący pierwszą reakcję prowadzącą do steroli, czyli syntazę cykloartenolu (CAS) ulega ekspresji we wszystkich tkankach rośliny macierzystej oraz we wszystkich wyprowadzonych kulturach *in vitro*, natomiast ekspresja genów kodujących enzymy związane z biosyntezą triterpenoidów jest tkankowo-specyficzna, gdyż ma miejsce tylko w niektórych tkankach rośliny oraz wymaga kultur o pewnym stopniu uorganizowania tkanek, np. korzeni włośnikowatych. Po zastosowaniu inhibitora syntazy CAS Autorom udało się uzyskać wzrost znakowania  $\beta$ -amyryny i glicyryzyny w korzeniach włośnikowatych *G. glabra*, w badaniach tych nie zastosowali oni jednak żadnego elicytora do stymulacji produkcji triterpenoidów.

Wiele kolejnych eksperymentów przeprowadzonych w celu podniesienia produktywności kultur *in vitro* różnych roślin syntetyzujących triterpenoidy wyspecjalizowane, a szczególnie saponiny triterpenoidowe, potwierdziło koncepcję o ujawniającej się pod wpływem elicytorów konkurencyjności szlaków steroli i triterpenoidów. Kultura zawieszinowa komórek *Uncaria tomentosa* (liany występującej w Ameryce Południowej i Środkowej, znanej pod nazwami „koci pazur” czy „vilcacora”) wykazała znaczący wzrost biosyntezy triterpenoidowych kwasów o szkieletie oleananu i ursanu po traktowaniu pektyną i innymi elicytorami grzybowymi (np. *Trichoderma* spp., *Alternaria tenuis*) [13]. Podanie elicytowanej kulturze zawieszinowej *U. tomentosa* radioaktywnego prekursora, [5-<sup>3</sup>H]MVA, ujawniło „przekierowanie” znakowania w stronę szlaku triterpenoidów, podczas gdy w nieelicytowanej kulturze kontrolnej to sterole były lepiej znakowaną grupą związków. Preferencyjna produkcja triterpenoidów kosztem biosyntezy steroli została również zaobserwowana w kulturach transformowanych korzeni przewiercienia sierpowatego (*Bupleurum falcatum*) poddanych elicytacji jasmonianem metylu (MeJA) [14]. Przewiercień sierpowaty jest jedną z najważniejszych roślin leczniczych stosowanych w ziołolecznictwie azjatyckim, korzeń tej byliny zawiera saponiny triterpenoidowe typu oleananu zwane saikosaponinami. Pod wpływem MeJA w kulturach korzeni *B. falcatum* nastąpiła nadprodukcja saikosaponin oraz zahamowanie biosyntezy steroli. W wyniku badania ekspresji genów w elicytowanych korzeniach potwierdzono akumulację transkryptów syntazy skwalenu, epoksydazy skwalenu i syntazy  $\beta$ -amyryny przy jednoczesnej redukcji akumulacji mRNA syntazy cykloartenolu.

Roślinne kultury *in vitro*, oprócz ich różnorodnych zastosowań biotechnologicznych, mogą służyć jako dobry model eksperymentalny do badań modyfikacji metabolicznych zachodzących pod wpływem czynników stresowych, gdyż obserwacje można prowadzić w ściśle kontrolowanych warunkach, a efekty są widoczne szybciej niż w całych roślinach, są intensywniejsze i można je łatwiej monitorować. Wykorzystując kultury korzeni włośnikowatych nagietka lekarskiego *Calendula officinalis*, mających zdolność biosyntezy i sekrecji do pożywki saponin kwasu oleanolowego, wykonano szereg eksperymentów nad wpływem czynników biotycznych i abiotycznych na produkcję saponin I konkurencyjność szlaków biosyntezy steroli i triterpenoidów [7, 15]. Wykazano, że najbardziej efektywnym elicytorem był kwas jasmonowy, który po 7 dniach od elicytacji zwiększył zarówno nagromadzenie saponin w tkankach korzeni włośnikowatych (20-krotnie w porównaniu do nieelicytowanej kontroli)

jak i sekrecję saponin na zewnątrz (ponad 100-krotnie), natomiast jednocześnie wywołał niewielki spadek biomasy korzeni i zahamowanie biosyntezy steroli (o 60%). Z kolei elicytor grzybowy, chitozan, spowodował jedynie niewielki wzrost biosyntezy saponin, jednocześnie stymulując prawie o 20% biosyntezę steroli [7]. Tak więc nie wszystkie elicytory biotyczne, a zwłaszcza grzybowe, wywołują takie same modyfikacje metaboliczne w kulturach *in vitro* różnych roślin; elicytory uzyskane z *C. albicans*, *Trichoderma* spp. i *Alternaria tenuis* w kulturach *T. divaricata* i *U. tomentosa* stymulowały biosyntezę triterpenoidów kosztem steroli, natomiast chitozan zastosowany w kulturach korzeni włósnikowatych *C. officinalis* wywołał efekt odwrotny. Testowane elicytory abiotyczne (jony kadmu i srebra, ultradźwięki, promieniowanie UV) nie wywarły aż tak jednoznacznego wpływu na współzawodnictwo szlaków biosyntezy saponin i steroli, najsilniej oddziaływały jony metali ciężkich, stymulując (12-krotnie) biosyntezę i sekrecję saponin, ale równocześnie zaburzając metabolizm steroli, co w efekcie doprowadziło do znacznych modyfikacji ich składu [15].

Kwas jasmonowy okazał się najbardziej efektywnym elicytorem biosyntezy saponin w kulturach korzeni włósnikowatych nagietka lekarskiego *C. officinalis*, jednak jego działanie obserwowano po relatywnie krótkim, 7-dniowym okresie inkubacji [7]. Aby prześledzić konsekwencje współzawodnictwa szlaków biosyntezy triterpenoidów i saponin w dłuższym okresie czasu, zastosowano metodę znakowania prekursorem [2-<sup>14</sup>C]MVA i zbadano dynamikę włączania radioaktywności do obu grup związków w ciągu 1, 2, 3 i 4 tygodni. Jak oczekiwano, po pierwszym tygodniu trwania eksperymentu poziom włączania znakowanego węgla do saponin był kilkakrotnie wyższy niż w nieelicytowanej kontroli, zaś znakowanie steroli mniejsze o około 20%. Jednak w kolejnych tygodniach trwania eksperymentu tendencja ta nie utrzymała się – zaobserwowano, że włączanie radioaktywnego węgla w kulturach elicytowanych było zwiększone zarówno we frakcji saponin, jak i steroli. Obserwacje te mogą sugerować, że ujawnienie się konkurencyjności szlaków zachodzi dość gwałtownie w krótkim czasie po zadziałaniu bodźca (elicytora), a wraz z upływem czasu efekt ten słabnie i równowaga między metabolizmem pierwotnym i wtórnym zostaje stopniowo przywrócona [16]. Trzeba jednak zaznaczyć, że kultury *in vitro* są modelem doświadczalnym, który nie odzwierciedla stopnia złożoności szlaków metabolicznych i procesów zachodzących w całej roślinie. Ponadto dodatek znakowanego kwasu mewalonowego może powodować szybsze wygaszenie współzawodnictwa szlaków ze względu na stałą dostępność prekursora, w takiej sytuacji dalsze „przekierowywanie” strumienia metabolitów może nie zachodzić.

## 6. Współzawodnictwo biosyntezy steroli i triterpenoidów w roślinach

Elicytacja jest także ważnym elementem nowych strategii w alternatywnych metodach stosowanych w rolnictwie w celu ograniczenia ilości używanych pestycydów [17]. Strategia ta opiera się na wyzwoleniu reakcji obronnych roślin poprzez użycie czynników zdolnych do stymulowania specyficznych mechanizmów obrony związanych ze stresem oraz do rozwijania odporności rośliny na kolejne ataki patogenów. Rolę elicytorów (lub też stymulatorów naturalnej obrony, ang. *natural defense stimulators*, NDS) mogą pełnić wyodrębnione i oczyszczone cząsteczki pochodzenia naturalnego lub całe ekstrakty z roślin, mikroorganizmy, sole nieorganiczne. Na przykład w alternatywnych metodach ochrony upraw winorośli

wykazano skuteczność takich elicytorów, jak rhamnolipidy bakteryjne, chitozan czy polimer  $\beta$ -1,3-glukanów (laminaryna) [18, 19]. Elicytorami mogą być również hormony roślinne o charakterze regulatorów wzrostu i rozwoju, które jednocześnie stanowią mediatory reakcji stresowych u roślin, przede wszystkim kwas salicylowy (SA) i wspomniany już kwas jasmonowy (JA) oraz ich estry metylowe (MeSA, MeJA). W celu wprowadzenia strategii elicytacji do upraw rolniczych konieczne jest nie tylko zbadanie skuteczności danej substancji jako stymulatora naturalnej odporności, ale również jej wpływ na różne szlaki metaboliczne, w tym konkurencyjność szlaków steroli i triterpenoidów wyspecjalizowanych. Zaburzenia w metabolizmie pierwotnym nie są pożądanym efektem elicytacji, ponieważ mogą one rzutować na ogólną kondycję uprawianej rośliny, a w konsekwencji na jakość plonów i uzyskiwanych z nich produktów. Zatem modyfikacje metabolizmu steroli, mogące powodować zaburzenia wzrostu i normalnego rozwoju rośliny, są ważnym aspektem, który należy brać pod uwagę przy ocenie atywności potencjalnych elicytorów.

We wstępnych badaniach poświęconych możliwości zastosowania metody stymulacji naturalnej odporności w uprawie winorośli odmiany *Cabernet Sauvignon*, po 7 dniach od elicytacji liści jasmonianem metylu (MeJA) wykazano gwałtowny spadek zawartości steroli oraz zmianę profilu triterpenoidów wyspecjalizowanych (spadek zawartości  $\beta$ -amyryny i typowego dla winorośli alkoholu triterpenoidowego, tarakserolu oraz równoczesną stymulację biosyntezy  $\alpha$ -amyryny i lupeolu). Jednocześnie w liściach nieelicytowanych nastąpił znaczny wzrost biosyntezy i akumulacji steroli, w przypadku najstarszych liści ponad dwukrotny. Zatem, podczas gdy nieelicytowane liście wciąż rosły (a w każdym razie potrzebowały steroli do budowy systemów błon w swoich komórkach), w liściach poddanych elicytacji nastąpiło zahamowanie szlaków biosyntezy związanych nie tylko z metabolizmem pierwotnym (steroli), ale także dominujących dotychczas triterpenoidów pentacyklicznych (tarakserolu i  $\beta$ -amyryny). Po 14 dniach od elicytacji poziom steroli w liściach wciąż był niższy od kontrolnego, ale zawartość triterpenoidów wyspecjalizowanych zaczęła wyraźnie wzrastać. Po 21 dniach efekt elicytacji zaczynał słabnąć, biosynteza triterpenoidów pentacyklicznych spadła, zaś steroli zaczęła powoli rosnąć [20]. Uzyskane wyniki wskazały, że po zastosowaniu elicytacji w roślinach mogą nastąpić zaburzenia metabolizmu związane z konkurencyjnością szlaków biosyntezy i przesunięciem równowagi między metabolizmem pierwotnym i wtórnym. Potwierdziły to szczegółowe badania metabolomiczne obrazujące wpływ elicytorów na biosyntezę różnych klas związków: cukrów, kwasów organicznych, aminokwasów i polifenoli w liściach winorośli [21].

Analogicznie do biotechnologicznych prób podniesienia produktywności kultur *in vitro*, elicytacja jest stosowana także w celu podwyższenia zawartości bioaktywnych saponin w całych roślinach leczniczych, używanych jako surowiec zielarski. Efekt elicytacji MeJA na zawartość steroli i triterpenoidów został zbadany w częściach nadziemnych (zielu) i korzeniach kilku znanych roślin leczniczych: wąkroty azjatyckiej (*Centella asiatica*), myszopłochu kolczastego (*Ruscus aculeatus*) i *Galphimia glauca* [22]. Rośliny te wytwarzają różne metabolity wyspecjalizowane: saponiny triterpenoidowe typu ursanu zwane centelozydami (*C. asiatica*), saponiny steroidowe typu spirostanu, pochodne ruscogeniny (*R. aculeatus*) i nie tworzące saponin

triterpenoidy typu friedelanu (*G. glauca*). Prekursorem saponin steroidowych jest cholesterol, związek powstający z cykloartenolu, zatem związki te, w przeciwieństwie do saponin triterpenoidowych, powstają na szlaku biosyntezy steroli. Elicytacja za pomocą MeJA wywołała u wszystkich tych roślin bardzo wyraźną konkurencyjność szlaków biosyntezy steroli i triterpenoidów. Zawartość triterpenoidów typu friedelanu u *G. lauca* i centelozydów u *C. asiatica* znacząco wzrosła pod wpływem MeJA (w przypadku centelozydów ponad 150-krotnie), jednocześnie jednak nastąpiło zahamowanie wzrostu roślin i obniżenie zawartości steroli. Zawartość saponin steroidowych u *R. aculeatus* nie zwiększyła się po elicytacji MeJA w częściach nadziemnych tej rośliny, zaś w korzeniach była nawet niższa niż w roślinach nieelicytowanych, ponadto – podobnie jak w przypadku *G. lauca* i *C. asiatica* – zaobserwowano też zahamowanie wzrostu roślin. Eksperyment prowadzono przez 4 tygodnie i wykazano, że w roślinach efekt konkurencyjności szlaków biosyntezy steroli i triterpenoidów narasta stopniowo i jest wyraźnie widoczny przez długi okres czasu, tak więc zjawisko współzawodnictwa szlaków metabolizmu pierwotnego i wtórnego może mieć różny przebieg w kulturach *in vitro* i roślinach natywnych. Trzeba jednak zaznaczyć, że eksperyment nie był prowadzony w warunkach polowych, badane rośliny rosły na pożywcze z dodatkiem elicytora i zostały poddane jego stałemu wpływowi, a więc takie warunki nie mogą być zastosowane jako wspomniana wcześniej strategia stymulacji naturalnej odporności w rolnictwie.

## 7. Podsumowanie

Modyfikacje metaboliczne są jedną z reakcji roślin na działanie czynników stresowych. Niektóre z nich, zwłaszcza te prowadzące do syntezy specyficznych substancji obronnych, wymagają zahamowania typowych procesów metabolizmu podstawowego (tzw. pierwotnego) i aktywacji szlaków tzw. metabolizmu wtórnego. Charakterystycznym punktem rozgałęzienia metabolizmu pierwotnego i wtórnego jest cyklizacja 2,3-oksydoskwalenu, wspólnego prekursora steroli i triterpenoidów. Sterole są niezbędnymi składnikami błon komórkowych i czynnikami regulującymi ich płynność i przepuszczalność, służą także jako prekursory jednej z grup hormonów roślinnych – brassinosteroidów, tak więc uważane są za metabolity pierwotne, których biosynteza jest w roślinach konstytutywna. Triterpenoidy są typowymi metabolitami wtórnymi, którym przypisuje się funkcje związane z oddziaływaniami rośliny ze środowiskiem, w tym funkcje obronne. W warunkach niektórych stresów biotycznych i abiotycznych szlaki biosyntezy steroli i triterpenoidów stają się konkurencyjne, a wzmóżona biosynteza metabolitów wtórnych odbywa się kosztem metabolitów pierwotnych. Wykazano, że niektóre mediatory reakcji stresowych u roślin, np. kwas jasmonowy i jego ester metylowy, mogą być wykorzystane jako efektywne elicytory do zwiększenia produktywności kultur *in vitro* lub indukcji naturalnej odporności roślin w rolnictwie ekologicznym. Sieć szlaków metabolizmu pierwotnego i wtórnego oraz ich wzajemnych zależności w roślinach jest jednak bardzo skomplikowana i opracowanie efektywnych strategii stymulacji syntezy metabolitów obronnych u roślin wymaga wielu dalszych badań.

## Podziękowania

Artykuł cytuje wyniki uzyskane w ramach projektów sfinansowanych z funduszy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego na badania naukowe służące rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich, finansowane w wewnętrznym trybie konkursowym dla Wydziału Biologii UW, DSM nr 2019 501-D114-01-1140100 (Agata Rogowska, Ocena dynamiki zmian metabolizmu triterpenoidów w kulturach *in vitro* korzeni włośnikowatych nagietka lekarskiego *Calendula officinalis* elicytowanych kwasem jasmonowym prowadzona za pomocą znakowania radioaktywnym kwasem  $^{14}\text{C}$ -mewalonowym) i DSM nr 2017 501-D114-86-0115000-06 (Aleksandra Burdziej, Wpływ elicytacji jasmonianem metylu na metabolizm steroli i triterpenoidów pentacyklicznych w liściach winorośli właściwej *Vitis vinifera*).

## Literatura:

1. Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G., *Natural Products (Secondary Metabolites)*, [w:] Buchanan R.B., W., Jones R.L. (red), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA 2000, s. 1250-1315.
2. Crozier A., Clifford M.N., Ashikara H., *Plant Secondary Metabolites*, Blackwell Publishing, Oxford, UK 2006.
3. Komives T., *Metabolomics – what nomenclature to use?*, *Ecocycles*, 3, 2017, s. 1-2.
4. Rogowska A. *Terpenoidy – biosynteza i rola w oddziaływaniach ze środowiskiem*, [w:] Danielewska A., Maciąg K. (red.), *Wybrane właściwości roślin – najnowsze doniesienia*, Wydawnictwo Naukowe Tygiel, Lublin 2019, s. 54-64.
5. Rogowska A., *Sterole roślinne – budowa, biosynteza i występowanie*, [w:] Danielewska A., Maciąg K. (red.), *Wybrane właściwości roślin – najnowsze doniesienia*, Wydawnictwo Naukowe Tygiel, Lublin 2019, s. 278-286.
6. Moses T., Pollier J., Thevelein J.M., Goossens A., *Bioengineering of plant triterpenoids: from metabolic engineering of plants to synthetic biology in vivo and in vitro*, *New Phytologist* 200, 2013, s. 27-43.
7. Alsoufi A.S.M., Pączkowski C., Szakiel A., Długosz M., *Effect of jasmonic acid and chitosan on triterpenoid production in Calendula officinalis hairy root cultures*, *Phytochemistry Letters* 31, 2019, s. 5-11.
8. Volkman J.K., *Sterols and other triterpenoids: source specificity and evolution of biosynthetic pathways*, *Organic Chemistry* 36, 2005, s. 139-159.
9. Yang L., Wen K.S., Ruan X., Zhao Y.X., Wei F., Wang Q., *Response of plant secondary metabolites to environmental factors*, *Molecules*, 23, 2018, s. 762.
10. Van der Heijden R., Threlfall D.R., Verpoorte R., Whitehead I.M., *Regulation and enzymology of pentacyclic triterpenoid phytoalexin biosynthesis in cell suspension cultures of Tabernaemontana divaricata*, *Phytochemistry*, 28, 1989, s. 2981-2988.
11. Patel H., Krishnamurthy R., *Elicitors in plant tissue culture*, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2, 2013, s. 60-65.
12. Ayabe S., Takano H., Fujita T., Furuya T., Hirota H., Takahashi T., *Triterpenoid biosynthesis in tissue cultures of Glycyrrhiza glabra var. glaudulifera*, *Plant Cell Reports* 9, 1990, s. 181-184.
13. Flores-Sánchez I.J., Ortega-López J., del Carmen Montes-Horcasitas M., Ramos-Valdivia A.C., *Biosynthesis of sterols and triterpenes in cell suspension cultures of Uncaria tomentosa*, *Plant Cell Physiology* 43, 2002, s. 1502-1509.
14. Kim Y.S., Cho J.H., Park S., Han J.Y., Back K., Choi Y.E., *Gene regulation patterns in triterpene biosynthetic pathway driven by overexpression of squalene synthase and methyl jasmonate elicitation in Bupleurum falcatum*, *Planta*, 233, 2011, s. 343-355.
15. Alsoufi A.S.M., Pączkowski C., Długosz M., Szakiel A., *Influence of selected abiotic factors on triterpenoid biosynthesis and saponin secretion in marigold (Calendula*

- officinalis* L.) *in vitro* hairy root cultures, Special Issue: Plant Isoprenoids, Molecules 24, 2019, s. 2907.
16. Rogowska A., Szakiel A., *Tracer method (<sup>14</sup>C-labelling) for investigating the metabolic flux pattern in triterpenoid biosynthetic pathway in Calendula officinalis hairy roots after elicitation with jasmonic acid*, Trends in Natural Product Research – PSE Young Scientists Meeting on Biochemistry, Molecular Aspects and Pharmacology of Bioactive Natural Products, Budapeszt, Węgry, Book of Abstracts, 2019, s. 71.
  17. Klarzynski O., Fritig B., *Stimulation of plant natural defenses*, Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, 324, 2001, s. 953963.
  18. Varnier A.L., Sanchez L., Vatsa P., Boudesocque L., Garcia-Brugger A., Rabenoelina F., Sorokin A., Renault J. H., Kauffmann S., Pugin A., Clement C., Baillicul F., Dorey S., *Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to Botrytis cinerea in grapevine*, Plant Cell Environment, 32, 2009, s. 178193.
  19. Aziz A., Trotel-Aziz P., Dhuiqcq L., Jeandet P., Couderchet M., Vernet G. *Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew*, Phytopathology, 96, 2006, s. 11881194.
  20. Burdziej A., Chojak M., Pączkowski C., Cluzet S., Szakiel A., *Metabolism of sterols and pentacyclic triterpenoids in grapevine Vitis vinifera leaves elicited with methyl jasmonate*. Trends in Natural Product Research – PSE Young Scientists Meeting on Biochemistry, Molecular Aspects and Pharmacology of Bioactive Natural Products, Budapeszt, Węgry, Book of Abstracts, 2019, s. 114.
  21. Burdziej A., Da Costa G., Gougeon L., Le Mao I., Bellée A., Corio-Costet M.F., Mérillon J.M., Szakiel A., Richard T., Cluzet S., *Impact of different elicitors on grapevine leaf metabolism monitored by 1H NMR spectroscopy*, Metabolomics, 15(5), 2019, s. 67.
  22. Mangas S., Bonfill M., Osuna L., Moyano E., Tortoriello J., Cusido R.M., Piñol M.T., Palazón J., *The effect of methyl jasmonate on triterpene and sterol metabolisms of Centella asiatica, Ruscus aculeatus and Galphimia glauca cultured plants*, Phytochemistry, 67, 2006, s. 2041-2049.

## **Konkurencyjność biosyntezy steroli i triterpenoidów w roślinach i kulturach *in vitro* w warunkach stresu biotycznego i abiotycznego**

### Streszczenie

Jednym z mechanizmów odpowiedzi roślin na stres są modyfikacje metaboliczne zmierzające do indukcji lub zwiększenia syntezy specyficznych metabolitów obronnych. Często następuje wtedy zahamowanie typowych procesów metabolizmu podstawowego (tzw. pierwotnego) i przekierowanie strumienia metabolitów na szlaki tzw. metabolizmu wtórnego (wyspecjalizowanego). Przykładem takiego punktu rozgałęzienia (ang. *branch point*) metabolizmu pierwotnego i wtórnego jest cyklizacja 2,3-oksydoskwalenu, wspólnego prekursora steroli i triterpenoidów, czyli konstytutywnych metabolitów pierwotnych i typowych metabolitów wtórnych zaangażowanych w różne strategie obrony chemicznej roślin. W warunkach stresu szlaki biosyntezy steroli i triterpenoidów mogą stać się konkurencyjne i ulegać różnym modyfikacjom. Zjawisko to może mieć szczególne znaczenie w próbach stymulacji produktywności kultur *in vitro*, czy indukcji naturalnej odporności roślin w rolnictwie ekologicznym.

Słowa kluczowe: triterpenoidy, sterole, kultury *in vitro*, elicytacja, czynniki stresowe

## **Competition of biosynthesis of sterols and triterpenoids in plants and *in vitro* cultures under biotic and abiotic stress conditions**

### Abstract

Metabolic modifications leading to the induction or enhancement of synthesis of specific defense metabolites are one of the mechanisms of plant response to stress. Inhibition of typical processes of basic (primary) metabolism very often triggers the redirection of metabolic flux into pathways of secondary (specialized) metabolism. Cyclisation of 2,3-oxidosqualene, the common precursor of sterols and triterpenoids (i.e. constitutive primary metabolites and typical secondary metabolites involved in various strategies of plant defense) is an example of such a branch-point of primary and secondary metabolism. Under stress conditions, the biosynthetic pathways of sterols and triterpenoids can become competitive and undergo various alterations. This phenomenon might have a particular meaning in biotechnological trials of the enhancement of productivity of *in vitro* cultures as well as in the induction of natural plant resistance in the ecological agriculture.

Keywords: triterpenoids, sterols, *in vitro* cultures, elicitation, stress factors



## Jak pokonać gryzącego wroga – roślinne glikozydy cyjanogenne jako metabolity obronne

### 1. Wstęp

Rośliny, jako organizmy o ograniczonej możliwości poruszania się, zmuszone zostały wytworzyć szereg mechanizmów obronnych umożliwiających im przetrwanie konfrontacji z wrogami naturalnymi. Jednym z ewolucyjnie najstarszych chemicznych systemów obronnych, jaki wykształcił się przeciwko zwierzętom roślinożernym jest zdolność do wydzielania toksycznego gazu – cyjanowodoru (HCN) w odpowiedzi na uszkodzenie tkanek rośliny podczas żerowania organizmu o gryzącym aparacie gębowym. Zjawisko to, nazywane cyjanogenezą, zostało stwierdzone u ponad 2600 gatunków roślin należących do niemal 130 rodzin botanicznych [1]. Wydzielanie HCN u roślin uwarunkowane jest obecnością dwóch komponentów: glikozydów cyjanogennych, będących substratem reakcji, oraz cyjanogennej  $\beta$ -glikozydazy, które w zdrowych tkankach są od siebie odseparowane, by niepotrzebnie nie narażać organów rośliny na działanie toksycznych produktów ich reakcji. Dopiero w efekcie przerwania ciągłości błon (np. na skutek żerowania gryzących owadów) dochodzi do kontaktu enzymu z substratem, hydrolizy wiązania  $\beta$ -glikozydowego i dalszych reakcji prowadzących do uwolnienia toksycznego HCN.

Za podstawową funkcję glikozydów cyjanogennych uważa się wyżej wspomniany mechanizm obronny przeciwko roślinożercom, jednak w ostatnim czasie opublikowano wiele badań sugerujących skomplikowaną i wielopłaszczyznową rolę tych metabolitów w roślinach.

Celem niniejszej pracy jest zebranie aktualnej wiedzy na temat glikozydów cyjanogennych, ich przemian i funkcji w roślinach oraz wpływu na interakcję roślin i owadów.

### 2. Struktura i występowanie glikozydów cyjanogennych

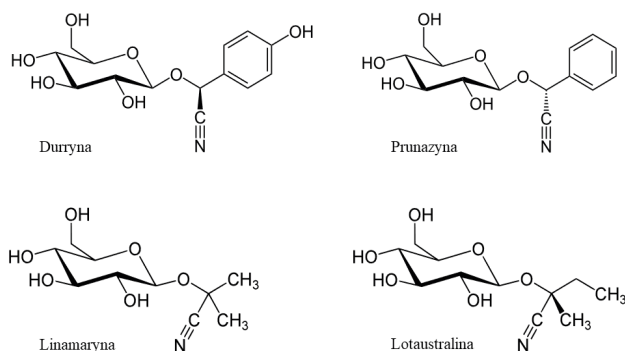
Glikozydy cyjanogenne są metabolitami wtórnymi (wyspecjalizowanymi) należącymi do pochodnych alifatycznych i aromatycznych aminokwasów, w których aglikon, będący  $\alpha$ -hydroksynitrylem, stabilizowany jest przez przyłączenie reszty cukrowej wiązaniem  $\beta$ -glikozydowym [1, 2]. Dotychczas opisano strukturę ok. 60 glikozydów cyjanogennych, będących pochodnymi aminokwasów zarówno białkowych (l-walina, l-izoleucyna, l-leucyna, l-fenylalanina, l-tyrozyna), jak i niebiałkowych (cyklopentenyloglicyna). Aglikony powstające w wyniku przemian tyrozyny, fenyloalaniny i cyklopentenyloglicyny zawierają w swojej strukturze centrum chiralne, co skutkuje występowaniem par epimerów pochodzących od tego samego aminokwasu, np. prunazyiny i sambunigriny biosyntetyzowanych

<sup>1</sup> olga.dlugosz-grochowska@uj.edu.pl, Małopolskie Centrum Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, www.uj.edu.pl.

<sup>2</sup> natalia.stefanik@doctoral.uj.edu.pl, Małopolskie Centrum Biotechnologii, Instytut Zoologii i Nauk Biomedycznych, Uniwersytet Jagielloński, www.uj.edu.pl.

<sup>3</sup> kenji.yamada@uj.edu.pl, Małopolskie Centrum Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, www.uj.edu.pl.

z fenyloalaniny, czy też deidakliny i tetrafilliny A [3]. Najczęściej spotykanymi w przyrodzie są monoglikozydy  $\alpha$ -hydroksynitryli: durryna, prunazyna, linamaryna i lotaustralina (rys. 1) [4].



Rysunek 1. Wzory strukturalne przykładowych najczęściej występujących w roślinach glikozydów cyjanogennych. Źródło: [opracowanie własne na podstawie [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)]

Prosta struktura monoglikozydów może być w dalszej kolejności modyfikowana poprzez pojedynczą lub wielokrotną hydroksylację, jak to ma miejsce np. w pochodnych leucyny i izoleucyny występujących w jęczmieniu (*Hordeum* spp.) [5] bądź też w gatunku *Lotus japonicus* [6] – roślinie modelowej wykorzystywanej do badań m.in. nad procesami związanymi z cyjanogenezą.

Różnorodność glikozydów cyjanogennych zwiększa się również dzięki występowaniu różnych reszt cukrowych dołączonych do aglikonów w zmiennych ilościach. Dotychczas znane monoglikozydy posiadają w swojej strukturze D-glukozę, do której może zostać dołączona kolejna reszta cukrowa tworząc diglikozyd. Najczęściej występującymi przykładami tych związków są amigdalina (6'-glikozyd prunazyny) i linostatyna (6'-glikozyd linamaryny), w których druga reszta glukozy przyłączona jest do pierwszej wiązaniem  $\beta$ -1,6 glikozydowym. Jednak struktura diglikozydów cyjanogennych może być jeszcze bardziej skomplikowana dzięki możliwości dołączenia drugiej reszty cukrowej w położeniu  $\beta$ -1,2,  $\beta$ -1,3, bądź  $\beta$ -1,4, jak na przykład, odpowiednio, w eukaliptozyne A, C i B [7]. Ponadto, reszta cukrowa może pochodzić nie tylko od glukozy, ale także innych cukrów, jak np. arabinozy, ksylozy, lub apiozy, co dodatkowo poszerza strukturalną różnorodność tej grupy metabolitów.

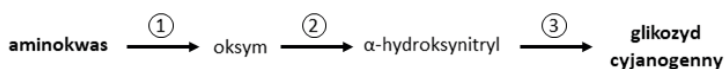
Współczesne metody analizy instrumentalnej umożliwiają otrzymywanie coraz bardziej precyzyjnych i wiarygodnych wyników badań dotyczących struktury i występowania glikozydów cyjanogennych. Dotychczas stwierdzono obecność szlaku cyjanogenego w ok. 2600 gatunkach roślin należących do 130 rodzin botanicznych, zarówno jedno-, jak i dwuliściennych. Aktualne zestawienie rzędów, rodzin i rodzajów roślin zawierających glikozydy cyjanogenne zostało opublikowane przez Vetter [1]. Wśród uprawnych, istotnych gospodarczo grup roślin zdolnych do syntezy glikozydów

cyjanogennych można znaleźć takie rodzaje, jak *Amygdalus* spp, *Malus* spp, *Prunus* spp, *Hevea* spp, *Linum* spp, *Brassica* spp, *Sorghum* spp, *Manihot* spp, *Trifolium* spp i wiele innych [1].

Pod względem dystrybucji glikozydów cyjanogennych w obrębie tkanek i komórek roślinnych, związki te gromadzone są w różnych miejscach i strukturach, jednak najczęściej występują w wakuolach komórek liściowych. W manioku (*Manihot esculenta*) linamaryna znajduje się w charakterystycznych pęcherzykowatych strukturach w lateksie obecnym w łodygach i ogonkach liściowych [4]. Cała grupa glikozydów cyjanogennych syntetyzowanych w jęczmieniu (*Hordeum vulgare*) przechowywana jest w epidermie oraz wosku epikutikularnym [5]. Natomiast w roślinach z rodziny różowatych (np. *Amygdalus* spp, *Prunus* spp i inne) amigdaliny także prunazyne magazynowane są w nasionach [8].

### 3. Biosynteza glikozydów cyjanogennych w roślinach

Pomimo różnorodności w strukturze chemicznej, biosynteza cyjanoglikozydów następuje według uniwersalnego, trój etapowego schematu w większości zbadanych gatunków roślin (rys. 2). Pierwszym krokiem jest konwersja  $\alpha$ -aminokwasu do metabolitu pośredniego – aldoksymu, przeprowadzana przez białko enzymatyczne z rodziny cytochromów P450 (CYP79). Następnie, przy udziale kolejnego cytochromu P450 (CYP71), dochodzi do powstania  $\alpha$ -hydroksynitrylu (cyjanohydryny), który w dalszej kolejności ulega glikozylacji poprzez UDP-glukozylotransferazę (UGT) [1]. Roślinne cytochromy P450 są białkami membranowymi zakotwiczone w błonach N-końcem, natomiast rozpuszczalne UDP-glukozylotransferazy najczęściej można znaleźć w cytozolu [9].



Rysunek 2. Uproszczony schemat przebiegu biosyntezy glikozydów cyjanogennych w roślinach. Cyfry oznaczają enzymy katalizujące kolejne reakcje: 1 – cytochrom P450 (z rodziny CYP79), 2 – cytochrom P450 (z rodziny CYP71), 3 – UDP-glukozylotransferaza. Źródło: [opracowanie własne na podstawie [1]]

Intensywne badania nad modelowymi oraz ważnymi gospodarczo gatunkami zdolnymi do cyjanogenezy przyczyniły się do opisanego genów i białek enzymatycznych biorących udział w powstawaniu cząsteczek cyjanogennych. Jako pierwszy opublikowany został szczegółowy schemat biosyntezy durriny w sorgo dwubarwnym (*Sorghum bicolor*) [10]. W pierwszym kroku monoooksygenaza tyrozynowa kodowana przez gen CYP79A1 (E.C. 1.14.14.36) katalizuje reakcję N-hydroksylacji tyrozyny oraz następujące po niej dehydratację i dekarboksylację z utworzeniem (Z)-p-hydroksyfenyloacetoaldoksymu, który dalej ulega NADPH-zależnej dehydratacji i C-hydroksylacji przy udziale drugiego białka cytochromu P450, kodowanego przez gen CYP71E1 (E.C. 1.14.14.37). Tak powstały p-hydroksy-mandelonitryl stabilizowany jest poprzez dołączenie glukozy w reakcji katalizowanej przez glukozylotransferazę UGT85B1 (E.C. 2.4.1.85), efektem której jest wytworzenie durriny [9]. Geny

zaangażowane w wyżej opisany szlak biosyntetyczny umiejscowione są w stosunkowo niewielkiej odległości od siebie tworząc klaster na chromosomie 1 genomu sorgo [11].

Eksperymenty z zastosowaniem znakowanych radioaktywnie metabolitów pośrednich wykazały, że synteza durriny w sorgo przebiega w sposób bardzo ukierunkowany. Zaproponowano więc model metabolonu tworzonego przez enzymy, biorące udział w przemianach związanych z wytworzeniem durriny (CYP79A1, CYP71E1, UGT85B1), zakotwiczonego w błonie retikularnej [12, 13]. Odpowiednia konfiguracja i ustawienie względem siebie miejsc aktywnych enzymów formujących metabolon przyczynia się do efektywnego przekazywania metabolitów pośrednich do kolejnych etapów biosyntezy, jednocześnie zapobiegając ich niekontrolowanemu wyciekowi. Jest to istotne również ze względu na potencjalną toksyczność tych związków, która mogłaby zakłócić prawidłowy metabolizm komórki.

Ze względu na istotne znaczenie manioku jadanego (*Manihot esculenta*) w żywieniu ludzi zamieszkujących strefę klimatu gorącego, dużo uwagi poświęca się badaniu szlaku cyjanogenetycznego funkcjonującego w bulwach tego gatunku. Podobnie jak u sorgo, geny związane z biosyntezą linamaryny w manioku, również tworzą klaster i są to CYP79D2 (E.C. 1.14.14.38), CYP71E7 (E.C. 1.14.14.41), UGT85K4 oraz UGT85K5 [11]. Ponieważ genom tego gatunku nie jest jeszcze dobrze zbadany, ich dokładna lokalizacja na chromosomie nie została określona.

*Lotus japonicus* to gatunek modelowy o zsekwencjonowanym genomie, służący do kompleksowych badań nad mechanizmami symbiozy z bakteriami brodawkowymi. Jest on także doskonałym modelem do poznawania metabolizmu związków cyjanogennych [14]. W częściach nadziemnych *L. japonicus* obecne są cztery glikozydy nitryli: rodiocyjanozyd A, rodiocyjanozyd D, lotaustralinę i linamarynę, z czego dwa ostatnie związki mogą ulegać dalszej aktywacji z wytworzeniem cyjanowodoru [6]. Lotaustralina, która jest dominującym glikozydem cyjanogennym tego gatunku, powstaje w wyniku przemian izoleucyny, natomiast linamaryna – waliny. Enzymy, biorące udział w biosyntezie tych związków, uznane są za homologiczne białka względem tych katalizujących reakcje prowadzące do powstania durriny. Reakcje pierwszego etapu przeprowadzane są z udziałem cytochromów P450 kodowanych przez geny CYP79D3 i CYP79D4 (E.C. 1.14.14.39). Za kolejny etap odpowiedzialny jest enzym CYP736A2, natomiast UGT85K2 i UGT85K3 katalizują glikozylację powstałych  $\alpha$ -hydroksynitryli [6, 11, 15]. Zarówno UGT85K2, jak i UGT85K3 wykazują podobne powinowactwo względem cyjanohydryny acetonu (aglikonu linamaryny) oraz 2-hydroksy-2-metylobutyronitrylu (aglikonu lotaustraliny) jako substratów reakcji [11]. Geny zaangażowane w biosyntezę glikozydów cyjanogennych u *L. japonicus* również tworzą klaster, który usytuowany jest na chromosomie 3 [11].

Glikozydy cyjanogenne w *L. japonicus* akumulowane są w częściach nadziemnych rośliny [6]. Najwyższe stężenia w miligramie świeżej masy notowane są w młodych, rozwijających się tkankach. Tam też, stwierdzono najwyższą ekspresję CYP79D3, genu otwierającego szlak biosyntezy tych związków [9]. Podobną zależność zanotowano dla CYP79A1 występującego w sorgo [16]. Najwyższa ekspresja CYP79D3 oraz CYP736A2 zachodzi w liściach wierzchołkowych, a poziom transkrypcji tych genów w kolejnych piętach liści obniża się [11]. Inaczej sprawa wygląda w przypadku kolejnych dwóch genów, UGT85K3 i UGT85K4, kodujących

enzymy katalizujące glikozylację  $\alpha$ -hydroksynitryli, których poziom ekspresji w liściach wierzchołkowych i kolejnych, starszych, pozostaje na podobnym poziomie, z tendencją do wzrostu w drugim liściu od góry [11]. Pod względem dystrybucji glikozydów cyjanogennych w obrębie rośliny, najwyższą ich zawartość (wyrażoną poprzez tzw. potencjał cyjanogeny, HCNp, czyli ilość wydzielonego cyjanowodoru po zmacerowaniu tkanki) stwierdzono w liściu wierzchołkowym oraz kwiatach. Istotnie niższe stężenie tych związków zanotowano w kolejnych liściach i łodydze, natomiast nie stwierdzono potencjału cyjanogennego w korzeniach ani nasionach *L. japonicus* [6]. Zmiany stężenia glikozydów cyjanogennych w liściach tego gatunku są stosunkowo dynamiczne. U młodych roślin zawartość linamaryny i lotaustraliny w tkankach gwałtownie rośnie tuż po skiełkowaniu, by osiągnąć lokalne maksimum 4 dnia i znów zmaleć. Następnie ich stężenie powoli i stabilnie rośnie wraz z wiekiem i rozmiarem rośliny [6]. W większości nadziemnych tkanek *L. japonicus* stosunek zawartości linamaryny do lotaustraliny jest względnie stały (ok. 1:8 do 1:12), ze znacznie dominującą ilością lotaustraliny. Wyjątek stanowią liścienie, w których stosunek linamaryny do lotaustraliny kształtuje się na poziomie 1:2 [6].

Jak wspomniano wyżej, w genomie *L. japonicus* zidentyfikowano dwa geny odpowiadające za pierwszy etap biosyntezy związków cyjanogennych: CYP79D3 oraz CYP79D4 o bardzo zbliżonych sekwencjach. Geny te różnią się zasadniczo poziomem ekspresji w roślinie. Transkrypcję CYP79D3 stwierdzono w niemal wszystkich częściach nadziemnych *L. japonicus* (z wyjątkiem starszych liści), natomiast CYP79D4 ulega ekspresji jedynie w korzeniach [6]. Co ciekawe, w częściach podziemnych tego gatunku nie stwierdzono występowania glikozydów cyjanogennych.

Dzięki zsekwencjonowanemu genomowi i postępowi w identyfikowaniu i opisywaniu kolejnych genów *L. japonicus* stał się podstawowym organizmem do badań nad procesem cyjanogenezy w roślinach. Przy pomocy mutagenyzy z zastosowaniem metanosulfonianu etylu udało się uzyskać mutanty nie wykazujące cyjanogenezy, posiadające mutacje w obrębie genów związanych z biosyntezą glikozydów cyjanogennych (cyd1, cyd4) bądź też z upośledzonym szlakiem katabolicznym (cyd2, cyd3), dzięki którym możliwe jest określenie specyficzności badanych enzymów względem substratów oraz ich precyzyjnej funkcji [11, 15]. Mutacja cyd1 ulokowana jest na drugim egzonie pierwszego genu na szlaku biosyntezy glikozydów cyjanogennych (CYP79D3), co skutkuje całkowitym brakiem linamaryny i lotaustraliny w tkankach [15]. Z kolei cyd4 wykazuje mutację w obrębie sekwencji drugiego białka enzymatycznego w szlaku biosyntezy cyjanoglikozydów, dając fenotyp o ponad 60% obniżonym stężeniu lotaustraliny [11].

## **4. Przemiany kataboliczne i detoksykacja glikozydów cyjanogennych**

### **4.1. Bomba cyjankowa**

Uwalnianie gazowego cyjanku wodoru z tkanek roślinnych uszkodzonych na skutek żerowania roślinożerców nazywane jest cyjanogenezą bądź też „bombą cyjankową”. W tym wypadku, glikozydy cyjanogenne są substratami reakcji enzymatycznej katalizowanej przez specyficzne  $\beta$ -glukozydazy, dzięki którym zachodzi hydroliza wiązania glikozydowego i odłączenie reszty cukrowej od  $\alpha$ -hydroksynitrylu, który następnie, pod wpływem działania liazy  $\alpha$ -hydroksynitrylowej (bądź, w przypadku wystąpienia odpowiednich warunków pH i temperatury –

samorzutnie), ulega rozpadowi do związku ketonowego i cyjanowodoru (rys. 3). Kluczowe dla przebiegu tej reakcji jest wejście w kontakt cyjanoglikozydów i  $\beta$ -glukozydazy. Jak wspomniano wcześniej (patrz podrozdział 3) glikozydy cyjanogenne magazynowane są w wakuolach bądź innych strukturach komórkowych. U roślin jednoliściennych  $\beta$ -glukozydazy zawierają na N-końcu chloroplastowy peptyd tranzytowy, dzięki któremu dochodzi do ich lokalizacji w chloroplastach [17]. U roślin dwuliściennych na N-końcu łańcucha aminokwasowego znajduje się sekwencja sygnałowa kierująca białko poprzez szlak wydzielniczy, co skutkuje jego glikozylacją i ulokowaniem w apoplazmie bądź przekierowaniem glikozylowanego białka do akumulacji wewnątrz komórki, w ciałkach białkowych [18]. Dzięki przestrzennemu rozdzielaniu substratów i enzymów roślina nie jest narażona na spontaniczne wydzielanie toksycznych produktów ich reakcji, a dochodzi do tego dopiero po przerwaniu ciągłości błon komórkowych, czyli np. na skutek żerowania owadów o gryzącym aparacie gębowym, jako odpowiedź obronna.



Rysunek 3. Uproszczony schemat reakcji „bomby cyjanowej” w roślinach.

Cyfry oznaczają enzymy katalizujące kolejne reakcje: 1 –  $\beta$ -glukozydaza, 2 – liaza hydroksynitylowa.

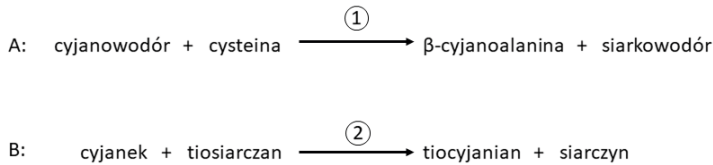
Źródło: [opracowanie własne na podstawie [1]]

Dotychczasowe badania pozwoliły wyizolować i opisać cyjanogenne  $\beta$ -glukozydazy w wielu gatunkach roślin. Jednym z lepiej zbadanych pod tym względem gatunków jest sorgo, w którego tkankach znaleziono dwie durryny ( $\beta$ -glukozydazy specyficzne wobec durriny, E.C. 3.2.1.21): Dhr1 akumulowaną w mezokotylu i wierzchołku korzenia, oraz Dhr2 znajdującą się w liściach [17, 19]. Natomiast w organach *L. japonicus* znaleziono cztery  $\beta$ -glukozydazy hydrolizujące glikozydy hydroksynityryli (E.C. 3.2.1.21): BDG2, BGD3, BGD4 oraz BGD7. BGD2 posiada zdolność do hydrolizy wszystkich glikozydów nityryli obecnych w tkankach tego gatunku i wraz z BGD4 ulega ekspresji w nadziemnych tkankach *L. japonicus* razem z CYP79D3 ze szlaku biosyntetycznego. Aktywność tej  $\beta$ -glukozydazy została stwierdzona zwłaszcza w miękiszku palisadowym liści [18]. Warto zaznaczyć, że BGD4, choć posiada zdolność do hydrolizy reszt glukozy z glikozydów  $\beta$ - i  $\gamma$ -hydroksynityryli (pochodnych izoleucyny), nie ma tej zdolności wobec linamaryny i lotaustraliny, nie prowadząc do wydzielenia HCN [15]. BGD3 jest cyjanogenną  $\beta$ -glukozydazą gromadzoną w generatywnych częściach kwiatów *L. japonicus*, natomiast obecność BGD7 stwierdzono jedynie w korzeniach tego gatunku [20].

## 4.2. Mechanizmy detoksykacji

Powstający w wyniku przemian glikozydów cyjanogennych cyjanowodor wykazuje wysoką toksyczność wobec wszystkich organizmów żywych ze względu na działanie hamujące względem terminalnej oksydazy cytochromowej mitochondrialnych przemian oddechowych [21]. Działanie to obejmuje również same rośliny, które w efekcie cyjanogenezy mogą cierpieć z powodu dyfuzji HCN w komórkach

i tkankach. Znane są dwa mechanizmy detoksykacji cyjanowodoru funkcjonujące w roślinach (rys. 4).



Rysunek 4. Dwa mechanizmy detoksykacji produktów przemian glikozydów cyjanogennych w roślinach: A – z wytworzeniem  $\beta$ -cyjanoalaniny, B – z wytworzeniem tiocyjanianu. Cyfry nad strzałkami oznaczają enzymy katalizujące poszczególne reakcje: 1 – syntaza  $\beta$ -cyjanoalaninowa, 2 – rodanaza (sulfurotransferaza tiosiarczanowa). Źródło: [opracowanie własne na podstawie [1]]

Pierwszy z nich opiera się na działaniu syntazy  $\beta$ -cyjanoalaninowej ( $\beta$ -CAS, E.C. 4.4.1.9), która katalizuje reakcje L-cysteiny z cyjanowodorem, w efekcie czego powstaje  $\beta$ -cyjanoalanina i siarkowódór. Enzym ten występuje uniwersalnie w wielu gatunkach roślin i lokalizowany jest głównie w mitochondriach, które – jako miejsce działania wrażliwej na obecność HCN oksydazy cytochromowej – są najbardziej narażone na negatywne skutki rozprzestrzeniania się cyjanowodoru w tkance [22].  $\beta$ -cyjanoalanina, będąca produktem końcowym tego szlaku detoksykacji, wykazuje działanie neurotoksyczne wobec zwierząt, stanowiąc również jeden z metabolitów obronnych i odstrasżających potencjalnych roślinożerców [23].

Drugi mechanizm detoksykacji cyjanoków w tkankach roślinnych nie jest tak rozpowszechniony, a polega na reakcji toksycznego cyjanoku z tiosiarczanem, katalizowanej przez rodanazę (sulfurotransferazę tiosiarczanową, E.C. 2.8.1.1), z utworzeniem tiocyjanianu i siarczynu [24]. Działanie tego enzymu udokumentowano w siewkach sorgo [25].

## 5. Rola glikozydów cyjanogennych w roślinach

Za główną funkcję glikozydów cyjanogennych uważa się udział w bombie cyjankowej, która jest mechanizmem obronnym przeciw roślinożercom i niektórym patogenom. Powstający po hydrolizie cyjanoglikozydów cyjanowódór, poprzez inhibicję wiązania tlenu do oksydazy cytochromu w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym, wykazuje wysoką toksyczność wobec zwierząt [26]. Roślina uważana jest za niebezpieczną, gdy potencjalnie wydzielany przez nią HCN osiąga 220 ppm (ze świeżej masy) bądź 500 ppm (z suchej masy) [1]. Dla bydła i owiec, które wypasane na pastwiskach mogą przypadkowo spożyć rośliny cyjanogenne (np. koniczynę białą), dawka śmiertelna szacowana jest na ok 2 mg HCN na kilogram masy ciała [27]. Bezpośrednia ekspozycja zwierzęcia na wysoką dawkę cyjanowodoru powoduje zatrucie ostre z objawami takimi, jak: niepokój, duszność, płytki i przyspieszony oddech, bradykardia, drżenie kończyn, obniżenie temperatury ciała, a później porażenie [1, 27]. Pierwsze objawy mogą pojawić się już po 5 do 15 minut po spożyciu toksycznego pokarmu, a większość pacjentów umiera po 2 godzinach od kontaktu ze śmiertelną dawką tej toksyny [27]. Bezpośrednią przyczyną śmierci jest niedotlenienie z powodu zatrzymania mitochondrialnych przemian oddechowych w komórkach

[28]. Długotrwałe przyjmowanie niskich dawek cyjanowodoru powoduje u zwierząt zatrucie przewlekłe, jednak jego objawy mogą się różnić w zależności od gatunku, stężenia spożywanych związków cyjanogennych i towarzyszących im innych składników pożywienia. Ciągła ekspozycja na niewielkie ilości HCN, poprzez działanie neurodegeneracyjne, u młodych źrebiąt i cieląt skutkuje zespołem deformacji mięśniowo-szkieletowej. Niskie dawki cyjanowodoru ulegają detoksykacji w wątrobie z wytworzeniem cząsteczek tiocyjanianu, który poprzez hamowanie transportu jodu wpływa na funkcjonowanie tarczycy, czego efektem może być formujące się wole. Natomiast u dorosłych koni, długotrwała obecność w diecie niewielkich ilości glikozydów cyjanogennych objawia się nietrzymaniem moczu, brakiem koordynacji tylnej i zapaleniem pęcherza moczowego [1].

Roślinożerni generaliści wykazują tendencję do unikania gatunków roślin zawierających glikozydy cyjanogenne, co więcej, owady unikają także składania jaj na powierzchni roślin bogatych w te związki [29]. Właściwości repelencyjne cyjanoglikozydów i ich skuteczność w ograniczeniu żerowania szkodników zostały wielokrotnie potwierdzone w badaniach na różnych gatunkach owadów [30, 31]. Jednakże niedawno opublikowane prace wskazują na wysoką tolerancję niektórych gatunków insektów wobec tych związków [32].

Drugą funkcją glikozydów cyjanogennych w roślinach jest magazynowanie i transport azotu, a także glukozy, co zostało zbadane przy użyciu trzech cyjanogennych gatunków: manioku, sorgo i drzewa migdałowego [33]. Zredukowane formy azotu i węgla mogą zostać przekierowane z powrotem do szlaków metabolizmu pierwotnego [33]. W sorgo opisano mechanizm przekształcania durryny przez heterokompleks SbNIT4A/B2, któremu nie towarzyszy wydzielanie HCN. Natomiast jeden z mechanizmów detoksykacji cyjanowodoru w tym gatunku prowadzi do powstania amoniaku i asparaginy, które mogą być dalej wykorzystane w kolejnych szlakach metabolicznych jako źródło azotu i aminokwasu [34]. Linamaryna może też stanowić źródło azotu magazynowanego w nasionach, służącego później roślinie do budowy biomasy w czasie kiełkowania i wzrostu siewki. Przykładowo, w nasionach kauczukowca linamaryna ulega glikozylacji do linustatyny, która w czasie kiełkowania metabolizowana jest do asparaginy, wykorzystywanej dalej w trakcie rozwoju siewek [34]. Podobne szlaki przemian obserwowano również w innych gatunkach roślin, np. w jęczmieniu [35].

Niektórzy badacze przypisują glikozydom cyjanogennym rolę w przeciwdziałaniu stresowi oksydacyjnemu w komórce, poprzez zdolność do zmiatania wolnych rodników [2]. Ma o tym świadczyć zwiększona żywotność i odporność cyjanogennych populacji niektórych gatunków roślin na wiele abiotycznych bodźców stresowych, jak np. susza czy niestabilna temperatura [33, 36-38].

## **6. Podsumowanie**

Metabolity cyjanogenne służą roślinom jako związki o charakterze obronnym od 430 milionów lat i występują obecnie w ponad 2600 gatunkach roślin lądowych, w tym również w gatunkach istotnych gospodarczo (np. maniok, sorgo, koniczyna). Zrozumienie zależności sterujących ich biosyntezą i aktywacją pozwoli na wykorzystanie naturalnej odporności roślin na żerowanie roślinożerców, co może przyczynić się do rozwoju zrównoważonej ochrony roślin oraz ograniczenia stosowania chemicznych środków ochrony roślin w produkcji roślinnej.



## Uwagi ogólne:

Niniejsza praca została sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki w Polsce (projekt nr UMO-2016/23/B/NA1/01847).

## Literatura:

1. Vetter J., *Plant Cyanogenic Glycosides*, [w:] Gopalakrishnakone P., Carlini C.R., Ligabue-Braun R., (red.) *Plant Toxins*, Springer Netherlands, 2017, s. 287-317.
2. Sun Z., Zhang K., Chen C., Wu Y., Tang Y., Georgiev M.I., Zhang X., Lin M., Zhou M., *Biosynthesis and regulation of cyanogenic glycoside production in forage plants*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(1), 2018, s. 9-16.
3. Olafsdottir E.S., Jørgensen L.B., Jaroszewski J.W., *Substrate specificity in the biosynthesis of cyclopentenoid cyanohydrin glucosides*, *Phytochemistry*, 31, 1992, s. 4129-4134.
4. Gleadow R.M., Møller B.L., *Cyanogenic Glycosides: Synthesis, Physiology, and Phenotypic Plasticity*, Annual Review in Plant Biology, 65(1), 2014, s. 155-185.
5. Nielsen K.A., Olsen C.E., Pontoppidan K., Møller B.L., *Leucine-derived cyano glucosides in barley*, *Plant Physiology*, 129(3), 2002, s. 1066-1075.
6. Forslund K., Morant M., Jørgensen B., Olsen C.E., Asamizu E., Sato S., Tabata S., Bak S., *Biosynthesis of the nitrile glucosides rhodiocyanoside A and D and the cyanogenic glucosides lotaustralin and linamarin in Lotus japonicus*, *Plant Physiology*, 135(1), 2004, s. 71-84.
7. Neilson E.H., Goodger J.Q., Motawia M.S., Bjarnholt N., Frisch T., Olsen C.E., Møller B.L., Woodrow I.E., *Phenylalanine derived cyanogenic diglucosides from Eucalyptus camphora and their abundances in relation to ontogeny and tissue type*, *Phytochemistry*, 72, 2011, s. 2325-2334.
8. Poulton J.E., Li C.P., *Tissue Level Compartmentation of ( R )-Amygdalin and Amygdalin Hydrolase Prevents Large-Scale Cyanogenesis in Undamaged Prunus Seeds*, *Plant Physiology*, 104, 1994, s. 29-35.
9. Bak S., Paquette S.M., Morant M., Morant A.V., Saito S., Bjarnholt N., Zagrobelny M., Jørgensen K., Osmani S., Simonsen H.T., Perez R.S., Van Heeswijck T.B., Jørgensen B., Møller B.L., *Cyanogenic glycosides: A case study for evolution and application of cytochromes P450*, *Phytochemistry Reviews*, 5(2-6), 2006, s. 309-329.
10. Halkier B.A., Møller B.L., *Biosynthesis of the Cyanogenic Glucoside Dhurrin in Seedlings of Sorghum bicolor ( L . ) Moench and Partial Purification of the Enzyme System Involved*, *Plant Physiology*, 90, 1989, s. 1552-1559.
11. Takos A.M., Knudsen C., Lai D., Kannangara R., Mikkelsen L., Motawia, M.S., Olsen C.E., Sato S., Tabata S., Jørgensen K., Møller B.L., Rook F., *Genomic clustering of cyanogenic glucoside biosynthetic genes aids their identification in Lotus japonicus and suggests the repeated evolution of this chemical defence pathway*, *Plant Journal*, 68(2), 2011, s. 273-286.
12. Nielsen K.A., Tattersall D.B., Jones P.R., Møller B.L., *Metabolon formation in dhurrin biosynthesis*, *Phytochemistry*, 69(1), 2008, s. 88-98.
13. Laursen T., Borch J., Knudsen C., Bavishi K., Torta F., Martens H.J., Silvestro D., Hatzakis N.S., Wenk M.R., Dafforn T.R., Olsen C.E., Motawia M.S., Hamberger B., Møller B.L., Bassard, J.E., *Characterization of a dynamic metabolon producing the defense compound dhurrin in sorghum*, *Plant Science*, 354(6314), 2016, s. 890-893.
14. VandenBosch K., Stacey G., *Summaries of legume genomics projects from around the globe*, *Plant Physiology*, 131, 2003, s. 840-865.
15. Takos A., Lai D., Mikkelsen L., Hachem M.A., Shelton D., Motawia M.S., Olsen C.E., Wang T.L., Martin C., Rook F., *Genetic screening identifies cyanogenesis-deficient mutants of Lotus japonicus and reveals enzymatic specificity in hydroxynitrile glucoside metabolism*, *Plant Cell*, 22(5), 2010, s. 1605-1619.
16. Busk P.K., Møller B.L., *Dhurrin synthesis in sorghum is regulated at the transcriptional level and induced by nitrogen fertilization in older plants*, *Plant Physiology*, 129(3), 2002, s. 1222-1231.

17. Thayer S.S., Conn E.E., *Subcellular localization of dhurrin beta-glucosidase and hydroxynitrile lyase in the mesophyll cells of sorghum leaf blades*, Plant Physiology, 67, 1981, s. 617-622.
18. Morant A.V., Bjarnholt N., Kragh M.E., Kjærgaard C.H., Jørgensen K., Paquette S.M., Piotrowski M., Imberty A., Olsen C.E., Møller B.L., Bak S., *The  $\beta$ -glucosidases responsible for bioactivation of hydroxynitrile glucosides in Lotus japonicus*, Plant Physiology, 147(3), 2008, s. 1072-1091.
19. Cicek M., Esen A., *Structure and expression of dhurrinase (beta-glucosidase) from Sorghum*, Plant Physiology, 115, 1998, s. 1469-1478.
20. Lai D., Pičmanová M., Abou Hachem M., Motawia M.S., Olsen C.E., Møller B.L., Rook F., Takos A.M., *Lotus japonicus flowers are defended by a cyanogenic  $\beta$ -glucosidase with highly restricted expression to essential reproductive organs*, Plant Molecular Biology, 89(1-2), 2015, s. 21-34.
21. Siegień I., Bogatek R., *Cyanide action in plants-from toxic to regulatory*, Acta Physiologiae Plantarum, 28(5), 2006, s. 483-497.
22. Meyers D.M., Ahmad S., *Link between L-3-cyanoalanine synthase activity and differential cyanide sensitivity of insects*, Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects, 1075(2), 1991, s. 195-197.
23. Ressler C., *Plant neurotoxins (lathyrogens and cyanogens)*, [w:] Runeckles V.C., (red.) *Recent Advances in Phytochemistry*, Vol.9. Plenum Press, New York 1975, s. 151-166.
24. Zagrobelny M., Bak S., Rasmussen A.V., Jørgensen B., Naumann C.M., Møller B.L., *Cyanogenic glucosides and plant – insect interactions*, Phytochemistry, 65, 2004, s. 293-306.
25. Miller J.M., Conn E.E., *Metabolism of Hydrogen Cyanide by Higher Plants*, Plant Physiology, 65, 1980, s. 1199-1202.
26. Mithöfer A., Boland W., *Plant Defense Against Herbivores: Chemical Aspects*, Annual Review in Plant Biology, 63(1), 2012, s. 431-450.
27. Yildiz K., Dokuzeylül B., Gonul R., Or M.E., *Cyanide Poisoning in Cattle*, Journal of Dairy and Veterinary Science, 1(4), 2017, s. 2-4.
28. Gurnsey M.P., Janos W.T., Merral M., *Cyanide poisoning in cattle: two unusual cases*, New Zealand Veterinary Journal, 25(5), 1977, s. 128-130.
29. Schlichta J.G., Glauser G., Benrey B., *Variation in cyanogenic glycosides across population of wild lima bean (Phaseolus lunatus) has no apparent effect on bruchid beetle performance*, Journal of Chemical Ecology, 56, 2008, s. 95-100.
30. Tattersall D.B., Bak S., Jones P.R., Olsen C.E., Nielsen J.K., Hansen M.L., Høj P.B., Møller B.L., *Resistance to an Herbivore Through Engineered Cyanogenic Glucoside Synthesis*, Science, 293(5536), 2001, s. 1826-1829.
31. Hay-Roe M.M., Meagher R.L., Nagoshi R.N., *Effects of Cyanogenic Plants on Fitness in Two Host Strains of the Fall Armyworm ( Spodoptera frugiperda )*, Journal of Chemical Ecology, 37, 2011, s. 1314-1322.
32. Pentzold S., Zagrobelny M., Bjarnholt N., Kroymann J., *Metabolism , excretion and avoidance of cyanogenic glucosides in insects with different feeding specialisations*, Insect Biochemistry and Molecular Biology, 66, 2015, s. 119-128.
33. Pičmanová M., Neilson E.H., Motawia M.S., Olsen C.E., Agerbirk N., Gray C.J., Flitsch S., Meier S., Silvestro D., Jørgensen K., Sánchez-Pérez R., Møller B.L., Bjarnholt N., *A recycling pathway for cyanogenic glycosides evidenced by the comparative metabolic profiling in three cyanogenic plant species*, Biochemistry Journal, 469(3), 2015, s. 375-389.
34. Jenrich R., Trompetter I., Bak S., Olsen C.E., Møller B.L., Piotrowski M., *Evolution of heteromeric nitrilase complexes in Poaceae with new functions in nitrile metabolism*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(47), 2007, s. 18848-18853.
35. Nielsen K.A., Hrmova M., Nielsen J.N., Forslund K., Ebert S., Olsen C.E., Fincher G.B., Møller B.L., *Reconstitution of cyanogenesis in barley (Hordeum vulgare L.) and its implications for resistance against the barley powdery mildew fungus*, Planta, 223, 2006, s. 1010-1023.

36. Ballhorn D.J., Heil M., Lieberei R., *Phenotypic plasticity of cyanogenesis in lima bean Phaseolus lunatus – Activity and activation of  $\beta$ -glucosidase*, Journal of Chemical Ecology, 32(2), 2006, s. 261-275.
37. Kautz S., Trisel J.A., Ballhorn D.J., *Jasmonic Acid Enhances Plant Cyanogenesis and Resistance to Herbivory in Lima Bean*. Journal of Chemical Ecology, 40(11-12), 2014, s. 1186-1196.
38. Ballhorn D.J., Lieberei R., Ganzhorn J.U., *Plant cyanogenesis of Phaseolus lunatus and its relevance for herbivore-plant interaction: The importance of quantitative data*, Journal of Chemical Ecology, 31(7), 2005, s. 1445-1473.

## **Jak pokonać gryzącego wroga – roślinne glikozydy cyjanogenne jako metabolity obronne**

### Streszczenie

Cyanogeneza nazywany jest proces wytwarzania i uwalniania cyjanku wodoru (HCN) przez organizmy żywe. W wielu gatunkach roślin funkcjonuje on jako skuteczny mechanizm obronny przed roślinożercami, ze względu na wysoką toksyczność ostrą i przewlekłą wydzielanego HCN. Do uwolnienia HCN wymagana jest reakcja enzymu (cyjanogenetycznej  $\beta$ -glukozydazy) oraz substratów (glikozydów cyjanogennych), które w zdrowych tkankach są odseparowane od siebie. Na skutek uszkodzenia błon biologicznych (np. podczas żerowania organizmów roślinożernych), dochodzi do kontaktu enzymu z substratem i produkcji szkodliwego HCN.

Celem niniejszej pracy jest zebranie i uporządkowanie dotychczasowej wiedzy z zakresu szlaków biosyntezy roślinnych glikozydów cyjanogennych, mechanizmów regulacji oraz funkcji, jakie pełnią w interakcji roślina-roślinożerca. Występowanie szlaku metabolicznego związanego z glikozydami cyjanogennymi zostało stwierdzone w wielu gatunkach o znaczeniu gospodarczym, np. sorgo, manioku, lnie, koniczynie białej czy też roślinach z rodziny różowatych (*Rosaceae*) i bobowatych (*Fabaceae*). Wiedza na temat mechanizmów działania i regulacji metabolizmu glikozydów cyjanogennych może mieć znaczenie dla rozwoju zrównoważonej ochrony roślin przyczyniając się do ograniczenia negatywnego wpływu chemicznych środków ochrony roślin na środowisko.

Słowa kluczowe: cyanogeneza, cyjanowodór, roślinne metabolity obronne

## **How to fight biting enemies – plant cyanogenic glycosides as defensive metabolites**

### Abstract

Cyanogenesis is a process of synthesis and release hydrogen cyanide (HCN) by living organisms. In many plant species, it is functioning as an effective defensive mechanism against herbivores, due to high acute and chronic toxicity of HCN. To release this compound, the reaction of the enzyme (cyanogenic  $\beta$ -glucosidase) and substrates (cyanogenic glycosides) is required, but in healthy tissues they are spatially separated. As a result of damage to biological membranes (e.g. during feeding of herbivores), the enzyme contacts the substrate and produces harmful HCN.

The purpose of this work is to collect and organize existing knowledge in the field of plant biosynthesis pathways of cyanogenic glycosides, regulation mechanisms and functions that they perform in the plant-herbivore interaction. The metabolic pathway associated with cyanogenetic glycosides has been found in many species of economic importance, e.g. sorghum, cassava, flax, white clover, and plants of the *rosaceae* and *fabaceae* families. Knowledge about the mechanisms of action and regulation of cyanogenic glycoside metabolism may be important for the development of sustainable plant protection contributing to reduction of the negative impact of chemical plant protection products on the environment.

Keywords: cyanogenesis, hydrogen cyanide, plant defense metabolites

# Obrazowanie spektrometrią mas MALDI jako skuteczna metoda do analizy metabolitów roślinnych

## 1. Wstęp

Spektrometria mas jest to technika, która służy do jakościowego i ilościowego oznaczania substancji jakie znajdują się w próbce. Od lat technika spektrometrii mas jest udoskonalana i dzięki temu tworzone są nowe jej rodzaje. Podczas badania metodą spektrometrii mas substancje znajdujące się w próbce są jonizowane, następnie rozdzielone ze względu na stosunek masy do ładunku ( $m/z$ ), aby ostatecznie trafić do detektora i zostać wykryte.

## 2. Spektrometria mas MALDI

Jednym z rodzajów spektrometrii mas jest spektrometria mas z jonizacją/desorpcją laserem w obecności matrycy (ang. MALDI, *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), której wynalazcami byli Karas, Hillenkamp oraz Tanaka [1-3]. Zasadę działania tej techniki można podzielić na kilka etapów:

- Na próbkę nanoszona jest matryca;
- Pulsacyjny laser o długości fali mieszczącej się w zakresie ultrafioletu pada na próbkę z matrycą;
- Pod wpływem lasera próbka z matrycą zostaje wzbudzona, a dzięki matrycy również zjonizowana;
- Próbka trafia do analizatora, gdzie jest rozdzielana pod względem jej stosunku masy do ładunku ( $m/z$ ) (w przypadku techniki MALDI-MS tym analizatorem jest zwykle analizator czasu przelotu (TOF), który rozdziela substancje dzięki różnicy czasu lotu przy różnym stosunku  $m/z$ );
- Próbka trafia do detektora, gdzie sygnał jonowy jest zmieniany na sygnał elektryczny;
- Komputer wyświetla widma zawierające stosunek  $m/z$  substancji występujących w próbce;
- Widma mogą być analizowane i zinterpretowane.

Technika jonizacji MALDI jest techniką jonizacji miękkiej, co oznacza, że substancje zwykle nie ulegają silnej fragmentacji pod wpływem działania lasera, tak więc duża część widma składa się ze stosunku  $m/z$  jonów pierwotnych bądź drugorzędowych. Biorąc pod uwagę ilość metabolitów np. w roślinie (ok. 100000) [4], ta niska fragmentacja sprawia, że widma próbek biologicznych po analizie MALDI są możliwe do interpretacji.

---

<sup>1</sup> Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Zakład Biofarmacji.

<sup>2</sup> Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Genetyki i Mikrobiologii.

<sup>3</sup> Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Zakład Biofarmacji, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Genetyki i Mikrobiologii.

Należy również pamiętać, że jony, które zwykle uzyskujemy w wyniku jonizacji posiadają dodany pozytywnie bądź negatywnie naładowany jon np. sodu bądź wodoru. Sprawia to, że jeśli szukamy konkretnej substancji to jej stosunek m/z będzie inny niż masa samej substancji (np. będzie większy o dwadzieścia trzy bądź jeden). Pamiętać należy również o tym, że substancje o małej masie molowej często mogą tworzyć klastry, przez co na widmie można zauważyć jon o masie dwukrotnie, lub trzykrotnie większej (plus kation bądź anion) od faktycznej, którą ma dana substancja.

### **3. Obrazowanie spektrometrią mas MALDI (MALDI-MSI)**

Oprócz wiedzy na temat samego składu chemicznego tkanki roślinnej bardzo ważna jest również informacja o dystrybucji poszczególnych składników w próbce. Technika umożliwiająca takie analizy jest MALDI-MSI (ang. *Mass Spectrometry Imaging*, MSI).

Za pomocą techniki spektrometrii mas MALDI można przeprowadzać mapowanie. Mapowanie jest to proces pobierania pomiarów punkt przy punkcie na próbce w płaszczyźnie x-y, które następnie są składane, aby uzyskać mapę chemiczną, która przedstawia dystrybucje danej substancji. W przypadku spektrometrii mas mapa przedstawia rozmieszczenie i intensywność danego stosunku m/z w próbce. W analizach obrazowania/mapowania próbki techniką MALDI-MSI wykorzystuje się przesuw stolika z badanym preparatem. Operator spektrometru decyduje o jaką odległość na próbce ma być oddalony następny punkt pomiarowy, przeważnie jest to od 10 do 100  $\mu\text{m}$ . Pozwala to uzyskać dobrą rozdzielczość dystrybucji substancji chemicznych w danej tkance.

## **4. Przygotowanie próbki roślinnej do analizy MALDI-MSI**

### **4.1. Pobranie oraz zamrożenie tkanki**

Aby przygotować próbkę do analizy techniką MALDI-MSI należy najpierw pobrać daną część tkanki roślinnej, a następnie zamrozić ją w ciekłym azocie. Jest to bardzo ważne, aby zapobiec działaniu enzymów rozkładających tkankę a także zatrzymać procesy metaboliczne. Ważne jest również, aby zamrozić tkankę szybko, ponieważ przy wolnym schładzaniu mogą wytworzyć się duże kryształy lodu, które mogą rozrywać komórki badanego materiału. Jeśli zamrozimy tkankę szybko, powstają kryształki małe, które nie rozerwą komórek badanej tkanki, a badanie dystrybucji metabolitów będzie bardziej miarodajne. Tkanki mrozić można w ciekłym azocie, suchym lodzie bądź w ciekłym izopentanie [5]. Próbki tkanek można następnie przechowywać w zamrażarce  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **4.2. Przygotowywanie skrawków tkanki**

Następnym etapem jest przygotowanie skrawków tkanki. Zwykle próbkę kroi się na kriomikrotomie. Kriomikrotom umożliwia krojenie próbek na dowolną grubość np. od 0,1 do 80  $\mu\text{m}$ , w niskiej temperaturze (zwykle jest to  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Do badań techniką MALDI-MSI tkanki zwykle kroi się na grubość 2-40  $\mu\text{m}$  (w zależności od gęstości danej tkanki). Analiza cieńszych tkanek pozwala uzyskać znacznie lepszą intensywność widm uzyskanych z badania, co związane jest z powierzchniową ekstrakcją analitów [5].

Do krojenia tkanek można wykorzystać medium – OCT (ang. *Optimal Cutting Temperature*). Służy ono do przytwierdzenia skrawka próbki do płytki/szkiełka. OCT może jednak dać dodatkowe sygnały, które będą utrudniać interpretację widma. Zaleca się korzystać z minimalnej jego ilości, a także (jeżeli to możliwe) zapobiec dostaniu

się OCT na szkiełko podstawowe, na które przytwierdzana jest próbka. Zamiast tego medium można również zastosować wodę jako środek do przytwierdzenia próbki. Wadą użycia wody jako medium jest jednak to, że w formie lodu jest krucha, a próbka podczas krojenia może odpaść od płytki [6].

Krojenie tkanek roślinnych jest relatywnie trudne. Jest to związane z twardością tkanki roślinnej oraz z niewielką ilością tłuszczu. Czynniki te sprawiają, że tkanki roślinne podczas krojenia za pomocą kriomikrotomu ulegają kruszeniu, a nie krojeniu – zamiast tworzyć ciągłą tkankę tworzy się z nich pył bądź pojawiają się dziury. Ponadto zewnętrzna część tkanki roślinnej często jest twardsza, a wewnętrzna miękka. To tylko potęguje problemy z jej krojeniem.

### 4.3. Oczyszczanie tkanki

Po przygotowaniu i pocięciu skrawków, próbkę często poddaje się oczyszczeniu (przemywaniu). Celem tej procedury jest wypłukanie pewnych analitów, które mogą zaburzać sygnał badanych związków. Ma to na celu pozbycie się analitów, które nas nie interesują w badaniu oraz zwiększenie intensywności sygnałów *s/n* (ang. *signal to noise*) w widmie MALDI.

Najczęściej próbkę poddaje się oczyszczeniu podczas badania tkanki zwierzęcej. W przypadku tkanki roślinnej robi się to rzadziej, ale również może być wykonywane w celu zwiększenia jakości sygnałów. Do tkanki roślinnej możemy wykorzystać dwa protokoły oczyszczania: z roztworem octanu amonu oraz z wykorzystaniem alkoholu etylowego. Czyszczenie za pomocą roztworu octanu amonu służy do badania lipidów w tkance. Roztwory octanu amonu służą do odpłukiwania soli i innych zanieczyszczeń będących w tkance. Czyszczenie za pomocą alkoholu etylowego służy do usunięcia soli z tkanki oraz wypłukania lipidów, w celu zwiększenia jakości sygnału białek.

Tkanki na szkiełkach podstawowych oczyszcza się w prosty sposób – do szalki Petriego nalewa się roztwór, a następnie zanurza się tam szkiełko podstawowe z tkanką na kilka sekund. Po takim płukaniu szkiełko wraz z tkanką będzie mokre i nie nadaje się do pomiaru MALDI-MSI, dlatego następnym krokiem jest umieszczenie szkiełka w eksykatorze na ok. 30 minut do całkowitego jej wysuszenia [7, 8].

### 4.4. Wybór i nakładanie matrycy

Matryca jest bardzo ważnym elementem przygotowania próbki do analizy techniką spektrometrii mas MALDI. Rolą matrycy jest jonizacja badanych substancji. Przy wyborze matrycy MALDI należy pamiętać, że jest to związek chemiczny, który również będzie widoczny w widmie. Dlatego należy wybrać taką matrycę, której widmo nie będzie się pokrywało z substancjami szukanymi. Matryce są substancjami krystalicznymi, a ich krystaliczność zależy między innymi od użytego rozpuszczalnika. Od wielkości kryształów zależy też jakość uzyskanej mapy z próbki, dlatego jeżeli chcemy uzyskać dobrą jakość mapy należy korzystać z matryc, które tworzą małe homogeniczne kryształy. Istotny zatem jest odpowiedni dobór rozpuszczalnika. Najczęstszym wyborem matryc do analizy tkanki roślinnej jest kwas 2,5-dihydroksybenzoowy (DHB) oraz kwas  $\alpha$ -cyjano-4-hydroksycynamonowy (CHCA), ze względu na małe masy cząsteczkowe, które zwykle nie pokrywają się z szukanymi substancjami. Mimo, że ich masy czasem mieszczą się w „regionie zainteresowania”, to pośród ich sygnałów można też znaleźć sygnały substancji poszukiwanych np. auksyn [5, 9].

Matryce najczęściej rozpuszcza się w mieszaninie rozpuszczalników. Takimi rozpuszczalnikami zwykle są substancje organiczne niepolarne z dodatkiem rozpuszczalnika polarnego. Rozpuszczalnik polarny to zwykle woda dejonizowana ze względu na jej łatwą dostępność. Rozpuszczalnikiem niepolarnym zwykle jest acetonitryl, metanol lub etanol. Ich funkcja jest dwójaka: po pierwsze powodują rozpuszczenie matrycy, po drugie naruszają niekowalencyjne połączenia pomiędzy białkami, a innymi strukturami w komórkach, co powoduje łatwiejszą jonizację oraz niweluje detekcję klastrów białka z inną strukturą [10].

Roztwory matrycy w rozpuszczalniku zwykle się zakwasza, ponieważ obniżone pH również zapobiega powstawaniu połączeń pomiędzy białkami i innymi strukturami oraz zwiększa ich rozpuszczalność. Najczęściej wybierane są kwasy organiczne takie jak: kwas mrówkowy, octowy, trifluorooctowy, octan amonu, mrówczan amonu czy węglan amonu [10].

Możliwe jest jeszcze wybranie alternatywnej matrycy, jaką są nanocząstki złota. Ta matryca bardzo dobrze jonizuje cząsteczki. Matryca ta ponadto jest selektywna, co jest zarówno zaletą, jak i wadą. Zaletą ponieważ pomiary z jej użyciem będą prostsze do odczytu, a wadą, ponieważ nie jest uniwersalna [11].

Najczęściej używane metody nakładania matrycy to nakładanie za pomocą aerografu ręcznego, profesjonalnego natryskiwacza z użyciem gazu obojętnego TM-Sprayer, chemicznej drukarki oraz metoda nanoszenia „na sucho” czyli bez użycia rozpuszczalnika.

Nakładanie matrycy za pomocą aerografu ręcznego wykorzystuje się do rozpuszczalnych matryc. Jest to najprostsza, najtańsza i skuteczna metoda. Jej wadą jest natomiast brak powtarzalności, ponieważ nakładanie robione jest ręcznie. Można próbować różnych technik w celu zwiększenia powtarzalności procedury nanoszenia matrycy MALDI. Przykładem jest wykorzystanie za każdym razem takiej samej ilości/objętości matrycy czy taki sam interwał czasowy podczas jej nakładania, jednak nigdy metoda ta nie będzie w 100% powtarzalna zatem nie będzie ona idealna [5]. Zastosowanie profesjonalnego rozpylacza dedykowanego do tej techniki jest najczęstszą metodą stosowaną do nanoszenia matrycy na badane tkanki. Powoduje to uzyskanie powtarzalnych wyników oraz uzyskanie homogenicznej warstwy matrycy na powierzchni próbki.

Nakładanie matrycy za pomocą drukarki chemicznej zapewnia powtarzalność wyników w przypadku rozpuszczalnych matryc. Jest to metoda cechująca się bardzo wysoką powtarzalnością i zapewnia lepszą ekstrakcję analitów. Jej dużą wadą jest natomiast wysoki koszt takiego urządzenia [5].

Nakładanie matrycy bez rozpuszczalnika jest metodą, którą wykorzystuje się do matryc nierozpuszczalnych. Metoda ta rozszerza możliwości jeśli chodzi o wybór potencjalnych matryc, jednak jest ona dość rzadko wykorzystywana ze względu na jej niską powtarzalność oraz procedurę nanoszenia, która jest czasochłonna [5].

#### **4.5. Identyfikacja związków w próbce**

Po przygotowaniu próbki roślinnej do analizy można przejść do obrazowania spektrometrią mas MALDI-MSI. Po wykonaniu obrazowania można uzyskać uśrednione widmo próbki, które daje ogólny pogląd o jej składzie chemicznym). Oprócz uzyskania uśrednionego widma próbki program do analizy danych MALDI-

MSI umożliwia również spis wszystkich stosunków m/z, które zostały wykryte. Po wybraniu odpowiedniej masy program pokazuje dystrybucje danego związku w próbce wraz z jego intensywnością (w wybranej skali kolorów). Aby zidentyfikować związek należy znać m/z jego jonu macierzystego, a następnie znaleźć go w widmie badanej próbki. Jednak sama obecność danego jonu nie wystarczy do definitywnej identyfikacji związku. Aby mieć większą pewność należy przeprowadzić analizę tandemową spektrometrii mas (MS/MS). Technika ta jest dostępna w spektrometrach mas, które posiadają dwa analizatory jonów. Pierwszy analizator powoduje, że przepuszczany jest jedynie ten jon o wybranym przez nas stosunku m/z. Jon ten następnie jest zderzany z gazem obojętnym, co powoduje jego fragmentację na jony wtórne. Jony wtórne natomiast są przepuszczane przez kolejny analizator, który rozdziela je ze względu na m/z. Uzyskujemy więc widmo jonów wtórnych. Przy stałej energii fragmentacji związek zawsze rozpada się na takie same jony wtórne, które zależą od siły wiązań poszczególnych części związku. Jeżeli profil m/z jonów wtórnych zgadza się z przewidywanym profilem dla danego związku możemy go z dużym prawdopodobieństwem zidentyfikować [12].

## **5. Wykrywanie związków w tkankach roślinnych**

Do analizy spektrometrią mas MALDI-MSI można wykorzystać właściwie każdą tkankę roślinną taką jak liść, łądyga, korzeń, brodawka korzeniowa, ziarna czy owoce [13-17].

### **5.1. Wykrywanie lipidów w tkance roślinnej**

Lipidy są często obrazowane za pomocą techniki spektrometrii mas MALDI-MSI. Powszechnie stosowaną metodą do obrazowania dystrybucji związku w tkance jest mikroskopia fluorescencyjna. Ograniczeniem tej techniki jest jednak to, że jest to badanie celowane. O ile w analizie białkowej jest to dość proste, ponieważ istnieją przeciwciała przeciwko dużej części białek, tak w przypadku lipidów jest to trudne, ze względu na brak przeciwciał przeciwko nim. Obrazowanie za pomocą spektrometrii mas MALDI-MSI jest natomiast bardzo dobrą alternatywą, która oprócz tego, że dobrze radzi sobie z wykrywaniem lipidów, to jest również metodą niecelowaną, co sprawia, że można badać wiele lipidów na jednej tkance jednocześnie. MALDI-MSI umożliwia zbadanie takich lipidów jak fosfolipidy, fosfatydylocholino, fosfatydyloetanolaminy i kwas fosfatydylowy (występujące w błonie komórkowej) czy triacyloglicerole (występujące w nasionach) [18-21].

### **5.2. Wykrywanie aminokwasów, peptydów i białek w tkance roślinnej**

Tkanka roślinna zawiera białka, peptydy i aminokwasy, które posiadają zarówno funkcję budulcową, jak i transportową czy enzymatyczną. Ich badanie jest więc kluczowe dla poznania pewnych mechanizmów zachodzących w tkankach roślinnych. Często nie tylko ich obecność, ale również umiejscowienie daje wymierną informację na temat mechanizmów zachodzących w tkance. MALDI-MSI umożliwia wykrycie oraz zaobserwowanie ich dystrybucji [6].

### **Wykrywanie metabolitów wtórnych w tkance roślinnej**

Rośliny charakteryzują się ogromną ilością metabolitów wtórnych, które produkują. Do badania składu chemicznego tkanek roślinnych często używane są również metody HPLC, GC-MS, HPCE oraz metody enzymatyczne i immunohistochemiczne.



Wymienione metody informują nas o składzie chemicznym danej próbki, nie dają jednak informacji na temat ich dystrybucji. Ponadto w badaniu HPLC, GC-MS oraz metodami enzymatycznymi nie jesteśmy w stanie zanalizować wszystkich metabolitów wtórnych w jednej analizie. W badaniu immunohistochemicznym natomiast analiza jest celowana, a przeciwciała przeciwko niektórym metabolitom wtórnym są niedostępne.

Za pomocą obrazowania MALDI-MSI można wykryć takie grupy metabolitów, jak alkaloidy, flawonoidy, glikozydy oraz hormony roślinne [9, 22, 23].

## 6. Podsumowanie

Obrazowanie spektrometrią mas MALDI-MSI jest skuteczną metodą do badania obecności oraz dystrybucji szerokiej gamy metabolitów pierwotnych i wtórnych w tkankach roślinnych. Dzięki temu, że technika ta jest niecelowana oraz umożliwia zobrazowanie umiejscowienia metabolitów, daje większe możliwości, niż zazwyczaj wykorzystywane metody analizy chemicznej tkanki roślinnej.

Praca finansowana przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach realizacji projektu LIDER (nr projektu: LIDER/11/0070/L-8/16/NCBR/2017).

## Literatura:

1. Karas M., Hillenkamp F., *Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons*, Analytical Chemistry, 60, 1988, s. 2299-2301.
2. Hillenkamp F., Karas M., *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers*, Analytical Chemistry, 63, 1991, s. 1193-1200.
3. Tanaka K. i in., *Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time of flight mass spectrometry*, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2, 1988, s. 151-153.
4. Fiehn O., Kopka J., Dörmann P., Altmann T., Trethewey R.N., Willmitzer L., *Metabolite profiling for plant functional genomics*, Nature Biotechnology, 18, 2000, s. 1157-1161.
5. Michno W., Wehrli P.M., Blennow K., Zetterberg H., Hanrieder J., *Molecular imaging mass spectrometry for protein dynamics in neurodegenerative disease pathology*, Journal of Neurochemistry, 151, 2019, s. 488-506.
6. Kaspar S., Peukert M., Svatos A., Matros A., Mock H., *MALDI-imaging mass spectrometry – An emerging technique in plant biology*, Proteomics, 11, 2011, s. 1840-1850.
7. Seeley E.H., Oppenheimer S.R., Mi D., Chaurand P., Caprioli R.M., *Enhancement of Protein Sensitivity for MALDI Imaging Mass Spectrometry After Chemical Treatment of Tissue Sections*, American Society for Mass Spectrometry, 19, 2008, s. 1069-1077.
8. Wang H.J., Liu C. Bin, Wu H., *A simple desalting method for direct MALDI mass spectrometry profiling of tissue lipids*, Journal of Lipid Research, 52, 2011, s. 840-849.
9. Kumar P., Kesari P., Dhindwal S., Choudhary A.K., *A novel function for globulin in sequestering plant hormone: Crystal structure of Wrightia tinctoria IIS globulin in complex with auxin*, Scientific reports, 7, 2017, s. 1-11.
10. Franck J. i in., *MALDI mass spectrometry imaging of proteins exceeding 30 000 daltons*, Medical Science Monitor, 16, 2010, s. 293-299.
11. Mclean J.A., Stumpo K.A., Russell D.H., *McLean-gold nanoparticles*, JACS Communications, 127, 2005, s. 5304-5305.
12. Hunt D.F., Yates J.R., Shabanowitz J., Winston S., Hauer C.R., *Protein sequencing by tandem mass spectrometry*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 83, 1986, s. 6233-6237.
13. Becker L., Carré V., Poutaraud A., Merdinoglu D., *MALDI Mass Spectrometry Imaging for the Simultaneous Location of Resveratrol, Pterostilbene and Viniferins on Grapevine Leaves*, Molecules, 19, 2014, s. 10587-10600.
14. Aziz M., Sturtevant D., Winston J., Collakova E., Jelesko J.G., Chapman K.D., *MALDI-MS Imaging of Urushols in Poison Ivy Stem*, Molecules, 22, 2017, s. 1-11.

15. Taira S., Ikeda R., *Mass spectrometric imaging of ginsenosides localization in Panax ginseng root*, JAIST Repository, 38, 2010, s. 485-493.
16. Velickowic D. i in., *Observed metabolic asymmetry within soybean root nodules reflects unexpected complexity in rhizobacteria-legume metabolite exchange*, ISME Journal, 12, 2018, s. 2335-2338.
17. Nakamura J., Morikawa-Ichinose T., Fujimura Y., *Spatially resolved metabolic distribution for unraveling the physiological change and responses in tomato fruit using matrix-assisted laser desorption / ionization – mass spectrometry imaging (MALDI – MSI)*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 409, 2017, s. 1697-1706.
18. Horn P.J. i in., *Spatial Mapping of Lipids at Cellular Resolution in Embryos of Cotton*, The Plant Cell, 24, 2012, s. 622-636.
19. Horn P.J., Chapman K.D., *Lipidomics In Situ: Insights into Plant Lipid Metabolism from High Resolution Spatial Maps of Metabolites* Progress in Lipid Research Lipidomics in situ: Insights into plant lipid metabolism from high resolution spatial maps of metabolites, Progress in Lipid Research, 54, 2014, s. 32-52.
20. Horn P.J., Sturtevant D., Chapman K.D., *Modified oleic cottonseeds show altered content, composition and tissue-specific distribution of triacylglycerol molecular species*, Biochimie, 96, 2014, s. 28-36.
21. Sturtevant D., Lee Y., Chapman K.D., *Matrix assisted laser desorption / ionization-mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) for direct visualization of plant metabolites in situ*, Current Opinion in Biotechnology, 37, 2016, s. 53-60.
22. Yang S. i in., *The metabolism and distribution of imidazole alkaloids from Lepidium meyenii (Maca) in mouse by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging*, International Journal of Mass Spectrometry, 434, 2018, s. 93-99.
23. Qin L. i in., *Recent advances in matrix assisted laser desorption / ionisation mass spectrometry imaging (MALDI MSI) for in situ analysis of endogenous molecules in plants*, Phytochemical Analysis, 29, 2018, s. 351-364.

## **Obrazowanie spektrometrią mas MALDI jako skuteczna metoda do analizy metabolitów roślinnych**

### **Streszczenie**

W niniejszej pracy przedstawione są podstawy dotyczące techniki spektrometrii mas MALDI oraz obrazowania za pomocą spektrometrii mas MALDI-MSI. Omówiono metody przygotowania tkanki roślinnej do badania przy użyciu tej techniki, sposób identyfikacji związków w danej próbce, a także opisane są związki jakie mogą zostać wykryte w badaniu tkanki roślinnej techniką MALDI-MSI. Ukazane są również zalety badania za pomocą techniki obrazowania MSI w porównaniu z konwencjonalnymi metodami analizy składu chemicznego tkanki roślinnej.

Słowa kluczowe: MALDI-MSI, metabolity pierwotne i wtórne, tkanka roślinna

## **MALDI mass spectrometry imaging as an effective method for the analysis of plant metabolites**

### **Abstract**

This review presents the basics of MALDI mass spectrometry technique and MALDI-MSI mass spectrometry imaging. The methods of plant tissue sample preparation, the method for identification the compounds are discussed, as well as the list of compounds that can be detected by MALDI-MSI within plant tissue are described.

Moreover the advantages of the MALDI-MSI over conventional methods of the chemical analysis of the plant tissue are presented in this paper.

Keywords: MALDI-MSI, primary and secondary metabolites, plant tissue

## Wady i zalety technik stosowanych do izolacji lotnych metabolitów na przykładzie wątrobowców

### 1. Wstęp

Mimo znacznego rozwoju medycyny, postępu w farmacji oraz chemicznej syntezy wielu nowych substancji leczniczych obserwuje się wzrost zainteresowania substancjami pochodzenia roślinnego jako potencjalnymi, obiecującymi terapeutykami w profilaktyce i leczeniu wielu chorób [1].

Olejki eteryczne (OE) są produktami metabolizmu wtórnego roślin. W skład olejków eterycznych wchodzi terpeny oraz ich pochodne, które stanowią dużą grupę naturalnych związków organicznych i są szeroko rozpowszechnione w królestwie roślin. Pochodne oligomeru izoprenu wykazują aktywność przeciwzapalną, działają przeciwbakteryjnie, przeciwwirusowo, przeciwgrzybiczo i przeciw pasożytniczo. Pod względem chemicznym olejki eteryczne to skomplikowane, wieloskładnikowe mieszaniny związków monoterpenu i seskwiterpenu oraz ich pochodnych, w tym pochodnych aromatycznych. Substancje te mogą mieć charakter alkoholi, ketonów, aldehydów, estrów i eterów. Charakterystyczną cechą jest to, że w skład jednego olejku może wchodzić kilkanaście lub nawet kilkadziesiąt związków o różnym stężeniu i właściwościach. Duże zróżnicowanie składu chemicznego olejków eterycznych warunkuje szeroki zakres ich biologicznej aktywności. Olejki eteryczne są wydzielinami roślinnymi o niewyjaśnionej w pełni roli fizjologicznej. Wytwarzane olejki mogą odgrywać pewną rolę w życiu rośliny, chronić przed pasożytami, zmniejszać parowanie, pomagać w zasklepieniu ran i w różny sposób wpływać na rośliny konkurencyjne [2, 3].

Rzeczywisty rozwój metod analitycznych przyczynił się do ponownego odkrycia właściwości prozdrowotnych olejków eterycznych. Dzięki wykorzystaniu m.in. chromatografii gazowej (*Gas Chromatography* – GC), chromatografii cieczowej (*Liquid Chromatography* – LC), wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (*High Pressure Liquid Chromatography* – HPLC) i spektrometrii mas (*Mass Spectrometry*) można w sposób precyzyjny określić skład chemiczny mieszanin pochodzenia naturalnego, a zastosowanie np. preparatywnego kolektora frakcji (*Preparative Fraction Collector* – PFC) umożliwia izolowanie wybranych związków o wysokim stopniu czystości, przejawiających określoną aktywność.

Techniki powszechnie stosowane do ekstrakcji olejków eterycznych obejmują ekstrakcję rozpuszczalnikiem, destylację z parą wodną, mikroekstrakcję do fazy stałej (SPME) oraz ekstrakcję CO<sub>2</sub>.

<sup>1</sup> rafwawrz@amu.edu.pl, Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

<sup>2</sup> gosia.guzowska@gmail.com, Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

<sup>3</sup> wasiakw@amu.edu.pl, Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

<sup>4</sup> androsac@amu.edu.pl, Zakład Genetyki, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

## 2. Roślinne metabolity pierwotne i metabolity wyspecjalizowane (wtórne)

Poznanie biochemicznych podstaw funkcjonowania roślin pozwoliło wyróżnić dwa poziomy metabolizmu. Metabolizm podstawowy to ogół wewnątrzkomórkowych procesów biochemicznych, koniecznych do zachowania przez daną komórkę elementarnych funkcji życiowych.

Metabolomika jest rozwijającą się dziedziną wiedzy, której głównym celem jest identyfikacja oraz analiza zmian ilościowych niskocząsteczkowych produktów naturalnych – metabolitów pierwotnych i wtórnych, które tworzą metabolom w organizmach żywych [4-6].

Obecne w roślinach substancje dzieli się na dwie grupy:

- substancje stanowiące materiał budulcowy i energetyczny rośliny, tzw. metabolity pierwotne. Należą do nich: cukry, aminokwasy, białka, estry kwasów tłuszczowych, kwasy organiczne;
- substancje będące produktem przemiany materii roślin, tzw. metabolity wtórne. Zalicza się do nich: niektóre glikozydy, garbniki, barwniki, terpeny, sterole, saponiny, olejki lotne, żywice, balsamy, alkaloidy.

Wtórne metabolity to te substancje chemiczne, które nie są bezpośrednio zaangażowane we wzrost i rozwój roślin prowadzą do biosyntezy prostych i złożonych metabolitów, wykorzystując produkty pośrednie z głównych metabolitów poprzez określone szlaki [7]. Aby powstały, musi zajść najpierw metabolizm pierwotny. Wiele z nich jest wykorzystywanych w lecznictwie. Znanych jest ok. 50 tys. metabolitów wtórnych, a część z nich jest obdarzona aktywnością farmakologiczną. Należące do tej grupy związki chemiczne cechuje złożona struktura chemiczna i aktywność biologiczna wykorzystywana przez roślinę w przystosowaniu się do bytowania w danych warunkach środowiskowych [8]. Wtórne metabolity nie występują w każdej komórce są wytwarzane w specyficznych komórkach, tkankach i organach.

Spośród dotychczas poznanych związków chemicznych pochodzenia naturalnego aż 80% jest biosynteżowane przez rośliny [9, 10]. Poznanie funkcjonalnych właściwości biologicznych i chemicznych wielu metabolitów wtórnych pozwoliło na zastosowanie ich jako wartościowych bioproduktów m. in. w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym. Otrzymywanie metabolitów wtórnych z roślin (pochodzących ze środowiska naturalnego i tradycyjnych upraw) ma istotne ograniczenia. Na biosyntezę metabolitów wtórnych ma wpływ zdolność przystosowania się do zmiennych warunków temperaturowych i fotoperiodu, a także działanie abiotycznych i biotycznych czynników stresogennych [10]. W komórkach roślin zachodzą procesy metabolizmu pierwotnego, prowadzące do powstania białek, lipidów, sacharydów, DNA i RNA, niezbędnych roślinom do podstawowych procesów życiowych. Roślinne metabolity wtórne wykorzystuje się również w wielu gałęziach przemysłu. W przemyśle spożywczym wykorzystuje się je jako dodatki do żywności (kapsaicyna, kurkumina). W przemyśle kosmetycznym jako składniki kosmetyków i wyrobów chemii gospodarczej [5, 11, 12]. W przemyśle perfumeryjnym do nadania zapachu wykorzystuje się głównie olejki eteryczne (np. lawendowy, miętowy, eukaliptusowy, bergamotkowy).

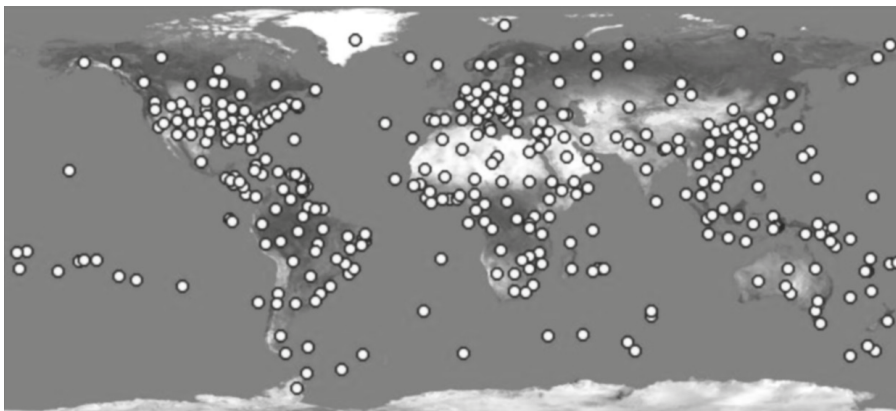
Analityka związków roślinnych jest jednym z najbardziej istotnych zagadnień współczesnej chemii analitycznej. W wielu pozyskiwanych substancjach pochodzenia roślinnego znajdują się związki o szerokim zakresie działania, w tym o właściwościach przeciwbakteryjnych przeciwnowotworowych, przeciwbólowych, przeciwzapalnych, antycholinergicznym, a także leki: przeciwwirusowe, kardiotoniczne, przeciw-cukrzycowe, regulujące ciśnienie krwi czy przeciwmalaryczne. Liczne związki pozwalają roślinie aktywnie bronić się przed owadami oraz niekorzystnymi warunkami środowiska [12, 13].

### 3. Wątrobowce

Wątrobowce nazwę zawdzięczają stożce ostrokrężnej (*Conocephalum conicum*), która swoim wyglądem przypomina wątrobę. Kiedyś wierzono, że jest przydatna w leczeniu wątroby, jednak medycyna nie potwierdziła jej właściwości leczniczych. Są to małe rośliny pierwotnie klasyfikowane do gromady mszaków, ale mają bardziej skomplikowaną budowę. Niektóre z tych roślin są plechowate, o kształcie nieregularnej rozetki lub taśmy. Inne posiadają delikatną łodyżkę i listki, przy czym zwykle są to dwa rzędy normalnych listków, a pomiędzy nimi rząd małych, odmiennie wykształconych. Zarodnia jest kulista lub podłużna, pęka na cztery klapy [14]. W rozsiewaniu zarodników pomagają długie komórki elatery, reagujące na wilgotność powietrza skręcaniem i rozkręcaniem. Wątrobowce wykształcają liczne formy rozmnożeń. Liczą około 7-10 tys. gatunków [15, 16]. Występują na całej kuli ziemskiej. Najbardziej upodobały sobie zakątki zacienione oraz nisze ekologiczne, które nie są zajęte przez konkurentów. Najkorzystniejsze warunki dla wątrobowców w naszym kraju to góry, ale tereny Polski północnej i północno-wschodniej również obfitują w te rośliny.

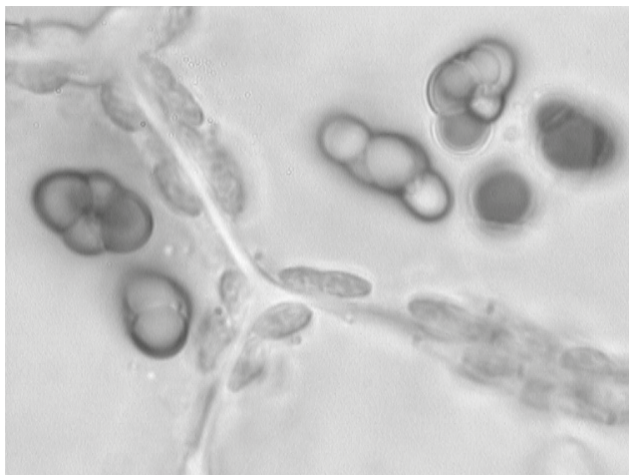
Torfowiska wysokie i przejściowe, zabagnione lasy, jak również piaszczyste brzegi, ubogie w związki pokarmowe, bardzo czystych jezior oligotroficznym, są idealnym miejscem do ich rozwoju [16, 17].

Poniżej przedstawiono mapę świata na której zaznaczono miejsca występowania wątrobowców [18].



Rysunek 1. Występowanie wątrobowców na świecie. Źródło: [18]

Wątrobowce są bardzo wrażliwe na wszelkie zmiany mikrośrodowiska. Na niewielkie różnice w wilgotności, temperaturze, nasłonecznieniu reagują zmianami w budowie ciała. Ta plastyczność stwarza wiele problemów podczas ich identyfikacji. W komórkach liści oprócz chloroplastów znajdują się ciała oleiste, spotykane jedynie wśród tych roślin. Te mikroskopijne struktury są bardzo istotną wskazówką, gdyż prawie u każdego gatunku są one inne. Niektóre z nich są bursztynowe, inne mają kolor ametystu, jeszcze inne kolor fioletowy i niebieski. Niezwykłość ciał oleistych polega także na ich nietrwałości – zwykle giną wraz ze śmiercią komórki [18, 19]. Na rysunku nr 2 przedstawiono ciała oleiste obecne w wątrobowcach z gatunku *Calypogeia azurea*.



Rysunek 2. Ciała oleiste *Calypogeia azurea*. Źródło: [zdjęcie własne]

Wątrobowce wykazują też zdolności do przebarwień pod wpływem promieni słonecznych – od barwy purpurowej [gatunki z rodzaju skapanka (*Scapania*)], poprzez różne odcienie brązu (*Gymnocolea*, *Marsupella* i *Nardia*), do zupełnie czarnych. Przyczyną takich przebarwień jest fakt, że w ścianie komórkowej odkładają się barwniki. Swój wygląd wątrobowce zawdzięczają także obecności rozmnożeń (1-, 2-komórkowych tworów) służących do rozmnażania wegetatywnego, przybierających różne barwy i sprawiających, że roślina wygląda tak, jak gdyby była przyprószona kolorowym pyłem [19].

#### **4. Techniki stosowane do izolacji lotnych metabolitów**

Etap przygotowania próbki do analizy chromatograficznej skupia na sobie uwagę wielu badaczy i analityków. Problem właściwego przygotowania materiału do badań jest bardzo istotny w przypadku analizy materiałów naturalnych takich jak materiał roślinny. Cechą która wyróżnia materiał roślinny, jest bogactwo bardzo zróżnicowanych pod względem właściwości fizykochemicznych związków, które występują w bardzo szerokim zakresie stężeń. Etap przygotowania próbek ma ważne znaczenie dla miarodajności wyników analizy uzyskanych w trakcie prowadzenia

badania. To ten etap decyduje o sukcesie analitycznym. Z tego powodu dobór właściwej techniki przygotowania próbki jest niezwykle istotny i dokonuje się go na podstawie czynników takich jak: czułość, wydajność, koszty, dostęp do odpowiedniej aparatury i urządzeń kontrolno-pomiarowych i ich możliwość wielokrotnego użycia, prostota, czas analizy dostosowane do techniki oznaczania analitów. Kluczowe znaczenie ma też selektywność ekstrakcji, skład i stan skupienia próbki, ilość analitów w próbce oraz aspekty ekologiczne [20]. Od dobrej metody przygotowania próbki roślinnej należałoby oczekiwać, aby niezależnie od miejsca położenia danego związku w matrycy, jej typu (twarda, gumowata czy delikatna), obecności innych składników (np. lipidów) równie łatwo i w pełni izolowała związek lotny i nielotny, polarny i niepolarny, wrażliwy jak i ten odporny na działanie np. wysokiej temperatury [20, 21].

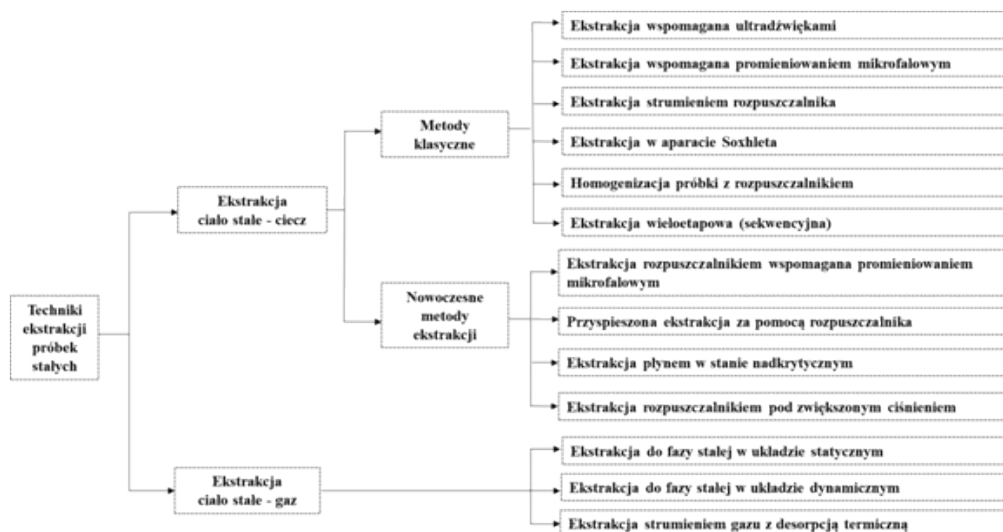
Lotne metabolity mogą charakteryzować się różnorodną polarnością, rozpuszczalnością, lotnością i stabilnością termiczną. Występują często w niskich stężeniach w surowcu, dlatego nie ma jednej uniwersalnej i prostej metody ich izolowania.

W procesie przygotowania próbek do analizy składników lotnych stosowane są metody destylacyjne (np. destylacja z parą wodną) i ekstrakcyjne oraz dynamicznie rozwijające się metody sorpcyjne, w tym na przykład mikroekstrakcja do fazy stałej [21].

Ekstrakcja jest jednym z najczęściej wykorzystywanych procesów przygotowania próbki. Swą popularność zawdzięcza możliwości osiągnięcia wszystkich celów stawianych przed etapem przygotowania próbki. Ponadto, odmienne właściwości fizykochemiczne analitów oraz matryc nie ograniczają obszaru jej stosowania [21].

Kryterium podziału technik ekstrakcyjnych są stany skupienia próbki oraz medium ekstrahującego (ekstrahenta). Technika ekstrakcji ciała stałego różni się od techniki ekstrakcji cieczy czy gazu.

Na rysunku nr 3 przedstawiono najczęściej stosowane metody ekstrakcji ciała stałego a na rysunku nr 4 sposoby ekstrakcji próbek gazowych.



Rysunek 3. Metody ekstrakcji próbek stałych. Źródło: [opracowanie własne]



Rysunek 4. Metody ekstrakcji próbek gazowych. Źródło: [opracowanie własne]

Poniżej omówiono techniki izolacji lotnych metabolitów obecnych w ciałkach oleistych wątrobowców. Oznaczanie zawartości olejku eterycznego w materiale roślinnym stanowi podstawę jego kwalifikacji dla wykorzystania w przemyśle farmaceutycznym. Izolację olejków eterycznych często przeprowadza się, stosując tradycyjną metodę destylacji z parą wodną, której prototypem jest aparat Clevengera, a polską odmianą jest aparat Derynga. Metoda polega na oddestylowaniu olejku eterycznego z ogrzewanej w kolbie mieszaniny surowca olejkodajnego i wody [21].

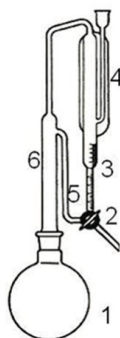
W Farmakopei Polskiej opisane są normy, które musi spełniać substancja roślinna. Ujednolicenie norm poprzez wprowadzenie Farmakopei Europejskiej spowodowało konieczność dostosowania w Polsce wymagań dotyczących oznaczania zawartości olejku eterycznego. Farmakopea Polska VII (2006) wprowadziła aparat typu Clevengera.

### • **Hydrodestylacja z wykorzystaniem aparatu Derynga**

Aparat Derynga to urządzenie otrzymane i opatentowane przez Jakuba Derynga. Służy do destylacji materiałów roślinnych. Na rysunku 5 przedstawiono jego schemat.



Hydrodestylację w aparacie Derynga można prowadzić metodą bezpośrednią i pośrednią. Metoda bezpośrednia polega na ogrzewaniu kolby, w której znajduje się odważona wcześniej odpowiednia ilość surowca i wody. Proces trwa około 3 godziny, licząc od rozpoczęcia wrzenia i przedestyłowania pierwszej kropli. W tym przypadku intensywność destylacji powinna wynosić około 3-4 cm<sup>3</sup> płynu na minutę. Po zakończeniu destylacji należy wyłączyć chłodzenie, olejek sprowadzić na mikroskalę i odczytać wynik po około 30 minutach, a odczytaną objętość olejku przeliczyć na 100 g surowca.



Rysunek 5. Aparat Derynga: 1 – kolba okrągłodenna, 2 – zawór trójdrożny, 3 – część kalibrowana, 4 – chłodnica, 5 – rurka przepływowa, 6 – kolumna destylacyjna. Źródło: [22]

Metoda pośrednia polega na ogrzewaniu kolby zawierającej surowiec, wodę oraz dodatek 0,30 cm<sup>3</sup> ksylenu. Hydrodestylacja przebiega analogicznie jak w metodzie bezpośredniej, jednak podczas odczytywania objętości olejku na mikroskali należy odjąć poprawkę ksylenową (dla aparatu zgodnego z FP VI poprawka wynosi 0,27 cm<sup>3</sup>). Na koniec odczytaną objętość olejku przeliczyć na 100 g surowca. Resztki olejku w obu metodach usuwa się przepłukując aparat gorącą wodą, a następnie etanolem lub acetonem [22].

Zalety destylacji z wykorzystaniem aparatu Derynga:

- stosowanie niewielkiej ilości surowca roślinnego;
- uzyskanie produktu pozbawionego składników nielotnych;
- prosta aparatura do prowadzenia hydrodestylacji;
- używanie jako rozpuszczalnika wody.

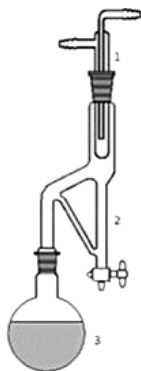
Wady destylacji z wykorzystaniem aparatu Derynga:

- nieznaczne ulatnianie się części olejku z górnej części aparatu, co skutkuje utratą związków najbardziej lotnych;
- powstawanie artefaktów (produktów izomeryzacji, cyklizacji, racemizacji, a także hydrolizy, eliminacji i transestryfikacji);
- podczas destylacji roślin bogatych w saponiny, występuje niekorzystne zjawisko pienienia, któremu zapobiega dodatek substancji, antypieniących, zanieczyszczających jednak destylat związkami krzemowymi [23].

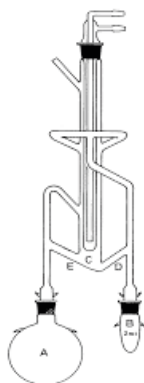
- **Hydrodestylacja z wykorzystaniem aparatu Clevengera**

Przebieg hydrodestylacji w aparacie Clevengera jest podobny do przebiegu w aparacie Derynga. Zawartość kolby utrzymywana jest w stanie wrzenia, powstająca para wodna wraz z olejkami eterycznymi zostaje odprowadzona do chłodnicy i skroplona na dwie fazy. Cały proces trwa około 3 godzin [23, 24].

Na rysunku 6 przedstawiono schemat aparatu Clevengera wykorzystywanego do hydrodestylacji.



Rysunek 6. Aparat Clevengera: 1 – chłodnica z skręplaczem typu „zimny palec”, 2 – aparat Clevengera, 3 – kolba okrągłodenna. Źródło: [25]



Rysunek 7. Aparat Likensa–Nickersona. Źródło: [26]

- **Równoczesna destylacja z parą wodną – ekstrakcja**

Równoczesna hydrodestylacja i ekstrakcja jest jedną z najbardziej skutecznych metod wydzielania związków zapachowych na skalę laboratoryjną.

Na rysunku 7 przedstawiono schemat aparatu Likensa–Nickersona wykorzystywanego do destylacji z parą wodną.

Materiał badawczy umieszczony jest w kolbie destylacyjnej (A wraz z wodą destylowaną (100 ml). W drugiej kolbie (B) umieszcza się rozpuszczalnik organiczny niemieszający się z wodą o gęstości większej od gęstości wody. Obie kolby zaczyna

się podgrzewać i w obu kolbach rozpoczyna się destylacja. W części aparatu, w której znajduje się materiał badawczy zachodzi destylacja z parą wodną, skroplony destylat, zawierający będące przedmiotem oznaczenia substancje lotne ekstrahowany jest w części C. Otrzymywany w ten sposób (ekstrakcja ciągła) ekstrakt służy ramieniem D do kolby B, a rafinat zawracany jest ramieniem E do kolby A. Proces ten, prowadzi się około 4 godzin. Końcowym etapem jest odparowanie rozpuszczalnika z kolby B pod zmniejszonym ciśnieniem [26].

- **Mikroekstrakcja do fazy stałej (ang. *Solid Phase Microextraction – SPME*)**

Mikroekstrakcja do fazy stałej to metoda izolacji i wzbogacania analitów z próbek stałych, ciekłych i gazowych. SPME zyskuje coraz większą popularność wśród analityków ponieważ staje się alternatywą dla konwencjonalnych metod przygotowania próbek środowiskowych żywności i farmaceutyków [27-29]. Metodę tę coraz częściej stosuje się do oznaczania lotnych związków organicznych. Wykorzystanie techniki SPME w analityce chemicznej pozwala na niemal całkowite wyeliminowanie rozpuszczalnika z procesu ekstrakcji.

Zaletami tej metody izolacji są:

- prostota i szybkość wykonania analizy, nie wymagającej zastosowania skomplikowanych przyrządów i aparatów;
- niewielkie rozmiary włókna SPME;
- wysoka czułość – możliwość oznaczenia substancji na poziomie ppt;
- możliwość jednoczesnego pobierania, zateżniania i oznaczania analitów;
- możliwość łączenia z innymi technikami analitycznymi. SPME; najczęściej stosowane jest w połączeniu z chromatografią gazową [30, 31].

Technika mikroekstrakcji do fazy stałej posiada jednak i wady:

- podczas desorpcji w wysokiej temperaturze faza stacjonarna oraz niestabilne termicznie składniki próbki mogą ulegać częściowej lub całkowitej degradacji;
- trwała adsorpcja związków trudno lotnych na włóknie, wpływa na zmianę jego właściwości sorpcyjnych [32, 33].

- **Ekstrakcja rozpuszczalnikowa wspomagana promieniowaniem mikrofalowym (ang. *Microwave Assisted Extraction – MAE*)**

Proces wykorzystujący pochłanianie energii mikrofalowej przez substancje chemiczne do wyodrębnienia ekstraktu z surowca. Materiał wraz z rozpuszczalnikiem, należącym do substancji organicznych umieszczany jest w naczyniu generującym promieniowanie mikrofalowe, w którym temperatura dochodzi nawet do 190°C.

Energia wpływa na poruszanie się jonów i dipoli w polu elektromagnetycznym, co powoduje wytworzenie ciepła, na skutek czego rośnie efektywność procesu. Warunkiem doboru rozpuszczalnika jest jego niezerowy moment dipolowy. Po zakończeniu procesu, konieczna jest separacja produktu oraz ochłodzenie naczynia [33].

Zalety ekstrakcji rozpuszczalnikowej wspomaganej promieniowaniem mikrofalowym:

- krótki czas procesu;
- nieskomplikowana aparatury.

Wady metody:

- wysoka temperatura, mogąca prowadzić do rozkładu produktu;

- konieczność odseparowania produktu od pozostałości ekstrakcyjnych;
- użycie substancji organicznych;
- powstawanie artefaktów.

### • **Ekstrakcja gazami w stanie nadkrytycznym (ang. *Supercritical Fluid Extraction* – SFE)**

Ekstrakcja gazami w stanie nadkrytycznym (SFE – *Supercritical Fluid Extraction*) jest doskonałą zachowawczą metodą izolowania składników surowców naturalnych, stosowaną od wielu lat.

W metodzie tej wykorzystuje się właściwości rozpuszczalnika w warunkach ciśnienia i temperatury poniżej tzw. punktu krytycznego, w którym ekstrahent występuje równocześnie w fazie ciekłej i gazowej. Proces ekstrakcji nadkrytycznej obejmuje trzy główne etapy: sprężanie rozpuszczalnika do stanu nadkrytycznego, ekstrakcja ciśnieniowa, separacja, czyli wydzielanie składnika ekstrahowanego [34, 35]

Dobierając odpowiednio warunki ekstrakcji (temperatura, ciśnienie, czas) można otrzymać produkt przypominający składem olejek eteryczny, a zmieniając stopniowo parametry procesu, można otrzymać frakcje zawierające różne składniki surowca. Produkty uzyskane tą metodą mogą jednak często znacznie różnić się składem nie tylko ilościowym, ale i jakościowym od olejków eterycznych. Efektywność wydzielania lotnych związków jest wyższa dla surowców uprzednio nawilżonych wodą, lub będących gęstymi cieczami (szampony, kondycjonery) [36].

Zalety ekstrakcji gazami w stanie nadkrytycznym:

- duża selektywność;
- krótki czas ekstrakcji;
- zmniejszenie stopnia degradacji składników termolabilnych i wrażliwych na działanie tlenu.

Wady:

- wysoki koszt aparatury i jej eksploatacji;
- trudny i czasochłonny proces doboru odpowiedniego przedziału temperatur, ciśnienia i przepływu gazu [34, 36].

### • **Porównanie technik stosowanych do izolacji metabolitów wtórnych na przykładzie wątrobowców**

W pracy porównano trzy popularne techniki pozyskiwania olejków z materiału roślinnego na przykładzie wątrobowców z gatunku *Calypogeia azurea*. Gatunek ten charakteryzuje się zróżnicowanymi metabolitami pod względem właściwości fizykochemicznych.

Pierwszą metodą pozyskiwania olejków była hydrodestylacja w aparacie Derynga. Zgodnie z Farmakopeą VI proces ten przeprowadzono w następujący sposób:

1. Do kolby odważono 5 g materiału roślinnego (*Calypogeia azurea*);
2. Do kolby z surowcem dodano około 150 ml wody destylowanej oraz 500  $\mu$ l m-ksylenu;
3. Rurkę aparatu zalano powoli wodą do wartości 3 na skali;
4. Kran aparatu ustawiono w pozycji – zawrót;
5. Ogrzewano przez 3 h od momentu wrzenia;
6. Uzyskany olejek umieszczono w fiolece.

Drugą metodą izolacji związków obecnych w ciałkach oleistych wątrobowców z gatunku *Calypogeia azurea* była ekstrakcja rozpuszczalnikowa wspomagana promieniowaniem mikrofalowym (MAE).

Ekstrakcję przeprowadzono w następujący sposób:

1. 50 gramów zamrożonego materiału roślinnego podzielono na próbki o masie 2 gramów;
2. Przygotowany materiał biologiczny umieszczono w naczyniach teflonowych zawierających mieszało magnetyczne;
3. Do każdej z próbek dodano 20 cm<sup>3</sup> eteru dietylowego, szczelnie zamknięto naczynia;
4. Naczynia teflonowe umieszczono w piecu mikrofalowym;
5. Przeprowadzono ekstrakcję przy użyciu promieniowania mikrofalowego (warunki procesu zamieszczono w tabeli 1);
6. Proces ekstrakcji prowadzono trzykrotnie – ostatni raz wykonywany był w temperaturze pokojowej przez okres 24 godzin.

Tabela 1. Warunki procesu ekstrakcji rozpuszczalnikiem przy wykorzystaniu mikrofal

Parametr	Warunki
Masa próbki	2 g
Objętość rozpuszczalnika	20 cm <sup>3</sup>
Czas ekstrakcji	45 min
Program temperaturowy	20°C 10°C/min do 70°C (35 min)
Moc	200 W
Mieszanie	20%

Trzecią metodą pozyskiwania olejków z materiału roślinnego na przykładzie wątrobowców z gatunku *Calypogeia azurea* była mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME). W tabeli 2 przedstawiono warunki procedury analitycznej przeprowadzonego procesu. Mikroekstrakcję do fazy stałej przeprowadzono w następujący sposób:

1. Odważono 5 mg wątrobowca w fiolce o pojemności 1,7 cm<sup>3</sup>;
2. Fiolkę szczelnie zamknięto stosując zakrętki z membraną PTFE/silikon;
3. Fiolkę z umieszczono w piecu grzewczym i ogrzewano w temperaturze 50°C;
4. Do fiolki wprowadzono włókno SPME i wykonano sorpcję lotnych związków. Proces prowadzono przez 60 minut;
5. Desorpcję wyizolowanych związków przeprowadzono w dozowniku chromatografu gazowego w temperaturze 250°C przez okres 10 minut.

W przeprowadzonych badaniach użyto włókno do długości 2 cm pokryte fazą diwinylobenzen/karboksen/polidimetylosiloksan (DVB/ CAR/PDMS).

Tabela 2. Warunki procesu mikroekstrakcji do fazy stałej

Parametr	Warunki
Masa próbki	5 mg w fiolce 1,7 cm <sup>3</sup>
Temperatura sorpcji	50°C
Czas sorpcji	60 min
Temperatura desorpcji	250°C
Czas desorpcji	10 min
Pokrycie włókna	DVB/CAR/PDMS

Uwolnione związki podczas opisanych powyżej ekstrakcji rozdzielono na kolumnie kapilarnej Quadrex 007-5 MS o długości 30 m, średnicy 0,25 mm i grubości fazy stacjonarnej 0,25  $\mu\text{m}$ . Do separacji związków zastosowano następujący program temperaturowy: 60°C z przyrostem 4°C na minutę do 230°C i następnie izotermicznie przez okres 20 min. Gazem nośnym był hel, który przepływał z prędkością 1 cm<sup>3</sup>/min. Temperatura linii transferowej wynosiła 250°C, źródła jonów 200°C a zakres mas rejestrowanych jonów od 33 do 550 m/z (tab. 3). Identyfikację lotnych związków wykonano na podstawie otrzymanych widm fragmentacyjnych, w oparciu o indeksy retencji, biblioteki widm masowych: NIST 11, NIST webbook, Pherobase oraz dane literaturowe.

Tabela 3. Warunki analizy chromatograficznej

Parametr	Warunki
Kolumna kapilarna	Quadrex 007-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu\text{m}$ )
Program temperaturowy	60°C z przyrostem 4°C/min do 230°C (20 min)
Temperatura dozownika	250°C
Tryb pracy dozownika	Bez podziału strumienia
Gaz nośny	Hel
Objętościowe natężenie przepływu gazu nośnego	1 cm <sup>3</sup> /min
Temperatura linii transferowej	250°C
Temperatura źródła jonów	200°C
Zakres mas (m/z)	33-550
Jonizacja strumieniem elektronów o energii	70 eV

W celu porównania wyżej wymienionych technik wytypowano 12 związków stanowiących główne lotne składniki analizowanego olejku, o odmiennych właściwościach fizykochemicznych. Wyniki zamieszczono w tabeli 4.

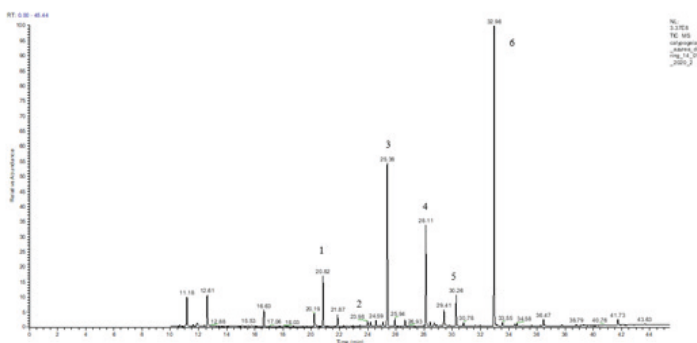
Tabela 4. Porównanie metod izolacji metabolitów wtórnych obecnych w wątrobowcach

Wyizolowany związek	Metoda ekstrakcji		
	Hydrodestylacja	MAE	SPME
Elemen	-	-	+
Anastrapten	+	+	+
$\alpha$ -Maalien	-	-	+
Aromadendren	+	-	+
Dehydroaromadodendren	-	-	+
Bicyclogermacren	+	+	+
1,4-Dimetyloazulen	+	-	+
Spathulenol	-	-	+
Globulol	+	-	-
8-Cedren-13-ol	-	-	+
1,4-Dimetyl-7,1-metyletylazulen	+	-	+
Metyl-2-metylazulen-1-carboksylate	-	+	+

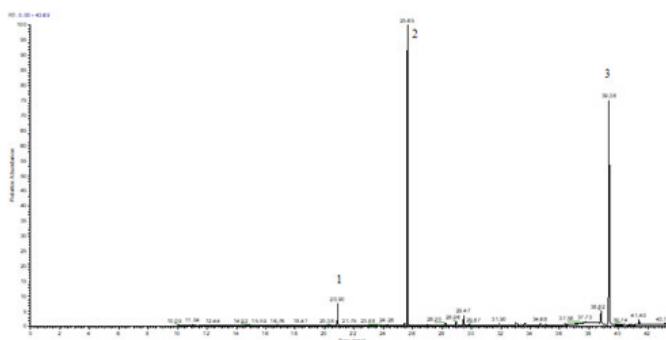
(+) – dobra izolacja, (-) – słaba izolacja. Źródło: opracowanie własne

Poniżej zamieszczono chromatogramy otrzymane podczas analizy składu metabolitów wtórnych w badanych wątrobowcach.

Na rysunku 8 przedstawiono chromatogram otrzymany podczas analizy składu olejków eterycznych otrzymanych w procesie hydrodestylacji.



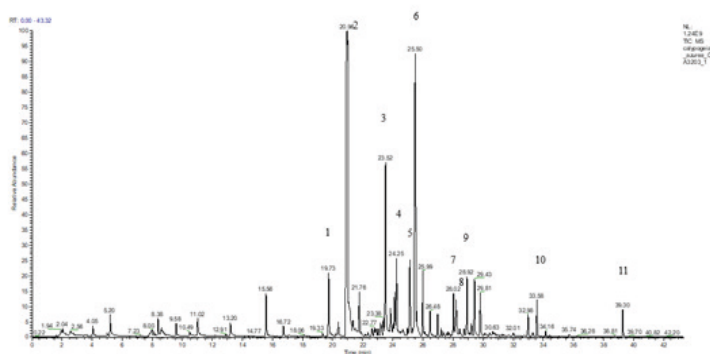
Rysunek 8. Chromatogram otrzymany podczas analizy składu olejków eterycznych otrzymanych w procesie ekstrakcji rozpuszczalnikowej wspomaganiej promieniowaniem mikrofalowym. Oznaczone związki to: 1) Anastrapten, 2) Aromadendren, 3) Bicyclogermacren, 4) 1,4-Dimetyloazulen, 5) Globulol, 6) Metyl-2-metylazulen-1-carboksylate



Rysunek 9. Chromatogram otrzymany podczas analizy składu olejków eterycznych otrzymanych w procesie ekstrakcji rozpuszczalnikowej wspomaganiej promieniowaniem mikrofalowym. Oznaczone związki to: 1) Anastrapten, 2) Bicyclogermacren, 6) Metyl-2-metylazulen-1-carboksylate

Na rysunku 9 przedstawiono chromatogram otrzymany podczas analizy składu olejków eterycznych otrzymanych w procesie ekstrakcji rozpuszczalnikowej wspomaganiej promieniowaniem mikrofalowym.

Na rysunku 10 przedstawiono chromatogram otrzymany podczas analizy składu olejków eterycznych otrzymanych w procesie mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME).



Rysunek 10. Chromatogram otrzymany podczas analizy składu olejków eterycznych otrzymanych w procesie mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME). Oznaczone związki to: 1) Elemen, 2) Anatraptren, 3)  $\alpha$ -Maalien, 4) Aromadendren, 5) Dehydroaromadodendren, 6) Bicyclogermacren, 7) 1,4-Dimetyloazulen, 8) Spathulenol, 9) 8-Cedren-13-ol, 10) 1,4-Dimetyl-7,1-metyletylazulen, 11) Metyl-2-metylazulen-1-carboksylate

Analizując otrzymane wyniki stwierdzono, że przeważają związki (90-95%) należące do monoterpenu i węglowodorów seskwiterpenowych oraz ich utlenione pochodne: aldehydy, alkohole, ketony, laktony, tlenki, etery, estry. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że technika mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME) pozwala na pozyskanie największej liczby lotnych metabolitów.



Można przypuszczać, że podczas hydrodestylacji i ekstrakcji rozpuszczalnikowej wspomaganej promieniowaniem mikrofalowym tworzą się artefakty lub w wyniku działania wysokiej temperatury metabolity uległy rozpadowi.

Dzięki wykorzystaniu SPME pozyskano w zadawalającej ilości 11 z 12 wytypowanych lotnych związków obecnych w ciałkach oleistych wątrobowców natomiast podczas izolacji przy użyciu aparatu Derynga już tylko 6 z 12 związków.

Najmniej, bo jedynie 3 z 12 związków wyizolowano po ekstrakcji rozpuszczalnikowej wspomaganej promieniowaniem mikrofalowym. Użyty do ekstrakcji rozpuszczalnik (eter dietylowy), wysoka temperatura, oraz działanie promieniowania mikrofalowego prawdopodobnie przyczyniło się do rozpadu części z wytypowanych składników.

Badania realizowano w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki 2017/27/B/NZ8/01091.

## Literatura:

1. Król S.K., Skalicka-Woźniak K., Kandefers-Szerszeń M., Stepulak A., *Aktywność biologiczna i farmakologiczna olejków eterycznych w leczeniu i profilaktyce chorób infekcyjnych*, Postepy Hig Med Dosw (online), 2013, 67, s. 1000-1007.
2. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., *Biological effect of essential oils – a review*, Food Chem. Toxicol., 2008, 4, s. 446-475.
3. Trytek M., Paduch R., Fiedurek J., Kandefers-Szerszeń M., *Monoterpeny – stare związki, nowe zastosowania i biotechnologiczne metody ich otrzymywania*, Biotechnologia, 2007, 1, s. 135-155.
4. Jones A.R., Miller M., Aebersold R., Apweiler R., Ball C., Brazma A., DeGreef J., Hardy N., Hermjakob H., Hubbard S., Hussey P., Igra M., Jenkins H., Jr R.K.J., Laursen K., Oliver S.G., Paton N.W., Sansone S.A., Sarkans U., Stoekert Jr Ch.J., Taylor Ch.F., Whetzel P.L., White J.A., Spellman P., Pizarro A., *The Functional Genomics Experiment model (FuGE): an extensible framework for standards in functional genomics*, Nature Biotechnol., 2007, 25, s. 1127-1133.
5. Hirai M.Y., Yano M., Goodenowe D.B., Kanaya S., Kimura T., Awazuhara M., Arita M., Fujiwara T., Saito K., *Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in Arabidopsis thaliana*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, 101, s. 10205-10210.
6. Stobiecki M., *Metabolomika – narzędzie w genomice funkcjonalnej i biologii systemów*, Biotechnologia, 2009, 2 (85), s. 54-64.
7. Najda A.B., *Volatiles substances in plants – essential oils*, Episteme, 2015, 29(4), s. 65-77.
8. Grajek W., *Biosynteza metabolitów wtórnych w kulturach in vitro*, w: Malepszy S. (red.), *Biotechnologia roślin*, s. 306-340, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2007.
9. Ramachandra Rao S., Ravishankar G.A., *Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites*, Biotechnology Advances, 2002, 20, s. 101-153.
10. Kawka M., Pilarek M., Sykłowska-Baranek K., Pietrosiuk A., *Roślinne metabolity jako kluczowy bioprodukt biotechnologii roślin*, Biul. Wydz. Farm. WUM, 2017, 8, s. 68-79.
11. Kubala A., *Biologiczne metody pozyskiwania związków leczniczych w botanice*, Gazeta Farmaceutyczna, 2013, wrzesień, s. 26-28.
12. Achakzai A.K., Achakzai P., Masood A., Kayani S.A., Tareen R.B., *Response of plant parts and age on the distribution of secondary metabolites on plants found in quetta*, Pak. J. Bot., 2009, 41 (5), s. 2129-2135.
13. Haliński Ł.P., Czerwicka M., Stepnowski P., *Współczesne metody ekstrakcji, izolacji i analizy metabolitów wtórnych roślin*, LAB, 2010, 15 (6), s. 16-21.
14. Jermaczek M., *Świat pod stopami – wątrobowce*, Bociek – Biuletyn. Lubuskiego Klubu Przyrodników nr (4/2001).
15. Kowalczyk T., Łucka M., Szemraj J., Sakowicz T., *Terapeutyczny potencjał metabolitów wtórnych produkowanych w kulturach korzeni włośnikowatych*, Postepy Hig Med Dosw (online), 2015, 69, s. 549-561.

16. Buczkowska K., Chudzińska E., *Nieznani krewni mchów*, Wiedza i życie 7/1999.
17. Szweykowska A., Szweykowski J., *Botanika – systematyka, tom 2*; Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006.
18. <http://www.discoverlife.org/> (Data dostępu: 08.03.2020).
19. Krzeptowski-Sabała J., *Zielony Świat Tatr; Wątrobowce*, <http://www.poznajtatry.pl/> (Data dostępu: 07.03.2020).
20. Marcinkowski Ł., Kloskowski A., Namieśnik J., *Nowe rozwiązania metodyczne i techniczne w zakresie techniki mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej*, Wiadomości Chemiczne, 2015, 69, s. 9-10.
21. Wojtowicz E., *Metody analizy związków zapachowych żywności*, Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, 2015, 70(4), s. 102-116.
22. Kulwik-Pióro A., *Hydrodestylacja jako metoda pozyskiwania olejków eterycznych*, Biotechnologia 2015, (online).
23. Da Costa N.C., Eri S., *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*, Blackwell Publishing Ltd, 2005, s. 12-23.
24. Stevens R., *An introduction to the cumulative subject Index*, Flavour Fragr. J., 1999, 14, s. 260-261.
25. Kwaśny, J. Vogt, O. Lasoń, E., *Analiza instrumentalna kompozycji olejków eterycznych z roślin baldaszkowatych (apiaceae) na przykładzie olejku anyżowego*, Czasopismo Techniczne. Chemia, 2012, 109(1-Ch), s. 71-83.
26. Jałoszyński K., Szarycz M., Jarosz B., *Zachowanie związków aromatycznych w suszu selera naciowego uzyskanego metodą mikrofalowo-próżniową*, Inżynieria Rolnicza, 2008, 4(102), s. 323-327.
27. Sukola K., Koziel J., Augusto F., Pawliszyn J., *Diffusion-based calibration for SPME analysis of aqueous samples*, Analytical Chemistry, 2001, 73, s. 13-18.
28. Augusto F., Koziel J., Pawliszyn J., *Design and Validation of Portable SPME Devices for Rapid Field Air Sampling and Diffusion-Based Calibration*, Analytical Chemistry, 2001, 73, s. 481-486.
29. Gorecki T., Pawliszyn J., *Analytical Chemistry, Determination of Tetraethyllead and Inorganic Lead in Water by Solid Phase Microextraction/Gas Chromatography*, Analytical Chemistry, 1996, 68, s. 3008-3014.
30. Farajzadeh M.A., Matin A.A., *Determination of BTEX in water samples with an SPME hollow fiber coated copper wire*, Chromatographia, 2008, 68, s. 443-446.
31. Banel A., Zygmunt B., *Zastosowanie połączenia mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej i chromatografii gazowej do oznaczania lotnych kwasów tłuszczowych w próbkach środowiskowych i pokrewnych*, Ecological Chemistry and Engineering S., 2008, 15, s. 7-28.
32. Palacz M., *Właściwości i zastosowanie modyfikowanej krzemionki osadzonej na włóknie kwarcowym w technice SPME*, (praca doktorska) Poznań 2012.
33. Chemat F., Abert-Vian M., Visinoni F., *Microwave hydrodiffusion for isolation of natural products*, European Patent EP 1, 955,749, 2008.
34. Kaiser C.S., Rompp H., Schmidt P.C., *Pharmaceutical applications of supercritical carbon dioxide*, Pharmazie, 2001, 56, s. 907-926.
35. Wolski T., Najda M., *Lipidy i olejki eteryczne występujące w owocach (nasionach) z rodzaju Nigella SP.*, Aromaterapia, 2004, 38, s. 18-25.
36. Reverchon E., *Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products*, J. Supercrit. Fluids, 1997, 10, s. 1-37.

## **Wady i zalety technik stosowanych do izolacji lotnych metabolitów na przykładzie wątrobowców**

### Streszczenie

Rozwój metod analitycznych przyczynił się do ponownego odkrycia właściwości prozdrowotnych olejków eterycznych. Dzięki wykorzystaniu m.in. chromatografii gazowej (*Gas Chromatography* – GC), chromatografii cieczowej (*Liquid Chromatography* – LC), wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (*High Pressure Liquid Chromatography* – HPLC) i spektrometrii mas (*Mass Spectrometry* – MS) można w sposób precyzyjny określić skład chemiczny mieszanin pochodzenia naturalnego, a zastosowanie np. preparatywnego kolektora frakcji (*Preparative Fraction Collector* – PFC) umożliwia izolowanie wybranych związków o wysokim stopniu czystości, przejawiających określoną aktywność.

Techniki powszechnie stosowane do izolacji olejków eterycznych obejmują ekstrakcję rozpuszczalnikiem oraz ich odmianny wspomagane mikrofalami i ultradźwiękami, destylację z parą wodną, ekstrakcję i mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej, ekstrakcję CO<sub>2</sub> w stanie nadkrytycznym.

Kiedy rozpuszczalność określonego lotnego metabolitu w wodzie jest wysoka można zastosować kohobację dzięki której można zapobiegać utracie rozpuszczalnych w wodzie związków poprzez powrót skroplonej wody z separatora z powrotem do destylatora.

W pracy lotne metabolity izolowano z materiału roślinnego – wątrobowców. Porównano metody izolacji oparte na ekstrakcji rozpuszczalnikiem wspomaganej mikrofalami, mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej oraz hydrodestylacji z wykorzystaniem aparatu Derynga. Omówiono wady i zalety stosowanych technik izolacji.

Słowa kluczowe: hydrodestylacja, mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej, wątrobowce, lotne metabolity

## **Advantages and disadvantages of techniques used to isolate volatile metabolites of liverworts**

### Abstract

The development of analytical methods has contributed to the rediscovery of the health-promoting properties of essential oils. Thanks to the use of, among others Gas Chromatography (GC), Liquid Chromatography (LC), High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) and Mass Spectrometry (MS), you can precisely determine the chemical composition of mixtures of natural origin, and the use of, for example, the Preparative Fraction Collector (PFC) allows the isolation of selected compounds with a high degree of purity that exhibit specific activity.

Techniques commonly used to isolate essential oils include solvent extraction and their varieties supported by microwaves and ultrasounds, steam distillation, stationary phase extraction and microextraction, supercritical CO<sub>2</sub> extraction.

When the solubility of a particular volatile metabolite in water is high, cohobation can be used to prevent the loss of water-soluble compounds by returning the condensed water from the separator back to the distiller.

In study, volatile metabolites were isolated from plant material – liverworts. The isolation methods based on solvent extraction supported by microwave, stationary phase microextraction and hydrodistillation using the Deryng apparatus were compared. Advantages and disadvantages of isolation techniques used are discussed.

Keywords: hydrodistillation, microextraction to stationary phase, liverworts, volatile compounds

## Wpływ elicytacji konopi na zawartość kannabinoidów oraz aktywność wybranych enzymów

### 1. Wstęp

Konopie (*Cannabis sativa* L.) należące do rodziny *Cannabaceae* są wykorzystywane od czasów starożytnych do produkcji włókna, oleju, a także jako środek leczniczy. Wytwarzają ważne metabolity wtórne obejmujące przede wszystkim kannabinoidy, terpenoidy i polifenole. W zależności od rodzaju i poziomu wytwarzanych kannabinoidów, w szczególności  $\Delta 9$ -tetrahydrokannabinolu ( $\Delta 9$ -THC), wyróżniamy konopie włókniste i narkotyczne. Obecnie możliwa jest uprawa konopi włóknistych zawierających poniżej 0,2%  $\Delta 9$ -THC, natomiast uprawa konopi leczniczych, o podwyższonej zawartości  $\Delta 9$ -THC, jest obwarowana wieloma prawnymi ograniczeniami. Oprócz  $\Delta 9$ -THC pozostałe kannabinoidy, takie jak kannabidiol (CBD) czy kannabigerol (CBG), posiadają istotne właściwości lecznicze, a jednocześnie pozbawione są efektu psychotropowego charakterystycznego dla  $\Delta 9$ -THC [1]. Konopie włókniste zawierają zarówno CBD, jak i CBG przy jednocześnie niskiej zawartości  $\Delta 9$ -THC, dlatego mogą wykazywać cenne właściwości lecznicze. Zawartość kannabinoidów zależy zarówno od czynników biotycznych: genotypu rośliny, fazy rozwojowej, jak i czynników abiotycznych obejmujących warunki wzrostu, np. światło, temperatura, substancje odżywcze czy promieniowanie UV. Największe stężenie kannabinoidów występuje w wierzchołkach, następnie w liściach, a najmniejsze w łodygach [1, 2].

W ostatnich latach zaobserwowano wzrost zainteresowania konopiami włóknistymi wykorzystywanymi na cele niespożywcze, jak i do produkcji żywności [1]. Uprawa roślin nie wymaga wielu nakładów finansowych czy środków ochrony roślin i jest możliwa w konwencjonalnych gospodarstwach. Konopie włókniste mogą mieć szerokie zastosowanie jako botaniczne środki owadobójcze w ramach programów zwalczania szkodników w rolnictwie ekologicznym czy jako źródło metabolitów wtórnych do celów farmaceutycznych, medycznych i badawczych [1, 3].

Konopie oprócz kannabinoidów mogą wytwarzać wiele innych metabolitów bezpośrednio lub pośrednio pochodzących ze szlaku fenylopropanoidowego, szczególnie ważnego dla farmakologii. Ważnym elementem łańcucha biosyntezy jest amoniakolizacja fenyloalaniny (PAL), katalizująca zmianę fenyloalaniny w kwas cynamonowy, który następnie może być prekursorem kumaryn oraz innych związków

<sup>1</sup> milena.szalata@iwnirz.pl, Zakład Biotechnologii, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, Wojska Polskiego 71b, 60-630 Poznań, <https://www.iwnirz.pl>.

<sup>2</sup> marcin.ozarowski@iwnirz.pl, Zakład Biotechnologii, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, Wojska Polskiego 71b, 60-630 Poznań, <https://www.iwnirz.pl>.

<sup>3</sup> mariola.dreger, Zakład Biotechnologii, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, Wojska Polskiego 71b, 60-630 Poznań, <https://www.iwnirz.pl>.

<sup>4</sup> grazyna.mankowska@iwnirz.pl, Zakład Biotechnologii, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, Wojska Polskiego 71b, 60-630 Poznań, <https://www.iwnirz.pl>.

<sup>5</sup> karolina.wielgus@iwnirz.pl, Zakład Biotechnologii, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, Wojska Polskiego 71b, 60-630 Poznań, <https://www.iwnirz.pl>.

będących składnikami ściany komórkowej (ligniny), pigmentów (flawonoidy, antybiotyki), środków chroniących przed promieniowaniem UV (kumaryny, flawonoidy) czy obrony roślin (izoflawonoidy, furano-kumaryny) [4-9].

Konopie od dawna są wykorzystywane do wytwarzania preparatów zmniejszających nudności i wymioty podczas chemioterapii, do poprawy apetytu u osób zakażonych HIV czy łagodzenia skurczów mięśni [10]. Za efekt leczniczy odpowiadają kannabinoidy będące metabolitami wtórnymi, dlatego istnieje ogromne zapotrzebowanie na ich produkcję w roślinach. Obecnie opracowywane są technologie pozwalające zwiększyć wytwarzanie poprzez pobudzanie, zmianę przepuszczalności błony oraz usuwanie produktu *in situ*. Stosowane są elicytory, czyli czynniki stresowe wywołujące reakcję obronną rośliny, która prowadzi do pobudzenia szlaków biosyntezy, a w efekcie zwiększa produkcję i akumulację pożądaných metabolitów. Cała roślina lub część rośliny (nasiona, hodowla komórkowa) poddawane są działaniu związków chemicznych czy hormonów, które zwiększają syntezę określonych związków [11-14]. Obecnie wykorzystuje się wiele łatwo dostępnych związków, które można zastosować do elicytacji. Pośród nich wyróżniamy związki biotyczne (pektyny, celuloza, guma arabska, wyciąg drożdżowy), abiotyczne (kwas octowy, etanol, światło UV, chłodzenie, susza) i hormony roślinne, takie jak kwas salicylowy (SA), kwas jasmonowy (JA), jasmonian metylu (MeJA), cytokininy i gibereliny [13, 15].

Elicytory biotyczne mogą powstać podczas infekcji grzybami, bakteriami czy wirusami (np. chitozan, alginian). Wykorzystywane są również preparaty biologiczne złożone, w których nie można dokładnie określić substancji czynnej związanej z procesem elicytacji, zaliczmy do nich wyciąg drożdżowy (substancje czynne: chityna, oligomery N-acetyloglukozaminy,  $\beta$ -glukan, glikopeptydy i ergosterol) oraz preparaty bakteryjnej ściany komórkowej [13]. Abiotyczne elicytory związane są ze stresem środowiskowym wywołanym czynnikami chemicznymi (sole nieorganiczne, jony metali) lub czynnikami fizycznymi (promieniowanie UV, zranienie czy chłodzenie) [13, 16, 17]. Kwas salicylowy, kwas jasmonowy i jasmonian metylu indukują ekspresję genów wielu szlaków biosyntezy. Określane są jako hormony ponieważ wywołują odpowiedź komórkową w niskich stężeniach odległych od miejsca syntezy i mogą być podawane na rośliny w różny sposób. Jasmonian metylu generuje odpowiedź po podaniu w formie gazowej, płynnej czy w formie oprysku [13, 18].

Odpowiedź roślin na elicytację zależy głównie od ich cech genetycznych (geny odporności) i stanu fizjologicznego rośliny [13, 19]. Rośliny w odpowiedzi uruchamiają mechanizmy obronne takie jak: indukcja białek i enzymów ochrony przed stresem oksydacyjnym, gwałtowne obumieranie komórek wokół miejsca zakażenia, produkcja reaktywnych form tlenu czy produkcja cząstek sygnałowych, które wpływają na produkcję metabolitów wtórnych [20, 21].

Kwas salicylowy jest powszechną cząsteczką sygnałową odpowiedzialną za zwiększenie tolerancji na czynniki biotyczne (grzyby, bakterie, wirusy) i abiotyczne (zasolenie gleby, chłodzenie, upał, susza, światło UV, ozon i metale ciężkie). Zastosowanie SA stymuluje biosyntezę określonych metabolitów wtórnych, ponadto zewnętrzna aplikacja wpływa na wzrost ekspresji amoniakolizy L-fenylalaninowej (PAL) [14, 22-25].

Elicytacja może być wykorzystana do zwiększenia wytwarzania związków fenolowych poprzez aktywację enzymu amoniakolizy fenylalaniny. Zwiększona

aktywność enzymu PAL w warunkach stresu powoduje stopniowe gromadzenie się metabolitów fenolowych jako efekt pobudzenia szlaków metabolicznych. Kwas salicylowy i kwas jasmonowy indukują wytwarzanie związków fenolowych, przy czym kwas jasmonowy bierze udział w aktywacji szlaku sygnałowego oktadekanoidu i zwiększa gromadzenie kumaryn, natomiast kwas salicylowy indukuje sygnalizację fenylpropanoidową poprzez stymulację aktywności enzymu PAL [13, 26-28].

Zmiany zachodzące pod wpływem stresu są powiązane ze zmianą aktywności enzymów. Amoniakoliza fenyloalaniny jest enzymem powszechnie występującym w roślinach, katalizuje eliminację amoniaku z cząsteczki L-fenyloalaniny. W wyniku tej reakcji powstaje amoniak i kwas trans-cynamonowy, który jest prekursorem wielu związków fenylpropanoidowych takich jak np. ligniny, flawonoidy, kumaryny i kwas salicylowy [27, 28].

Inna grupa enzymów biorących udział w odpowiedzi na stres to peroksydazy, których aktywność wiąże się z rozwojem roślin i różnicowaniem się komórek. Peroksydazy związane są z procesem lignifikacji, biosyntezą etylenu, obroną przed patogenami, jednocześnie wykazują działanie antyoksydacyjne. W warunkach stresu oksydacyjnego obserwuje się między innymi wzrost aktywności enzymów unieczynnających reaktywne formy tlenu – peroksydaz (peroksydazy glutationowej, peroksydazy gwajakolowej, peroksydazy askorbinianowej) oraz katalazy. Peroksydazy związane są z procesem lignifikacji, biosyntezą etylenu, obroną przed patogenami, jednocześnie wykazują działanie antyoksydacyjne [29].

## 2. Cel pracy

Metabolity wtórne wykorzystywane w farmacji są często wytwarzane przez rośliny w warunkach stresu. Przypuszcza się, że kannabinoidy powstają w podobnych okolicznościach [30]. Istnieje ogromne zapotrzebowanie na kannabinoidy, jednak uprawa konopi jest limitowana przez restrykcyjne prawo. Ponadto związki te wytwarzane są jedynie w okresie kwitnienia przez osobniki żeńskie w wierzchołkach i liściach. Zastosowanie procesu elicytacji do wywołania stresu sprzyjającemu zwiększeniu produkcji kannabinoidów może stanowić rozwiązanie na pokrycie rosnącego zapotrzebowania. Dlatego celem prowadzonych badań jest ocena wpływu elicytacji konopi na zawartość kannabinoidów oraz aktywność wybranych enzymów: amoniakolazy fenyloalaninowej, katalazy i peroksydazy gwajakolowej.

## 3. Materiały i metody

### 3.1. Materiał roślinny

W badaniach wykorzystano konopie włókniste (*Cannabis sativa* L.) odmiany LKCSO. Odmiana LKCSO to konopie dwupienne, pochodzące z konopi środkowo-europejskich, wyhodowane przez Lniarsko-Konopną Centralną Stację Doświadczalną, a następnie przez Instytut Przemysłu Włókien Łykowych (obecnie Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich). Odmiana charakteryzuje się krótkim okresem wegetacji (125 dni). Konopie osiągają wysokość 160-180 cm, dojrzewają we wrześniu, natomiast zbiór osobników męskich (płaskoni) występuje w połowie sierpnia [31].

### 3.2. Warunki wzrostu

Konopie włókniste (*Cannabis sativa* L.) odmiany LKCSO uprawiano na poletkach doświadczalnych w Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Włókien Naturalnych

i Roślin Zielarskich (IWNiRZ) w Pętakowie. Tamtejsza gleba (czarne ziemie), kwalifikowana jest pod względem przydatności rolniczej jako kompleks 2 (pszenny dobry), o odczynie lekko kwaśnym, o wysokiej zawartości fosforu, średniej zawartości potasu, magnezu, boru, manganu, miedzi i cynku oraz niskiej zawartości żelaza.

### **3.3. Elicytacja**

W prowadzonym doświadczeniu wykorzystano elicytory abiotyczne (30% etanol EtOH), biotyczne (wyciąg drożdżowy YE) oraz związki pełniące funkcję hormonów roślinnych (SA i MeJA). Wyciąg drożdżowy oraz kwas salicylowy rozpuszczono w wodzie destylowanej, natomiast jasmonian metylu w 30% roztworze etanolu [32, 33]. Na rośliny z kwiatostanem żeńskim podano po 50 ml roztworu elicytorów: jasmonian metylu (4 mM/L, 11 mM/L, 22 mM/L), ekstrakt drożdżowy: woda (1:1), kwas salicylowy (10 mM/L, 25 mM/L, 50 mM/L) i 30% etanol. W przeprowadzonym doświadczeniu materiał kontrolny stanowiły konopie odmiany LKCSO niepoddane elicytacji. Po oprysku rośliny zakrywano folią (30 minut) w celu uniknięcia parowania związków i zanieczyszczenia pozostałych roślin. Proces elicytacji przeprowadzono w trzech terminach uwzględniających fazy rozwojowe rośliny. Pierwszy oprysk wykonano podczas fazy początkowej kwitnienia, drugi oprysk przeprowadzono w fazie pełni kwitnienia, natomiast ostatni oprysk obejmował rośliny w pełnej fazie dojrzewania nasion (koniec kwitnienia). Po 5 dniach od oprysku pobierano do analiz wiechy z roślin poddanych elicytacji oraz roślin kontrolnych w każdej fazie rozwoju. Zebrany materiał suszono w temperaturze 40°C.

Do badań nad zawartością kannabinoidów wykorzystano materiał pochodzący z roślin poddanych działaniu etanolu, wyciągu drożdżowego, różnych stężeń jasmonianu metylu i kwasu salicylowego oraz z roślin kontrolnych, nie poddanych działaniu czynnika stresowego. Materiał zbierano na każdym etapie rozwoju roślin. Wyszuszony materiał poddano analizie.

Do przeprowadzenia analizy enzymatycznej wykorzystano materiał poddany działaniu różnych stężeń jasmonianu metylu. Kontrolę stanowiły wiechy roślin niepoddanych procesowi elicytacji. Do badań wykorzystano rośliny z pełnej fazy dojrzewania nasion (koniec kwitnienia), które natychmiast zamrożono w ciekłym azocie, następnie próbki przechowywano w zamrażarce w temperaturze -20°C [34]. Jasmonian metylu to związek powszechnie znany jako elicytor indukujący zmiany w szlakach biosyntezy. Często definiowany jest jako hormon, ponieważ produkowany jest także przez rośliny, a niewielkie zmiany w jego stężeniu wywołują odpowiedź w miejscach odległych od syntezy. Przy wyborze materiału do analizy enzymatycznej zdecydowano się na badanie zmian zachodzących w roślinach poddanych działaniu jasmonianu metylu, który można podać roślinie na wiele sposobów, np. w postaci płynnej, gazowej czy aerozolu, co jest dużym atutem dla komercyjnego wykorzystania tego związku [13].

### **3.4. Analiza kannabinoidów**

W badanych próbkach oznaczono zawartość kannabidiolu (CBD) oraz  $\Delta^9$ -tetrahydrokannabidiolu ( $\Delta^9$ -THC). Analizy GC-FID (chromatografia gazowa z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym) przeprowadzono na chromatografie AutoSystem XL sprzężonym z detektorem jonów płomienia (Perkin Elmer, USA). Analizę danych przeprowadzono przy użyciu standardowego oprogramowania

dostarczonego przez producenta (TurboChrom, PekinElmer Corporation). Substancje rozdzielono na kapilarnej kolumnie ze stopionej krzemionki (SPB-5, 30 m x 0,32 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ). Kannabinoidy zidentyfikowano na podstawie porównania ich względnych czasów retencji z odpowiednimi wartościami wzorców testowanych w tych samych warunkach chromatograficznych [35, 36]. Identyfikacji dokonano przy użyciu standardowych krzywych. Oznaczenia zawartości kannabinoidów w materiale roślinnym przeprowadzono w Zakładzie Badań i Przetwórstwa Nasion IWNiRZ.

### 3.5. Aktywność amoniakolizy fenyloalaniny (PAL)

Ekstrakcja: 3 g liści ucierano w móżdzierzu w 4 ml buforu (50 mM Tris-HCl, 14,4 mM 2-merkaptoetanol, 5% PVPP, pH 8,5), następnie wirowano 10 min 13 000 x g, 7 min 13 000 x g.

Aktywność PAL: 0,5 ml ekstraktu inkubowano 30 min. w 37°C z 2,5 ml mieszaniny (0,2% L-fenyloalanina lub D-fenyloalanina, 50 mM Tris-HCl, pH 8,5). Reakcję zatrzymano 0,5 ml 4 M HCl, mierzono absorbancję przy długości fali 270 nm. Aktywność oceniano na podstawie ilości powstałego kwasu trans-cynamonowego. Ilość kwasu trans-cynamonowego powstałego z L-fenyloalaniny obliczano wg wzoru wyznaczonego na podstawie krzywej standardowej.

Aktywność PAL wyrażano w  $\mu\text{M}$  kwasu trans-cynamonowego powstałego w ciągu godziny w 1 g świeżej masy liści [37].

### 3.6. Aktywność katalazy (CAT) i peroksydazy gwajakolu (GPX)

Ekstrakcja: 500 mg liści ucierano w móżdzierzu w 8 ml buforu (50 mM bufor fosforanowy, 1% PVP, pH 7,0), następnie wirowano 20 min 15 000 x g.

Aktywność CAT: 0,1 ml ekstraktu dodano do 2,9 ml mieszaniny (50 mM bufor fosforanowy, 15 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pH 7,0). Mierzono absorbancję co 20 sekund przy długości fali 240 nm.

Aktywność GPX: 0,3 ml ekstraktu dodano do 2,7 ml mieszaniny (0,1 M bufor fosforanowy, 30 mM gwajakol, 30 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pH 6,8). Mierzono absorbancję co 20 sekund przy długości fali 470 nm.

Jedną jednostką aktywności CAT i GPX jest zdefiniowana przez zmianę absorbancji o 0,001 w ciągu minuty [38].

### 3.7. Analiza statystyczna

Wyniki przedstawione w pracy zostały sprawdzone z wykorzystaniem programu STATISTICA 12 testem statystycznym Tukey'a na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

## 4. Wyniki i dyskusja

Surowiec roślinny zbierano w trzech terminach: na początku kwitnienia roślin, w pełni kwitnienia oraz na końcu kwitnienia. Wykazano największą zawartość kannabinoidów w ostatnim terminie zbioru, w materiale kontrolnym (CBD 3,145% i  $\Delta^9$ -THC 0,039%) oraz poddanym działaniu wyciągu drożdżowego: woda 1:1 (CBD 3,080% i  $\Delta^9$ -THC 0,041%) (tab. 1 i 2). Przeprowadzona analiza wskazuje, że kannabinoidy wytwarzane są głównie przez rośliny pod koniec kwitnienia, a największa ich zawartość występuje w wiechach, co znajduje swoje potwierdzenie w literaturze [39, 40].



Tabela 1. Zawartość  $\Delta$ 9-THC w wiechach konopi poddanych elicytacji w kolejnych terminach oprysku (Test HSD Tukeya, alfa = ,05000)

Termin	Początek kwitnienia	Pełnia kwitnienia	Koniec kwitnienia
Kontrola	0,005b	0,014ab	0,039a
30% etanol	0,007ab	0,033ab	0,020ab
Wyciąg drożdżowy	0,004b	0,018ab	0,041a
4 mM/L jasmonian metylu	0,019ab	0,019ab	0,022ab
11 mM/L jasmonian metylu	0,009ab	0,031ab	0,028ab
22 mM/L jasmonian metylu	0,023ab	0,034ab	0,026ab
10 mM/L kwas salicylowy	0,020ab	0,033ab	0,026ab
25 mM/L kwas salicylowy	0,020ab	0,031ab	0,026ab
50 mM/L kwas salicylowy	0,015ab	0,024ab	0,021ab

Źródło: Opracowanie własne

Tabela 2. Zawartość CBD w wiechach konopi poddanych elicytacji w kolejnych terminach oprysku (Test HSD Tukeya, alfa = ,05000)

Termin	Początek kwitnienia	Pełnia kwitnienia	Koniec kwitnienia
Kontrola	0,632c	1,148abc	3,145a
30% etanol	0,675c	1,474abc	1,683abc
Wyciąg drożdżowy	0,538c	0,632c	3,080ab
4 mM/L jasmonian metylu	0,661c	0,597c	1,668abc
11 mM/L jasmonian metylu	0,375c	1,271abc	2,256abc
22 mM/L jasmonian metylu	0,729c	1,380abc	2,173abc
10 mM/L kwas salicylowy	0,773c	1,322abc	2,153abc
25 mM/L kwas salicylowy	0,733c	1,211abc	2,050abc
50 mM/L kwas salicylowy	0,532c	0,942abc	1,992abc

Źródło: Opracowanie własne

Nie zaobserwowano znaczącego wpływu elicytacji na zawartość  $\Delta$ 9-THC i CBD w konopiach, a zaistniałe różnice w zawartości kannabinoidów mogą być wywołane uwarunkowaniami genetycznymi. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze badania przeprowadzone na hodowlach komórkowych konopi, które również nie wykazały istotnego wpływu elicytacji na biosyntezę kannabinoidów [33, 39].

Aktywność enzymów oznaczano w roślinach poddanych elicytacji wybranymi stężeniami jasmonianu metylu w ostatniej fazie kwitnienia, kiedy obserwuje

się największą zawartość kannabinoidów. Przeprowadzone badania wykazały zwiększenie aktywności enzymu amoniakolizy fenyloalaniny (PAL) z 50,98 U/ $\mu$ M w konopiach niepoddanych elicytacji do 58,34 U/ $\mu$ M w konopiach elicytowanych 11 mM/L jasmonianem metylu (tab. 3). Tendencja wzrostowa utrzymywała się także przy ponownym pomiarze przeprowadzonym po 15 minutach, gdzie zaobserwowano aktywność 60,16 U/ $\mu$ M w próbce pochodzącej z konopi poddanej działaniu 11 mM/L jasmonianu metylu w odniesieniu do kontroli (56,10 U/ $\mu$ M). Zwiększenie aktywności wraz z upływem czasu stwierdzono we wszystkich badanych próbkach z wyjątkiem konopi potraktowanych 4 mM/L MeJA, gdzie wykazano spadek aktywności PAL z wartości 50,39 U/ $\mu$ M do wartości 45,75 U/ $\mu$ M. Ponadto zdecydowanie mniejsze wartości pomiaru wykazano w konopiach poddanych działaniu 22 mM/L jasmonianu metylu, jednak tendencja wzrostowa aktywności badanego enzymu PAL wraz z upływem czasu została utrzymana. Wzrost aktywności PAL powiązany z elicytacją MeJA potwierdzają badania prowadzone przez inne jednostki [34].

Tabela 3. Aktywność amoniakolizy fenyloalaninowej w konopiach poddanych działaniu jasmonianu metylu o stężeniu 1 ml/L, 2,5 ml/L i 5 ml/L [U/ $\mu$ M]

Czas [min]	1	15
Kontrola	50,98	56,10
4 mM/L jasmonian metylu	50,39	45,75
11 mM/L jasmonian metylu	58,34	60,16
22 mM/L jasmonian metylu	28,98	31,22

Źródło: Opracowanie własne

Wzrost aktywności katalazy w prównaniu z kontrolą zanotowano przy zastosowaniu 22 mM/L MeJA (tab. 4). W trakcie prowadzonego pomiaru zaobserwowano spadek aktywności katalazy w trakcie 30 minut od momentu zainicjowania reakcji we wszystkich badanych próbkach niezależnie od podanego stężenia elicytora, z poziomu 10,14 U/mg po 5 minutach do poziomu 0,35 U/mg, dla stężenia 22 mM/L. Analogicznie aktywność kontroli w badanym czasie wynosiła odpowiednio 9,35 U/mg i 0,19 U/mg. Wzrost aktywności katalazy pod wpływem kwasu jasmonowego lub kwasu jasmonowego i kwas salicylowego w odniesieniu do kontroli wykazały badania prowadzone przez zespół Gholi-Tolouie (2018) [34].

Tabela 4. Aktywność katalazy w konopiach poddanych działaniu jasmonianu metylu o stężeniu 1 ml/L, 2,5 ml/L i 5 ml/L [U/mg]

Czas [min]	1	3	5	30
Kontrola	9,35	3,62	2,12	0,19
4 mM/L jasmonian metylu	5,35	1,99	1,15	0,07
11 mM/L jasmonian metylu	8,93	3,79	2,06	0,29
22 mM/L jasmonian metylu	10,14	4,42	2,65	0,35

Źródło: Opracowanie własne

Zwiększoną aktywność peroksydazy gwajakolowej na poziomie 16,02 U/mg zaobserwowano jedynie przy elicytacji 11 mM/L MeJA w odniesieniu do kontroli (7,82 U/mg), natomiast pozostałe dawki jasmonianu metylu nie wywołały zmian w aktywności (tab. 5). Według literatury aktywność peroksydaz wzrasta po podaniu czynnika elicytującego, jednak w przeprowadzonym doświadczeniu zwiększoną aktywność wobec kontroli stwierdzono tylko w obecności średniego stężenia MeJA, co może sugerować działanie innych czynników [34].

Tabela 5. Aktywność peroksydazy gwajakolu w konopiach poddanych działaniu jasmonianu metylu o stężeniu 1 ml/L, 2,5 ml/L i 5 ml/L [U/mg]

Czas [min]	5	30	60	90	120	150
Kontrola	7,82	3,49	2,09	1,43	1,08	0,85
4 mM/L jasmonian metylu	9,11	4,01	2,06	1,16	0,99	0,68
11 mM/L jasmonian metylu	16,02	3,87	1,98	1,46	1,14	0,93
22 mM/L jasmonian metylu	8,61	3,16	2,07	1,44	1,16	0,97

Źródło: Opracowanie własne

Badania przeprowadzone przez innych badaczy wskazują na wzrost aktywności katalazy i innych badanych enzymów pod wpływem stresu termicznego [38, 41]. Ponadto wykazano, że wcześniejszy stres może zwiększyć lub w inny sposób zmienić tolerancję na inne niekorzystne warunki. Nie zaobserwowano natomiast wpływu chłodzenia na aktywność peroksydazy. Być może rodzaj stresu ma wpływ na aktywność badanych enzymów, ponieważ w niniejszej pracy zaobserwowano wzrost aktywności peroksydazy przy zastosowaniu 11 mM/L jasmonianu metylu, natomiast nie zaobserwowano znaczącej zmiany przy innych stężeniach MeJA.

## 5. Wnioski

Nie stwierdzono wpływu elicytacji na zawartość kannabinoidów w konopiach, ponadto uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze badania przeprowadzone na hodowli komórkowych konopi.

Wykazano wzrost aktywności badanych enzymów po zastosowaniu elicytacji jasmonianem metylu. Uzyskane wyniki sugerują, że konopie w odpowiedzi na stres uruchamiają różne mechanizmy ochronne, jednym z nich może być stres oksydacyjny obejmujący wytworzenie reaktywnych form tlenu. Enzymy antyoksydacyjne takie jak katalaza czy peroksydazy chronią komórkę przed wolnymi rodnikami.

Natomiast enzym amoniakoliaza fenyloalaniny bierze udział w biosyntezie związków polifenolowych w roślinach. W prowadzonych badaniach zaobserwowano wzrost aktywności PAL w roślinach poddanych działaniu jasmonianu metylu, co sugeruje zwiększone wytwarzanie fenoli biorących udział w miejscowym mechanizmie obronnym.

Kolejnym etapem badań będzie dostosowanie metodyk oznaczania enzymów do materiału pochodzącego z innych gatunków roślin.

## Podziękowania

Badanie zostało sfinansowane przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi (RM 171/2017).

## Literatura:

1. García-Tejero I.F., Durán Zuazo V.H., Sánchez-Carnenero C., Hernández A., Ferreiro-Vera C., Casano S., *Seeking suitable agronomical practices for industrial hemp (Cannabis sativa L.) cultivation for biomedical applications*, Industrial Crops and Products, 139, 2019, s. 111524, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111524>.
2. Glivar T., Eržen J., Kreft S., Zagožen M., Čerenak A., Čeh B., Tavčar Benković E., *Cannabinoid content in industrial hemp (Cannabis sativa L.) varieties grown in Slovenia*, Industrial Crops & Products, 145, 2020, s. 112082, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.112082>.
3. Benelli G., Pavela R., Petrelli R., Cappellacci L., Santini G., Fiorini D., Sut S., Dall'Acqua S., Canale A., Maggi F., *The essential oil from industrial hemp (Cannabis sativa L.) by-products as an effective tool for insect pest management in organic crops*, Industrial Crops and Products, 122, 2018, s. 308-315, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.032>.
4. Marks M.D., Tian L., Wenger J.P., Omburo S.N., Soto-Fuentes W., He J., Gang, D.R., Weiblen G.D., Dixon R.A., *Identification of candidate genes affecting  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol biosynthesis in Cannabis sativa*, Journal of experimental botany, 60, 2009, s. 3715-3726, <https://doi.org/10.1093/jxb/erp210>.
5. Stout J.M., Boubakir Z., Ambrose S.J., Purves R.W., Page J.E., *The hexanoyl-CoA precursor for cannabinoid biosynthesis is formed by an acyl-activating enzyme in Cannabis sativa trichomes*, The Plant Journal, 71, 2012, s. 353-365, <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04949.x>.
6. Treutter D., *Significance of flavonoids in plant resistance: A review*, Environmental Chemistry Letters, 4, 2006, s. 147-157, <https://doi.org/10.1055/s-2005-873009>.
7. Vogt T., *Phenylpropanoid biosynthesis*, Molecular Plant, 3, 2010, s. 2-20, <https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>.
8. Hahlbrock K., Scheel D., *Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism*, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 40, 1989, s. 347-369.
9. Docimo T., Consonni R., Coraggio I., Mattana M., *Early Phenylpropanoid Biosynthetic Steps in Cannabis sativa: Link between Genes and Metabolites*, International Journal of Molecular Sciences, 14, 2013, s. 13626-13644, <https://doi.org/10.3390/ijms140713626>.
10. Citti C., Ciccarella G., Braghiroli D., Parenti C., Vandelli M.A., Cannazza G., *Medicinal cannabis: Principal cannabinoids concentration and their stability evaluated by a high performance liquid chromatography coupled to diode array and quadrupole time of flight mass spectrometry method*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 128, 2016, s. 201-209, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.033>.
11. Cai Z., Kastell A., Knorr D., Smetanska I., *Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures*, Plant Cell Reports, 31, 2012, s. 461-477, <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1165-0>.
12. Chandra S., Chandra R., *Engineering secondary metabolite production in hairy roots*, Phytochemistry Reviews, 10, 2011, s. 371-395, <https://doi.org/10.1007/s11101-011-9210-8>.
13. Baenas N., García-Viguera C., Moreno D., *Elicitation: a tool for enriching the bioactive composition of foods*, Molecules, 19, 2014, s. 13541-13563, <https://doi.org/10.3390/molecules190913541>.
14. Jalali S., Salami S.A., Sharifi M., Sohrabi S., *Signaling compounds elicit expression of key genes in cannabinoid pathway and related metabolites in cannabis*, Industrial Crops & Products, 133, 2019, s. 105-110, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.03.004>.
15. Angelova Z., Georgiev S., Roos W., *Elicitation of Plants*, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 20(2), 2006, s. 72-83, <https://doi.org/10.1080/13102818.2006.10817345>.
16. Radman R., Saez T., Bucke C., Keshavarz T., *Elicitation of plants and microbial cell*

- systems, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37, 2003, s. 91-102, <https://doi.org/10.1042/BA20020118>.
17. Dörnenburg H., Knorr D., *Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures*, *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 1995, s. 674-684, [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00108-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00108-4)
  18. Rohwer C.L., Erwin J.E., *Horticultural applications of jasmonates: A review*, *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83, 2008, s. 283-304, <https://doi.org/10.1080/14620316.2008.11512381>.
  19. García-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D., Pugin A., *Early signaling events induced by elicitors of plant defenses*, *Molecular Plant-microbe Interactions*, 19, 2006, s. 711-724, <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0711>.
  20. Ferrari S., *Biological elicitors of plant secondary metabolites: Mode of action and use in the production of nutraceuticals*, [w:] Giardi M.T., Rea G., Berra B. (red.), *Bio-Farms for Nutraceuticals*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer, Boston, MA 698, 2010, s. 152-166, [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7347-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7347-4_12).
  21. Zhao J., Davis L.C., Verpoorte R., *Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites*, *Biotechnology Advances*, 23, 2005, s. 283-333, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.003>.
  22. Janda T., Horváth E., Szalai G., Paldi E., *Role of Salicylic Acid in the Induction of Abiotic Stress Tolerance*, [w:] Hayat S., Ahmad A. (red.), *Salicylic Acid: a Plant Hormone*, Springer, Dordrecht, 2007, s. 91-150, [https://doi.org/10.1007/1-4020-5184-0\\_5](https://doi.org/10.1007/1-4020-5184-0_5).
  23. Wobbe K.K., Klessig D.F., *Salicylic acid – an important signal in plants*, [w:] Verma D.P.S. (red.), *Signal Transduction in Plant Growth and Development, Plant Gene Research (Basic Knowledge and Application)*, Springer, Vienna, 1996, 167-196, [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-7474-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-7474-6_7).
  24. Sun Y., Xia X., Jiang J., Chen S., Chen F., Lv G., *Salicylic acid-induced changes in physiological parameters and genes of the flavonoid biosynthesis pathway in Artemisia vulgaris and Dendranthema nankingense during aphid feeding*, *Genetics and Molecular Research*, 15(1), 2015, s. 15017546, <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15017546>.
  25. Ejtahed R.S., Radjabian T., Tafreshi S.A.H., *Expression analysis of phenylalanine Ammonia lyase gene and rosmarinic acid production in Salvia officinalis and Salvia virgata shoots under salicylic acid elicitation*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176, 2015, s. 1846-1858, <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-015-1682-3>.
  26. Mewis I., Smetanska I.M., Müller C.T., Ulrichs C., *Specific poly-phenolic compounds in cell culture of Vitis vinifera L.: cv. Gamay Fréaux*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164, 2011, s. 148-161, <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-010-9122-x>
  27. Gałązka A., *Przemiany związków fenolowych i rola PAL w indukcji mechanizmów obronnych rośliny*, *Polish Journal of Agronomy*, 15, 2013, s. 83-88.
  28. Dias M.I., Sousa M.J., Alves R.C., Ferreira I., *Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review*, *Industrial Crops and Products*, 82, 2016, s. 9-22, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.016>
  29. Małecka A., Tomaszewska B., *Reaktywne formy tlenu w komórkach roślinnych i enzymatyczne systemy obronne. Reactive oxygen species in plant cells and antioxidative defense systems*, *Postępy Biologii Komórki*, 32(2), (2005), 311-325.
  30. Gorelick J., Bernstein N., *Chemical and Physical Elicitation for Enhanced Cannabinoid Production in Cannabis*, [w:] Chandra S., Lata H., ElSohly M. (red.), *Cannabis sativa L. – Botany and Biotechnology*, Springer, Cham, 2017, s. 439-456, [https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6\\_21](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6_21).
  31. Białousowa J., Bartosik A., Kurhański M., Nagórski A., Tumalewicz B., *Rośliny włókniste*, [w:] Białousowa J. (red.), Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, 1958, s. 218-219.
  32. Flores-Sanchez I.J., Ortega-Lopez J., Montes-Horcasitas M.C., Ramos-Valdivia A.C.,

- Biosynthesis of sterols and triterpenes in cell suspension cultures of Uncaria tomentosa*, Plant and Cell Physiology, 43(12), 2002, s. 1502-1509, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf181>.
33. Flores-Sanchez I.J., Pec J., Fei J., Choi Y.H., Dusek J., Verpoorte R., *Elicitation studies in cell suspension cultures of Cannabis sativa L.*, Journal of Biotechnology, 143, 2009, s. 157-168, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.05.006>.
34. Gholi-Tolouie S., Sokhandan-Bashir N., Davari M., Sedghi M., *The effect of salicylic and jasmonic acids on tomato physiology and tolerance to Cucumber mosaic virus (CMV)*, European Journal of Plant Pathology, 151, 2018, s. 101-116, <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1356-9>.
35. Dussy F.E., Hamberg C., Luginbuhl M., Schwerzmann T., Briellmann T.A., *Isolation of  $\Delta^9$ -THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of  $\Delta^9$ -THC in cannabis products*, Forensic Science International, 149, 2005, s. 3-10, <https://doi.org/doi:10.1016/j.forsciint.2004.05.015>.
36. Raharjo T.J., Verpoorte R., *Methods for the analysis of cannabinoids in biological materials: a review*, Phytochemical analysis, 15, 2004, s. 79-94, <https://doi.org/10.1002/pca.753>.
37. Peltonen S., Karjalainen R., *Phenylalanine Ammonia-lyase Activity in Barley After Infection with Bipolaris sorokiniana or Treatment with its Purified Xylanase*, Journal of Phytopathology, 143, 1995, s. 239-245, <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1995.tb00606.x>.
38. Rached-Kanouni M., Alatou D., *Change in activity of antioxidative enzymes in leaves of Acacia retinodes, Biota orientalis and Casuarina equisetifolia under heat stress condition*, European Scientific Journal, 9, 2013, s. 402-410.
39. Flores-Sanchez I.J., Verpoorte R., *Secondary metabolism in cannabis*, Phytochemistry Reviews, 7, 2008, s. 615-639, <https://doi.org/10.1007/s11101-008-9094-4>.
40. Bernstein N., Gorelick J., Kocha S., *Interplay between chemistry and morphology in medical cannabis (Cannabis sativa L.)*, Industrial Crops and Products, 129, 2019, s. 185-194, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.039>.
41. Kang H.M., Saltveit M.E., *Antioxidant Enzymes and DPPH-Radical Scavenging Activity in Chilled and Heat-Shocked Rice (Oryza sativa L.) Seedlings Radicles*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 2002, s. 513-518, <https://doi.org/10.1021/jf011124d>.

## **Wpływ elicytacji konopi na zawartość kannabinoidów oraz aktywność wybranych enzymów**

### Streszczenie

Konopie odmiany LKCSD poddano działaniu elicytorów: jasmonian metylu (4 mM/L, 11 mM/L, 22 mM/L), ekstrakt drożdżowy: woda (1:1), kwas salicylowy (10 mM/L, 25 mM/L, 50 mM/L) i 30% etanol. Opryski wykonano w trzech terminach: początek kwitnienia, pełnia kwitnienia, początek dojrzewania nasion. Po 5 dniach wiechy pobierano do analiz. Wykazano największą zawartość kannabidiolu (CBD) i  $\Delta^9$ -tetrahydrokannabinolu (THC) w ostatnim terminie zbioru, w materiale kontrolnym (CBD 3,145% i THC 0,039%) i poddanym działaniu wyciągu drożdżowego (CBD 3,080% i THC 0,041%). Nie zaobserwowano znaczącego wpływu elicytacji na zawartość  $\Delta^9$ -THC i CBD w konopiach, ponieważ zaistniałe różnice w zawartości kannabinoidów mogą być wywołane uwarunkowaniami genetycznymi. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze badania przeprowadzone na hodowlach komórkowych konopi, które również nie wykazały istotnego wpływu elicytacji na biosyntezę kannabinoidów. Stwierdzono zwiększenie aktywności enzymu amoniakolizazy fenyloalaniny (PAL) do wartości 60,16 U/ $\mu$ M w próbce pochodzącej z konopi poddanej działaniu 11 mM/L jasmonianu metylu (MeJA) w odniesieniu do kontroli (56,10 U/ $\mu$ M). Wzrost aktywności katalazy wykazano w roślinach poddanych elicytacji 11 i 22 mM/L MeJA. Największą aktywność peroksydazy gwajakolowej stwierdzono przy zastosowaniu 11 mM/L MeJA. Kolejnym etapem będzie dostosowanie metodyk oznaczania enzymów do materiału pochodzącego z innych gatunków roślin.

Badanie zostało sfinansowane przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi (RM 171/2017).

Słowa kluczowe: kannabinoidy, elicytacja, amoniakolizaza fenyloalaniny, katalaza, peroksydaza gwajakolu

## **Effect of elicitation on cannabinoid content and activity of selected enzymes in hemp**

### Abstract

Hemp variety LKCSD was treated with the following elicitors: methyl jasmonate (4 mM/L, 11 mM/L, 22 mM/L), yeast extract: water (1:1), salicylic acid (10 mM/L, 25 mM/L, 50 mM/L) and 30% ethanol. Plants were misted three times: the beginning of flowering, full flowering, beginning of seed ripening. After 5 days, panicles were taken for analysis. The highest content of cannabidiol (CBD) and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) was found at the last harvest date in control material (CBD 3.145% and THC 0.039%) and material treated with yeast extract (CBD 3.080% and THC 0.041%). No significant effect of elicitation on the content of  $\Delta^9$ -THC and CBD in cannabis was observed, as the differences in cannabinoid content may be due to genetic conditions. An increase in the activity of the phenylalanine ammonia-lyase (PAL) to 60.16 U/ $\mu$ M was found in a hemp sample treated with 11 mM/L methyl jasmonate (MeJA) in comparison with the control (56.10 U/ $\mu$ M). An increase in catalase activity was demonstrated in plants elicited with 11 and 22 mM/L MeJA. Guaiacol peroxidase activity increased with the concentration of the used elicitor, the highest activity was demonstrated using 11 mM/L MeJA. The next step will be to adapt the methodology for determining enzymes to material from other plant species. The study was funded by Ministry of Agriculture and Rural Development (RM 171/2017).

Keywords: cannabinoids, elution, phenylalanine ammonia lyase, catalase, guaiacol peroxidase

## **Biodegradacja ksenobiotyków – stymulująca aktywność wtórnych metabolitów roślinnych (WMR)**

### **1. Wstęp**

Ksenobiotyki to związki, które nie występują naturalnie w środowisku. Często charakteryzują się one wysoką toksycznością, zdolnością do bioakumulacji i trwałością w środowisku. Wśród ksenobiotyków możemy wyróżnić: trwałe zanieczyszczenia organiczne – TZO (m.in. WWA – wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, PCB – polichlorowane bifenyly) oraz nowo pojawiające się zanieczyszczenia. Ze względu na swoje właściwości, związki te wykazują również negatywny wpływ na środowisko glebowe, stąd nieustannie poszukuje się skutecznych i przyjaznych dla środowiska metod ich usuwania. Dotychczasowe badania wskazują, że mikroorganizmy ryzosferowe (bakterie i grzyby) mogą wykorzystywać ksenobiotyki jako źródło węgla, tym samym przyczyniając się do ich efektywnej degradacji w strefie korzeniowej (ryzodegradacja). Aktywność biodegradacyjna mikroorganizmów ryzosferowych jest stymulowana przez wtórne metabolity roślinne (WMR) wydzielane do ryzosfery. Współdziałanie roślin i ich eksudatów (w tym przede wszystkim WMR, charakteryzujących się podobieństwem strukturalnym do zanieczyszczeń) oraz mikroorganizmów zasiedlających ryzosferę jest jednym z najefektywniejszych procesów remediacyjnych przyczyniających się nie tylko do usunięcia danego związku z gleby, ale również do zachowania jej elementarnych funkcji.

### **2. Mikroorganizmy glebowe i rośliny jako efektywne narzędzia remediacji gleb**

Biodegradacja jest jedną z wielu dostępnych metod usuwania zanieczyszczeń ze środowiska. Proces ten polega na wykorzystaniu zdolności katabolicznej mikroorganizmów (bakterii i grzybów) w celu usunięcia ksenobiotyków z danej matrycy środowiskowej [1]. Kompletna konwersja zanieczyszczeń o skomplikowanej budowie w proste związki nieorganiczne to mineralizacja, a pojedyncza przemiana jednej substancji w inną to biotransformacja [1]. Biodegradowalność niektórych komponentów może zmieniać się w czasie wraz postępującymi zmianami aktywności i struktury populacji drobnoustrojów oraz ich adaptacją do danych warunków środowiska [1]. Badania nad biodegradacją stają się coraz bardziej kompleksowe i interdyscyplinarne, ponieważ wykorzystują one osiągnięcia z różnych dziedzin nauki, a procesy usuwania zanieczyszczeń ze środowiska mogą być kontrolowane na wielu poziomach organizacji biologicznej. Na efektywność ww. procesów wpływa również wiele czynników np. właściwości fizyczne i chemiczne zanieczyszczeń, charakterystyka mikrobiologiczna gleby (stężenie biomasy, aktywność enzymów), parametry fizykochemiczne środowiska (pH, temperatura, wilgotność), procesy sorpcji oraz obecność innych

<sup>1</sup> elzbieta.mierzejewska@unilodz.eu, Katedra UNESCO Ekohydrologii i Ekologii Stosowanej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, www.uni.lodz.pl.

<sup>2</sup> magdalena.urbaniak@biol.uni.lodz.pl; Katedra UNESCO Ekohydrologii i Ekologii Stosowanej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, www.uni.lodz.pl.



źródeł węgla [2]. Usuwanie zanieczyszczeń jest również zależne od ich biodostępności dla mikroorganizmów. Ze względu na obecność w zanieczyszczonych glebach mikroorganizmów autochtonicznych, zdolnych do metabolizowania zanieczyszczeń organicznych, biodegradacja może być przyspieszona w wyniku biostymulacji. Biostymulacja polega na wprowadzeniu do gleby substancji odżywczych lub innych potrzebnych komponentów niezbędnych dla rozwoju drobnoustrojów glebowych [2]. Może to polegać m.in. na dodaniu pierwiastków biogenych, takich jak azot lub fosfor, kometabolitów (m.in. WMR) oraz związków powierzchniowo czynnych, które zwiększają biodostępność zanieczyszczeń organicznych dla mikroorganizmów. Zdarza się również, iż stężenie zanieczyszczeń jest tak wysokie, że wpływa negatywnie na rozwój mikroorganizmów zmniejszając ich liczebność i aktywność [3]. Wyzwaniem dla biotechnologii jest również zjawisko starzenia się zanieczyszczeń (ang. *aging*), które oznacza, że zanieczyszczenia poniżej pewnej warstwy gleby są niemożliwe do usunięcia [4]. Dodatkowo, nieodpowiednie praktyki użytkowania i składowania wielu komponentów chemicznych (m.in. pestycydów) oraz ich transport w środowisku poprzez spływ powierzchniowy, sedymentację, adsorpcję, mogą doprowadzić do pogorszenia się stanu ekosystemów glebowych i wodnych oraz zubożenia lub zniszczenia naturalnych siedlisk organizmów żywych.

Dlatego, kolejną obiecującą i szybko rozwijającą się metodą oczyszczania skażonych gleb jest fitoremediacja, wykorzystująca rośliny charakteryzujące się m.in. wysokim przyrostem biomasy, tolerancją na wysokie stężenia zanieczyszczeń oraz zdolnością do ich akumulacji. Równie istotną cechą, determinującą wysoki potencjał fitoremediacyjny rośliny, jest jej system korzeniowy, dzięki któremu roślina może efektywnie pobierać zanieczyszczenia organiczne zapobiegając tym samym ich dalszemu rozprzestrzenianiu się. Dlatego wzrasta zainteresowanie badaniem procesów degradacyjnych zachodzących w strefie korzeniowej roślin [5]. Proces ten nosi nazwę ryzodegradacja i w ostatnim czasie przykuł szczególną uwagę naukowców jako efektywna metoda usuwania szkodliwych substancji ze środowiska. W glebie ryzosferowej (tj. glebie przylegającej bezpośrednio do korzeni) znajduje się największa ilość mikroorganizmów (do kilku rzędów wielkości więcej niż w glebie pozakorzeniowej). Dodatkowo do strefy korzeniowej wydzielane są eksudaty roślinne, wzbogacone o WMR, których funkcją jest m.in. [5]:

- zwiększanie biodostępności makro- i mikroelementów;
- pośredniczenie w interakcjach między organizmami (allelopatia);
- działanie przeciwdrobnoustrojowe – zwalczanie potencjalnych patogenów;
- stymulacja aktywności biodegradacyjnej mikroorganizmów ryzosferowych w zanieczyszczonych glebach.

Zdolność roślin do wydzielania WMR zależy od: stanu fizjologicznego rośliny, warunków środowiskowych, wieku rośliny (siewki produkują więcej WMR niż dojrzałe rośliny [5]) oraz ekspozycji na stres środowiskowy. Około 10-20% zasymilowanego węgla zostaje wykorzystanego przez roślinę do produkcji eksudatów roślinnych w tym WMR. Wśród WMR można wyróżnić kilka podstawowych grup [5]:

- fenole i polifenole (m.in. flawonoidy);
- terpenoidy i steroidy;
- substancje zawierające atomy azotu i siarki m.in. alkaloidy i glukozytolany.

Rośliny mogą regulować nie tylko ilość, ale również udział różnych WMR w eksudatach korzeniowych. Często te same związki mogą pełnić różne funkcje w zależności od gatunku rośliny oraz warunków środowiskowych. Zmiany w składzie eksudatów roślinnych mogą powodować modyfikacje w biomacie, strukturze populacji oraz funkcji mikroorganizmów ryzosferowych. Wynika to z wzajemnych zależności między drobnoustrojami symbiotycznymi oraz roślinami, oraz z ich współzawodnictwa o zasoby mineralne w glebie [5].

### **3. Stymulacja procesów biodegradacji ksenobiotyków przez WMR**

Wykorzystanie związków organicznych obecnych w zanieczyszczonych ekosystemach daje mikroorganizmom możliwość przetrwania, jednak często nie są one zdolne do metabolizowania zanieczyszczeń organicznych oraz wykorzystania ich jako źródła węgla. Dlatego, obecność innych związków, strukturalnie podobnych do ksenobiotyków, umożliwia mikroorganizmom wykorzystanie ich jako pierwotnych źródeł węgla oraz jednocześnie metabolizowanie innych związków organicznych m.in. TZO oraz nowo pojawiających się zanieczyszczeń organicznych.

Obecne w glebie ryzosferowej WMR mogą stymulować ekspresję genów, a tym samym aktywować produkcję enzymów, odpowiedzialnych za biodegradację strukturalnie podobnych zanieczyszczeń organicznych, jednocześnie dostarczając drobnoustrojom energii na drodze kometabolizmu. W kontekście biodegradacji, pojęcie kometabolizmu oznacza postępujące transformacje związku wyjściowego (ksenobiotyku) w obecności innego związku (substratu wzrostowego), służącego jako źródło węgla i energii, podczas gdy procesom przemian ksenobiotyków nie towarzyszy przyrost biomasy mikroorganizmów [6]. Usunięcie zanieczyszczenia z otoczenia, nie przynosi mikroorganizmom korzyści energetycznych, jednak może przyczynić się do zmniejszenia toksyczności matrycy środowiskowej. Postępujące biotransformacje związku wyjściowego, przeprowadzone przez różne mikroorganizmy, prowadzą do częściowej lub całkowitej mineralizacji substancji organicznej. Dlatego WMR służą bakteriom jako pierwotne źródła węgla, zaś zanieczyszczenia organiczne ulegają transformacji w obecności pierwotnego źródła energii. Gleba ryzosferowa charakteryzuje się największą efektywnością w zakresie biodegradacji w porównaniu do gleby pozakorzeniowej ponieważ obecność dodatkowych źródeł węgla wpływa na przyrost biomasy bakterii ryzosferowych, tym samym przyspiesza oraz ułatwia procesy transformacji i mineralizacji zanieczyszczeń w glebie [5].

### **4. Stymulacja procesów biodegradacji TZO**

Współdziałanie mikroorganizmów oraz roślin w zakresie usuwania zanieczyszczeń organicznych ze środowiska jest już od dłuższego czasu tematem wielu publikacji naukowych. TZO są to substancje chemiczne, które charakteryzują się wysoką toksycznością oraz trwałością w środowisku, przez co mogą powodować ciężkie choroby u ludzi i zwierząt oraz utratę bioróżnorodności w środowisku. Począwszy od II połowy XX wieku, TZO były w dużej mierze wykorzystywane w produkcji m.in. pestycydów, farb, barwników, klejów. Przyjęcie międzynarodowej umowy, Konwencji Sztokholmskiej, zapoczątkowało walkę z produkcją i użyciem związków należących do grupy TZO. Jednak zakaz produkcji oraz sprzedaży i wykorzystania TZO nie zlikwidował problemu ich pozostałości w środowisku.

Jako pierwszy tematyką dotyczącą wpływu strukturalnie podobnych związków na

stymulację procesów biodegradacji TZO zajął się zespół Donnelly i in. (1994) [7], badając wpływ bifenylu na stymulację procesów biodegradacji PCB. PCB to pochodne bifenylu, które były produkowane i wykorzystywane w przemyśle elektrotechnicznym od lat 30. XX wieku. Pomimo tego, że zostały one wycofane z UE (zgodnie z dyrektywą Komisji Europejskiej 96/59/EC), ich pozostałości w środowisku nadal stwarzają duże zagrożenie dla zdrowia człowieka oraz bioróżnorodności. Kolejne badania wykazały, iż WMR strukturalnie podobne do PCB (m.in. mirecytyna, kumaryna, kwas salicylowy) przyczyniają się do ich szybszej degradacji. Dzieje się tak w wyniku zmian w strukturze mikrobiomu glebowego, a tym samym ilości mikroorganizmów degradujących PCB m.in. *A. eutrophus*, *Corynebacterium* sp., *P. putida* [7]. WMR produkowane przez *Avena sativa* (owies zwyczajny), *Brachiaria decumbens* (roślina z rodziny wiechlinowatych), *Medicago sativa* (lucerna siewna), *Brassica juncea* (kapusta sitowata), takie jak: flawanony, flawon, izoflawon, 7-hydroksyflawon, 7-hydroksyflawanon, 6-hydroksyflawon, stymulowały wzrost mikroorganizmów metabolizujących PCB [8]. Efektywną biodegradację PCB mogą przeprowadzać również grzyby białej zgnilizny drewna (ang. *white rot fungi*), produkujące enzymy ligninolityczne, których wydzielanie jest stymulowane przez obecność roślin. Zespół Stella i in. 2017 [9] wykazał, że grzyb zgnilizny białej *Pleurotus ostreatus* nie tylko brał udział w efektywnej biodegradacji PCB, ale również stymulował wzrost i aktywność bakterii ryzosferowych, które również metabolizowały zanieczyszczenia. Niektóre grzyby zgnilizny białej tj. szczep *Panellus stypticus* zostały również zidentyfikowane jako efektywne narzędzia usuwania dibenzo-p-dioksyn (PCDD) [10] – produktów ubocznych procesów przemysłowych i charakteryzujących się wysoką toksycznością. Podsumowując, dzięki aktywności enzymatycznej grzybów, indukowanej przez obecność metabolitów roślinnych, grzyby zgnilizny białej mogą metabolizować TZO [9-11].

WWA są powszechne w środowisku, jednak nie są one produkowane celowo, a źródłem ich pochodzenia są m.in. procesy przemysłowe, procesy spalania, produkcja asfaltu. Terpeny, pochodne kwasu salicylowego i kwas linolowy, wydzielane przez *Apium graveolens* (seler zwyczajny) oraz *Raphanus sativus* (rzodkiew zwyczajna) stymulowały proces biodegradacji WWA [12]. Dodatkowo, linolan sodu i palmitynian sodu przyspieszały biodegradację WWA w glebie [13]. Próby polowe wykonane przez zespół Robichaud i in. 2019 [14], wykazały, że współdziałanie systemów składających się z roślin (*Salix* spp., wierzba) oraz grzybów (*Psathyrella* sp.) wpłynęło pozytywnie na zmniejszenie toksyczności gleby zanieczyszczonej węglowodorami ropopochodnymi oraz metalami ciężkimi oraz przyczyniło się do usunięcia zanieczyszczeń organicznych z matrycy glebowej.

Ostatnie badania wykazują, że grzyby występujące w środowisku glebowym, których aktywność jest stymulowana przez obecność metabolitów roślinnych [11], mają zdolność do usuwania pozostałości endryny. Endryna była używana jako środek owadobójczy, jednak została wpisana na listę TZO, ze względu na szczególną trwałość w środowisku oraz wysoką toksyczność dla organizmów. Grzyby zgnilizny białej m.in. *Phlebia acanthocystis* i *Phlebia brevispora* wykazują nie tylko tolerancję na wysokie stężenia endryny, ale też wysoką aktywność biodegradacyjną względem tego związku [13]. Lindan ( $\gamma$ -heksachlorocykloheksan;  $\gamma$ -HCH) należy do grupy pestycydów

chloroorganicznych i jest środkiem zakazanym na terenie UE, lecz wcześniej służył jako insektycyd, środek do konserwacji drewna oraz jako farmaceutyk do zwalczania wszy główowej i świerzbu. Wykazano, iż eksudaty roślinne kukurydzy, bogate we WMR, determinowały odporność roślin na wysokie stężenie tego związku oraz stymulowały aktywność promieniowców *Streptomyces* sp., wspomagając usuwanie lindanu ze środowiska [14].

Podobnie jak lindan, DDT (dichlorodifenylotrichloroetan) był szeroko stosowanym pestycydem chloroorganicznych oraz środkiem przeciw malarii, tyfusowi i zapaleniu mózgu. DDE (1,1-dichloro-2,2-di(4-chlorofenylo)etylen) jest metabolitem DDT charakteryzującym się wysoką toksycznością i trwałością w środowisku. Badania wykonane przez grupę White i in. 2003 [17] wykazały, że kwas cytrynowy oraz kwas szczawiowy, obecne w eksudatach korzeniowych *Cucurbita pepo* (cukinia), zwiększały biodostępność DDE dla mikroorganizmów, tym samym wpływały pozytywnie na efektywność procesów biodegradacji.

## 5. Stymulacja procesów biodegradacji nowo pojawiających się zanieczyszczeń

Badania prowadzone w ostatnim czasie pokazały duże zainteresowanie tematyką stymulacji procesów biodegradacji nowo pojawiających się zanieczyszczeń w środowisku. Wśród nowo pojawiających się zanieczyszczeń można wyróżnić substancje, których negatywne działanie na zdrowie człowieka oraz środowisko zostało udowodnione, lecz nadal brak jest ścisłych regulacji prawnych, które kontrolowałyby ich produkcję i zastosowanie oraz regulowałyby ich dopuszczalne stężenia w środowisku.

Wśród takich zanieczyszczeń można wyróżnić p-tert-butylofenol (PTBP), który jest środkiem używanym w produkcji klejów oraz produktów powlekających, substancji zapachowych i odświeżaczy powietrza. PTBP, zgodnie z decyzją wykonawczą Komisji UE 2019/1194 z dnia 5 lipca 2019 r., został zidentyfikowany jako substancja wzbudzająca szczególnie duże obawy ze względu na jej właściwości zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego oraz prawdopodobne poważne skutki dla środowiska. Badania Zhang i in. 2020 [18] pokazały, że biodegradacja PTBP w środowisku może być bardziej efektywna dzięki związkom fenolowym wydzielanym do strefy korzeniowej przez *Phragmites australis* (trzcina pospolita).

Innymi nowo pojawiającymi się zanieczyszczeniami są dichloroeteny m.in. cis-1,2-dichloroeten (cDCE) są szeroko używane w przemyśle, dlatego ich nadużycie oraz nieodpowiednie składowanie, doprowadziły do zanieczyszczenia środowisk glebowych oraz wodnych. Jak dotąd zidentyfikowano wiele szczepów, które mogą metabolizować te substancje chemiczne, jednak biodegradacja w warunkach tlenowych zwykle nie prowadzi do kompletnej mineralizacji zanieczyszczenia – pozostałości dichloroetenów są akumulowane w środowisku i negatywnie oddziałują na ekosystemy [19]. Acetofenon, alkohol fenetylowy, kwas p-hydroksybenzoesowy i kwas trans-cynamonowy wywierały pozytywny wpływ na stymulację wzrostu mikroorganizmów metabolizujących cDCE (*Cupriavidus* sp., *Rhodococcus* sp., *Burkholderia* sp., *Acinetobacter* sp. i *Pseudomonas* sp.) [19].

Kwas 2,4-dichlofenoksyoctowy (2,4-D) i kwas 2-chloro-4-metylofenoksyoctowy (MCPA) to herbicydy z grupy fenoksykwasów. Szacuje się, iż ich roczna sprzedaż stanowi 18% całkowitej sprzedaży herbicydów w Polsce. Ze względu na ich

powszechne użycie mogą one stwarzać długoterminowe zagrożenie dla środowiska.  $\alpha$ -pinen i limonen, należące do grupy monoterpenu, znacznie zwiększały stopień bakteryjnej degradacji 2,4-DCP, będącego metabolitem 2,4-D, w glebie pobranej spod uprawy sosny i dębu [20]. Ostatnie badania wykazały również, że WMR wydzielane do ryzosfery przez *Cucurbita pepo* (cukinia) stymulują aktywność biodegradacyjną bakterii ryzosferowych (m.in. pochodne fenolu takie jak kwas syringowy) poprzez stymulację obecności genów funkcyjnych odpowiedzialnych za początkowe procesy biodegradacji MCPA [21].

Tabela 1. Przykłady działania WMR na procesy biodegradacji wybranych TZO oraz nowo pojawiających się zanieczyszczeń

Zanieczyszczenia	WMR	Zaobserwowany efekt	Źródło
TZO			
PCB	flawanony, flawon, izoflawon, 7-hydroksyflawon, 7-hydroksyflawanon, 6-hydroksyflawon	stymulacja wzrostu mikroorganizmów metabolizujących PCB	[8]
PCB	m.in. bifenyl, naringina, kumaryna, mirecytyna	stymulacja wzrostu bakterii degradujących PCB	[7]
WWA	terpeny i pochodne kwasu salicylowego kwas linolowy	stymulacja procesów biodegradacji; zwiększenie biodostępności dla mikroorganizmów	[13]
WWA	linolan sodu i palmitynian sodu	przyspieszanie biodegradacji w glebie	[12]
endryna	Stymulacja obecności szczepów grzybów zgnilizny białej przez metabolity roślinne	wysoka aktywność grzybów zgnilizny białej w zakresie biotransformacji endryny	[15]
lindan	eksudaty roślinne (mieszanina WMR)	promowanie wzrostu rośliny w warunkach zanieczyszczenia; stymulacja aktywności <i>Streptomyces</i> sp.	[16]
DDE	kwas cytrynowy, kwas szczawiowy	zwiększenie biodostępności dla mikroorganizmów	[17]
Nowo pojawiające się zanieczyszczenia			
PTBP	związki fenolowe	przyspieszenie biodegradacji	[18]
cDCE	acetofenon, alkohol fenetylowy, kwas p-hydroksybenzoesowy i kwas trans-cynamonowy	stymulacja wzrostu mikroorganizmów metabolizujących cDCE	[19]
2,4-DCP	terpeny: limonen, $\alpha$ -pinen	stymulacja procesów biodegradacji przez bakterie glebowe	[20]

MCPA	kwas syringowy	stymulacja procesów biodegradacji przez bakterie glebowe; zmniejszenie poziomu fitotoksyczności gleby	[21]
------	----------------	---	------

Źródło: Opracowanie własne

## 6. Podsumowanie

Rośliny, wydzielając do strefy korzeniowej eksudaty zawierające WMR, wpływając w ten sposób na strukturę populacji mikroorganizmów ryzosferowych. Mikroorganizmy ryzosferowe mogą wykorzystywać zanieczyszczenia organiczne m.in. TZO oraz nowo pojawiające się zanieczyszczenia jako źródło węgla, tym samym przyczyniając się do ich efektywnej degradacji (ryzodegradacja). Aktywność biodegradacyjna mikroorganizmów ryzosferowych jest często uzależniona od obecności WMR. Wiele badań wiąże stymulującą rolę WMR z ich podobieństwem strukturalnym do degradowanych zanieczyszczeń. Stąd też współdziałanie roślin, ich eksudatów, w tym przede wszystkim WMR charakteryzujących się podobieństwem strukturalnym do ksenobiotyków, oraz mikroorganizmów jest jednym z najefektywniejszych procesów remediacyjnych przyczyniających się do nie tylko do usunięcia danego związku z gleby, ale również do zachowania elementarnych funkcji gleby.

Dotychczasowe badania wykazały, że procesy biodegradacji najintensywniej zachodzą w ryzosferze, a WMR wydzielane przez rośliny do ryzosfery pozytywnie wpływają na procesy usuwania zanieczyszczeń organicznych z gleby poprzez zwiększenie ich biodostępności, stymulację wzrostu biomasy i aktywności biodegradacyjnej bakterii ryzosferowych. Jednak nadal istnieje potrzeba bardziej dokładnych badań na temat wpływu WMR na aktywność biodegradacji zanieczyszczeń organicznych przez grzyby ryzosferowe.

Biorąc pod uwagę powyższe, interakcje pomiędzy środowiskiem glebowym, mikroorganizmami glebowymi, roślinami i ich WMR, są istotnym elementem strategii bezpiecznego, opartego na naturze, usuwania ksenobiotyków ze środowiska.

## Literatura:

1. Crawford R.L., *Biodegradation: Principles, Scope, and Technologies*, [w:] Crawford R.L., (red), *Comprehensive Biotechnology*, Elsevier B.V., 2011, s. 3-13.
2. Klimiuk E., Łebkowska M., *Biotechnologia w ochronie środowiska*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
3. Vallero D.A., *Applied Microbial Ecology: Bioremediation*, [w:] Vallero D.A. (red), *Environmental Biotechnology*, Elsevier, 2010, s. 325-400.
4. Kristiansen B., Ratledge C., *Zastosowanie w ochronie środowiska*, [w:] Kristiansen B., Ratledge C. (red), *Podstawy Biotechnologii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2011, s. 282-303.
5. Musilova L., Ridl J., Polivkova M., Macek T., Uhlik O., *Effects of Secondary Plant Metabolites on Microbial Populations: Changes in Community Structure and Metabolic Activity in Contaminated Environments*, *International Journal of Molecular Sciences*, 29;17(8), 2016, s. 1-31.
6. Greń I., *Mikrobiologiczne przemiany ksenobiotyków*, CHEMIK, 66, 8, 2012, s. 835-842.
7. Donnelly P.K., Hegde R.S., Fletcher J.S., *Growth of PCB-degrading bacteria on compounds from photosynthetic plants*, *Chemosphere*. 28(5), 1994, s. 981-988.
8. Pino N.J., Muñera L.M., Peñuela G.A., Pino N.J., Muñera L.M., Peñuela G.A., *Root*

- exudates and plant secondary metabolites of different plants enhance polychlorinated biphenyl degradation by rhizobacteria*, *Bioremediation Journal*, 20(2), 2017, s. 108-16.
9. Stella T., Covino S., Čvančarová M., Filipová A., Petruccioli M., D'Annibale A., *Bioremediation of long-term PCB-contaminated soil by white-rot fungi*, *Journal of Hazardous Materials*, 324, 2017, s. 701-710.
  10. Sato A., Watanabe T., Watanabe Y., Harazono K., Fukatsu T., *Screening for basidiomycetous fungi capable of degrading 2,7-dichlorodibenzo – p – dioxin*. *FEMS Microbiology Letters*, 213(2), 2002, s. 213-217
  11. Shukla S.K., Kungwani N., Rao T.S., *Bioremediation Approaches for Persistent Organic Pollutants Using Microbial Biofilms*, [w:] Nancharaiah Y.V., Vayalam P. Venugopalan (red), *Microbial Biofilms in Bioremediation and Wastewater Treatment*, CRC Press, Boca Raton, 2019, s. 179-20
  12. Yi H., Crowley D.E., *Biostimulation of PAH degradation with plants containing high concentrations of linoleic acid*, *Environmental Science & Technology*, 41(12), 2007, s. 4382-4288.
  13. Wang Q., Hou J., Yuan J., Wu Y., Liu W., Luo Y. *Evaluation of fatty acid derivatives in the remediation of aged PAH-contaminated soil and microbial community and degradation gene response*, *Chemosphere*, 248, 2020, 125983.
  14. Robichaud K., Stewart K., Labrecque M., Hijri M., Cherewyk J., Amyot M., *An ecological microsystem to treat waste oil contaminated soil: Using phytoremediation assisted by fungi and local compost, on a mixed-contaminant site, in a cold climate*, *Science of Total Environment*, 672, 2019, s. 732-742.
  15. Xiao P., Kondo R., *Biodegradation and bioconversion of endrin by white rot fungi, Phlebia acanthocystis and Phlebia brevispora*, *Mycoscience*, 60(4), 2019, s. 255-261.
  16. Simon Sola M.Z., Pérez Visňuk D., Benimeli C.S., Polti M.A., Alvarez A., *Cr(VI) and lindane removal by Streptomyces M7 is improved by maize root exudates*, *Journal of Basic Microbiology*, 57(12), 2017, s. 1037-1044.
  17. White J., Mattina M., Lee W-Y., D. Eitzer B., Berger W., *Role of organic acids in enhancing the desorption and uptake of weathered pp'-DDE by Cucurbita pepo*, *Environmental pollution*, 124, 2003, s. 71-80.
  18. Zhang N., Qiu R., Li C., Wang S., Ni Z., *Accelerated biodegradation of p-tert-butylphenol in the Phragmites australis rhizosphere by phenolic root exudates*, *Environmental and Experimental Botany*, 169, 2020, s. 103891.
  19. Fraraccio S., Strejcek M., Dolinova I., Macek T., Uhlík O., *Secondary compound hypothesis revisited: Selected plant secondary metabolites promote bacterial degradation of cis-1,2-dichloroethylene (cDCE)*, *Scientific Reports*, 7(1), 2017, s. 8406.
  20. McLoughlin E., Rhodes A.H., Owen S.M., Semple K.T., *Biogenic volatile organic compounds as a potential stimulator for organic contaminant degradation by soil microorganisms*, *Environmental Pollution*, 157(1), 2009, s. 86-94.
  21. Urbaniak M., Mierzejewska E., Tankiewicz M., *The stimulating role of syringic acid, a plant secondary metabolite, in the microbial degradation of structurally-related herbicide, MCPA*, *PeerJ*, 2019, 10:7:e6745.

## **Biodegradacja ksenobiotyków – stymulująca aktywność wtórnych metabolitów roślinnych (WMR)**

### Streszczenie

Aktywność biodegradacyjna mikroorganizmów ryzosferowych (zasiedlających strefę korzeniową roślin – ryzosferę), w zakresie usuwania ksenobiotyków, takich jak trwale zanieczyszczenia organiczne (TZO) oraz nowo pojawiające się zanieczyszczenia (tzw. *emerging pollutants*), jest stymulowana przez WMR wydzielane przez rośliny do ryzosfery. Współdziałanie roślin, ich WMR (w tym szczególnie tych charakteryzujących się podobieństwem strukturalnym do ksenobiotyków) oraz mikroorganizmów ryzosferowych jest jednym z najefektywniejszych procesów remediacyjnych. Ksenobiotyki organiczne mogą ulegać degradacji na szlaku przemian kometabolicznych, stanowiąc dodatkowe źródło węgla dla mikroorganizmów, podczas gdy WMR są pierwotnym źródłem węgla. Obecność WMR może modyfikować strukturę mikrobiomu glebowego oraz ekspresję genów odpowiedzialnych za produkcję enzymów kluczowych dla metabolizmu ksenobiotyków. Dodatkowo WMR wydzielane do ryzosfery wywierają pozytywny wpływ na procesy usuwania ksenobiotyków organicznych z gleby poprzez zwiększanie ich biodostępności, a także wpływają na zawiększenie odporności roślin względem zanieczyszczeń.

Słowa kluczowe: wtórne metabolity roślinne, ryzodegradacja, biostymulacja, trwale zanieczyszczenia organiczne, nowo pojawiające się zanieczyszczenia

## **Biodegradation of xenobiotics – stimulating activity of plant secondary metabolites**

### Abstract

The biodegradation activity of rhizospheric microorganisms (inhabiting the root zone of plants – rhizosphere), in matters of removing xenobiotics such as persistent organic pollutants (POPs) and emerging pollutants, is stimulated by plant secondary metabolites (PSM) secreted by plants to the rhizosphere. The interaction of plants, their PSMs (especially those characterized by structural similarity to xenobiotics) and rhizospheric microorganisms is one of the most effective remediation processes. Organic xenobiotics can be degraded along within the cometabolic pathway, providing an additional carbon source for microorganisms, while PSMs are serving as the primary carbon source. The presence of PSMs may modify the structure of the soil microbiome and the expression of genes responsible for the production of key enzymes for the metabolism of xenobiotics. In addition, PSMs secreted to the rhizosphere have a positive effect on the processes of removing organic xenobiotics from soil by increasing their bioavailability, and also increase the resistance of plants to pollution.

Keywords: plant secondary metabolites, rhizodegradation, biostimulation, persistent organic pollutants, emerging contaminants



## Chromatograficzne otrzymywanie barwników betacyjanin z ekstraktów owoców *Basella alba* L.

### 1. Wstęp

Rosnące w ostatnich latach zainteresowanie naturalnymi barwnikami pochodzenia roślinnego wynika z ich możliwego wielodziedzinowego wykorzystania, nie tylko w przemyśle spożywczym i kosmetycznym, ale również w medycynie, czy farmacji [1]. Właściwości naturalnych barwników, takich jak karotenoidy czy antocyjaniny, są przedmiotem licznych badań. Pod kątem bioaktywności najślabiej przebadane są betalainy, m.in. ze względu na ich mniej liczne występowanie [2].

Najpowszechniejszymi barwnikami o barwie czerwono-fioletowej są antocyjany, które znajdują zastosowanie przede wszystkim w przemyśle spożywczym, jednak posiadają one znaczącą wadę, którą jest niestabilność w pH większym niż 3 [1]. W porównaniu do nich betalainy nie tracą swoich właściwości w o wiele szerszym zakresie pH (od 3 do 7) co czyni je bardzo dobrą alternatywą dla barwników antocyjanowych [3]. Betalainy, a dokładniej pomarańczowo-żółte betaksantyny mogą również z powodzeniem zastępować obecnie wykorzystywane karotenoidy, których największym problemem jest słaba rozpuszczalność w wodzie, co w znaczącym stopniu ogranicza ich możliwości technologiczne [4]. Ze względu na dużą ilość grup hydroksylowych w swojej strukturze, betalainy łatwo rozpuszczają się w wodzie, co stanowi ważną zaletę dla ich potencjalnych zastosowań.

Betalainy to barwniki, które charakteryzuje występowanie atomów azotu w ich strukturze. Substratem do ich syntezy jest aminokwas (tyrozyna). Betalainy naturalnie występują głównie w burakach ćwikłowych, amarantusach i kaktusach [5]. Można je podzielić na czerwono-fioletowe betacyjaniny i żółto-pomarańczowe betaksantyny [6]. Ze względu na budowę chemiczną, rozróżnia się cztery główne grupy betacyjanin, są to typy: betaninowy; amarantyninowy; gomfreninowy bugenwillenowy [2] (rys. 1).

Poza typowym zastosowaniem w przemyśle spożywczym, barwniki te przejawiają potencjał prozdrowotnego wykorzystania. Co ciekawe, ekstrakty bogate w betalainy charakteryzują się działaniem przeciwdrobnoustrojowym [6]. Należy też wspomnieć o ich silnych właściwościach przeciwutleniających wynikających ze zdolności do reakcji z różnymi reaktywnymi formami tlenu i azotu oraz przypisywanemu im działaniu antynowotworowemu.

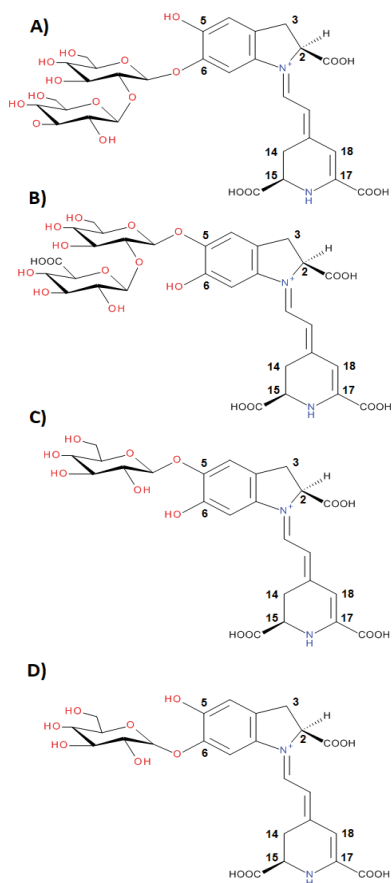
Znaczną zawartość betacyjanin odnotowano w owocach rośliny *Basella alba* L., znanej jako szpinak malabarski (bądź inaczej wyćwiklin biały). Roślina ta to wieloletni, rozgałęziony sukulent, występujący w postaci pnącej, osiągający kilka metrów długości [7]. Owoce *B. alba* są mięsiste i w przybliżeniu kuliste, o barwie

<sup>1</sup> Zakład Chemii Analitycznej, Instytut C-1, Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej, Politechnika Krakowska, ul. Warszawska 24, Kraków 31-155 (katarzyna.sutor@doktorant.pk.edu.pl).

<sup>2</sup> Katedra Sadownictwa i Pszczelarstwa, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy, al. 29-Listopada 54, Kraków 31-425.

ciemnofioletowej, pozbawione zapachu, osiągające długość ok. 5-6 mm, a w ich profilu betalainowym można znaleźć głównie betacyjaniny [8]. Jak już wspomniano, ekstraktom z owoców tej rośliny przypisuje się wiele pozytywnych właściwości, do których można zaliczyć działanie antyoksydacyjne, przeciwcukrzycowe [9], przeciwzapalne, przeciwdrobnoustrojowe, hepatoprotekcyjne, czy przyspieszające gojenie się ran [10]. Jednakże dotychczas w literaturze brakuje szczegółowych badań aktywności czystych, wyizolowanych betalain. Ponieważ chemiczna synteza takich związków jest procesem wieloetapowym i trudnym do przeprowadzenia, ważna jest znajomość skutecznych narzędzi, które w sposób wydajny pozwolą pozyskać omawiane barwniki z surowców naturalnych [11]. Obecnie do tego celu stosuje się wymiennicze jonowe oraz tradycyjną, kolumnową, preparatywną chromatografię cieczową ze stałą fazą stacjonarną [12]. Wcześniejsze badania wskazują na wysoką skuteczność zastosowania powyższej techniki w izolacji pojedynczych betacyjanin z mieszanin zawierających diastereoizomery, pozwalającej na otrzymywanie czystych produktów rozdzielania [8].

Niniejsza praca skupia się na badaniu chromatograficznego otrzymywania barwników betacyjanin z ekstraktów owoców *B. alba*, co w dalszej perspektywie pozwoli na szersze rozpoznanie właściwości prozdrowotnych poszczególnych związków z tej grupy, a także umożliwi generowanie nowych pochodnych, które mogą wykazywać jeszcze lepsze właściwości w porównaniu do związków wyjściowych.



Rysunek 1. Struktury chemiczne głównych typów betacyjanin: A) bugenwillenowe; B) amarantynowe; C) betaninowe; D) gomfreninowe. Źródło: [opracowanie własne]

## 2. Materiały i metody

### Reagenty

Kwas solny, kwas mrówkowy i EDTA (Sigma, St. Louis, MO, USA). Aceton (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Polska). Woda dejonizowana do HPLC (Milli-Q, Millipore Corp., MA, USA).

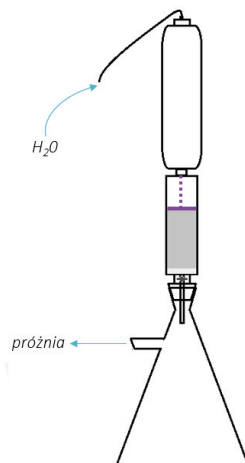
## 3. Przygotowanie ekstraktu z owoców *Basella alba* L.

Owoce *B. alba* zostały zebrane w szklarni Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Owoce ekstrahowano wodą destylowaną z dodatkiem nasyconego roztworu EDTA (w ilości 1 ml r-u EDTA na 1 l mieszaniny ekstrakcyjnej).

### 3.1. Oczyszczanie wstępne

Otrzymane ekstrakty sączono na leжку Böhnera przez żel krzemionkowy (Merck) pozbywając się wielkocząsteczkowych zanieczyszczeń. Następnie zakwaszono kwasem solnym do stężenia 0,05 M i kierowano na wymiennicze jonowe. W pierwszym etapie zastosowano chromatografię kolumnową z żywicą kationowymienną Lewatit (Lanxess AG). Po zaadsorbowaniu betalain na żywicy, złożę przemycano 1 M HCl

oraz 5% HCOOH, usuwając aniony i substancje obojętne, w tym kwasy organiczne i cukry. W dalszym etapie barwniki wymywano wodą destylowaną wprost na wymienniczu anionowy (polimer styrenowo-diwinylobenzenowy modyfikowany czwartorzędową aminą) Sepra (Phenomenex) (rys. 2). Z anionitu desorbowano związki za pomocą eluentu: 5% HCOOH z 50% acetonu, zaś pozostałości z kationitu roztworem 50% acetonu.



Rysunek 2. Wymywanie frakcji barwników wprost na wymienniczu anionowy Sepra (Phenomenex).

Źródło: [opracowanie własne]

### 3.2. Izolacja techniką HPLC na skalę mikropreparatywną

Do izolacji poszczególnych betacyjanin z wstępnie oczyszczonych ekstraktów z owoców *Basella alba* użyto wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z pompami LC-20AP (Shimadzu Corp., Japonia) i dozownikiem FCV-20AH2 (Shimadzu) działającej na oprogramowaniu LabSolutions 5.51 (Shimadzu). Użyto kolumny Metachem C18 (Metachem, Niemcy) o długości 250 mm i średnicy wewnętrznej 50 mm. Objętość nastrzyku wynosiła 120 µl, a szybkość przepływu wynosiła 50 ml/min. Pierwsze rozdzielanie przeprowadzono z użyciem eluentów z 1% HCOOH oraz kolejno: 6, 8, 10, 12% acetonu. Doczyszczanie, po połączeniu i odparowaniu wybranych frakcji, przeprowadzono używając eluentów z 0,05% HCOOH i 4-5% acetonu. Detekcja on-line odbywała się w detektorze PDA (UV/Vis) przy długościach fal  $\lambda_1 = 538$  nm i  $\lambda_2 = 470$  nm. Otrzymane frakcje połączono i zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem, po czym liofilizowano w celu uzyskania czystych barwników.

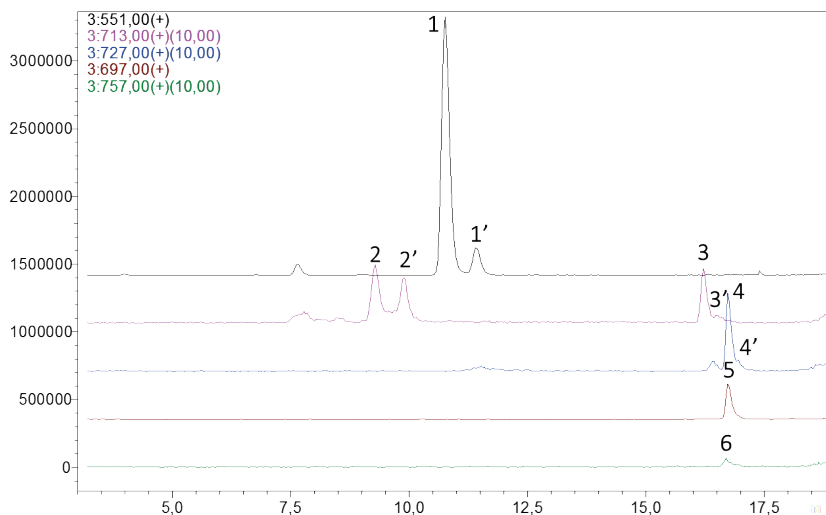
### 3.3. Analiza techniką LC-DAD-ESI-MS

W celu przeprowadzenia analiz otrzymanych eluatów użyto spektrometru mas LCMS-8030 (Shimadzu) sprzężonego z pompami HPLC LC-20ADXR, dozownikiem SIL-20ACXR i detektorem PDA (z matrycą fotodiodową) SPD-M20A. Cały układ oparty jest na oprogramowaniu LabSolution 5.60 SP1 (Shimadzu). Próbkę eluowano z kolumny Kinetex 5 µm C18 100 Å o wymiarach 150 x 4,6 mm, poprzedzonej kolumną ochronną z tego samego materiału (Phenomenex, Kalifornia). Objętość nastrzyku wynosiła 20 µl, szybkość przepływu wynosiła 0,5 ml/min. Kolumna

była termostатовana w temperaturze 40°C. Anality rozdzielono z wykorzystaniem gradientu binarnego. Fazami ruchomymi były: A, 2% roztwór kwasu mrówkowego w wodzie oraz B, czysty metanol. Widma masowe dla jonów dodatnich rejestrowano w układzie LC-MS kontrolowanym oprogramowaniem LabSolution. Jonizacja była prowadzona w trybie dodatnim (ESI+) przy napięciu elektrorozpylania równym 4,5 kV, w temperaturze kapilary równej 250°C, oraz z zastosowaniem N<sub>2</sub> jako gazu do rozpylania. Zarejestrowane zostały chromatogramy jonów pełnego skanowania, widma mas i chromatogramy jonowe dla wybranych jonów (tryb SIM), a także widma fragmentacyjne.

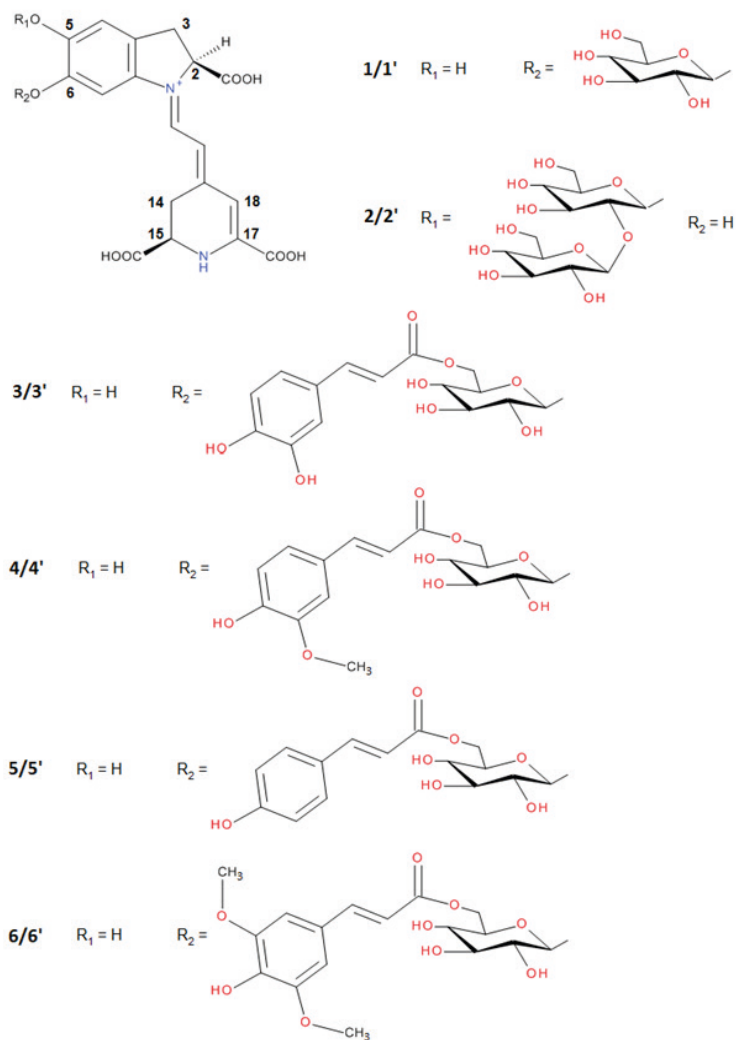
## 4. Wyniki i dyskusja

### 4.1. Analiza wodnego ekstraktu *Basella alba* L.



Rysunek 3. Chromatogram wybranych jonów dla ekstraktu z owoców *Basella alba* L. otrzymany w analizie techniką LC-DAD-ESI-MS. Monitorowana długość fali na detektorze  $\lambda = 540$  nm. Poszczególne wartości  $m/z$  jonów odpowiadają kolejnym liniom na chromatogramie. Liczby nad sygnałami odnoszą się do wartości w tabeli 1. Źródło: [opracowanie własne]

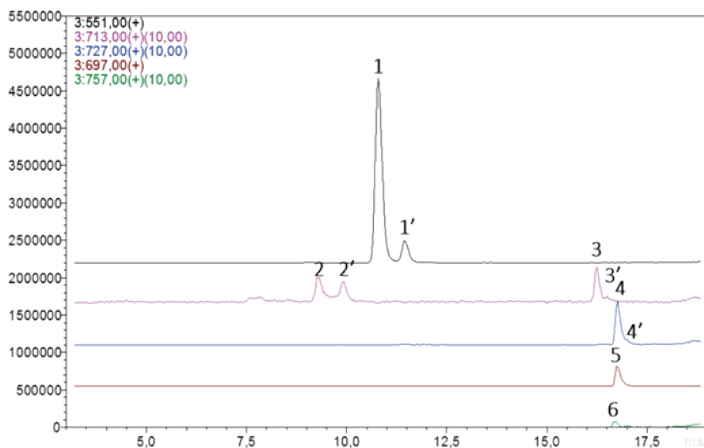
W tabeli 1 zebrano dane z analiz LC-DAD-ESI-MS związków betacyjanin z ekstraktu *B. alba* i poszczególnych etapów rozdzielania. Na podstawie rys. 3 zidentyfikowano obecne w wodnym ekstrakcie owoców *B. alba*, jako dominujące, polarne betacyjaniny: gomfreninę I /izogomfreninę I (1/1'); 5-O- $\beta$ -soforozyd betanidyny/izobetanidyny (2/2') oraz bardziej hydrofobowe: 6-O-(6'-O-trans-kawo)- $\beta$ -glukozyd betanidyny/izobetanidyny (3/3'); gomfreninę III/izogomfreninę III (4/4'); gomfreninę II (5); 6-O-(6'-O-trans-synapo)- $\beta$ -glukozyd betanidyny (6) (rys. 4). Odniesienie wyników do wzorców wyizolowanych z kwiatów *Gomphrena globosa* L. pozwoliło na potwierdzenie struktury związków [13].



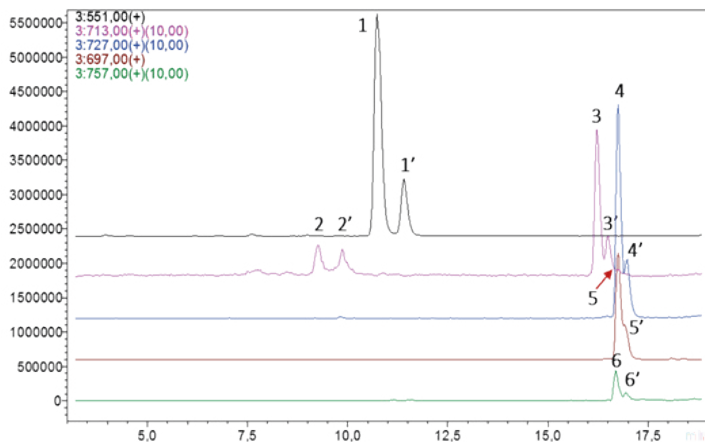
Rysunek 4. Struktury wyizolowanych związków. Numery związków odnoszą się do oznaczeń podanych w tabeli 1. Źródło: [opracowanie własne]

## 4.2. Analiza eluatów uzyskanych po wstępnym oczyszczeniu na kationicie

Analizy chromatograficzne i spektrometrii mas wykazały, że dla wodnych eluatów z kationitów, profil betacyjanin jest bardzo zbliżony do charakterystycznego profilu dla ekstraktów przed naniesieniem na kationit (rys. 5). Jednak, w przypadku eluatów po wymywaniu 50% roztworem acetonu, zauważyć można dodatkową obecność izogmfreniny II (5') oraz 6-O-(6'-O-trans-synapo)- $\beta$ -glukozydu izobetanidyny (6'), a także zwiększenie ilości izoform pozostałych związków (rys. 6).



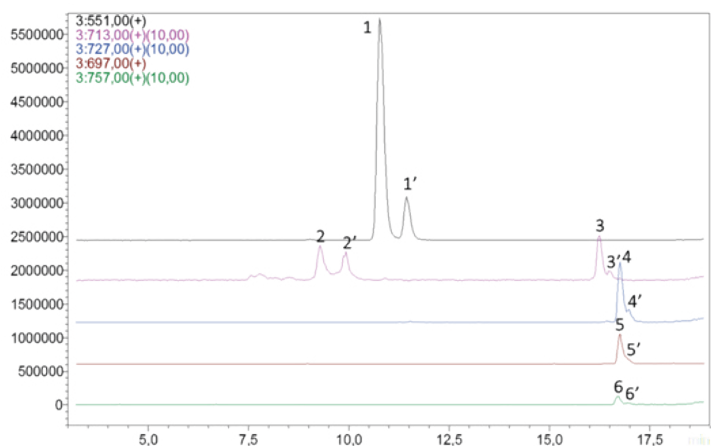
Rysunek 5. Chromatogram wybranych jonów dla eluatu wodnego z owoców *Basella alba* L. po kationicie otrzymanego techniką LC-DAD-ESI-MS. Monitorowana długość fali na detektorze  $\lambda = 540$  nm. Poszczególne wartości m/z jonów odpowiadają kolejnym liniom na chromatogramie. Oznaczenia pików odnoszą się do opisu w tabeli 1. Źródło: [opracowanie własne]



Rysunek 6. Chromatogram wybranych jonów dla eluatu acetonowego z owoców *Basella alba* L. po kationicie otrzymanego techniką LC-DAD-ESI-MS. Monitorowana długość fali na detektorze  $\lambda = 540$  nm. Poszczególne wartości m/z jonów odpowiadają kolejnym liniom na chromatogramie. Oznaczenia pików odnoszą się do opisu w tabeli 1. Źródło: [opracowanie własne]

### 4.3. Analiza eluatów z anionitu

Wyniki analiz LC-DAD-ESI-MS dla roztworów po wymyciu związków z anionitu roztworem 5% HCOOH i 50% acetonu są zbliżone dla tych uzyskanych dla eluatu acetonowego z kolumny Lewatit. Z otrzymanych danych wynika, że proces wstępnego oczyszczania z zanieczyszczeń nie wpłynął negatywnie na odzysk pozyskiwanych betacyjanin (rys. 7).

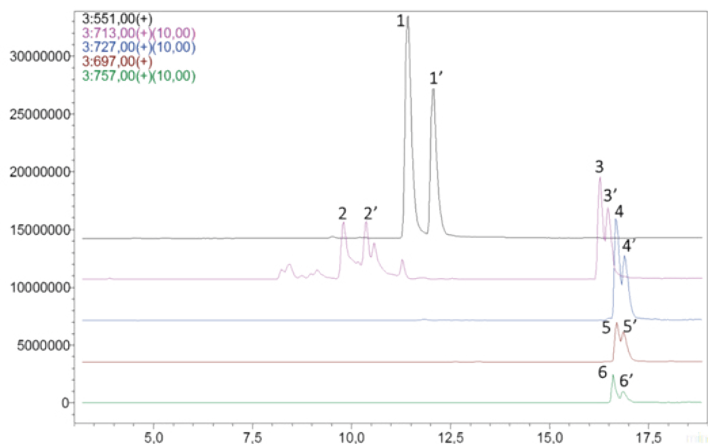


Rysunek 7. Chromatogram wybranych jonów dla eluatu z owoców *Basella alba* L. po anionicy, otrzymany techniką LC-DAD-ESI-MS. Monitorowana długość fali na detektorze  $\lambda = 540$  nm. Poszczególne wartości  $m/z$  jonów odpowiadają kolejnym liniom na chromatogramie. Oznaczenia pików odnoszą się do opisu w tabeli 1. Źródło: [opracowanie własne]

#### 4.4. Analiza eluatów przed rozdzielaniem na wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Po zebraniu roztworów po wstępnym oczyszczeniu poddano je odparowaniu na wyparkach próżniowych pod zmniejszonym ciśnieniem. Chromatogram z analizy LC-MS przedstawiono na rysunku 8.

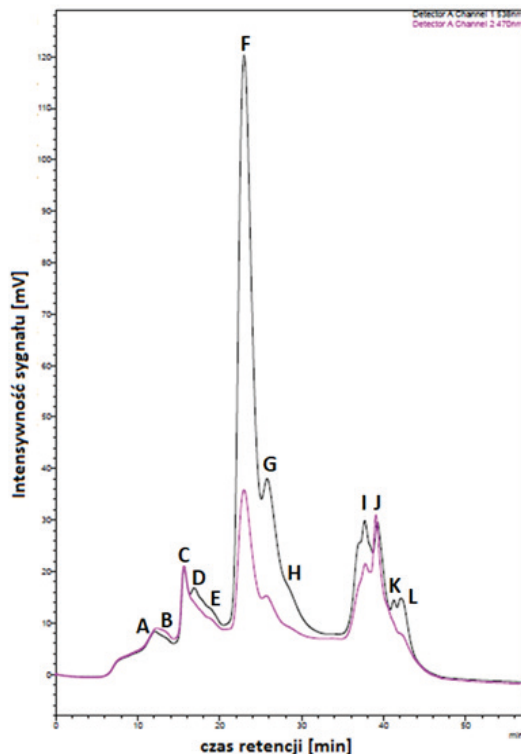




Rysunek 8. Chromatogram wybranych jonów dla eluatów z owoców *Basella alba* L. przed rozdzielaniem techniką preparatywną HPLC, otrzymany techniką LC-DAD-ESI-MS. Monitorowana długość fali na detektorze  $\lambda = 540$  nm. Poszczególne wartości  $m/z$  jonów odpowiadają kolejnym liniom na chromatogramie. Oznaczenia pików odnoszą się do opisu w tabeli 1. Źródło: [opracowanie własne]

#### 4.5. Pierwszy etap rozdzielania techniką preparatywną wysokosprawnej chromatografii ciekowej

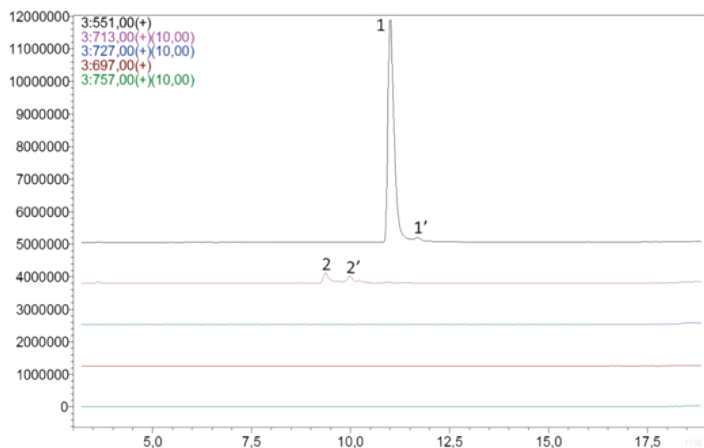
Rysunek 9 przedstawia typowy chromatogram pierwszego rozdzielania ekstraktu z owoców *B. alba*, w którym otrzymano 12 frakcji związków. Zwłaszcza przy detekcji dla długości fali 538 nm, zaobserwować można dominującą obecność związku frakcji F, którym jest gomfrenina I.



Rysunek 9. Chromatogram pierwszego rozdzielania HPLC eluatów z oczyszczania wstępnego ekstraktów *Basella alba* L., z zaznaczonymi frakcjami. Spektrofotometryczna detekcja dla dwóch dł. fal:  $\lambda_1 = 538$  nm;  $\lambda_2 = 470$  nm. Źródło: [opracowanie własne]

#### 4.6. Analiza frakcji głównej z pierwszego etapu rozdzielania techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Czystość otrzymanej w największej ilości frakcji, określono standardowo techniką LC-DAD-ESI-MS. Oprócz głównego związku – gomfreniny I zaobserwowano jej izoformę, a także niewielkie sygnały od 5-O- $\beta$ -soforozydu betanidyny/izobetamidyny (rys. 10).

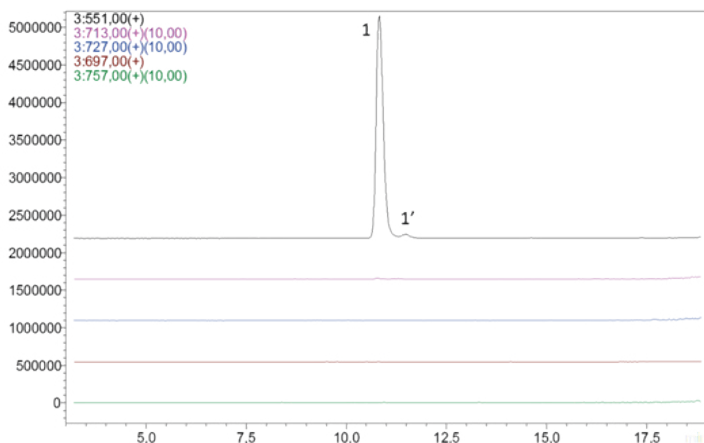


Rysunek 10. Chromatogram wybranych jonów dla frakcji głównej po pierwszym rozdzielaniu techniką preparatywnej HPLC, otrzymany techniką LC-DAD-ESI-MS. Monitorowana długość fali na detektorze  $\lambda = 540$  nm. Poszczególne wartości m/z jonów odpowiadają kolejnym liniom na chromatogramie.

Liczby nad sygnałami odnoszą się do wartości w tabeli 1. Źródło: [opracowanie własne]

#### 4.7. Analiza frakcji głównej drugiego etapu rozdzielania techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Po odparowaniu frakcji F i jej ponownym rozdzielaniu HPLC udało się otrzymać bardzo czystą gomfreninę I, co określono chromatograficznie (rys. 11).



Rysunek 11. Chromatogram wybranych jonów dla frakcji głównej po drugim rozdzielaniu techniką preparatywnej HPLC, otrzymany techniką LC-DAD-ESI-MS. Monitorowana długość fali na detektorze  $\lambda = 540$  nm. Poszczególne wartości m/z jonów odpowiadają kolejnym liniom na chromatogramie.

Liczby nad sygnałami odnoszą się do wartości w tabeli 1. Źródło: [opracowanie własne]

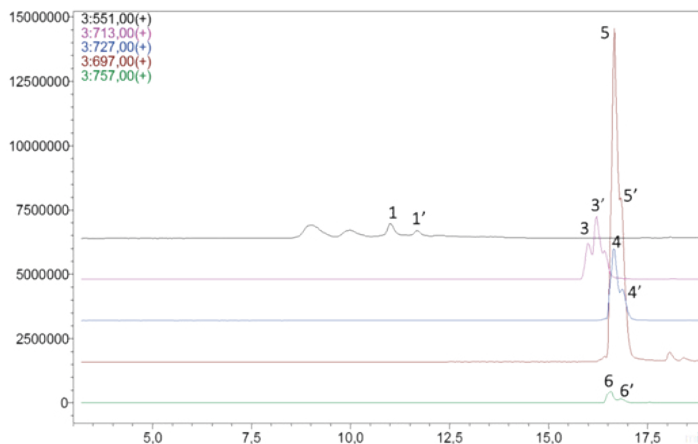
#### 4.8. Analiza frakcji związków acylowanych

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów rozdzielania otrzymano głównie gomfreninę I, ze względu na jej najliczniejsze występowanie w wykorzystanym surowcu. Niektóre z pozostałych frakcji stanowiły mieszaninę związków acylowanych o mniejszej polarności, po ich połączeniu i odparowaniu otrzymano roztwór, którego wyniki analizy LC-MS zostały przedstawione na rysunku 12. Rozdzielenie i oczyszczenie tych związków będzie możliwe po dobraniu innego gradientu elucyjnego.

Tabela 1. Wybrane dane z identyfikacji LC-DAD-ESI-MS związków betacyjanin z ekstraktu *Basella alba* L. Oznaczenia pików chromatograficznych odnoszą się do informacji zawartych na chromatogramach DAD i MS

Nr pików	Czas retencji [nm]	Nazwa związku	$\lambda_{max}$	m/z [M+H] <sup>+</sup>
2'	9,3	5-O- $\beta$ -soforyzyd betanidyny	539	713
2'	10,0	5-O- $\beta$ -soforyzyd izobetanidyny	539	713
1'	10,7	6-O- $\beta$ -glukozyd betanidyny [gomfrenina I]	536	551
1'	11,5	6-O- $\beta$ -glukozyd izobetanidyny [izogomfrenina I]	537	551
3'	16,2	6-O-(6'-O-trans-kawo)- $\beta$ -glukozyd betanidyny	543	713
3'	16,5	6-O-(6'-O-trans-kawo)- $\beta$ -glukozyd izobetanidyny	543	713
4'	16,6	6-O-(6'-O-trans-ferulo)- $\beta$ -glukozyd betanidyny [gomfrenina III]	544	727
5'	16,6	6-O-(6'-O-trans-4-kumaro)- $\beta$ -glukozyd betanidyny [gomfrenina II]	544	697
6'	16,7	6-O-(6'-O-trans-synapo)- $\beta$ -glukozyd betanidyny	544	757
4'	16,8	6-O-(6'-O-trans-ferulo)- $\beta$ -glukozyd izobetanidyny [izogomfrenina III]	544	727
5'	16,9	6-O-(6'-O-trans-4-kumaro)- $\beta$ -glukozyd izobetanidyny [izogomfrenina II]	544	697
6'	16,9	6-O-(6'-O-trans-synapo)- $\beta$ -glukozyd izobetanidyny	544	757

Źródło: Opracowanie własne



Rysunek 12. Chromatogram wybranych jonów dla frakcji związków acylowanych po drugim rozdzielaniu techniką preparatywną HPLC, otrzymany techniką LC-DAD-ESI-MS. Monitorowana długość fali na detektorze to 540 nm. Poszczególne wartości m/z jonów odpowiadają kolejnym liniom na chromatogramie. Liczby nad sygnałami odnoszą się do wartości w tabeli 1.

Źródło: [opracowanie własne]

## 5. Podsumowanie

Przeprowadzone badania potwierdziły możliwość chromatograficznego pozyskiwania czystych betacyjanin, po zastosowaniu odpowiedniej sekwencji technik chromatograficznych. Zastosowanie żelu krzemionkowego i złożeń jonowymiennych pozwoliło na wstępne oczyszczenie barwników ze składowych matrycy takich jak lipidy, białka i cukry. Po takim procesie, pożądane związki nie ulegały rozkładowi, tworzyły się jednak w większej ilości izomery związków podstawowych.

Elucja gradientowa zastosowana w technice HPLC pozwoliła na otrzymanie chromatograficznie czystej frakcji gomfreniny I, która po odparowaniu, zamrożeniu i zliofilizowaniu będzie mogła być użyta do dalszych badań. Wybrane frakcje wzbogaciły zasób pozostałych związków betacyjaninowych, występujących w *B. alba* w mniejszej ilości niż gomfrenina. Po przetworzeniu większej ilości surowca roślinnego, możliwe będzie ich doczyszczenie i rozdzielanie techniką preparatywną HPLC.

Dzięki opracowaniu efektywnego wydzielania betacyjanin, możliwe jest planowanie dalszych badań z ich udziałem. Po pierwsze będzie można wykonać badania ich aktywności biologicznej, czy antyoksydacyjnej. Po drugie, otwiera się możliwość do semi-syntezy ich nowych pochodnych o oczekiwanych prozdrowotnych właściwościach.

## Uwagi ogólne/Podziękowania

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr UMO-2017/27/B/NZ9/02831 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

## Literatura:

1. Stintzing F.C., Carle R., *Functional properties of anthocyanins and betalains implants, food, and in human nutrition*, Trends in Food Science and Technology, 15, 2004, s. 19-38.
2. Reshmi S.K., Aravinthan K.M., Suganya P., *Antioxidant analysis of betacyanin extracted from Basella alba fruit*, International Journal of PharmTech Research, 4, 2012, s. 900-913.
3. Stintzing F.C., Schieber, *Cactus pear – a promising component to functional food*, Obst-, Gemuse-und Kartoffelverarbeitung, 85, 2000, s. 12-19.
4. Azerdo M.C.H., *Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review*, International Journal of Food Science & Technology, 44, 2009, s. 2365-2376.
5. Cai Y.Z., Sun M., Corke H., *Characterization and application of betalain pigments from plants of Amaranthaceae*, Trends in Food Science and Technology, 16, 2005, s. 370-376.
6. Spórna-Kucab A., Bernaś K., Grzegorzczak A., Malm A., Skalicka-Woźniak K., Wybraniec S., *Liquid chromatographic techniques in betacyanin isomers separation from Gomphrena globosa L. flowers for the determination of their antimicrobial activities*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 161, 2018, s. 83-93.
7. Adhikari R., Kumar N.H.N., Shruthi S.D., *A review on medicinal importance of Basella alba L.*, Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research, 4, 2012, s. 110-114.
8. Kumorkiewicz A., Wybraniec S., *Thermal degradation of major gomphrenin pigments in the fruit juice of Basella alba L. (Malabar spinach)*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65, 2017, s. 7500-7508.
9. Biswas A., Azad Md., Kushal I., Ohidul I., Khairuzzaman M., Haque S., *Antidiabetic property of methanol extract of B. alba (fruits along with shoots) and its relationship with the antioxidant property*, International Journal of Pharmaceutical Research and Innovation, 9, 2016, s. 9-16.
10. Deshmukh S.A., Gaikwad D.K., *A review of the taxonomy, ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of Basella alba (Basellaceae)*, Journal of Applied Pharmaceutical Science, 4, 2014, s. 153-165.
11. Spórna-Kucab A., Jagodzińska J., Wybraniec S., *Separation of betacyanins from purple flowers of Gomphrena globosa L. by ion-pair high-speed counter-current chromatography*, Journal of Chromatography A, 1489, 2017, s. 51-57.
12. Wybraniec S., Starzak K., Szneler E., Pietrkowski Z., *Separation of chlorinated diastereomers of decarboxy-betacyanins in myeloperoxidase catalyzed chlorinated Beta vulgaris L. extract*, Journal of Chromatography A, 1036, 2016, s. 20-32.
13. Szot D., Starzak K., Skopińska A., Wybraniec S., *Chromatographic fractionation of betacyanins from flowers of Gomphrena globosa*, Challenges of Modern Technology, 2015, s. 19-23.

## **Chromatograficzne otrzymywanie barwników betacyjanin z ekstraktów owoców *Basella alba* L.**

### Streszczenie

Celem badań było pozyskiwanie betacyjanin z ekstraktów owoców *Basella alba* L. Betacyjaniny są szeroką grupą bioaktywnych barwników o dużym potencjale prozdrowotnym, ale jak dotąd słabo rozpoznanych zwłaszcza w przypadku ich badań w postaci wyizolowanych związków.

W oczyszczaniu wstępnym betacyjanin zastosowano chromatografię kolumnową z kationitem Lewatit (Lanxess AG), a następnie wymienniczem anionowym Sepra (Phenomenex). Ekstrakt po zaadsorbowaniu na kationicie przemywano 0,1 M HCl oraz 5% HCOOH, po czym wymywano pierwsze frakcje barwników wodą destylowaną wprost na wymiennicz anionowy. Desorbowano związki osobno z każdego złoża kolumny za pomocą eluentów: 5% HCOOH z 50% acetonu z anionitu oraz 50% acetonu z kationitu. Dalsze rozdzielanie związków prowadzono techniką preparatywnej HPLC na kolumnie Metachem C18 (Metachem) eluowanej układem 1% HCOOH/aceton. Tożsamość barwników określono techniką LC-DAD-MS jako gomfrenina ( $m/z$  551), diglukozylowana gomfrenina ( $m/z$  713), acylowane pochodne gomfreniny ( $m/z$  713, 697 i 727) oraz ich diastereoizomery.

Otrzymane wyniki potwierdzają konieczność sekwencyjnego zastosowania wymienniczy jonowych i chromatografii HPLC w celu otrzymania odpowiednio oczyszczonych barwników do dalszych badań ich bioaktywności czy też generowania ich pochodnych.

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr UMO-2017/27/B/NZ9/02831 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

Słowa kluczowe: betalainy, betacyjaniny, *Basella alba* L, chromatografia jonowymienna, HPLC

## **Chromatographic preparation of betacyanin dyes from *Basella alba* L. fruit extracts**

### Abstract

The aim of this research was to obtain betacyanins from *Basella alba* L. fruit extracts. Betacyanins are a broad group of bioactive dyes with health-promoting potential but not fully studied especially as isolated compounds.

For pre-purification, column chromatography with Lewatit (Lanxess AG) cation exchanger followed by Sepra (Phenomenex) anion exchanger was used. The extract after adsorption on Lewatit column was washed with 0.1 M HCl and 5% HCOOH after which the first dye fractions were eluted with distilled water directly onto the anion exchanger. The compounds were desorbed separately from each column bed using 5% HCOOH with 50% acetone from anion exchanger and 50% acetone from cation exchanger. Further separation of the compounds was carried out by preparative HPLC on a Metachem C18 (Metachem) column eluted with 1% HCOOH/acetone solvent system. The dyes obtained were identified by LC-DAD-MS as gomphrenin ( $m/z$  551), diglucosylated gomphrenin ( $m/z$  713), acylated gomphrenin derivatives ( $m/z$  713, 697, 727) as well as their diastereomers.

Obtained results confirm the necessity of sequential application of ion exchangers and HPLC chromatography for isolation of properly purified dyes for further studies of their bioactivity, or generate their derivatives.

This research was financed by Polish National Science Centre (Project No. UMO-2017/27/B/NZ9/02831).

Keywords: betalaines, betacyanines, *Basella alba* L, ion exchange chromatography, HPLC

Mariola Dreger<sup>1</sup>, Milena Szalata<sup>2</sup>, Agnieszka Gryszczyńska<sup>3</sup>, Marcin Ożarowski<sup>4</sup>, Karolina Wielgus<sup>5</sup>

## Zawartość oenoteiny B i wydajność mikrorozmnażania w zależności od wieku kultur wierzbówki koprzyicy

### 1. Wprowadzenie

Obecnie na całym świecie obserwuje się rosnące zainteresowanie suplementami diety oraz produktami zielarskimi. Nutraceutyki i żywność funkcjonalna spożywane są w celu poprawy stanu zdrowia, samopoczucia oraz obniżenia ryzyka wystąpienia chorób, także nowotworowych.

Wierzbówka koprzyca (*Chamerion angustifolium* (L.) Holub) jest ważną rośliną zielarską, wykorzystywaną od lat w tradycyjnej medycynie ludowej do leczenia m.in. schorzeń układu moczowo-płciowego. Ziele wierzbówki wykorzystywane jest w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym w profilaktyce i łagodzeniu objawów łagodnego rozrostu gruczołu krokowego (ang. *benign prostatic hyperplasia*, BPH). Obecnie suplementy diety i nutraceutyki powstałe na bazie wierzbówki koprzyicy są szeroko dostępne w wielu krajach w postaci herbat, kapsułek, tabletek oraz wodnych lub alkoholowych ekstraktów. Ekstrakty wierzbówki koprzyicy znajdują się również w kremach, szamponach i innych produktach kosmetycznych, przede wszystkim przeznaczonych dla cery trądzikowej. Ziele zawiera duże ilości związków polifenolowych, zwłaszcza elagotanin, flawonoidów i kwasów fenolowych. Uważa się, że prozdrowotne właściwości ekstraktów z wierzbówki koprzyicy wynikają z synergistycznego działania związków polifenolowych i oenoteiny B, która wykazuje szereg farmakologicznych właściwości, w tym antyandrogenowe, antyproliferacyjne, przeciwnowotworowe, przeciwutleniające, przeciwzapalne i immunomodulujące. Ponadto ziele wierzbówki wykazuje właściwości przeciwbakteryjne, przeciwbólowe oraz fotoprotekcyjne i spowalniające starzenie [1].

W 2016 roku Europejska Agencja Oceny Produktów Lecznicych (EMA), wydała monografię poświęconą wierzbówce koprzyicy i wierzbownicy drobnokwiatowej, która zawiera udokumentowane badania aktywności farmakologicznej obu gatunków oraz ocenę bezpieczeństwa ich stosowania. Na podstawie zebranych badań stwierdzono, że ziele wierzbówki koprzyicy jest bezpiecznym i skutecznym surowcem w łagodzeniu objawów towarzyszących schorzeniom dróg moczowych i prostaty, w tym w łagodnym przeroście gruczołu krokowego [2].

<sup>1</sup> mariola.dreger@iwnirz.pl, Zakład Biotechnologii, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, www.iwnirz.pl.

<sup>2</sup> milena.szalata@iwnirz.pl, Zakład Biotechnologii, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, www.iwnirz.pl.

<sup>3</sup> agnieszka.gryszczynska@iwnirz.pl, Zakład Farmakologii i Fitochemii, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, www.iwnirz.pl.

<sup>4</sup> marcin.ozarowski@iwnirz.pl, Zakład Biotechnologii, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, www.iwnirz.pl.

<sup>5</sup> karolina.wielgus@iwnirz.pl, Zakład Biotechnologii, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, www.iwnirz.pl.



## 2. Surowiec i jego związki aktywne

Surowcem zielarskim jest nadziemna część rośliny, czyli ziele (*Epilobii herba*). Dotychczas zidentyfikowano ponad 250 różnych metabolitów, z których 170 zidentyfikowano w ciągu ostatnich sześciu lat [3-14]. W przeważającej ilości występują związki polifenolowe: flawonoidy, kwasy fenolowe i elagotaniny. Ponadto stwierdzono obecność lignanów, steroidów, triterpenoidów, kwasów tłuszczowych i olejków eterycznych [15].

### 2.1. Flawonoidy

W ekstraktach wierzbówki kiprzyicy zidentyfikowano około 50 różnych flawonoidów i ich pochodnych, wśród nich aglikony: kemferol, kwercytnę, mirycytnę połączone z pojedynczą resztą cukrową kwasu glukuronowego, ramnozy, glukozy, arabinozy lub galaktozy. Przeważającym i charakterystycznym flawonoidem dla *Ch. angustifolium* jest 3-O-glukuronid kwercetyny, podczas gdy dla pozostałych gatunków *Epilobium* dominującym flawonoidem jest 3-O-glukuronid mirycetyny [16].

### 2.2. Kwasy fenolowe

Kwasy fenolowe i ich pochodne są najważniejszymi spośród związków fenolowych *Ch. angustifolium*. Obecność tych związków w znacznej mierze warunkuje działanie oksydacyjne [11] i terapeutyczne wierzbówki w kierunku łagodnego rozrostu gruczołu krokowego [13]. W ziele wierzbówki stwierdzono obecność 39 różnych kwasów fenolowych m. in. kwasy kawowy, elagowy, ferulowy, galusowy i protokatechowy oraz izomery kwasu kawoilochinowego [5, 7, 12-14].

### 2.3. Hydrolizowalne taniny

Zawartość elagotanin w ziele wierzbówki kiprzyicy stanowi do około 15% suchej masy [3]. Elagotaniny to związki fenolowe należące do grupy hydrolizowalnych tanin. Elagotaniny są estrami kwasu heksahydroksydifenylowego (HHDP), węglowodanów (najczęściej glukozy) i fenolokwasów. Z ziela wierzbówki kiprzyicy wyizolowano zarówno elagotaniny w formie monomerów (np.: telimagrandynę I), jak i makrocyclicznych elagotanin [3, 4]. Oenoteina B jest dimerem składającym się z dwóch cząsteczek telimagrandyny I. Za pomocą metod analitycznych jak UHPLC-MS/MS (chromatografia cieczowa sprzężona z spektrometrem mas) potwierdzono ponadto obecność wielu makrocyclicznych elagotanin, w tym oenoteiny A (trimer) i dużej grupy związków składających się z kilku cząsteczek (aż do heptamerów) [3]. Spośród wyizolowanych elagotanin oenoteina B jest najważniejszym związkiem bioaktywnym. Jej zawartość sięga do 50% całkowitej masy elagotanin w ekstrakcie [3]. W zależności od pochodzenia rośliny oraz czasu zbioru zawartość oenoteiny B w surowcu waha się od 2 do 4,5 % [15, 17, 18]. Uważa się, że obecność właśnie tego związku ma decydujący wpływ na aktywność antyandrogenową, antyproliferacyjną, przeciwutleniającą, przeciwzapalną i przeciwdrobnoustrojową ekstraktów z *Ch. angustifolium* [19]. Obecnie rekomenduje się standaryzację surowca wierzbówki kiprzyicy na zawartości oenoteiny B i 3-O-glukuronidu kwercetyny [7, 16, 19, 20].

### 3. Najważniejsze właściwości farmakologiczne i biologiczne wyciągów z wierzbówki koprzyicy

#### 3.1. Własności antyproliferacyjne i przeciwnowotworowe

Wyniki badań farmakologicznych wskazują, że wyciągi z wierzbówki koprzyicy mogą być skuteczne w terapii łagodnego przerostu prostaty BPH [21]. W latach 90 wykazano, że wodne wyciągi z wierzbówki koprzyicy i pokrewnych gatunków z rodzaju *Epilobium* wpływają na aktywność dwóch kluczowych enzymów odpowiedzialnych za przemianę testosteronu oraz znaczący udział w etiopatogenezie BPH tj. 5- $\alpha$ -reduktazy i aromatazy [22, 23]. Odkryto, że oenoteina B jest aktywnym inhibitorem 5- $\alpha$ -reduktazy [22]. W doświadczeniach na modelu zwierzęcym badacze podawali niekastrowanym szczurom wyciąg wodny z wierzbówki (w dawce 40 mg/kg masy ciała), innej zaś grupie niekastrowanych szczurów – testosteron. W pierwszej grupie wyniki wskazywały na efekt antyandrogeny, natomiast w drugiej proandrogeny (powodujący proliferację komórek prostaty) [24]. Odkrycia te zainspirowały kolejne badania na modelu *in vitro* z udziałem linii komórek raka prostaty (LNCaP) i nabłonka prostaty [25, 26]. Badania te dowiodły specyficznego działania anty-proliferacyjnego wyciągów z wierzbówki poprzez jednoczesne zahamowanie syntezy DNA i podziałów komórkowych [26].

Badania wpływu wodnych wyciągów *Ch. angustifolium* na metalopeptydazy (obojętna endopeptydaza NEP, konwertaza angiotensynowa ACE) wykazały hamowanie ich aktywności w sposób wprost proporcjonalne do dawki wyciągu [27, 28]. Aktywność wobec metalopeptydaz przypisano oenoteinie B, bądź też jej synergistycznemu działaniu z innymi polifenolami. Kolejne badania na liniach komórek raka prostaty androgenozależnego (LNCaP) i niewrażliwego na androgeny (DU 145) potwierdziły antyproliferacyjny efekt wyciągów z wierzbówki koprzyicy [29, 30]. Ponadto stwierdzono ścisłą korelację między zawartością oenoteiny B, a zdolnością do hamowania proliferacji komórek LNCaP. Jednocześnie wykazano znacznie słabsze działanie antyproliferacyjne w stosunku do komórek fizjologicznych (nabłonka prostaty i fibroblastów skóry) i brak działania w stosunku do komórek raka prostaty linii DU 145. Udowodniono, że oenoteina B ma nie tylko zdolność hamowania namnażania się komórek nowotworowych, ale też odpowiada za ich apoptozę, a więc posiada również działanie przeciwnowotworowe.

#### 3.2. Działanie przeciwzapalne

Wyciągi z wierzbówki koprzyicy wykazują silne działanie przeciwzapalne, co dowiodły liczne badania [31-34]. Jednym z wielu czynników biorących udział w procesach zapalnych są prostaglandyny – hormony tkankowe, syntetyzowane przez enzym cyklooksygenazę (COX). Wytwarzane przez izoformę COX-2 prostaglandyny należą do tzw. mediatorów stanu zapalnego i uczestniczą w procesach zapalnych, przyczyniając się do powstania bólu, gorączki i obrzęków. Zahamowanie działania cyklooksygenazy powoduje zahamowanie wytwarzania prostaglandyn, a w efekcie stanu zapalnego. Wyciągi etanolowe i wodne wierzbówki, wykazywały działanie hamujące wobec enzymów COX i produkcji prostaglandyn (PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> i PGD<sub>2</sub>), przy czym wyciągi etanolowe charakteryzowały się wyższą aktywnością [35]. W innych badaniach stwierdzono jedynie słabe działanie wodnych wyciągów z *Ch. angustifolium*, *E. parviflorum* i *E. hirsutum* na cyklooksygenazy [33]. Potwierdzono natomiast, że wszystkie wyciągi hamowały aktywność lipooksygenazy i hialuronidazy, enzymów

biorących udział w procesie zapalnym, co dowodzi, że aktywność przeciwzapalna wyciągów ma różne podłoże i działa wieloczynnikowo poprzez różne mechanizmy.

Antyoksydanty zapobiegają procesowi utleniania w organizmie i w ten sposób opóźniają procesy starzenia komórek oraz przeciwdziałają rozwojowi wielu chorób cywilizacyjnych. Z uwagi na wysoką zawartość związków fenolowych w surowcu wierzbówki, a zwłaszcza flawonoidów wysunięto postulat, że to one odpowiadają za efekt antyoksydacyjny. Jednak w kilku badaniach udowodniono, że za działanie przeciwutleniające wyciągów odpowiedzialna jest przede wszystkim oenoteina B [8, 12, 33], co nie wyklucza, że także inne związki (flawonoidy, fitosterole) składają się na efekt antyoksydacyjny [33]. Niemniej jednak najsilniejszym antyoksydantem wśród polifenoli wierzbówki jest oenoteina B, co potwierdza, że elagotaniny należą do jednych z silniejszych przeciwutleniaczy [9].

### 3.3. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa

Ekstrakty z wierzbówki wykazują szerokie spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego w tym: przeciwbakteryjnego, przeciwgrzybicznego i przeciwwirusowego. W licznych pracach wykazano aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyrogenes*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus sanguis* i *Micrococcus luteus*, jak i Gram-ujemnych: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* i *Pseudomonas aeruginosa* [36-39]. Aktywność przeciwgrzybiczną udowodniono w stosunku do grzybów z rodzaju *Candida*, *Microsporum* i *Trichophyton* [37].

### 3.4. Kultury *in vitro* wierzbówki kiprzycy i gatunków pokrewnych

Kultury *in vitro* wierzbówki kiprzycy stanowią mało poznany i nieprzebadany jeszcze obszar. Nieliczne, dotychczas opublikowane prace, ograniczają się do mikrorozmnażania [40, 41]. Opracowany protokół mikrorozmnażania pozwala na bardzo efektywne namnażanie pędów na drodze organogenezy bezpośredniej, a wysoki współczynnik namnażania (średnio 37 pędów/eksplantat) jest jednym z wyższych dla roślin leczniczych [41]. Badania nad gatunkami pokrewnymi: wierzbownicą drobnokwiatową *E. parviflorum* i wierzbownicą kosmatą *E. hirsutum* wskazują, że możliwe jest otrzymywanie kultur pędów z eksplantatów węzłowych na pożywkach płynnych [42]. Analiza chemiczna zregenerowanych roślin oraz roślin pochodzących ze stanowisk naturalnych wykazała znaczne zróżnicowanie i różnorodność syntetyzowanych metabolitów. Do oznaczenia ilościowego i jakościowego zastosowano metodę chromatografii cienkowarstwowej (TLC) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), co umożliwiło wykrycie kwasów fenolowych, (kwasu galusowego i elagowego), flawonoidów, takich jak kwercytyna i rutyna oraz tanin. Wykazano, że zarówno *E. hirsutum*, jak i *E. parviflorum* produkowały w warunkach naturalnych galoglukozy (tetra-, penta-, hekso-, hepta-, i okta-GG) oraz monomeryczne (telimagrandyna I, telimagrandyna II i stryktynina), dimeryczne (oenoteina B) i trimeryczne elagotaniny (oenoteina A). Różnice w zawartości tanin u obu gatunków były znaczące i wynikały z różnic międzygatunkowych, rodzaju użytego podłoża, zawartości hormonów oraz użytych antyoksydantów. Pędy zregenerowane z eksplantatów węzłowych wykazywały kompletny zestaw analizowanych tanin, w tym także obie oenoteiny (A i B). Wyniki, choć nie zawierały dokładnych oznaczeń ilościowych dla elagotanin i galotanin, wykazywały podobieństwo do wyników otrzymanych przez

inne grupy badawcze [43]. Zauważono również, że intensywność procesu syntezy tanin zależy od stopnia rozwoju, a w szczególności od stopnia zróżnicowania komórkowego w obrębie rośliny. Badania nad gatunkami pokrewnymi: *E. hirsutum* i *E. parviflorum* wskazują, że regeneranty są stabilne genetycznie i zdolne do syntezy tych samych związków co rośliny dziko rosnące. Pozwala to przypuszczać, że również kultury *Ch. angustifolium* zdolne są do syntezy kluczowych metabolitów.

Celem prowadzonych badań było określenie zależności pomiędzy zawartością oenoteiny B w surowcu roślinnym, a wiekiem kultur wierzbowki kiprzycy. Istnieją bowiem pewne przesłanki dotyczące wpływu wieku kultur na zawartość tanin, w tym oenoteiny B [43].

Ponadto analizowano wpływ wieku kultury na wydajność mikrorozmnażania tj. liczbę pozyskanych eksplantatów, ich przeżywalność oraz wysokość pędów. Założono, że wydłużenie okresu między pasażami z siedmiu do dziesięciu tygodni może wpływać na wysokość pędów, a tym samym liczbę możliwych do pozyskania eksplantatów oraz ich przeżywalność. Przyjęto także hipotezę, że młodsze eksplantaty charakteryzują się wyższym potencjałem regeneracyjnym i wyższą żywotnością w stosunku do starszych kultur.

## 4. Materiały i metodyka badań

### 4.1. Materiał roślinny

Materiał roślinny stanowiły kultury węzłowe *C. angustifolium*, pasażowane co 7 tygodni na pożywkę ukorzeniającą ½ MS (MS wg Murashige i Skooga 1962) zawierającą kwas 3-indoliloctowy (IAA) oraz kwas askorbinowy. Źródłem eksplantatów były ukorzenione pędy w wieku siedmiu i dziesięciu tygodni, z których pobierano eksplantaty: wierzchołki pędów oraz odcinki węzłowe, mierzące około 1 cm. Odcinki węzłowe zawierały 1-3 pąki boczne. Eksplantaty wykładano po 9 sztuk do pojemników (Magenta 350 ml; Merck) z pożywką ukorzeniającą. W trakcie doświadczenia monitorowano wysokość pędów, liczbę i rodzaj pozyskiwanych eksplantatów oraz ich przeżywalność. Wysokość pędów mierzono za pomocą linijki (wielość próby wynosiła 35 pędów) i obliczano średnią wysokość pędu dla danego pasażu (powtórzenia), a następnie dla całego doświadczenia. Ilość eksplantatów otrzymanych z jednego pędu określano tnąc indywidualnie każdy z 20 pędów i licząc osobno pozyskane wierzchołki pędów oraz odcinki węzłowe dla każdej z grup wiekowych. Przeżywalność eksplantatów określano po 4 tygodniach hodowli w fitotronie, obliczając odsetek eksplantatów, które przeżyły w dobrej kondycji tj. rozwinęły ulistniony pęd i ukorzeniły się. Wielkość próby wynosiła 10 kultur, czyli 90 pędów dla każdego powtórzenia i dla każdej z grup wiekowych. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach, co odpowiadało trzem kolejnym subkulturom: 22, 23 i 24. Kultury hodowano w fitotronie w temperaturze 20°C (±1°C), w warunkach fotoperiodu (16 godzin dnia i 8 godzin noc), przy intensywności światła około 25-30 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (Lampy Fluora Osram).

### 4.2. Skład pożywki

W doświadczeniu wykorzystano jeden rodzaj pożywki – pożywkę ukorzeniającą, zawierającą: połowę mikro- i makroelementów oraz witamin pożywki MS (wg Murashige i Skooga 1962), kwas indolilo-3-octowy (IAA) w stężeniu 0,5 mg/l

kwas askorbinowy (0,1 g/l), sacharozę (15,0 g/l) i agar (8,5 g/l; Bactoagar; BD Dickinson). Przy sporządzeniu pożywki korzystano z gotowych koncentratów mikro-, makroelementów oraz witamin (Merck). W celu ograniczenia wydzielania polifenoli przez eksplantaty do medium dodawano kwas askorbinowy (witamina C) będący czynnikiem antyoksydacyjnym, hamującym działanie oksydazy fenolowej. Po rozpuszczeniu wszystkich składników wykonano pomiar pH za pomocą pehametru i ustalono na poziomie 5,7 za pomocą 1N kwasu solnego oraz 1N zasady sodowej. Pożywkę sterylizowano w autoklawie przez 20 minut (0,1 MPa 120°C).

## 5. Analiza zawartości oenoteiny B

### 5.1. Ekstrakcja oenoteiny B

Około 50 mg ziela umieszczano w 50 ml kolbie. Do próbki dodawano 35 ml wody i ekstrahowano w łaźni ultradźwiękowej przez 60 minut w temp. 40°C. Po schłodzeniu próbki dodawano 5 ml acetonitrylu. Supernatant przesączało przez filtry 0,45 µm.

### 5.2. Analiza HPLC-DAD

Detekcję prowadzono wg metody opisanej przez Kiss i wsp. [20]. W procesie rozdzielania wykorzystano LiChrospher 100 RP-18e. 5 µm × 4 mm × 250 mm (Merck). Zastosowano 2,5% CH<sub>3</sub>COOH (faza A) i 2,5% H<sub>3</sub>COOH:ACN (2:8 V/V) (faza B). Warunki rozdzielania: 0 min – 7% faza B. 30 min – 20% faza B. 60 min – 40% faza B. Temperatura kolumny wynosiła 25°C. prędkość przepływu 1,0 ml/min. Detekcja przy λ=263 nm. Pik zidentyfikowano przez porównanie czasu retencji i widm UV-VIS substancji wzorcowej.

### 5.3. Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej wykorzystano program Statistica 10.0 (StatSoft Inc., 2011). Zgodność rozkładów rozpatrywanych zmiennych z rozkładem normalnym badano przy użyciu testu Shapiro-Wilka, natomiast jednorodność wariancji sprawdzano testem Levene'a. Do porównań międzygrupowych wykorzystano: test t (Studenta) dla zmiennych niezależnych, test U Manna-Whitney'a oraz test różnicy dla dwóch wskaźników struktury. Założono poziom istotności α = 0,05. Za istotne statystycznie uznawano wyniki, gdy wyliczone prawdopodobieństwo testowe p spełniało nierówność p < 0,05.

## 6. Wyniki i dyskusja

### 6.1. Wydajność mikrorozmnażania

Mikropropagacja to klonalne namnażanie roślin w kulturach *in vitro*, gdzie nowe rośliny otrzymuje się poprzez indukcję istniejących merystemów (zarodków, pąków szczytowych lub bocznych) bądź z merystemów przybyszowych, które tworzą się bezpośrednio lub przy udziale kalusa [44, 45]. Dzięki mikrorozmnażaniu uzyskuje się wysoką wydajność – nawet kilka tysięcy sztuk roślin z jednego eksplantatu, przy czym są to rośliny o wyrównanym fenotypie i identyczne pod względem genotypu z rośliną macierzystą.

We wstępnym etapie badań nad mikrorozmnażaniem wierzbowki kiprzyicy otrzymano linie pochodzące od pojedynczych osobników [40]. Ukorzenione pędy posłużyły do założenia kultur węzłowych, które stanowiły formę przechowywania oraz rezerwuuar eksplantatów do doświadczeń nad mikrorozmnażaniem. Dlatego

jednym z aspektów prowadzonych badań był wpływ wieku kultur na efektywność namnażania oraz na ich przeżywalność, co stanowi jeden z celów niniejszej pracy. Ma on także aspekt praktyczny, gdyż pozwoli określić czy kultury przechowywane przez 10 tygodni mogą stanowić pełnowartościowy materiał roślinny i źródło eksplantatów do dalszych badań.

W celu porównania wydajności namnażania kultur w wieku 7 i 10 tygodni obliczono średnie wartości dla obu rodzajów pozyskiwanych eksplantatów tj. odcinków węzłowych i wierzchołków pędów oraz liczbę wszystkich eksplantatów w przeliczeniu na jeden pęd, dla wszystkich pasaży (tab. 1).

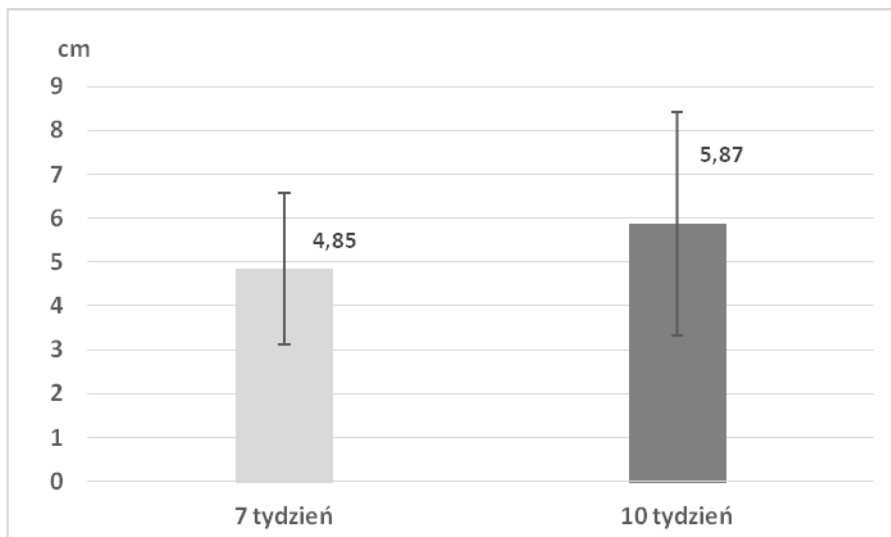
Tabela 1. Średnia liczba eksplantatów pozyskanych z pędów w 7 i 10 tygodniu kultury. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach dla próby 20 pędów (n = 20). Analizę statystyczną wykonano w oparciu o test U Manna-Whitneya

Wiek kultur	Średnia liczba eksplantatów ( $\pm$ SD)		L. ekspl./pęd ( $\pm$ SD)
	Odcinki węzłowe	Wierzchołki pędów	
7 tygodni	3,40 $\pm$ 1,56*	1,30 $\pm$ 0,62*	4,70 $\pm$ 1,83*
10 tygodni	5,25 $\pm$ 2,40**	1,30 $\pm$ 0,56*	6,55 $\pm$ 2,63**

Źródło: obliczenia własne

Porównanie badanych parametrów wykazało istotne statystycznie różnice między kulturami w siódmym i dziesiątym tygodniu hodowli. Całkowita liczba eksplantatów w przeliczeniu na pęd jest wyższa dla kultur dziesięcioletniowych w stosunku do kultur siedmioletniowych, a różnica wynosi blisko 2 eksplantaty (1,85) na pęd. Na taki wynik miała wpływ przede wszystkim liczba odcinków węzłowych, która była większa dla kultur dziesięcioletniowych, a różnica między grupami wiekowymi wynosiła dokładnie 1,85. Nie stwierdzono różnic w liczbie wierzchołków pędów, których uśredniona liczba wynosiła 1,3 zarówno dla kultur starszych, jak i młodszych. Wzrostowi liczby odcinków węzłowych nie towarzyszył wzrost liczby wierzchołków pędów, gdyż rośliny rzadko wytwarzały dodatkowy pęd. W wyniku braku cytokinin w pożywce, których działanie znosiłoby efekt dominacji wierzchołkowej rośliny nie tworzyły pędów bocznych i nie rozgałęziały się.

Wzrost pędów wyrażał się poprzez tworzenie nowych węzłów i wzrost elongacyjny, co znalazło swoje odzwierciedlenie w wysokości pędów (wyk. 1). W trakcie doświadczenia mierzono wysokość 35 pędów w 7 i 10 tygodniu hodowli oraz określano średnią wysokość pędów dla danego okresu. Pędy 10-tygodniowe były średnio wyższe o blisko 1 cm niż pędy 7-tygodniowe. Tempo wydłużania pędu, któremu towarzyszył także przyrost liczby węzłów, było wolne i wynosiło średnio 0,32 cm na tydzień. W doświadczeniu zastosowano stałe warunki hodowli jak temperatura i oświetlenie, tak by wyeliminować inne czynniki mogące zakłócać przebieg doświadczenia.



Wykres 1. Porównanie wysokości pędów w zależności od wieku kultur (7 i 10 tygodni kultury). Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe SD. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o test U Manna-Whitneya. Wielkość próby 35 pędów

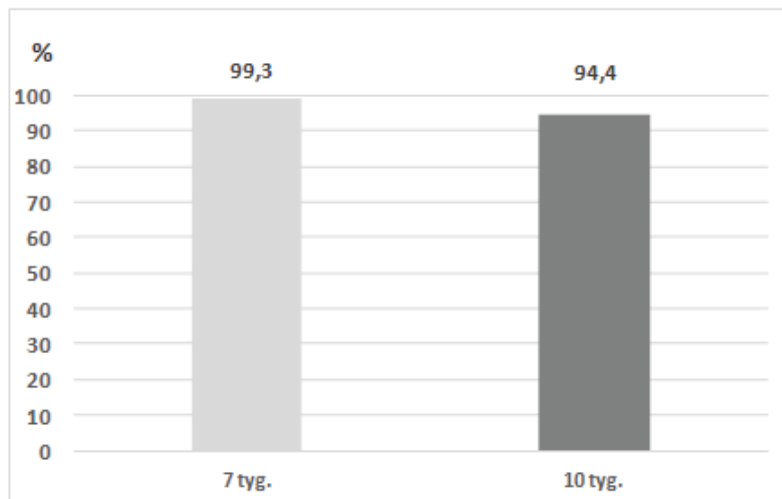
Istotnym czynnikiem wpływającym na sukces mikrorozmnażania jest wysoka przeżywalność eksplantatów oraz ich zdolność do regeneracji nowych, ukorzenionych pędów. Porównując zdolność przeżycia eksplantatów w wieku 7 i 10 tygodni, stwierdzono, wyższą przeżywalność eksplantatów siedmioletniowych. Różnica wynosiła blisko 5% i była statystycznie znamienne, co potwierdzono odpowiednim testem statystycznym (wyk. 2). Należy dodać, że wszystkie eksplantaty, które przeżyły, ukorzeniły się i rozwinęły prawidłowo zbudowane pędy.

Wiadomo, że młodsze tkanki posiadają większy potencjał regeneracyjny, gdyż zawierają więcej centrów merystematycznych i komórek zdolnych do podziałów [5], co może tłumaczyć wyższy wynik dla młodszych pędów. Badania przeprowadzone na *Anthurium andreaanum* [12] wykazały, że eksplantaty pochodzące z dorosłych roślin macierzystych (rocznych) w porównaniu do młodszych (6-miesięcznych), cechowały się znacznie obniżonym potencjałem regeneracyjnym i zdolnością do organogenezy. Eksplantaty liściowe pobierane z młodszych roślin wytwarzały 2,8 pędów na eksplantat podczas gdy eksplantaty pozyskane z rocznych egzemplarzy wytwarzały tylko 0,3 pędów na eksplantat.

Innym przykładem są kultury czeremchy (*Prunus serotyna*), gdzie 91,4% młodych eksplantatów tworzyło i regenerowało pędy, podczas gdy starsze – tylko w 40% [13]. Obniżenie zdolności regeneracyjnych starszych eksplantatów autorzy tłumaczą wydzielaniem polifenoli oraz wahaniami stosunku auksyn IAA do IBA w dojrzałych liściach [12].

Niższa przeżywalność eksplantatów dziesięcioletniowych mogła wynikać także z wydzielania polifenoli do pożywki i ich oksydacji, co skutkuje ciemnieniem tkanek i w efekcie doprowadza do zamierania eksplantatów. Ciemnienie eksplantatów w kulturach *in vitro* jest dość powszechne i dotyczy przede wszystkim gatunków

bogatych w związki polifenolowe, do których należy wierzbówka kiprzyca [3, 46, 6]. W przypadku niniejszego doświadczenia zaobserwowano sporadyczne ciemnienie wokół eksplantatów, najbardziej intensywne w ciągu pierwszych kilku dni od pasażowania do momentu wytworzenia korzeni. Dodatek kwasu askorbinowego do pożywki mógł ograniczyć proces ciemnienia po pasażowaniu, gdyż świeża pożywka zawierała jeszcze stosunkowo dużą ilość tego antyoksydantu. Pozytywny wpływ witaminy C hamujący wydzielanie polifenoli do pożywki zanotował Turker [3], który dodawał kwas askorbinowy do wszystkich pożywek od etapu indukcji pędów po ukorzenianie.



Wykres 2. Porównanie przeżywalności eksplantatów w zależności od tygodnia hodowli. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach dla próby  $n = 90$  eksplantatów. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o test różnicy między dwoma wskaźnikami struktury

## 6.2. Zawartość oenoteiny B

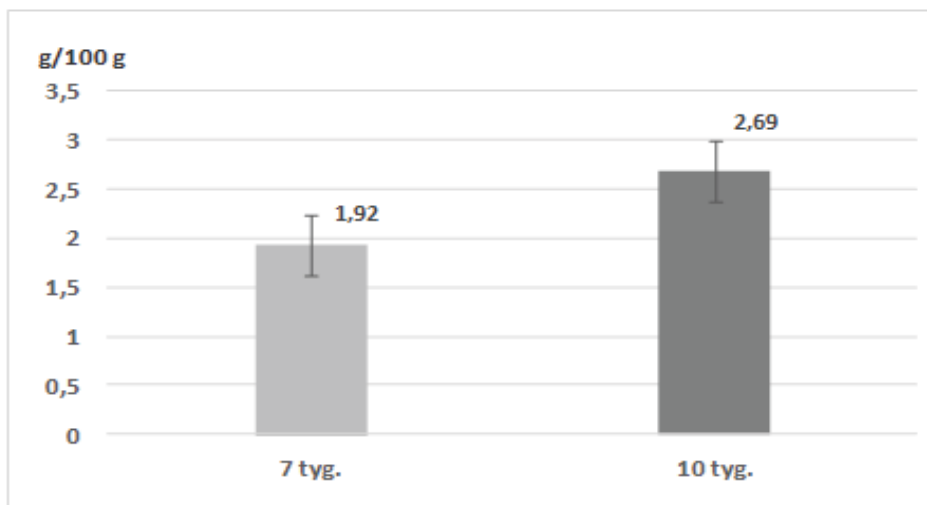
Aspekt wpływu wieku kultury na produkcję metabolitów wtórnych w kontekście przechowywania w warunkach *in vitro* jest jeszcze stosunkowo słabo poznany. Opisano wpływ wieku kultur pędów przybyszowych *Hypericum perforatum* na produkcję biomasy oraz metabolitów wtórnych podczas długo- i krótkoterminowego przechowywania kultur [11]. Różnice między krótkoterminowym (30 dni) oraz długoterminowym (100 dni) przechowywaniem kultur odnosiły się przede wszystkim do biomasy i liczby tworzonych pędów. Wiek kultur wpływał także na produkcję metabolitów wtórnych – zarejestrowano wzrost zawartości hyperycyny, ale tylko do 20 dnia hodowli. Dłuższy okres przechowywania kultur powodował spadek poziomu hyperycyny, co autorzy tłumaczą ścisłą korelacją z rozwojem i różnicowaniem się liści. Natomiast zawartość sumy związków fenolowych wzrastała wraz z wiekiem.

W ramach prowadzonych badań porównano zawartość oenoteiny B, jednego z najważniejszych związków czynnych tego gatunku, w zależności od wieku kultur. Porównanie wykazało większą zawartość oenoteiny B w kulturach starszych



(wyk. 3). Różnica wynosiła około 30% (0,77 g/100 g) na korzyść starszych kultur i była statystycznie istotna. Przyczyną wzrostu zawartości oenoteiny B w trakcie hodowli kultur mógł być stres wywołany pogarszaniem się warunków hodowli np.: zubożeniem pożywki itp. Elagotaniny należą do grupy związków fenolowych, których biosynteza uwarunkowana jest genetycznie poprzez obecność genów, kodujących enzymy szlaku biosyntezy i regulowana przez bodźce środowiska [47, 48].

Zmiany zawartości oenoteiny B w roślinach dziko rosnących rejestrowano w ciągu sezonu wegetacyjnego [50]. Najwyższy pik zawartości tego związku odnotowano w maju, w początkowej fazie wegetatywnej rozwoju roślin. Zwiększona zawartość elagotaniny w młodych rozwijających się pędach może być tłumaczona dwojako: może być związana z rozwojem liści i akumulacją tanin w chloroplastach jako odpowiedź na zwiększony stres UVB [44] lub wiązać się z ochroną młodych pędów przed działaniem roślinożerców [50].



Wykres. 3. Zawartość oenoteiny B (g/100 g) w surowcu w zależności od tygodnia hodowli kultur. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach dla próby 5 kultur (0,5 g-1,5 g). Analizę statystyczną wykonano w oparciu o test Studenta

Zdolność kultur pędowych *Oenothera tetraptera* do produkcji oenoteiny B oraz innych elagotanin była opisana przez Taniguchiego (2002) [43]. Zmiany poziomu zawartości elagotanin oraz ich składu zanotowano w trakcie regeneracji pędów, jak i podczas aklimatyzacji roślin. W przeciwieństwie do innych elagotanin, zawartość oenoteiny B rosła w rozwijających się pędach. Natomiast w trakcie aklimatyzacji zanotowano ponad dwukrotny wzrost zawartości oenoteiny B, co autorzy tłumaczyli pozytywnym efektem działania światła naturalnego zawierającego także widmo UVB w odróżnieniu od lamp fitotronowych. Należy dodać, że za wzrost zawartości oenoteiny B mógł być odpowiedzialny także stres związany przejściem z sterylnych warunków do warunków *ex vitro* w trakcie aklimatyzacji. Natomiast wg niektórych doniesień zwiększona zawartość tanin, w tym także elagotanin czynni rośliny trujące lub mniej

strawne, a przez to nieatrakcyjne jako pokarm, co stanowi odpowiedź obronną roślin na wzrastającą presję roślinożerców [50, 51]. Ma to swoje uzasadnienie, gdyż młodsze organy są bardziej narażone na atak roślinożerców, dlatego zwiększona biosynteza metabolitów ma charakter obronny.

Podsumowując należy stwierdzić, że wiek pędów wierzbowki koprzyicy wpływał na przeżywalność i zdolność eksplantatów do regeneracji oraz produkcję oenoteiny B. Eksplantaty pochodzące z młodych roślin cechował wyższy potencjał regeneracyjny i zdolności adaptacyjne, co tłumaczy ich wyższą przeżywalność. Kultury 10-tygodniowe cechowała wyższa zawartość oenoteiny B w stosunku do młodszych kultur, co mogło wynikać z stresu wiążącego się pogarszający się warunków pokarmowych pod koniec okresu prowadzenia kultur. Definitywne rozstrzygnięcie tej kwestii przyniosłoby przeprowadzenie dodatkowych badań, ukierunkowanych na stymulację stresu z użyciem odpowiednich elicytorów (stres głodu, elicytacja UVB itp.).

## 7. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że wiek kultur wpływał istotnie zarówno na zawartość oenoteiny B w kulturach wierzbowki koprzyicy, jak i na wydajność mikrorozmnażania. Bardziej efektywne jest namnażanie kultur dziesięcio-tygodniowych, pomimo ich niższej przeżywalności, gdyż są wydajniejszym źródłem eksplantatów. Ponadto stanowią surowiec bogatszy w oenoteinę B niż kultury 7-tygodniowe.

## Podziękowania

Badania zrealizowano w ramach projektu EPIMAN, PBS2/A8/23/2013, finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach Programu Badań Stosowanych II. Część wyników dotycząca kultur *in vitro* wierzbowki koprzyicy została ujęta w pracy inżynierskiej Pana Wiktora Zakrzewskiego, wykonanej w IWNiRZ pod kierunkiem dr Karoliny Wielgus.

## Literatura:

1. Vitalone A., Allkanjari O., *Epilobium spp: Pharmacology and Phytochemistry* 32, (2018), 1229-1240. doi: <https://doi.org/10.1002/ptr.6072>.
2. European Medicines Agency, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), *European Union Herbal Monograph on Epilobium angustifolium L. and/or Epilobium parviflorum Schreb., herba*, European Medicines Agency (2016).
3. Baert N., Karonen M., Salminen J.P., *Isolation, characterisation and quantification of the main oligomeric macrocyclic ellagitannins in Epilobium angustifolium by ultra-high performance chromatography with diode array detection and electrospray tandem mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 1419, 2015, s. 26-36, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.050>.
4. Baert N., Kim J., Karonen M., Salminen J.P., *Interpopulation and inter-organ distribution of the main polyphenolic compounds of Epilobium angustifolium*, Phytochemistry, 134, 2017, s. 54-63, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.11.003>.
5. Kaškonienė V., Stankevičius M., Drevinskas T., Akuneca I., Kaškonas P., Bimbiraitė-Survilienė K., Maruška A., Ragažinskienė O., Kornysova O., Briedis V., Ugenskienė R., *Evaluation of phytochemical composition of fresh and dried raw material of introduced Chamerion angustifolium L. using chromatographic, spectrophotometric and chemometric techniques*, Phytochemistry, 115, 2015, s. 184-193, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.02.005>.
6. Frolova T.S., Sal'nikova O.I., Dudareva T.A., Kukina T.P., Sinitsyna O.I., *Isolation of pomolic acid from Chamaenerion angustifolium and the evaluation of its potential*

- genotoxicity in bacterial test systems, Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 40(1), 2014, s. 82-88, doi: <http://dx.doi.org/10.1134/S1068162013060046>.
7. Granica S., Piwowarski J.P., Czerwińska M.E., Kiss A.K., *Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of different Epilobium species (Onagraceae): A review*, Journal of Ethnopharmacology, 156, 2014, s. 316-346. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.08.036>.
  8. Maruška A., Ragažinskienė O., Vyšniauskas O., Kaškonienė V., Bartkuviene V., Kornyšova O., Briedis V., Ramanauskienė K., *Flavonoids of willow herb (Chamerion angustifolium (L.) Holub) and their radical scavenging activity during vegetation*, Advances in Medical Sciences, 59(1), 2014, s. 136-141, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.advms.2013.10.002>.
  9. Kaškonienė V., Maruška A., Akuņeca I., Stankevičius M., Ragažinskienė O., Bartkuviene V., Kornyšova O., Briedis V., Ugenkienė R., *Screening of antioxidant activity and volatile compounds composition of Chamerion angustifolium (L.) Holub ecotypes grown in Lithuania*, Natural Product Research, 30(12), 2016, s. 1373-1381, doi: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2015.1058792>.
  10. Moilanen J., Koskinen P., Salminen J.P., *Distribution and content of ellagitannins in Finnish plant species*, Phytochemistry, 116, 2015, s. 188-197, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.03.002>.
  11. Monschein M., Jandl K., Buzimkić S., Bucar F., *Content of phenolic compounds in wild populations of Epilobium angustifolium growing at different altitudes*, Pharmaceutical Biology, 53(11), 2015, s. 1576-1582, doi: <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2014.993039>.
  12. Deng L.Q., Zhou S.Y., Mao J.X., Liu S., Lan X.Z., Liao Z.H., Chen M., *HPLC-ESI-MS/MS analysis of phenolics and in vitro antioxidant activity of Epilobium angustifolium L.*, Natural Product Research, 32(12), 2018, s. 1432-1435, doi: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2017.1344659>.
  13. Deng L., Zong W., Tao X., Liu S., Feng Z., Lin Y., Liao Z., Chen M., *Evaluation of the therapeutic effect against benign prostatic hyperplasia and the active constituents from Epilobium angustifolium L.*, Journal of Ethnopharmacology, 232, 2019, s. 1-10, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2018.11.045>.
  14. Gryszyńska A., Dreger M., Piasecka A., Kachlicki P., Witaszak N., Sawikowska A., Ozarowski M., Opala B., Łowicki Z., Pietrowiak A., Miklaś M., Mikołajczak P.L., Wielgus K., *Qualitative and quantitative analyses of bioactive compounds from ex vitro Chamaenerion angustifolium (L.) (Epilobium angustifolium) herb in different harvest times*, Industrial Crops and Products, 123, 2018, s. 208-220, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.010>.
  15. Adamczak A., Dreger M., Seidler-Łożykowska K., Wielgus K., *Fireweed (Epilobium angustifolium L.): botany, phytochemistry and traditional uses. A review*, Herba Polonica, 65(3), 2019, s. 51-63, doi: <http://dx.doi.org/10.2478/hepo-2019-0018>.
  16. Hevesi T.B., Blazics B., Kéry Á., *Polyphenol composition and antioxidant capacity of Epilobium species*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 49(1), 2009, s. 26-31, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2008.09.047>.
  17. Ducrey B., Marston A., Göhring S., Hartmann R.W., Hostettmann K., *Inhibition of 5 $\alpha$ -reductase and aromatase by the ellagitannins oenothein A and oenothein B from Epilobium species*, Planta Medica, 63(2), 1997, s. 111-114, doi: <http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-957624>.
  18. Granica S., Bazyłko A., Kiss A.K., *Determination of macrocyclic ellagitannin oenothein B in plant materials by HPLC-DAD-MS: method development and validation*, Phytochemical analysis, 23(6), 2012, s. 582-587, doi: <http://dx.doi.org/10.1002/pca.2358>.
  19. Schepetkin I.A., Ramstead A.G., Kirpotina L.N., Voyich J.M., Jutila M.A., Quinn M.T., *Therapeutic potential of polyphenols from Epilobium angustifolium (fireweed)*, Phytotherapy research, 30(8), 2016, s. 1287-1297, doi: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.5648>.
  20. Kiss A.K., Bazyłko A., Filipek A., Granica S., Jaszewska E., Kiarszys U., Kośmider A., Piwowarski J., *Oenothein B's contribution to the anti-inflammatory and antioxidant*

- activity of *Epilobium* sp. *Phytomedicine*, 18(7), 2011, s. 557-560, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2010.10.016>.
21. Kujawski R., Bogacz A., Derebecka-Hołosz N., Cichocka J., Kujawski J., Mikołajczak P.Ł., Bobkiewicz-Kozłowska T., Grześkowiak E., Krajewska-Patan A., Czerny B., Mrozikiewicz P.M., *Rośliny lecznicze z rodzaju Epilobium – działanie biologiczne i farmakologiczne*, *Herba Polonica*, 56, 2010, s. 67-81.
  22. Lesuisse D., Berjonneau J., Ciot C., Devaux P., Doucet B., Gourvest J.F., Khemis B., Lang C., Legrand R., Lowinski M., Maquin P., Parent A., Schoot B., Teutsch G., Chodounska H., Kasal A., *Determination of oenothain B as the active 5-alpha-reductase-inhibiting principle of the folk medicine Epilobium parvi – florum*, *Journal of Natural Products*, 59, 1996, s. 490-492.
  23. Ducrey B., Marston A., Gohring S., Hartmann R.W., Hostettmann K., *Inhibition of 5 alpha-reductase and aromatase by the ellagitannins oenothain A and oenothain B from Epilobium species*, *Planta Medica*, 63, 1997, s. 111-114.
  24. Hiermann A., Bucar F., *Studies of Epilobium angustifolium extracts on growth of accessory sexual organs in rats*, *Journal of Ethnopharmacology*, 55, 1997, s. 179-183.
  25. Vitalone A., Bordi F., Baldazzi C., Mazzanti G., Saso L., Tita B., *Anti – proliferative effect on a prostatic epithelial cell line (PZ-HPV-7) by Epilobium angustifolium L.*, *Il Farmaco*, 56, 2001, s. 483-489.
  26. Vitalone A., McCroll J., Thome D., Costa L.G., Tita B., *Characterization of the effect of Epilobium extracts on human cell proliferation*, *Pharmacology*, 69, 2003, s. 79-87.
  27. Kiss A., Kowalski J., Melzig M.F., *Induction of neutral endopeptidase activity in PC-3 cells by an aqueous extract of Epilobium angustifolium L. and oenothain B*, *Planta Medica*, 70(10), 2004, s. 919-923.
  28. Kiss A., Kowalski J., Melzig M.F., *Induction of neutral endopeptidase activity in PC-3 cells by an aqueous extract of Epilobium angustifolium L. and oenothain B*, *Phytomedicine*, 13, 2006, s. 284-289.
  29. Stolarczyk M., Naruszewicz M., Kiss A.K., *Extracts from Epilobium sp. herbs induce apoptosis in human hormone-dependent prostate cancer cells by activating the mitochondrial pathway*, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65, 2013, s. 1044-1054. <https://doi.org/10.1111/jphp.12063>.
  30. Stolarczyk M., Piwowarski J., Granica S., Stefańska J., Naruszewicz M., Kiss A.K., *Extracts from Epilobium sp. Herbs, Their Components and Gut Microbiota Metabolites of Epilobium Ellagitannins, Urolithins, Inhibit Hormone-Dependent Prostate Cancer Cells-(LNCaP) Proliferation and PSA Secretion*, *Phytotherapy Research*, 27, 2013, s. 1842-1848. doi: 10.1111/jphp.12063.
  31. Hiermann A., Juan H., Sametz W., *Influence of Epilobium extract on prostaglandin biosynthesis and carrageenin induced oedema of the rat paw*, *Journal of Ethnopharmacology*, 17, 1986, s. 161-169, [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(86\)90055-3](https://doi.org/10.1016/0378-8741(86)90055-3).
  32. Steenkamp V., Gouws M.C., Gulumian M., Elgorashi E.E., Van Staden J., *Studies on antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant activity of herbal remedies used in the treatment of benign prostatic hyperplasia and prostatitis*, *Journal of Ethnopharmacology*, 103, 2006, s. 71-75, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.07.007>.
  33. Kiss A.K., Bazyłko A., Filipek A., Granica S., Jaszewska E., Kiarszys U., Kośmider A., Piwowarski J., *Oenothain B's contribution to the anti-inflammatory and antioxidant activity of Epilobium sp.*, *Phytomedicine*, 18, 2011, s. 557-560, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.10.016>.
  34. Schepetkin I.A., Ramstead A.G., Kirpotina L.N., Voyich J.M., Jutila M.A., Quinn M., *Therapeutic potential of polyphenols from Epilobium Angustifolium (Fireweed)*, *Phytotherapy Research*, 30, 2016, s. 1287-1297, <https://doi.org/10.1002/ptr.5648>.
  35. Hiermann A., Juan H., Sametz W., *Influence of Epilobium extracts on prostaglandin biosynthesis and carrageenin induced oedema of the rat paw*, *Journal of Ethnopharmacology*, 17, 1986, s. 161-169, [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(86\)90055-3](https://doi.org/10.1016/0378-8741(86)90055-3).

36. Rauha J.P., Remes S., Heinonen M., Hopia A., Kähkönen M., Kujala T., Pihlaja K., Vuorela H., Vuorela P., *Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds*, International Journal of Food Microbiology, 56, 2000, s. 3-12, [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00218-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00218-X).
37. Battinelli L., Tita B., Evandri M.G., Mazzanti G., *Antimicrobial activity of Epilobium spp. Extracts*, Il Farmaco 56, 2001, s. 345-348.
38. Bartfay W.J., Bartfay E., Johnson J.G., *Gram-negative and Gram-positive antibacterial properties of the whole plant extract of willowherb (Epilobium angustifolium)*, Biological Research for Nursing, 14, 2012, s. 85-89, <https://doi.org/10.1177/1099800410393947>.
39. Kosalec I., Kopjar N., Kremer D., *Antimicrobial activity of willowherb (Epilobium angustifolium L.) leaves and flowers*, Current Drug Targets, 14, 2013, s. 986-991, DOI: 10.2174/13894501113149990177.
40. Dreger M., Wegenke J., Makowiecka J., Michalik T., Wielgus K., *Application of multi-shoots cultures in micropropagation of willow herb (Chamaenerion angustifolium (L.) Scop.)*, Herba Polonica, 62, 2016, s. 28-39, DOI: 10.1515/hepo-2016-0015.
41. Turker A.U., Mutlu E.C., Yıldırım A.B., *Efficient in vitro regeneration of fireweed, a medicinal plant*. Acta Physiologiae Plantarum, 30, 2008, s. 421-426, DOI 10.1007/s11738-008-0136-8.
42. Deliu C., Coste A., Mircea T., *Epilobium Sp. (Willow Herb): Micropropagation and Production of Secondary Metabolites*, [w:] Chandra S., LATA H., Varma A. (red.), *Biotechnology for Medicinal Plants*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2013, s. 149-170, [https://doi.org/10.1007/978-3-642-29974-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-29974-2_6).
43. Taniguchi S., Imayoshi Y., Hatano T., Yazaki K., Yoshida T., *Hydrolysable tannin production in Oenothera tetraptera shoot tissue culture*, Plant Biotechnology, 19(5), 2002, s. 357-363.
44. Wysokińska H., Świątek L., *Ćwiczenia z botaniki i podstawy biotechnologii roślin*, Wydawnictwo Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Łódź, 2009, s. 1-206.
45. Malepszy S., *Biotechnologia roślin*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 2001, 2, s. 19-33.
46. Thompson K.A., Husband B.C., Maherali H., *Climatic niche differences between diploid and tetraploid cytotypes of Chamaenerion angustifolium (Onagraceae)*, American Journal of Botany, 101(11), 2014, s. 1868-1875, doi: <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.1400184>.
47. Cheynier V., Comte G., Davies K.M., Lattanzio V., Martens S., *Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology*, Plant Physiology and Biochemistry, 72, 2013, s. 1-20, <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>.
48. Naikoo M.I., Dar M.I., Raghieb F., Jaleel H., Ahmad B., Raina A., Khan F.A., Naushin F., *Chapter 9 – Role and Regulation of Plants Phenolics in Abiotic Stress Tolerance: An Overview*, [w:] Khan M.I.R., Reddy P.S., Ferrante A., Khan N.A. (red.), *Plant Signaling Molecules*, Woodhead Publishing, 2019, s. 157-168, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816451-8.00009-5>.
49. Jürgenson S., Matto V., Raal A., *Vegetational variation of phenolic compounds in Epilobium angustifolium*, Natural Product Research, 26(20), 2012, s. 1951-1953, doi: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2011.643310>.
50. Salminen J.P., Karonen M., *Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach*, Functional Ecology, 25, 2011, s. 325-338, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01826.x>.
51. Anstett D.N., Cheval I., D'Souza C., Salminen J.P., Johnson M.T.J., *Ellagitannins from the Onagraceae Decrease the Performance of Generalist and Specialist Herbivores*, Journal of Chemical Ecology, 45, 2019, s. 86-94, <https://doi.org/10.1007/s10886-018-1038-x>.

## **Zawartość oenoteiny B i wydajność mikrorozmnażania w zależności od wieku kultur wierzbówki koprzycey**

### Streszczenie

Wierzbówka koprzyca jest ważną rośliną zielarską, wykorzystywaną od lat w tradycyjnej medycynie ludowej. Obecnie ziele wierzbówki znajduje zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym, w profilaktyce i łagodzeniu objawów łagodnego rozrostu gruczołu krokowego. W ziele wierzbówki koprzycey zidentyfikowano dotychczas ponad 250 różnych metabolitów, w tym 170 w ciągu ostatnich sześciu lat. Zawartość elagotanin w ziele wierzbówki koprzycey stanowi do około 15% suchej masy, spośród nich oenoteina B jest najważniejszym związkiem bioaktywnym. Obecnie rekomenduje się standaryzację surowca wierzbówki koprzycey na zawartości oenoteiny B i 3-*O*-glukuronidu kwercetyny. W literaturze przedmiotu istnieją przesłanki dotyczące wpływu wieku kultur *in vitro* na zawartość tanin, w tym oenoteiny B, stąd celem prowadzonych badań było określenie zależności pomiędzy zawartością oenoteiny B w surowcu roślinnym, a wiekiem kultur wierzbówki koprzycey. Ponadto, biorąc pod uwagę, że kultury wierzbówki koprzycey stanowią mało poznany i nieprzebadany jeszcze obszar, analizowano wpływ wieku kultury na wydajność mikrorozmnażania tj. liczbę pozyskanych eksplantatów, ich przeżywalność oraz wysokość pędów. Materiał roślinny do badań stanowiły kultury węzłowe. Zawartość oenoteiny B określano na podstawie wyników analizy DAD-HPLC. Istotność otrzymanych wyników potwierdzano poprzez analizę statystyczną w program Statistica 10.0. Stwierdzono, że wiek kultur wpływał istotnie zarówno na zawartość oenoteiny B w kulturach wierzbówki koprzycey, jak i na wydajność mikrorozmnażania. Bardziej efektywne jest namnażanie kultur 10-tygodniowych, które stanowią surowiec bogatszy w oenoteinę B niż kultury 7-tygodniowe.

Słowa kluczowe: wierzbówka koprzyca, oenoteina B, mikrorozmnażanie

## **The content of oenothien B and micropropagation efficiency depending on the age of fireweed cultures**

### Abstract

Fireweed has been traditionally used in folk medicine for centuries. Currently, the plant is used in the pharmaceutical and food industry for the prevention and relief of the symptoms of benign prostatic hyperplasia. To date, over 250 different metabolites have been identified in the fireweed, including 170 in the past six years only. The herb contains up to 15% dry mass of elagotanins, with oenothien B being the most important bioactive compound. For quality assurance, it is recommended to standardize raw material of fireweed herb on the content of oenothien B and quercetin 3-*O*-glucuronide. Some previous research hypothesized that the age of *in vitro* cultures impacts the content of tannins, including oenothien B. This study aimed to verify this hypothesis and examine the relationship between the content of oenothien B in plant material and the age of fireweed cultures. There is still little known about the fireweed cultures, and the study examined also the impact of culture age on micropropagation efficiency, i.e. the number of explants obtained, their survival rate and shoot high. The plant material used were nodal cultures. The oenothien B content was determined using DAD-HPLC analysis. The significance of the obtained results was confirmed by statistical analysis in the Statistica 10.0. The age of the cultures was found to indeed significantly affect both oenothien B content in fireweed cultures and micropropagation efficiency. It is more effective to propagate 10-week cultures were more efficient in propagation and their raw material was richer in oenothien B, than 7-week cultures.

Keywords: fireweed, oenothien B, micropropagation

## Aktywność przeciwtoksynotwórcza wybranych ekstraktów z kłącza imbiru lekarskiego (*Zingiber officinale* Rosc.)

### 1. Wstęp. Imbir (*Zingiber* Boehm.) – systematyka, zastosowanie, morfologia

Imbir lekarski (*Zingiber officinale* Rosc.) to roślina należąca do rodziny imbirowatych (*Zingiberaceae* Lindl.), a więc roślin wieloletnich z rzędu imbirowców (*Zingiberales* Griseb.) [1, 2]. Rodzaj ten obejmuje ok. 150 gatunków, z których najbardziej znany i rozpowszechniony jest imbir lekarski (*Zingiber officinale* Rosc.) wykorzystywany głównie jako roślina uprawna i lecznicza. Stanowisko systematyczne tej rośliny przedstawiono w tabeli 1 [3, www.1, www.2].

Tabela 1. Stanowisko systematyczne imbiru lekarskiego (*Zingiber officinale* Rosc.) [3, www.1, www.2]

Królestwo	rośliny ( <i>Archaeplastida</i> Adl et al.)
Kład	naczyniowe ( <i>Tracheophyta</i> Cavalier-Smith)
Kład	nasienne ( <i>Spermatophyta</i> Britton & Brown)
Klasa	okrytonasienne ( <i>Magnoliophyta</i> Cronquist, Takht. & Zimmerm. ex Reveal)
Kład	jednoliścienne ( <i>Monocotyledoneae</i> de Candolle)
Rząd	imbirowce ( <i>Zingiberales</i> Griseb.)
Rodzina	imbirowate ( <i>Zingiberaceae</i> Lindl.)
Rodzaj	imbir ( <i>Zingiber</i> Boehm.)
Gatunek	imbir lekarski ( <i>Zingiber officinale</i> Rosc.)

Roślina ta nie występuje w stanie dzikim, ale jej rozległe plantacje występują między innymi w Azji, Ameryce Łacińskiej, Afryce, a także w Australii. Prawdopodobnie pochodzi z Azji Południowej, a dokładnie z gór wschodnich Himalajów. Jego uprawą zajmowano się ponad 3000 lat temu w tropikalnych rejonach Azji. Największymi producentami imbiru są Chiny, Japonia i Indie. Liczne uprawy imbiru można również znaleźć w południowej oraz zachodniej Afryce, na Haiti, Barbados, Tajwanie oraz w Australii [4-6]. Do najważniejszych gatunków handlowych imbiru należą: jamajski (gatunek najwyższej jakości), malabarski (dobrej jakości) czy zachodnioafrykański (najniższej jakości) [7, 8].

Imbir to bylina (rys. 1) niewydająca owoców (rozmnaża się przez podział kłączy), która charakteryzuje się dużymi, lancetowatymi liśćmi wyrastającymi w dwóch rzędach. Ich długie pochwy obejmują pędy płonne osiągające od 80 do 100 cm wysokości. Natomiast pędy kwiatowe są krótsze, łuskowate i bezlistne. Grube i mięsiste kłącze (potocznie określane w różnych krajach jako m.in. ada, adrak,

<sup>1</sup> r.becker@biol.uw.edu.pl, Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, www.biol.uw.edu.pl/pl/.

ajenjibre, ata-le jinja, gengibre, ingwer, kan chiang, shengiang, czy zingibil) o jasnobrązowej barwie, jest dość silnie rozgałęzione i pokryte łuskowatymi liśćmi. Kwiaty o barwie zielonożółtej zebrane są w kłosowate kwiatostany. Są to kwiaty grzbieciste o bardzo małym kielichu, trzykrotnie wciętej koronie z żółtymi płatkami i fioletową warzką [3, 9, 10].



Rysunek 1. Imbir lekarski (*Zingiber officinale* Rosc.). Źródło: [www.3]

Częścią jadalną imbiru jest kłącze wykorzystywane głównie jako przyprawa w wielu krajach świata, a w szczególności w kuchni azjatyckiej ze względu na swój specyficzny i silny aromat (określany jako odświeżający z nieco słodką nutą) oraz palący i lekko gorzki smak. Nasycony słodką, drzewną nutą aromat imbiru pochodzi od wchodzącego w skład olejku eterycznego zingiberolu, będącego mieszaniną izomerów cis i trans  $\beta$ -eudesmolu [9, 11-13]. Z kolei lekko palący i gorzkawy smak jest zasługą substancji żywicznych [11]. Co ciekawe, imbir jest niezwykle pożądanym składnikiem perfum. Jego pobudzający, cierpki i świeży zapach doskonale komponuje się z jaśminem, lawendą, różą, bergamotką i neroli.

Jako roślina lecznicza, imbir korzystnie wpływa między innymi na układ krążenia (obniża stężenie cholesterolu we krwi) i układ pokarmowy. Zwalcza liczne dolegliwości żołądkowo-trawienne działając rozkurczowo na mięśnie gładkie przewodu pokarmowego i łagodząc objawy zespołu jelita drażliwego. Badania naukowe dowodzą, że imbir jest bardzo dobrym panaceum na reumatoidalne zapalenie stawów zmniejszając ból i towarzyszące mu obrzęki. Ponadto pomaga przy przeziębieniu, kaszlu, nieżyty gardła, czy zapaleniu oskrzeli. Kłącze imbiru ma także właściwości przeciwzapalne, przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne i przeciw pasożytnicze [14-17].



## 2. Substancje biologicznie aktywne występujące w imbirze

Właściwości prozdrowotne imbiru, a także jego smak i zapach, zależą głównie od obecności związków biologicznie czynnych (tzw. fitoskładników). Surowcem farmakognostycznym jest wysuszone, całe lub rozdrobnione kłącze imbiru (*Zingiberis rhizoma*), natomiast w celach leczniczych wykorzystuje się również otrzymywany z niego olejek eteryczny (*Oleum zingiberis*) [9].

Olejek, którego zawartość w surowcu wynosi do 4%, zawiera złożoną mieszaninę związków składającą się przede wszystkim z terpenoidów, wśród których można wyróżnić [7, 9, 10, 18]:

- seskwiterpeny:
  - $\alpha$ -zingiberen
  - zingiberol (ar-kurkumen)
  - $\beta$ -seskwifelandren
  - $\beta$ -bisabolen
  - $\alpha$ -farnezan
- monoterpeny:
  - kamfen
  - $\beta$ -felandren
  - cyneol
  - geraniol
  - kurkumen
  - cytral
  - terpineol
  - borneol

Skład olejku zależy między innymi od chemotypu, pochodzenia, czy warunków przechowywania surowca. Wykazano, że zawartość zingiberolu będącego głównym seskwiterpenowym składnikiem, zwiększa się kosztem  $\beta$ -seskwifelandrenu i zingiberenu w trakcie przechowywania surowca [7].

Natomiast za specyficzny, ostry smak kłącza imbiru odpowiedzialna jest grupa pochodnych fenylopropanu identyfikowanych jako 1-(3'-metoksy-4'-hydroksyfenyl)-5-hydroksyalkan-3-ony, czyli gingerole. Ich zawartość wynosi nawet do 7,5% w surowcu, a dominującym związkiem tej grupy jest 6-gingerol czy występujące w mniejszych ilościach 8-gingerol i 10-gingerol. Proces suszenia kłącza imbiru powoduje dehydratację tych związków, wskutek czego powstają szogaole nadające mu ostrzejszy smak. Innymi składnikami aktywnymi biologicznie wśród ostrych substancji są m.in. gingediole czy gingerdiony [19, 20].

Ponadto kłącze imbiru zawiera podstawowe składniki odżywcze, takie jak białka, tłuszcze, węglowodany, błonnik pokarmowy oraz witaminy i składniki mineralne. Wśród lipidów, obecne są wolne kwasy tłuszczowe (kwasy: palmitynowy, oleinowy, linolowy, kaprylowy, kaprynowy, laurynowy, mirystynowy, pentadekanowy, heptadekanowy, stearynowy, linolenowy czy arachidowy), a także lecytyna, kwas fosfatydowy i glikolipidy. Skład aminokwasowy imbiru stanowią głównie: arginina, kwas asparaginowy, cysteina, glicyna, izoleucyna, leucyna, seryna, treonina i walina [10, 21].

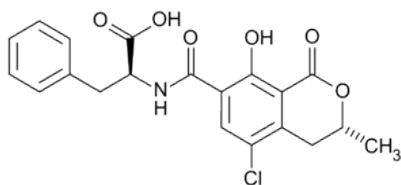
### 3. Toksynotwórcze grzyby strzępkowe

Występowanie grzybów strzępkowych w środowisku naturalnym, np. w glebie, wodzie i powietrzu jest zjawiskiem powszechnym. Duża zdolność przystosowawcza grzybów pleśniowych w stosunku do pobieranych składników odżywczych, warunków fizycznych i klimatycznych środowiska oraz zdolność do rozprzestrzeniania się, pozwalają im zasiedlać wciąż nowe habitaty, w tym otoczenie człowieka. Z sanitarnego punktu widzenia grzyby mikroskopowe zanieczyszczają środowisko bytowania człowieka, a swymi metabolitami (zwłaszcza toksynami, tzw. mykotoksynami) mogą zagrażać zdrowiu ludzi i zwierząt powodując trudne do zwalczenia infekcje i grzybice, a także psucie się żywności [22]. Są również patogenami roślin powodującymi straty w uzyskanych plonach i stają się coraz bardziej odporne na stosowane powszechnie fungicydy, co powoduje narastanie problemu skutecznej ochrony roślin [23].

Wzrost oporności toksynotwórczych grzybów strzępkowych na powszechnie stosowane fungicydy spowodował potrzebę poszukiwania nowych, naturalnych substancji zarówno przeciwgrzybowych, jak i przeciwtoksynotwórczych. Bioaktywne substancje pochodzenia roślinnego mogłyby stanowić skuteczną i bezpieczną alternatywę dla obecnie stosowanych chemicznych środków ochrony roślin i niektórych konserwantów żywności.

Grzyby z rodzaju *Aspergillus* są zdecydowanie najliczniej reprezentowane wśród dotychczas poznanych grzybów toksynotwórczych i jako tzw. grzyby przechowalnicze rozwijają się na płodach rolnych (ziarnach zbóż) i ogrodniczych (owocach, warzywach), przyczyniając się do ich psucia i skażenia mykotoksynami. Toksyny tych grzybów, takie jak np.: aflatoksyny, fumonizyny czy ochratoksyny, będące silnymi zootoksynami, wykazują inhibicyjny wpływ na przemianę materii roślin, np. hamują kiełkowanie nasion oraz wzrost siewek zarówno korzonków, jak i koleoptyli, co może być wykorzystane jako prosty i szybki test do oceny fitotoksyczności tych metabolitów. Z drugiej strony pleśnie wprowadzone do organizmu człowieka drogą pokarmową mogą wywoływać zarówno ciężkie infekcje płuc, jak również wykazywać działanie nowotworowe, cytotoksyczne i neurotoksyczne [24].

Ochratoksyna A (rys. 2), będąca jedną z najczęściej występujących mykotoksyn w produktach spożywczych, jest peptydem L-feniloalaniny połączonym wiązaniem peptydowym poprzez grupę aminową z pochodną kumaryny (kwasem izokumarynowym). Człowiek najczęściej naraża się na kontakt z tą toksyną, zjadając pokarm wyprodukowany z niewłaściwie magazynowanych produktów, takich jak zboża; nasiona soi, fasoli, ciecierzycy; ziarna surowej kawy, kakao; wino; sok z winogron; piwo; przyprawy i przetwory mięsne. Wysoką zawartością ochratoksyny A charakteryzują się również suszone owoce, np. rodzynki i porzeczki [25].



Rysunek 2. Wzór strukturalny ochratoksyny A. Źródło: [www.3]

## 4. Materiały i metody

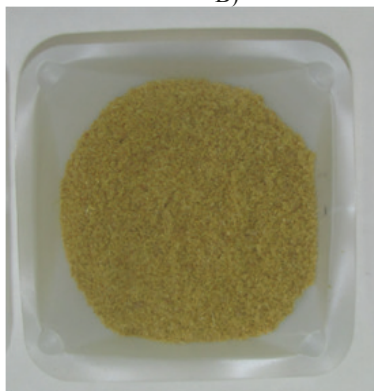
### 4.1. Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiły: przyprawa (Kotanyi) i wysuszone kłącze świeżego imbiru lekarskiego *Zingiber officinale* (kraj pochodzenia: Tajlandia) – rys. 3, a także wyizolowane z żywności toksynotwórcze grzyby strzępkowe z rodzaju *Aspergillus* (*A. ochraceus*).



A)

B)



C)



Rysunek 3. Świeże (A), wysuszone (B) kłącze i przyprawa (C) imbiru lekarskiego (*Zingiber officinale*). Źródło: [opracowanie własne]

## 4.2. Izolacja i identyfikacja toksynotwórczych grzybów strzępkowych

Izolacja badanych grzybów strzępkowych (*Aspergillus ochraceus*) była wykonana z nadpsutych produktów spożywczych (ziaren kawy) poprzez pobranie fragmentu grzybni, a kultury kilku wyizolowanych szczepów były prowadzone na podłożu agarowym Czapek-Dox z ekstraktem drożdżowym (CYA).

Wstępną identyfikację gatunkową wyizolowanych szczepów grzybów przeprowadzono po około 7 dniach zgodnie z wytycznymi International Commission of Penicillium and Aspergillus (ICPA) w oparciu o charakterystykę morfologiczną metodą makroskopową uwzględniając: kształt, wielkość, brzeg, powierzchnię, strukturę, zabarwienie grzybni powierzchniowej oraz metodą mikroskopową poprzez ocenę wyglądu konidioforów.

Kolejnym etapem była właściwa identyfikacja molekularna wstępnie wytypowanego szczepu jako *A. ochraceus*. Analizy molekularne obejmowały następujące etapy: izolację i oczyszczenie genomowego DNA ze świeżej grzybni hodowanej przez 7 dni w 20°C na podłożu CYA przy użyciu zestawu Extractme Genomic DNA Kit (EM13) oraz amplifikację polimorficznych regionów ITS (*internal transcribed spacer*), które charakteryzują się dużą zmiennością międzygatunkową. Do reakcji PCR były zastosowane specyficzne dla grzybów startery:

- ITS1f zawierający sekwencję komplementarną do odcinka genu 18S przy 3' końcu;
- ITS4 (rewersyjny) komplementarny do regionu 28S.

Wielkość uzyskanego amplikonu całego regionu ITS zawierającego fragment 5.8S (o wielkości ok. 700 pz), była określana przy użyciu elektroforezy w 1% żelu agarozowym z domieszką bromku etydyny. Uzyskane w ten sposób produkty zostały oczyszczone i poddane reakcji sekwencjonowania (przeprowadzenie reakcji sekwencjonowania oraz jej odczytów zostało zlecone firmie zewnętrznej Genomed).

## 4.3. Ekstrakcja roślinnego materiału badawczego

Próbki świeżego kłącza imbiru lekarskiego (*Z. officinale*) wysuszono w temperaturze 50°C, rozdrobniono w młynku laboratoryjnym (Bionovo) i wraz z badaną przyprawą ekstrahowano etanolem w aparatach Soxhleta przez 10 godzin. Otrzymane ekstrakty zatężono w wyparce wolnoobrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem (Heidolph).

## 4.4. Ocena aktywności przeciwtoksynotwórczej

Powierzchniową grzybnię dojrzałej (7-dniowej) hodowli grzybów wskaźnikowych (zidentyfikowaną jako *A. ochraceus*) zawieszono w jałowym 0,1% (v/v) roztworze Tween 80 w soli fizjologicznej i przefiltrowano przez sączek typu Whatman nr 1. Z tak przygotowanej zawiesiny z zarodnikami grzybów, które zostały policzone w komorze Bürkera i odpowiednio rozcieńczone, wykonano posiewy metodą zalewową (w ilości 105 zarodników/ml) na podłożu CYA. Następnie, do jałowo wydrążonych w podłożach studzienek, dodawano po 50 µl roztworu uzyskanych etanolowych ekstraktów z przyprawy i wysuszonego kłącza świeżego imbiru lekarskiego (przefiltrowanych przez sterylne filtry strzykawkowe PTFE 0,45 µm, 25 mm) w następujących stężeniach 0, 50, 100, 150, 200 mg/ml. Próby (w trzech równoległych powtórzeniach) były inkubowane w temperaturze 20°C przez 30 dni.

W celu zbadania aktywności przeciwtoksynotwórczej badanych ekstraktów, tak uzyskane hodowle grzybów (po 6 krążków o średnicy 0,5 cm wyciętych wraz

z podłożem), zostały rozdrobnione w homogenizatorze Pottera i ekstrahowane roztworem acetonitryl-woda (84:16 z 1% kwasem octowym, v/v) w łaźni ultradźwiękowej przez 30 min w temperaturze pokojowej. Uzyskane ekstrakty zostały wysuszone z wody bezwodnym siarczanem magnezu, przefiltrowane przez sączki typu Whatman nr 1 i odparowane do sucha w strumieniu azotu. Następnie zostały oczyszczone zgodnie z protokołem producenta z wykorzystaniem kolumnienek MycoSep 229 Ochra (Romer Labs) dedykowanych do oczyszczania ochratoksyny A.

Otrzymane frakcje zostały przefiltrowane przez filtry strzykawkowe PTFE (0,45 µm, 25 mm) i oznaczone techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Analizy prowadzono z wykorzystaniem chromatografu cieczowego LC-20AD (Shimadzu) z detektorem fluorescencyjnym RF-10AXL. Rozdział prowadzono na kolumnie C18 (Bionacom Velocity) o wymiarach 250 x 4.6 mm i średnicy cząstek 5 µm, w temp. 30°C. Fazę ruchomą stanowił następujący układ rozpuszczalników: acetonitril, woda i kwas octowy (57:41:2, v/v/v) w izokratycznym przepływie 0.5 mL/min. Detektor fluorescencyjny pracował przy długości fali wzbudzenia 330 nm i długości fali emisji 460 nm. Całkowity czas pojedynczej analizy wynosił 35 minut.

Ochratoksyna A była zidentyfikowana przez porównanie uzyskanych czasów retencji z wzorcem, natomiast analizy ilościowe były wykonane na podstawie krzywej kalibracyjnej.

## 5. Wyniki i wnioski

### 5.1. Analiza morfologiczna i molekularna

Wstępną identyfikację gatunkową przeprowadzono w oparciu o charakterystykę morfologiczną. Potencjalny szczep *A. ochraceus* w obrazie mikroskopowym wykazywał m.in. typowy dla gatunku promienisty układ żółto-pomarańczowych, nieco szorstkich i okrągłych zarodników. Główki konidioforów charakteryzowały się układem promienistym, ich trzonki kolorem jasnożółtym, a cienkościenne pęcherzyki były lekko przezroczyste. Natomiast ułożone dwurzędowo struktury zarodnikotwórcze pokrywały całą powierzchnię pęcherzyka.

Właściwa identyfikacja molekularna wytypowanego szczepu obejmowała następujące etapy: izolację i oczyszczenie genomowego DNA ze świeżych grzybni każdego z izolatów hodowanych przez 7 dni w 20°C na podłożu CYA oraz amplifikację polimorficznych regionów ITS. Do reakcji PCR zastosowano specyficzne dla grzybów startery: ITS1f zawierający sekwencję komplementarną do odcinka genu 18S przy 3' końcu (sekwencja: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTA) oraz ITS4 (rewersyjny) komplementarny do regionu 28S (sekwencja: TCCTCCGCTTATTGATATGC). Produkty amplifikacji o wielkości ok. 700 pz zostały oczyszczone i poddane reakcji sekwencjonowania. Uzyskane sekwencje porównano z sekwencjami znajdującymi się w bazie danych serwisu NCBI – National Center for Biotechnology Information [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>], przy pomocy narzędzia BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) celem identyfikacji gatunkowej badanego szczepu grzyba. Wynik analizy uznano za pozytywny, jeśli podobieństwo wprowadzonej do bazy sekwencji wynosiło > 99% wobec sekwencji zamieszczonych w bazie danych BLAST.

Na podstawie uzyskanych sekwencji ITS, wytypowany szczep zidentyfikowany wstępnie (morfologicznie) jako *A. ochraceus*, został ostatecznie zidentyfikowany jako ten gatunek.

## 5.2. Analiza wagowa uzyskanych ekstraktów

Ze świeżego kłącza imbiru o masie 150,40 g, otrzymano 11,51 g suchego materiału, który ekstrahowano etanolem w aparacie Soxhleta przez 10 godzin, wskutek czego otrzymano 1,49 g ekstraktu. Zatem porównując świeżą i uzyskaną suchą masę badanego materiału, kłącze imbiru cechuje się wysokim stopniem uwodnienia wynoszącym około 92%. Natomiast z 14,63 g przyprawy tej rośliny otrzymano 1,89 g ekstraktu etanolowego.

Podsumowując, z 1 g suchego imbiru (przyprawy lub wysuszonego, a potem sproszkowanego świeżego kłącza), otrzymano 0,13 g ekstraktu etanolowego (tab. 2).

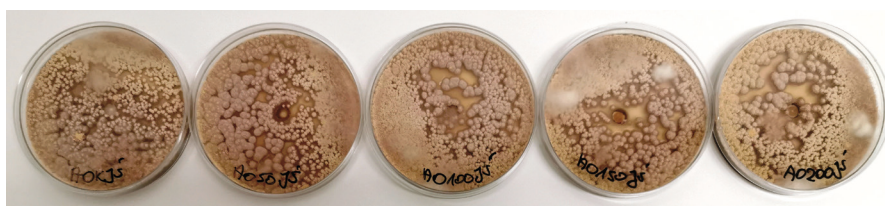
Tabela 2. Masy ekstraktów z wysuszonego świeżego kłącza oraz przyprawy imbiru lekarskiego (*Zingiber officinale*)

	kłącze	przyprawa
Świeża masa [g]	150,40	-
Sucha masa [g]	11,51	14,63
Masa uzyskanego ekstraktu [g]	1,49	1,89
Masa ekstraktu [g/g suchej masy]	0,13	0,13

## 5.3. Analiza aktywności przeciwtoksynotwórczej

Przeprowadzona ocena wpływu wybranych ekstraktów z kłącza imbiru lekarskiego na wytwarzanie mykotoksyn przez badany szczep *A. ochraceus* miała na celu określenie ich potencjału przeciwtoksynotwórczego.

Jedyną mykotoksyną zidentyfikowaną w badanym układzie eksperymentalnym – po 30-dniowej inkubacji w temperaturze 20°C (rys. 4), okazała się ochratoksyna A (rys. 2), wytwarzana we wszystkich zastosowanych stężeniach ekstraktów (0-200 mg/ml).



Rysunek 4. Kultura *A. ochraceus* w badanym układzie eksperymentalnym (po 30 dniach inkubacji w temperaturze 20°C na podłożu CYA z dodatkiem etanolowych ekstraktów z wysuszonego kłącza świeżego imbiru lekarskiego (*Zingiber officinale*))

W wyniku analizy metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) wykazano, że wzrastające stężenie zastosowanych ekstraktów było proporcjonalnie skorelowane z malejącym stężeniem tej mykotoksyny (tab. 3). Należy jednak zwrócić uwagę, że nieco silniejszy efekt hamujący zaobserwowano w przypadku ekstraktu z wysuszonego świeżego kłącza imbiru (tab. 3 – E) niż w przypadku przyprawy z tej rośliny (tab. 3 – D), gdyż stężenie ochratoksyny A między próbą kontrolną

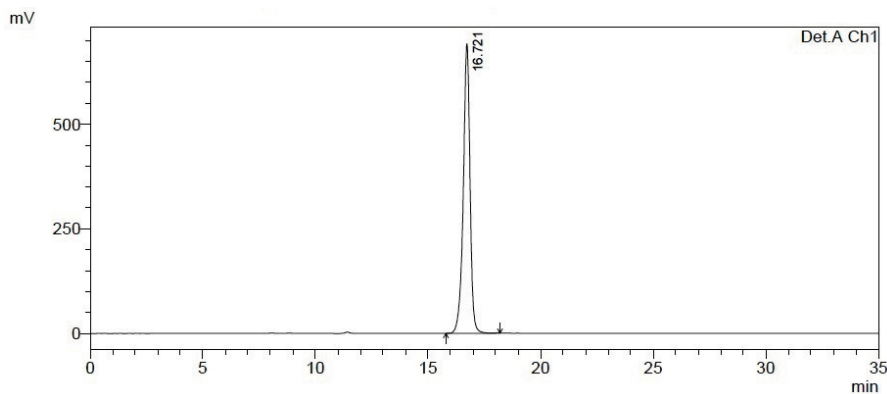
a najwyższymi zastosowanymi stężeniami ekstraktów w tych wariantach było odpowiednio 20,84 i 17,09 razy mniejsze.

Tabela 3. Wpływ wybranych ekstraktów z imbiru lekarskiego (*Zingiber officinale*) na wytwarzanie ochratoksyny A przez szczep *Aspergillus ochraceus* na podłożu CYA (wartości są średnimi z 3 równoległych powtórzeń  $\pm$  odchylenie standardowe)

stężenie ekstraktu z przyprawy (D) i wysuszonego kłącza świeżego imbiru (E) [mg/ml]	stężenie ochratoksyny A [ $\mu\text{g/ml}$ ekstraktu]	
	D	E
0	20,00 $\pm$ 0,94	10,42 $\pm$ 0,39
50	15,65 $\pm$ 0,75	7,79 $\pm$ 0,55
100	1,05 $\pm$ 0,04	2,09 $\pm$ 0,11
150	1,09 $\pm$ 0,07	1,70 $\pm$ 0,09
200	1,17 $\pm$ 0,10	0,50 $\pm$ 0,01

Tak więc wykazano, że obecność ekstraktu z imbiru (tak przyprawy, jak i wysuszonego, a potem sproszkowanego świeżego kłącza) znacząco hamuje produkcję ochratoksyny A przez szczep *A. ochraceus* po 30-dniowej inkubacji w temperaturze 20°C. Trzeba jednak zaznaczyć, że efekt ten zaobserwowano tylko na jednym badanym podłożu (CYA), a więc niezbędne są dalsze analizy, np. z wykorzystaniem innych podłoży mikrobiologicznych (agarze glukozowo-ziemniaczanym – PDA, czy agarze maltozowym – MEA) i/lub innych warunków doświadczalnych.

Przykładowy chromatogram (HPLC-DAD) wzorca ochratoksyny A przedstawiono na rysunku 5.



Rysunek 5. Chromatogram (HPLC-DAD) wzorca ochratoksyny A

## 6. Podsumowanie i wnioski

Obecnie problem występowania mykotoksyn, choć jeszcze nie do końca poznany, jest bardzo ważnym zagadnieniem dotyczącym głównie bezpieczeństwa żywności związanego z obecnością grzybów i ich toksycznych metabolitów, co skłania do poszukiwania nowych sposobów ograniczenia ich przedostawania się do łańcucha

żywnościowego. W obliczu zrównoważonego rozwoju rolnictwa i dbałości o ochronę środowiska coraz większe zainteresowanie budzą metody biologiczne, w tym wykorzystanie naturalnych substancji pochodzenia roślinnego jako czynników stanowiących element biokontroli patogenów w uprawach roślin, hamujących rozwój grzybów czy unieszkodliwiających mykotoksyny.

Wydaje się, że ekstrakty uzyskane z roślin mogą pełnić nie tylko szeroko zbadane funkcje obronne, ale także przeciwtoksynotwórcze. Uzyskane wstępne wyniki badań wskazują, że takie działanie wykazują badane ekstrakty z przyprawy i wysuszonego kłącza świeżego imbiru lekarskiego (*Zingiber officinale*), ale z pewnością na podstawie aktualnie prowadzonych badań z wykorzystaniem innych gatunków grzybów, nie jest to działanie uniwersalne i w dużym stopniu zależy od rodzaju grzybowego patogenu.

Tak więc, możliwość praktycznego zastosowania substancji bioaktywnych pochodzenia roślinnego wymaga jeszcze wielu badań, a zwłaszcza ustalenia szczegółowych zależności między aktywnością danych metabolitów charakteryzujących dany ekstrakt a konkretnym patogenem.

### Literatura:

1. Ali B.H., Blunden G., Tanira M.O., Nemmar A., *Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (Zingiber officinale Roscoe): a review of recent research*, Food and Chemical Toxicology, 46 (2), 2008, s. 409-420.
2. Wang W.H., Wang Z.M., *Studies of commonly used traditional medicine-ginger*, China Journal of Chinese Materia Medica, 30 (20), 2005, s. 1569-1573.
3. Ravindran P.N., Nirmal Babu K., Shiva K.N., *Botany and crop improvement of ginger*, Ginger: the genus Zingiber, 41, 2005, s. 15-85.
4. Shahrajabian M.H., Sun W., Cheng Q., *Clinical aspects and health benefits of ginger (Zingiber officinale) in both traditional Chinese medicine and modern industry*, Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science, 69 (6), 2019, s. 546-556.
5. Suhaj M., *Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review*, Journal of Food Composition and Analysis, 19 (6-7), 2006, s. 531-537.
6. Randhawa K.S., Nandpuri K.S., *Ginger (Zingiber officinale Rosc.) in India-a review*, Punjab Horticultural Journal, 10, 1970, s. 111-122.
7. Newerli-Guz J., Pych M., *Właściwości przeciwutleniające imbiru (Zingiber officinale Roscoe)*, Zeszyty Naukowe Akademii Morskiej w Gdyni, 73 (9), 2012, s. 28-33.
8. Melchior H., Kastner H., *Przyprawy. Badania botaniczne i chemiczne*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 1978.
9. Łażewska D., Miętkiewska K., Studzińska-Sroka E., *Imbir lekarski – roślina o właściwościach neuroochronnych*, Postępy Fitoterapii, 20 (4), 2019, s. 268-276.
10. Kulczyński B., Gramza-Michałowska A., *Znaczenie żywieniowe imbiru*, Bromatologia i Chemia Toksykologiczna XLIX – 1, 2016, s. 57-63.
11. Manasa D., Srinivas P., Sowbhagya H.B., *Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from ginger (Zingiber officinale Roscoe)*, Food Chemistry, 13(1-4), 2013, s. 509-514.
12. Bhowmik D., Tripathi K.K., Chandira M.R., Kumar K.P., *Zingiber officinale the herbal and traditional medicine and its therapeutically importance*, Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2 (2), 2010, s. 102-110.
13. Ying-Fang L.Z.K.H., *Chemical Constituents of the Essential Oil from Zingiber Officinale Rose of Sichuan [J]*, Chinese Journal of Organic Chemistry, 6, 1987.
14. Kumar Gupta S., Sharma A., *Medicinal properties of Zingiber officinale Roscoe – a review*, Journal of Pharmacy and Biological Sciences, 9, 2014, s. 124-129.
15. Banerjee S., Mullick H.I., Banerje, J., Ghosh A., *Zingiber officinale: 'a natural gold'*, International Journal of Pharma and Bio Sciences, 2, 2011, s. 283-94.



16. Stewart J.J., Wood M.J., Wood C.D., Mims M.E., *Effects of ginger on motion sickness susceptibility and gastric function*, Pharmacology, 42 (2), 1991, s. 111-120.
17. Mowrey D., Clayson D., *Motion sickness, ginger, and psychophysics*, The Lancet, 319 (8273), 1982, s. 655-657.
18. Sasidharan I., Menon A.N., *Comparative chemical composition and antimicrobial activity fresh & dry ginger oils (Zingiber officinale Roscoe)*, International Journal of Current Pharmaceutical Research, 2 (4), 2010, s. 40-43.
19. Wohlmuth H., Leach D.N., Smith M.K., Myers S.P., *Gingerol content of diploid and tetraploid clones of ginger (Zingiber officinale Roscoe)*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (14), 2005, s. 5772-5778.
20. Connell D.W., Sutherland M.D., *A re-examination of gingerol, shogaol, and zingerone, the pungent principles of ginger (Zingiber officinale Roscoe)*, Australian Journal of Chemistry, 22 (5), 1969, s. 1033-1043.
21. Imtiyaz S., Rahman K., Sultana A., Tariq M., Chaudhary S.S., *Zingiber officinale Rosc.: a traditional herb with medicinal properties*, TANG, 3 (4), 2013, e26.
22. Chróst A., *Grzyby pleśniowe w środowisku człowieka – zagrożenie i skutki zdrowotne*, Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia, 68, 2016, s. 135-150.
23. Pieczul K. *Przyczyny odporności na fungicydy grzybów patogenicznych dla roślin*, [w:] Rastawicki W. (red.). Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Poznań 2015, s. 135-150.
24. Desjardins A.E., Hohn T.M., *Mycotoxins in Plant Pathogenesis*, Molecular Plant-Microbe Interactions, 10, 1997, s. 147-152.
25. Iqbal S.Z., Mehmood Z., Asi M.R., Shahid M., Sehar M., Malik N., *Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in nuts, dry fruits, and nuty products*, Journal of Food Safety, 38 (4), 2018, e12462.

## Netografia:

[www.1]: <https://www.theplantlist.org>

[www.2]: <https://www.plants.sc.egov.usda.gov>

[www.3]: <https://www.wikipedia.org>

## Aktywność przeciwtoksynotwórcza wybranych ekstraktów z kłącza imbiru lekarskiego (*Zingiber officinale* Rosc.)

### Streszczenie

Imbir lekarski (*Zingiber officinale* Rosc.) to wieloletnia roślina należąca do rodziny imbirowatych (*Zingiberaceae* Lindl.).

Celem pracy było zbadanie wpływu wybranych ekstraktów z przyprawy i wysuszonego kłącza świeżego imbiru lekarskiego (*Zingiber officinale* Rosc.) na produkcję ochratoksyny A analizowanej metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

Wykazano, że obecność badanych ekstraktów z imbiru znacząco hamuje produkcję ochratoksyny A przez szczep *A. ochraceus* po 30-dniowej inkubacji w temperaturze 20°C. Możliwość praktycznego zastosowania substancji bioaktywnych pochodzenia roślinnego wymaga jeszcze wielu badań, a zwłaszcza ustalenia szczegółowych zależności między aktywnością danych metabolitów występujących w ekstraktach roślinnych a konkretnym patogenem.

Słowa kluczowe: imbir lekarski, *A. ochraceus*, ochratoksyna A, HPLC

## **Anti-toxinogenic activity of selected ginger rhizome extracts (*Zingiber officinale* Rosc.)**

### Abstract

Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) is a perennial plant belonging to the *Zingiberaceae* family.

The aim of the study was to investigate the effect of selected extracts from spice and dried rhizome of fresh ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) on the production of ochratoxin A analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC).

It was shown that the presence of tested ginger extracts significantly inhibits the production of ochratoxin A by *A. ochraceus* strain after a 30-day incubation at 20°C.

The practical applicability of bioactive substances of plant origin still requires a number of studies, in particular the establishment of detailed relationships between the activity of the relevant metabolites present in plant extracts and the specific pathogen.

Keywords: ginger, *A. ochraceus*, ochratoxin A, HPLC

## Rola chitozanu w stymulacji naturalnych mechanizmów obrony roślin

### 1. Wstęp

Rośliny zaatakowane przez patogeny wykazują wiele strategii obronnych, w które zaangażowane są zarówno mechanizmy odpowiedzi konstytutywnej jak i indukowanej. Indukowalne odpowiedzi obronne są wyzwalane po rozpoznaniu szeregu czynników chemicznych zwanych „elicytorami” [1]. Pierwotnie termin „elicytor” był używany dla cząsteczek zdolnych do indukowania produkcji fitoaleksyn, ale obecnie jest powszechnie stosowany do określenia związków stymulujących dowolny rodzaj obrony roślin. Białka, oligosacharydy, glikoproteiny, kwasy tłuszczowe i ich pochodne oraz składniki wewnątrzkomórkowego systemu transdukcji sygnału u roślin to tylko niektóre przykłady elicytorów [2, 3]. Ogólna klasyfikacja elicytorów roślinnych została przedstawiona w tabeli 1 [1]

Przykładami mechanizmów obronnych roślin indukowanych przez elicytory są m.in.: synteza i akumulacja fitoaleksyn, indukcja śmierci komórek (martwica nadwrażliwa, ang. *hypersensitive necrosis*), produkcja glikozylohydrolaz zdolnych do unieszkodliwiania powierzchniowych polimerów patogenów, synteza inhibitorów enzymów litycznych wytwarzanych przez patogeny, produkcja aktywnych form tlenu prowadzących do „wybuchu oksydacyjnego” (ang. *oxidative burst*) oraz modyfikacje ścian komórek roślinnych, w tym odkładanie kalozy, glikoprotein bogatych w hydroksyprolinę i/lub ligniny [3]. Stymulujący wpływ elicytorów na biosyntezę fitoaleksyn wykorzystuje się w biotechnologii do produkcji biologicznie czynnych metabolitów wtórnych, np. o wysokiej wartości terapeutycznej. Elicytory są również wykorzystywane jako narzędzia badawcze do lepszego zrozumienia elementów złożonych ścieżek i interakcji sygnalizacyjnych w metabolizmie wtórnym roślin [1].

---

<sup>1</sup> a.rogowska@biol.uw.edu.pl, Zakład Biochemii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, <http://zbr.uw.edu.pl>.

Tabela 1. Klasyfikacja elicytorów roślinnych

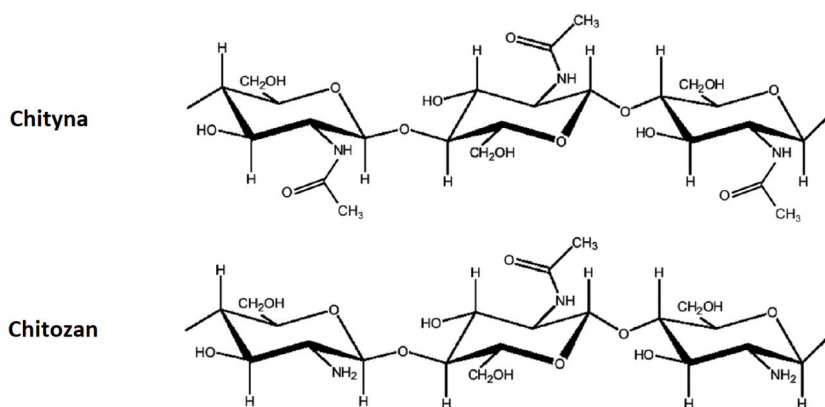
Elicytory						
Elicytory fizyczne	Uszkodzenie					
Elicytory chemiczne	Abiotyczne		Jony metali (kadm, srebro, wapń), szczawiany			
	Biotyczne	Złożony skład	Ściana komórkowa drożdży, ściana komórkowa grzybni, spory grzybów			
		Zdefiniowany skład	Węglowodory	Polisacharydy	Pektyny Chitozan Alginian	
				Oligosacharydy	Mannan Mannuronian Galakturonidy	
			Peptydy	Glutation		
			Białka	Proteiny	Oligandryna Celulaza Elicytyny	
			Lipidy		Lipopolisacharydy	
			Glikoproteiny		Nie scharakteryzowano	
Związki lotne		C <sub>6</sub> -C <sub>10</sub>				

Źródło: [1]

Zastosowanie elicytorów w celu indukowania odporności wykorzystującej naturalne mechanizmy obronne znajduje zastosowanie w przyjaznej dla środowiska integrowanej ochronie roślin. Wprowadzenie elicytorów do praktyki rolniczej umożliwi zminimalizowanie stosowania chemicznych środków ochrony roślin, przyczyniając się tym samym do rozwoju zrównoważonego rolnictwa [4]. Od wielu lat aplikacja pestycydów oraz chemicznych fungicydów jest głównym sposobem kontroli patogenów roślin uprawnych oraz zwiększania plonów. Zaletą pestycydów jest łatwość aplikacji, relatywnie niski koszt oraz szerokie spektrum działania. Stosowanie chemicznych środków ochrony roślin ma jednak wiele wad, są to m.in. toksyczność, długi czas degradacji, zdolność do bioakumulacji oraz niespecyficzne działanie (oprócz samych szkodników, pestycydy mogą eliminować inne organizmy, w tym naturalnych wrogów szkodników). Alternatywą dla chemicznych środków ochrony roślin są związki naturalne, bezpieczne dla środowiska i człowieka. Związki te stymulują odporność u roślin poprzez uruchomienie reakcji obronnych o zasięgu lokalnym lub systemowym, tym samym zmniejszając ich podatność na patogeny. Jednym z takich związków jest chitozan, deacetylowana pochodna chityny [5, 6]. Chityna i chitozan są strukturalnymi składnikami ściany komórkowej grzybów. Pierwotnie nieoczekiwane było, że oligomery tych polimerów mogą wywoływać reakcje obronne i regulować inne procesy roślinne, takie jak wzrost [7]. Badania wykazały jednak, że chitozan wykazuje szerokie spektrum działania przeciwbakteryjnego wśród fitopatogenów oraz indukuje wiele odpowiedzi biologicznych w roślinach [5].

## 2. Charakterystyka i otrzymywanie chitozanu

Chitozan [ $\beta$ -(1,4)-D-glukozamina] jest liniowym polisacharydem otrzymanym przez deacetylację chityny [ $\beta$ -(1,4)-N-acetylo-D-glukozaminy] (rys. 1). Chityna, będąca długołańcuchowym polimerem, jest drugim po celulozie najbardziej rozpowszechnionym w naturze polimerem, obecnym m.in. w ścianach komórkowych grzybów oraz w egzoszkieletach skorupiaków [5, 7, 8]. Właściwości chemiczne chitozanu i chityny różnią się od siebie głównie tym, że w chitozanie eksponowane są grupy aminowe, które mogą wiązać dodatnio naładowane cząsteczki białek. W konsekwencji, chitozan wykazuje duże powinowactwo do polikationowych białek, takich, jak protamina, histony i syntetyczne polimery ornityny, argininy i lizyny. Zarówno chityna jak i chitozan są nierozpuszczalne w wodzie, dopóki nie zostaną rozbite na oligomery zbudowane z  $\leq 7$  reszt cukrowych lub będące na 7 stopniu polimeryzacji (dp). Dłuższe polimery chitozanu są rozpuszczalne w roztworach wodnych o pH < 7 oraz w rozcieńczonych kwasach organicznych, np. mlekowym i octowym [7].



Rysunek 1. Wzory strukturalne chityny i chitozanu. Źródło: [5]

Pozyskiwanie chityny z pancerzyków wodnych skorupiaków (np. krewetek) jest bardzo tanie, ponieważ pancerzyki te stanowią odpady w procesie przetwarzania owoców morza. W produkcji przemysłowej chitozanu, stałą chitynę poddaje się namaczaniu w 40-50% (w/v) NaOH. Proces ten pozwala usunąć ponad 80% reszt acetylowych i powoduje przekształcenie N-acetylo-D-glukozaminy do  $\beta$ -(1,4)-D-glukozaminy. Aby całkowicie pozbyć się reszt acetylowych, proces alkalizacji należy powtórzyć. Określenie „chitozan” nie należy więc do konkretnego związku, lecz do grupy polimerów różniących się stopniem deacetylacji, masą cząsteczkową, stopniem polimeryzacji i stałą dysocjacji pKa. Zróżnicowanie w rozpuszczalności i lepkości wpływa na właściwości biologiczne chitozanu oraz efekt jaki wywołuje w roślinach i patogenach roślin [5].

### 3. Rozpoznawanie chitozanu i indukcja odpowiedzi

Polimery chityny i ich zmodyfikowana postać, chitozan, indukują odpowiedzi obronne gospodarza zarówno u roślin jednoliściennych, jak i dwuliściennych. Reakcja roślin na chitynę, chitozan i pochodne oligosacharydy nie jest jednakowa, ponieważ zależy od stopnia acetylacji i polimeryzacji tych związków. Wydzielane przez rośliny enzymy chitynolityczne hydrolizują ścianę komórkową grzybów, co powoduje utratę integralności komórek oraz uwalnianie małych fragmentów chityny. Chitoooligosacharydy (fragmenty chityny) w niezmodyfikowanej formie o stopniu polimeryzacji od 6 do 8 są silnymi induktorami, które skutecznie indukują pierwszy etap obrony roślin – odporność MTI (ang. *MAMP-triggered immunity*) [8]. Rośliny w odpowiedzi na atak patogenów aktywują mechanizmy na wielu płaszczyznach, od poziomu komórkowego po ścieżki sygnałowe powodujące zmiany w całym organizmie.

U roślin indukowanie odpowiedzi na atak patogenów grzybowych jest możliwe dzięki rozpoznaniu konserwowanych wzorców molekularnych charakterystycznych dla mikroorganizmów (ang. *microbe-associated molecular patterns*, MAMPs), a następnie aktywowaniu odporności MTI [8, 9]. Receptorami dla MAMPs są białka PRRs (ang. *pattern recognition receptors*), które odgrywają kluczową rolę w indukowaniu odporności wrodzonej roślin. Chitoooligosacharydy są reprezentacyjnymi wzorcami MAMPs grzybów [10]. Receptory elicytorów chitynowych (EC) zidentyfikowano w wielu roślinach uprawnych (kukurydza, jęczmień, sorgo), lecz najlepiej opisane zostały w rzodkiewniku oraz ryżu [6]. AtCERK1 (ang. *Arabidopsis thaliana chitin elicitor receptor kinase 1*) jest receptorem EC u *Arabidopsis* zlokalizowanym w błonie komórkowej. Ta receptorowa kinaza białkowa posiada trzy motywy lizynowe (LysM) w regionie pozakomórkowym oraz domenę serynowo-treoninową w regionie wewnątrzkomórkowym. Mutanty typu knock-out genu CERK1 całkowicie tracą zdolność do odpowiedzi na EC, co sugeruje kluczową rolę tego białka w indukowaniu odpowiedzi obronnej u *Arabidopsis* [11]. AtCERK1 wiąże się z EC poprzez drugi motyw LysM [12]. Oprócz AtCERK1, w *Arabidopsis* zidentyfikowano również inne białka należące do rodziny kinaz receptorowych z motywem lizynowym. Są to RLK1/AtLYK1 oraz AtLYK2-5 [13]. Mutacje w genie kodującym AtLYK4 spowodowały znaczący spadek odpowiedzi obronnej na obecność chityny u roślin, choć fenotyp nie był tak wyraźny jak u mutantów AtCERK1 [14]. Mutacje w genie kodującym AtLYK5 również powodowały znaczący spadek odpowiedzi na obecność chityny, przy czym białko to wiązało chitozan z dużo większym powinowactwem niż AtCERK1. AtLYK5 jest również niezbędne do homodimeryzacji i fosforylacji AtCERK1 indukowanej obecnością chitozanu, co sugeruje, że to AtLYK5 jest głównym receptorem EC u *Arabidopsis*, a tworzenie kompleksów z AtCERK1 w obecności chitozanu indukuje mechanizmy odporności wrodzonej roślin [13].

Receptory EC ryżu należą do dwóch grup białek występujących w błonie plazmatycznej, OsCERK1 (ang. *Oryza sativa chitin elicitor receptor kinase 1*) i CEBiP (ang. *chitin elicitor binding protein*). OsCERK1 jest homologiem AtCERK1, jednak udowodniono, że nie bierze udziału w wiązaniu EC [15]. Mutacja typu knock-down w genie OsCERK1 skutkowałą znaczącym słumieniem odpowiedzi obronnej w ryżu wywołanej EC, co wskazuje na to, że białko to jest niezbędne do prawidłowej

transdukcji sygnału z udziałem EC [16]. CEBiP, pierwszy zidentyfikowany receptor EC, który wiąże się z nim bezpośrednio jest glikoproteiną zlokalizowaną w błonie plazmatycznej, zawierającą 2 motywy LysM [10]. CEBiP nie posiada regionu wewnątrzkomórkowego i wiąże się z OsCERK1 w obecności EC. To może sugerować, że komórki ryżu rozpoznają EC przez kompleks receptorów, w którym CEBiP wiąże EC, a OsCERK1 fosforyluje białko (lub białka) docelowe, aby wywołać kolejne etapy reakcji obronnej [16]. Genom ryżu koduje kilka białek podobnych do CEBiP, w tym LYP4 i LYP6, które wiążą chitozan i peptydoglikan i biorą udział w indukcji odpowiedzi obronnej. LYP4 i LYP6 podobnie jak CEBiP są białkami błonowymi oraz posiadają motywy LysM [17]. Nie wiadomo jednak, jakie są wzajemne oddziaływania między tymi białkami [10].

#### 4. Odpowiedź na poziomie komórkowym

Chitozan wywołuje w roślinach wiele zmian na poziomie komórkowym. Do tej pory odnotowano m.in.: uszkodzenia DNA, modyfikacje chromatyny, wzrost stężenia cytozolowego  $Ca^{2+}$ , aktywację kinaz MAP, wybuch oksydacyjny, odkładanie kalozy, wzrost ilości mRNA pochodzących od genów związanych z patogenezą (ang. *pathogenesis-related genes*, PR genes), syntezę białek PR, akumulację fitoaleksyn, odpowiedź nadwrażliwości (ang. *hypersensitive response*), oraz w niektórych przypadkach syntezę kwasów jasmonowego i abscysynowego i akumulację nadtlenu wodoru [7, 9, 18-24].

Wykorzystując jako model badawczy groch, porównano odpowiedź obronną wywołaną patogenem grochu *Fusarium solani* f.sp. *pisi* i fasoli *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* oraz chitozanem. Okazało się, że chitozan wywołuje podobną odpowiedź obronną u grochu jak patogeny grzybowe. Zaobserwowano m.in. zwiększoną ekspresję genów PR, wzmożoną aktywność enzymów zaangażowanych w metabolizm wtórny roślin oraz akumulację pisatyny (fitoaleksyny występującej w grochu). Fitoaleksyny są związkami należącymi do grupy izoflawonoidów o właściwościach przeciwgrzybiczych, które są wytwarzane przez rośliny w odpowiedzi na obecność patogenu [19]. Innymi genami, których ekspresja wzrasta w odpowiedzi obronnej roślin, są geny kodujące enzymy:  $\beta$ -glukanazę i chitynazę [7]. Geny specyficzne w obronie roślin to również m.in.: DRR49, DRR 230 i DRR 206 kodujące, odpowiednio, RNazę, defensynę oraz enzymy szlaku biosyntezy ligniny, a także geny kodujące  $\beta$ -glukanazę i chitynazę. Wszystkie wymienione powyżej geny były indukowane przez chitozan lub patogen fasoli *F. solani* f.sp. *phaseoli* podczas rozwoju odporności na infekcję u grochu [19].

Analizy przeprowadzone przez Ha i wsp. dotyczące wpływu dwóch patogenów grzybowych, *Fusarium graminearum* oraz *Magnaporthe* sp. na poziom ekspresji genów pszenicy wykazały, że siedem genów było silniej regulowanych przez *Fusarium*. Poziom ekspresji genów kodujących chitynazę (Chi2),  $\beta$ -1,3-glukanazę (PR2), roślinny homolog defensyny (PRPI) oraz peroksydazę (Pox2) był wysoki u roślin narażonych na atak obu typów patogenów, niezależnie od tego, czy testowana odmiana pszenicy była wrażliwa czy odporna na patogen. Poziom ekspresji Chi2 był wyższy u wrażliwej odmiany pszenicy w porównaniu do roślin o fenotypie niewrażliwym. Podwyższony poziom ekspresji genu kodującego chitynazę jest związany z rozprzestrzenianiem grzyba w osadkach kłosa i odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi obronnej pszenicy [25].

Odpowiednia koordynacja sygnałów molekularnych, w szczególności wzrost stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$ , odpowiada za rozpoczęcie reakcji nadwrażliwości, czyli szybkiej i programowanej śmierci komórek zainfekowanych przez patogen oraz z nimi sąsiadujących. Reakcja nadwrażliwości może przebiegać w pojedynczej komórce lub dotyczyć większego obszaru zainfekowanej tkanki [26]. Zuppini i wsp. przeprowadzili badania dotyczące programowanej śmierci komórek zaindukowanej chitozanem w kulturach zawiesinowych soi. Niskie stężenie chitozanu ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) powodowało wzrost stężenia cytoplazmatycznego  $\text{Ca}^{2+}$ , akumulację  $\text{H}_2\text{O}_2$  w medium hodowlanym, indukcję ekspresji genu kodującego syntazę chalkonu (enzymu zaangażowanego w produkcję związków obronnych) oraz śmierć komórek. Indukowana chitozanem śmierć komórek następowała w wyniku kurczenia się cytoplazmy, kondensacji chromatyny oraz aktywacji proteazy podobnej do kaspazy 3 [20]. Kondensację chromatyny zaobserwowano również podczas indukowanej chitozanem śmierci komórek epidermy liści grochu. Nastęstwem tego zjawiska była destrukcja jąder komórek epidermalnych oraz fragmentacja wewnątrzjądrowego DNA [27].

Elicytacja chitozanem może również indukować ścieżki sygnałowe związane z hormonami roślinnymi, takimi jak etylen, kwas jasmonowy, salicylowy czy abscysynowy. Analiza różnic ekspresji genów przy użyciu mikromacierzy cDNA wykazała, że wrodzona odporność u *Brassica napus* po elicytacji chitozanem była regulowana przez ścieżkę sygnalizacyjną etylenu/kwasu jasmonowego [28]. Wykazano, że kwas abscysynowy reguluje szybkość i ilość odkładania kalozy podczas ataku patogenu [29]. Elicytacja chitozanem fasoli zwykłej (łac. *Phaseolus vulgaris* L) powodowała wzrost syntezy kwasu abscysynowego oraz odkładania kalozy. Dodanie inhibitora kwasu abscysynowego, NDGA (ang. *nordihydroguaiaretic acid*) razem z chitozanem, powodowało spowolnienie odkładania kalozy oraz spadek odporności na roślinny patogen wirusowy [30].

## 5. Zastosowanie w rolnictwie

Chitozan znajduje wiele zastosowań w rolnictwie oraz w towarzyszących gałęziach przemysłu. Może być stosowany jako czynnik kondycjonujący glebę, regulator rozwoju roślin, powłoka chroniąca owoce i warzywa przed wysychaniem oraz jako warstwa ochronna dla nasion [29]. Chitozan dzięki swoim właściwościom zwiększa wrodzoną odporność u roślin, co sprawia, że są mniej podatne na atak patogenów, szczególnie grzybów. Poprawia również kiełkowanie nasion oraz zwiększa tolerancję roślin na stres wywołany suszą [31].

Obecnie chemiczne fungicydy są najczęściej stosowane do ochrony roślin przed patogennymi grzybami, jednak są szkodliwe dla zdrowia ludzi oraz środowiska, a ich częste stosowanie może prowadzić do wytworzenia odporności przez patogeny. Chitozan, ze względu na swoje właściwości przeciugrzybicze, przeciwbakteryjne oraz przeciwwirusowe, jest obiecującą alternatywą dla chemicznych środków ochrony roślin [29]. Aplikacja chitozanu pozwoliła zahamować rozwój patogennych grzybów, *Physalospora piricola* oraz *Alternaria kikuchiana* na gruszkach [32]. Podobnie, chitozan stłumił rozwój szarej pleśni winorośli wywołanej przez *Botrytis cinerea* i gnicie kiści winogron odmian Chardonnay i Sauvignon blanc [33]. Fungistatyczne działanie chitozanu zaobserwowano również w przypadku takich patogenów jak *Rhizoctonia solani* w ryżu [34] oraz *Fusarium oxysporum*, patogenu atakującego



wspięę wężowatą, roślinę z rodziny bobowatych [35]. Zastosowanie chitozanu jako powłoki ochronnej nasion kukurydzy spowodowało wytworzenie mechanizmów obronnych siewek przeciwko patogenom grzybowym, *Aspergillus flavus* i *Fusarium moniliforme* w warunkach stresu abiotycznego. Nasiona traktowane chitozanem wykazywały po wykiełkowaniu odporność na oba patogeny [36].

Kapsułkowanie związków chemicznych w cząsteczkach o powolnym uwalnianiu może być bardzo cenne dla rozwoju zrównoważonego rolnictwa i zapewnienia bezpieczeństwa żywności. Wykazano, że chitozan może być wykorzystywany do produkcji nanocząstek zdolnych do efektywnego zaopatrzenia roślin w związki chemiczne i składniki odżywcze [21]. Chitozan oraz jego pochodne są także proponowane jako inteligentne systemy dostarczania pestycydów, których warunkiem skutecznego działania jest precyzyjna aplikacja oraz duża wydajność preparatu. Przeprowadzone kapsułkowanie syntetycznych pestycydów takich jak imidaklopyryd, lambda-cyhalotryna, acetamipryd czy beauverycyna oraz biopestycydów, takich jak harpinaPss w nanocząstkach chitozanu wykazywało wysoką skuteczność i precyzję działania, co więcej, kapsułkowany biopestycyd cechował się lepszą wchłaniałością i biodostępnością w porównaniu z niekapsułkowanym [37-40]. Nanocząstki chitozanu są również skuteczne w przypadku kapsułkowania herbicydów [29].

Badania udowodniły również ochronne działanie chitozanu przeciwko patogenom roślinnym innym niż bakterie, grzyby czy wirusy. Nalistna aplikacja chitozanu oraz dodanie chityny do gleby skutecznie zredukowały ilość osobników nicienia korzeniowego *Meloidogyne javanica* żerującego na pomidorach i tym samym pozytywnie wpłynęły na rozwój roślin [41]. Podobnie, nalistna aplikacja chitozanu na grusze drastycznie obniżyła liczbę nimf pasożytniczych pluskwiaków *Cacopsylla pyricola* [42].

## 6. Podsumowanie

Chitozan, pochodna chityny, jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych w naturze polimerów. Związek ten może wywoływać odpowiedź obronną u roślin na drodze różnych ścieżek sygnałowych, wykorzystując aktywację przekaźników drugorzędowych. Konieczność poszukiwań alternatywnych, przyjaznych dla środowiska technologii dostarczania związków aktywnych roślinom uprawnym sprawia, że liczba jego zastosowań zarówno w przemyśle jak i rolnictwie wciąż rośnie. Po aplikacji chitozanu rośliny mogą uzyskać zwiększoną tolerancję na wiele różnorodnych patogennych mikroorganizmów oraz niesprzyjające warunki klimatyczne. Nanocząstki chitozanu w których kapsułkowane są m.in. pestycydy, nawozy czy mikroskładniki odżywcze, charakteryzują się powolnym i kontrolowanym uwalnianiem zawartości. Zastosowanie nośników na bazie chitozanu może skutkować zmniejszeniem wymaganej dawki nawozów i pestycydów oraz częstości ich stosowania. Chitozan jest więc obiecującym elicytorem w strategii zwalczania chorób roślin lub zabezpieczania roślin przed patogenami.

**Literatura:**

1. Angelova Z., Georgiev S., Roos W., *Elicitation of plants*, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 20(2), 2006, s. 72-83.
2. Eder J., Cosio E.G., *Elicitors of plant defense responses*, [In] Kwang W. Jeon, Jonathan Jarvik [Eds] International Review of Cytology (Vol. 148, pp. 1-36), Academic Press, 1994.
3. Hahn M.G., *Microbial elicitors and their receptors in plants*, Annual Review of Phytopathology, 34(1), 1996, s. 387-412.
4. Mishra A.K., Sharma K., Misra R.S., *Elicitor recognition, signal transduction and induced resistance in plants*, Journal of Plant Interactions, 7(2), 2012, s. 95-120.
5. Orzali L., Corsi B., Forni C., Riccioni L., *Chitosan in agriculture: a new challenge for managing plant disease*, Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides, 2017, s. 17-36.
6. Das S.N., Madhuprakash J., Sarma P., Purushotham P., Suma K., Manjeet K., Podile A.R., *Biotechnological approaches for field applications of chitooligosaccharides (COS) to induce innate immunity in plants*, Critical Reviews in Biotechnology, 35(1), 2015, s. 29-43.
7. Hadwiger L.A., *Multiple effects of chitosan on plant systems: solid science or hype*, Plant Science, 208, 2013, s. 42-49.
8. Pusztahelyi T., *Chitin and chitin-related compounds in plant-fungal interactions*, Mycology, 9(3), 2018, s. 189-201.
9. Iriti M., Faoro F., *Chitosan as a MAMP, searching for a PRR*, Plant Signaling & Behavior, 4(1), 2009, s. 66-68.
10. Kouzai Y., Nakajima K., Hayafune M., Ozawa K., Kaku H., Shibuya N., Nishizawa Y., *CEBiP is the major chitin oligomer-binding protein in rice and plays a main role in the perception of chitin oligomers*, Plant Molecular Biology, 84(4-5), 2014, s. 519-528.
11. Miya A., Albert P., Shinya T., Desaki Y., Ichimura K., Shirasu K., Shibuya N., *CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(49), 2007, s. 19613-19618.
12. Liu T., Liu Z., Song C., Hu Y., Han Z., She J., Zhou J.M., *Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor*, Science, 336(6085), 2012, s. 1160-1164.
13. Cao Y., Liang Y., Tanaka K., Nguyen C.T., Jedrzejczak R.P., Joachimiak A., Stacey G., *The kinase LYK5 is a major chitin receptor in Arabidopsis and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1*, eLife, 3, 2014, e03766.
14. Wan J., Tanaka K., Zhang X.C., Son G.H., Brechenmacher L., Nguyen T.H.N., Stacey G., *LYK4, a lysin motif receptor-like kinase, is important for chitin signaling and plant innate immunity in Arabidopsis*, Plant Physiology, 160(1), 2012, s. 396-406.
15. Shinya T., Motoyama N., Ikeda A., Wada M., Kamiya K., Hayafune M., Shibuya N., *Functional characterization of CEBiP and CERK1 homologs in Arabidopsis and rice reveals the presence of different chitin receptor systems in plants*, Plant and Cell Physiology, 53(10), 2012, s. 1696-1706.
16. Shimizu T., Nakano T., Takamizawa D., Desaki Y., Ishii-Minami N., Nishizawa Y., Shibuya N., *Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice*, The Plant Journal, 64(2), 2010, s. 204-214.
17. Liu B., Li J.F., Ao Y., Qu J., Li Z., Su J., He Y., *Lysin motif-containing proteins LYP4 and LYP6 play dual roles in peptidoglycan and chitin perception in rice innate immunity*, The Plant Cell, 24(8), 2012, s. 3406-3419.
18. Hartney S., Carson J., Hadwiger L.A., *The use of chemical genomics to detect functional systems affecting the non-host disease resistance of pea to Fusarium solani f. sp. phaseoli*, Plant Science, 172(1), 2007, s. 45-56.
19. Hadwiger L.A., *Pea-Fusarium solani interactions contributions of a system toward understanding disease resistance*, Phytopathology, 98(4), 2008, s. 372-379.
20. Zuppini A., Baldan B., Millionini R., Favaron F., Navazio L., Mariani P. *Chitosan induces Ca<sup>2+</sup>-mediated programmed cell death in soybean cells*, New Phytologist, 161(2), 2004, s. 557-568.

21. Malerba M., Cerana R., *Chitosan effects on plant systems*, International Journal of Molecular Sciences, 17(7), 2016, s. 996.
22. Yin H., Zhao X., Bai X., Du Y., *Molecular cloning and characterization of a Brassica napus L. MAP kinase involved in oligochitosan-induced defense signaling*, Plant Molecular Biology Reporter, 28(2), 2010, s. 292-301.
23. Paulert R., Ebbinghaus D., Urlass C., Moerschbacher B.M., *Priming of the oxidative burst in rice and wheat cell cultures by ulvan, a polysaccharide from green macroalgae, and enhanced resistance against powdery mildew in wheat and barley plants*, Plant Pathology, 59(4), 2010, s. 634-642.
24. Lin W., Hu X., Zhang W., Rogers W.J., Cai W., *Hydrogen peroxide mediates defence responses induced by chitosans of different molecular weights in rice*, Journal of Plant Physiology, 162(8), 2005, s. 937-944.
25. Ha X., Koopmann B., von Tiedemann A., *Wheat blast and Fusarium head blight display contrasting interaction patterns on ears of wheat genotypes differing in resistance*, Phytopathology, 106(3), 2016, s. 270-281.
26. Iriti M., Varoni E.M., *Chitosan-induced antiviral activity and innate immunity in plants*, Environmental Science and Pollution Research, 22(4), 2015, s. 2935-2944.
27. Vasil'ev L.A., Dzyubinskaya E.V., Zinovkin R.A., Kiselevsky D.B., Lobysheva N.V., Samuilov V.D., *Chitosan-induced programmed cell death in plants*, Biochemistry (Moscow), 74(9), 2009, s. 1035-1043.
28. Yin H., Li S., Zhao X., Du Y., Ma X., *cDNA microarray analysis of gene expression in Brassica napus treated with oligochitosan elicitor*, Plant Physiology and Biochemistry, 44(11-12), 2006, s. 910-916.
29. Rani T.S., Nadendla S.R., Bardhan K., Madhuprakash J., Podile A.R., *Chitosan conjugates, microspheres, and nanoparticles with potential agrochemical activity*, Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation, 2020, s. 437-464.
30. Iriti M., Faoro F., *Abscisic acid is involved in chitosan-induced resistance to tobacco necrosis virus (TNV)*, Plant Physiology and Biochemistry, 46(12), 2008, s. 1106-1111.
31. Katiyar D., Hemantaranjan A., Singh B., *Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review*, Indian Journal of Plant Physiology, 20(1), 2015, s. 1-9.
32. Meng X., Yang L., Kennedy J.F., Tian S., *Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit*, Carbohydrate Polymers, 81(1), 2010, s. 70-75.
33. Reglinski T., Elmer P.A.G., Taylor J.T., Wood P.N., Hoyte S.M., *Inhibition of Botrytis cinerea growth and suppression of botrytis bunch rot in grapes using chitosan*, Plant Pathology, 59(5), 2010, s. 882-890.
34. Liu H., Tian W., Li B., Wu G., Ibrahim M., Tao Z., Sun G., *Antifungal effect and mechanism of chitosan against the rice sheath blight pathogen, Rhizoctonia solani*, Biotechnology Letters, 34(12), 2012, s. 2291-2298.
35. Berger L., Stamford N., Willadino L., Laranjeira D., de Lima M., Malheiros S., Stamford T., *Cowpea resistance induced against Fusarium oxysporum f. sp. tracheiphilum by crustacean chitosan and by biomass and chitosan obtained from Cunninghamella elegans*, Biological Control, 92, 2016, s. 45-54.
36. Lizárraga-Paúlín E.G., Torres-Pacheco I., Moreno-Martínez E., Miranda-Castro S.P., *Chitosan application in maize (Zea mays) to counteract the effects of abiotic stress at seedling level*, African Journal of Biotechnology, 10(34), 2011, s. 6439-6446.
37. Bharani R.A., Namasivayam S.K.R., Shankar S.S., *Biocompatible chitosan nanoparticles incorporated pesticidal protein beauvericin (CSNp-BV) preparation for the improved pesticidal activity against major groundnut defoliator Spodoptera litura (Fab.) (Lepidoptera; Noctuidae)*, International Journal of ChemTech Research, 6, 2014, s. 5007-5012.
38. Moradi F.G., Hejazi M.J., Hamishehkar H., Enayati A.A., *Co-encapsulation of imidacloprid and lambda-cyhalothrin using biocompatible nanocarriers: characterization*

- and application, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 175, 2019, s. 155-163.
39. Kumar S., Chauhan N., Gopal M., Kumar R., Dilbaghi N., *Development and evaluation of alginate–chitosan nanocapsules for controlled release of acetamiprid*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 2015, s. 631-637.
40. Nadendla S.R., Rani T.S., Vaikuntapu P.R., Maddu R.R., Podile A.R., *Harpin<sub>PSS</sub> encapsulation in chitosan nanoparticles for improved bioavailability and disease resistance in tomato*, *Carbohydrate Polymers*, 199, 2018, s. 11-19.
41. Mota L.C., dos Santos M.A., *Chitin and chitosan on *Meloidogyne javanica* management and on chitinase activity in tomato plants*, *Tropical Plant Pathology*, 41(2), 2016, s. 84-90.
42. Cooper W.R., Horton D.R., *Effects of elicitors of host plant defenses on pear psylla, *Cacopsylla pyricola**, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 157(3), 2015, s. 300-306.

## **Rola chitozanu w stymulacji naturalnych mechanizmów obrony roślin**

### Streszczenie

Chitozan jest naturalnym polimerem, będącym pochodną chityny, która buduje ściany komórkowe grzybów oraz pancerzyki skorupiaków. Jest też jednym z najbardziej rozpowszechnionych w przyrodzie polisacharydów. Chitozan jest powszechnie stosowanym elicytorem, ponieważ indukuje szereg odpowiedzi obronnych roślin. Aplikacja chitozanu wpływa również na zwiększenie odporności roślin na patogeny oraz redukuje liczebność niektórych szkodników, dzięki czemu ten polimer może być stosowany jako biostymulator w zrównoważonym rolnictwie.

Słowa kluczowe: chitozan, elicytacja, chityna, patogeny roślinne

## **The role of chitosan in stimulating natural plants defense mechanisms**

### Abstract

Chitosan is a natural polymer, a derivative of chitin, which builds fungal cell walls and shells of crustaceans. It is also one of the most widespread polysaccharides in nature. Chitosan is a commonly used elicitor since it induces a number of plant defense responses. Application of chitosan also increases plant resistance to pathogens and limits the occurrence of some pests; hence, this polymer can be used as a biostimulator in sustainable agriculture.

Keywords: chitosan, elicitation, chitin, plants pathogens

## Morfologia, uprawa i charakterystyka fitochemiczna świdośliwy (*Amelanchier* Medik.)

### 1. Wprowadzenie

Świdośliwa (*Amelanchier* Medik.) jest krzewem lub niewielkim drzewem owocowym, dla którego naturalnym środowiskiem jest klimat chłodny i umiarkowany. Roślina ta pochodzi z południowego Jukonu, prerii kanadyjskich i północnych równin Stanów Zjednoczonych, gdzie uprawiana jest na skalę towarową od połowy lat 60-tych [1-4].

Największą popularnością w Ameryce Północnej cieszą się dwa gatunki – świdośliwa olcholistna (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) i świdośliwa lamarcka (*Amelanchier lamarckii* F.G. Schroed.) znana także jako świdośliwa kanadyjska (*Amelanchier canadensis* L. Medik.) [5, 6]. Obok wyżej wymienionych gatunków, w Europie (np. Finlandii, Litwie i Łotwie) uprawiana jest także spokrewniona z nimi świdośliwa jajowata (*Amelanchier ovalis* Medik.) [7, 8]. Natomiast większość odmian uprawnych tego krzewu wywodzi się od świdośliwy olcholistnej [4].

W Polsce rośliny należące do tego rodzaju, a w szczególności świdośliwa lamarcka czy kłosowa (*Amelanchier spicata* (Lam.) K. Koch), uznawane są za gatunki zadomowione (kenofity), lokalnie inwazyjne, które były dawniej wprowadzane do lasów jako gatunki podszytowe ze względów fitomelioracyjnych i biocenotycznych [9-11]. Obecnie spotykane są w lasach i zaroślach, w pobliżu dużych miast w Polsce centralnej i południowej jako rośliny ozdobne z powodu efektownych kwiatów i liści.

Ponadto coraz bardziej popularna staje się uprawa świdośliwy w sadach komercyjnych ze względu na odporność na choroby, wysokie plony i jakość owoców, a w szczególności ich smak, kolor i konsystencję. Najbardziej popularne odmiany uprawne tego krzewu ('Honeywood', 'Martin', 'Northline', 'Pembina', 'Smoky' i 'Thiessen'), które należą do gatunku *A. alnifolia* oraz ich krótką charakterystykę zestawiono w tabeli 1 [4, 12, www.1-3].

---

<sup>1</sup> r.becker@biol.uw.edu.pl, Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, www.biol.uw.edu.pl/pl/.

Tabela 1. Zestawienie najbardziej popularnych odmian świdoliwy olcholistnej (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) [4, 12, www. 1-3]

Odmiana	Pochodzenie (rok wprowadzania do uprawy)	Charakterystyka
'Honeywood' ( <i>A. alnifolia</i> )	Kanada (1973 r.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– wysokość krzewu: do 5 m;</li> <li>– szerokość krzewu: do 4 m;</li> <li>– owoce: niebiesko-czarne pokryte woskowym nalotem o średnicy ok. 16 mm;</li> <li>– uprawa: stanowisko słoneczne i wilgotne;</li> <li>– 3 strefa mrozoodporności zgodnie z klasyfikacją USDA*</li> </ul>
'Martin' ( <i>A. alnifolia</i> )	Kanada (1990 r.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– wysokość krzewu: do 3 m;</li> <li>– szerokość krzewu: do 2 m;</li> <li>– owoce: purpurowo-czarne pokryte woskowym nalotem o średnicy ok. 14 mm;</li> <li>– uprawa: stanowisko słoneczne i półcieniste;</li> <li>– 3 strefa mrozoodporności zgodnie z klasyfikacją USDA*;</li> <li>– siewka odmiany Thiessen, ale o większych owocach i średniej liczbie odrostów korzeniowych</li> </ul>
'Northline' ( <i>A. alnifolia</i> )	Kanada (1950 r.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– wysokość krzewu: do 4 m;</li> <li>– szerokość krzewu: do 6 m;</li> <li>– owoce: purpurowo-czarne pokryte woskowym nalotem o średnicy ok. 16 mm, wydłużone w kształcie gruszki;</li> <li>– uprawa: stanowisko słoneczne i półcieniste;</li> <li>3 strefa mrozoodporności zgodnie z klasyfikacją USDA*;</li> <li>– odmiana bardzo plenna o licznych odrostach korzeniowych</li> </ul>
'Pembina' ( <i>A. alnifolia</i> )	Kanada (1952 r.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– wysokość krzewu: do 5 m;</li> <li>– szerokość krzewu: do 4 m;</li> <li>– owoce: fioletowo-niebieskie pokryte woskowym nalotem o średnicy ok. 15 mm;</li> <li>– uprawa: stanowisko słoneczne;</li> <li>– 3 strefa mrozoodporności zgodnie z klasyfikacją USDA*;</li> <li>– odmiana plenna posiadająca mało odrostów korzeniowych</li> </ul>

‘Smoky’ ( <i>A. alnifolia</i> )	Kanada (1952 r.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– wysokość krzewu: do 5 m;</li> <li>– szerokość krzewu: do 6 m;</li> <li>– owoce: fioletowo-czarne pokryte woskowym nalotem o średnicy ok. 13 mm;</li> <li>– uprawa: stanowisko słoneczne i półcieniste;</li> <li>– 3 strefa mrozoodporności zgodnie z klasyfikacją USDA*;</li> <li>– odmiana bardzo plenna posiadająca dużo odrostów korzeniowych;</li> <li>– najbardziej powszechna odmiana uprawiana w Kanadzie posiadająca najśladzkie owoce ze wszystkich odmian <i>A. alnifolia</i></li> </ul>
‘Thiessen’ ( <i>A. alnifolia</i> )	Kanada (1976 r.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– wysokość krzewu: do 5 m;</li> <li>– szerokość krzewu: do 6 m;</li> <li>– owoce: niebiesko-czarne pokryte cienką warstwą woskowego nalotu o średnicy ok. 17 mm;</li> <li>– uprawa: stanowisko słoneczne;</li> <li>– 3 strefa mrozoodporności zgodnie z klasyfikacją USDA*;</li> <li>– odmiana plenna z dużą liczbą odrostów korzeniowych</li> </ul>

\*Strefy mrozoodporności wyznaczane są zgodnie z klasyfikacją USDA (United States Department of Agriculture). Określają one średnią z corocznych rekordów najniższych temperatur z okresu co najmniej 30 lat. Wszystkich stref jest 13, a im mniejszy numer strefy, tym większa mrozoodporność rośliny. Dla większej dokładności dla poszczególnych stref wyznaczono podstrefy *a* i *b* i każdej z podstref przypisany jest zakres minimalnych temperatur i tak w strefie 3 wynoszą one od -40°C do -37,3°C (podstrefa 3a) i od -37,2°C do -34,4°C (podstrefa 3b) [www.4].

Ze względu na niewielkie wymagania agrotechniczne, potencjał prozdrowotny owoców, jak i łatwość ich produkcji, świdośliwę uważa się za gatunek perspektywiczny, który wprowadzony do produkcji ogrodniczej mógłby z powodzeniem sprzyjać zróżnicowaniu i wzbogaceniu dostępnego asortymentu owoców jagodowych.

## 2. Stanowisko systematyczne świdośliwy

Świdośliwa (*Amelanchier Medik.*) to wieloletnia roślina owocodajna należąca do rodziny różowatych (*Rosaceae*), podrodziny jabłkowatych (*Pomoideae*) [13]. Rodzaj ten zawiera ok. 25 gatunków, które różnią się przede wszystkim wielkością, z czego w Europie i Polsce roślina ta zaliczana jest do grupy mało znanych gatunków krzewów owocowych [4].

Stanowisko systematyczne świdośliwy przedstawiono w tabeli 2 [www.5].

Tabela 2. Stanowisko systematyczne świdośliwy (*Amelanchier Medik.*) [www.5]

Królestwo	rośliny ( <i>Archaeplastida</i> Adl et al.)
Kład	naczyniowe ( <i>Tracheophyta</i> Cavalier-Smith)
Kład	nasienne ( <i>Spermatophyta</i> Britton & Brown)
Klasa	okrytonasienne ( <i>Magnoliophyta</i> Cronquist, Takht. & Zimmerm. ex Reveal)

Kład	różowe ( <i>Rosidae</i> Takht.)
Rząd	różowce ( <i>Rosales</i> Perleb)
Rodzina	różowate ( <i>Rosaceae</i> Juss.)
Rodzaj	świdośliwa ( <i>Amelanchier</i> Medik.)

### 3. Opis morfologiczny świdośliwy

Świdośliwa (ang. *saskatoon*; rys. 1), to w zależności od gatunku krzew lub niewielkie drzewo (zwykle do 6 m wysokości) o zwartym i wzniesionym pokroju, żyjący nawet 50 lat, które jak już wspomniano ma ugruntowaną pozycję w sadownictwie Kanady i Stanów Zjednoczonych [1-4].

W Polsce roślina ta zakwita w pierwszej połowie maja (pąki kwiatowe rozwijają się na zeszlórocznych pędach), a ozdobne kwiaty zebrane są po kilka lub kilkanaście w kwiatostanie. Natomiast na stosunkowo krótkiej szypułce znajdują się kwiaty złożone z pięciu białych (rzadziej różowych, żółtych lub czerwonych) płatków [13, www.6].

Sezonowe liście są ciemnozielone i pokryte woskowym nalotem. Błazki pojedynczych i dość cienkich liści są lancetowate, eliptyczne, lub owalne o długości do 10 cm i szerokości do 6 cm [13, www.6].

Owoce świdośliwy popularnie nazywane jagodami, w rzeczywistości są owocami ziarnkowymi i dojrzewają na przełomie czerwca i lipca. Cechuje je zwykle ciemnoniebieska barwa (rzadziej czerwona, purpurowa lub czarna), ale znane są też odmiany o białych owocach (np. odmiana ‘Antaglow’) [7, 14]. Są one zwykle kuliste (czasem gruszkowate) i woskowane. Ich masa wynosi przeważnie 0,5-1 g, a średnica 10-17 mm. Owoce świdośliwy zawierają 1-5 miękkich nasion, które są niewyczuwalne podczas spożywania [6, 15, 16].

Świdośliwę charakteryzują atrakcyjne z punktu widzenia konsumentów owoce, które są soczyste, słodkie i bardzo smaczne. Owoce świdośliwy nadają się do bezpośredniego spożycia i mogą konkurować pod względem smaku i ceny z owocami borówki amerykańskiej (*Vaccinium corymbosum*). Nadają się również do przetwórstwa (np. produkcji dżemów, soków, lodów, deserów, czy win), w tym do suszenia [17].



A)



B)

Rysunek 1. Owoce, liście (A) i kwiaty (B) świdośliwy (*Amelanchier* Medik.).

Źródło: [www.7, www.8]



#### **4. Uprawa świdosiłwy**

Rosnąca popularność uprawy świdosiłwy jest spowodowana między innymi, bardzo smaczными owocami, stosunkowo wczesnym owocowaniem (przełom czerwca i lipca) oraz niezwykłą odpornością tych krzewów na mrozy. Jej uprawa staje się w Polsce w ostatnich latach coraz bardziej powszechna, a szczególnie cenione są ich niewielkie wymagania klimatyczno-agrotechniczne, a także bogaty skład związków biologicznie czynnych zawartych w owocach [5, 18, 19].

Świdosiłwa bardzo dobrze przystosowuje się i rośnie w różnych warunkach środowiskowych, z wyjątkiem stanowisk ekstremalnie suchych i podmokłych. Co ciekawe, rośliny należące do tego rodzaju mają znacznie mniejsze wymagania glebowe od dość popularnej w naszym kraju borówki amerykańskiej [17]. Świdosiłwa jest rośliną mało wymagającą pod względem warunków siedliskowych: w zależności od odmiany preferuje glebę na stanowisku uprawy od lekko kwaśnej (pH 6,1-6,7) do lekko zasadowej (pH 7,0-7,2), która powinna być gliniasta, gliniasto-piaszczysta, próchnicza, średnio-zwięzła lub żyzna [5, 6, 17, 20, www.9]. Ziemię zbyt ciężką należy wzbogacić obornikiem lub kompostem, a lekką zagęścić torfem. Odpowiednie nawadnianie plantacji powoduje ponadto istotny wzrost masy i miąższości jagód. Pomimo, iż roślina nie jest wymagająca pod względem warunków siedliskowych, to nawożenie doglebowe lub dolistne znacząco wpływa na poprawę zarówno wielkości, jak i jakości plonów.

Świdosiłwa jest rośliną światłolubną, dlatego też obfite zbiory obserwuje się głównie na stanowiskach nasłonecznionych, półcienistych i osłoniętych od wiatru [www.9]. Jak wspomniano, świdosiłwę cechuje również wysoka mrozoodporność – roślina zaliczana jest głównie do 3 strefy mrozoodporności zgodnie z klasyfikacją USDA znosząc spadki temperatury nawet do -40°C [4, 17, 18, 21, www.4].

Ponadto rośliny te są odporne na choroby i szkodniki, nadają się zatem do uprawy ekologicznej. Krzewy są długowieczne – na plantacjach towarowych owocują nawet przez 20-30 lat. Zalecana gęstość sadzenia to ok. 2500 roślin/ha w rozstawie do zbioru kombajnowego 4,5 × 0,75-1,0 m (zaleca się też sadzenie 3-5 odmian na dużych plantacjach towarowych – ze względu na zapylenie krzyżowe). Świdosiłwa plonuje od 3-4 roku, a pełnię owocowania uzyskuje w 6-7 roku po posadzeniu [22, 23].

Jednym z podstawowych zaleceń uprawowych jest wysadzanie sadzonek do gruntu jesienią, na przełomie września i października, jednak wysadzanie może odbywać się również przez cały okres wegetacyjny rośliny. Za najlepsze sadzonki uważa się rośliny o wysokości powyżej 30 cm, z dwoma lub trzema pędami, o grubości szyjki korzeniowej w przedziale 0,7-1 cm i długości systemu korzeniowego ok. 20-25 cm. Dołki powinny mieć wielkość dostosowaną do wielkości systemu korzeniowego. Dodatkowo przed wysadzeniem dołki warto zaprawić kompostem, obornikiem lub innymi dodatkami organicznymi. Nawożenie młodych roślin z wykorzystaniem m.in. wieloskładnikowych nawozów mineralnych odbywa się 2-3 razy w okresie wegetacji: pierwsze na początku kwietnia (wiosenne), drugie na początku lipca (letnie), trzecie na początku września (jesienne). Odpowiednie przygotowanie stanowiska uprawy i nawożenie w pierwszym roku po posadzeniu sprawia, że w ciągu kolejnych dwóch lat, dodatkowe nawożenia nie są konieczne. Natomiast starsze rośliny (6-7 letnie) nawozi się dwa razy w ciągu roku – wiosną i jesienią zwiększając odpowiednio dawkę [22].

Pielęgnacja sprowadza się do usuwania chwastów i spulchniania okręgów wokół krzewów na głębokość ok. 58 cm. Spulchnianie gleby przeprowadza się jesienią po opadnięciu liści tak, aby nie uszkodzić systemu korzeniowego. Dodatkowo zalecane jest, aby w ciągu pierwszych 7 lat po posadzeniu roślin nie przycinać ich (poza uszkodzonymi pędami), ponieważ wówczas wraz z wierzchołkami utraci się znaczną część plonu. Systematyczne przycinanie najlepiej rozpocząć jesienią po opadnięciu liści w 8-10 roku uprawy. Natomiast dla roślin 20-25 letnich zalecane jest cięcie odmładzające (do wysokości 30-40 cm), a w następnym roku pozostawienie wyrosłych pędów [24].

W zależności od metody zbioru, krzewy świdośliwy sadzone są na plantacjach według dwóch schematów:

1. do zbioru metodą ręczną – wówczas odległość między kolejnymi rzędami wynosi 2,5-3,5 m, a w rzędach odległość między sadzonkami wynosi 1-1,5 m;

2. do zbioru mechanicznego (np. kombajnem) – wówczas odległość między rzędami wynosi 4-4,5 m, a w rzędach odległość między sadzonkami wynosi 0,5-0,7 m.

## 5. Charakterystyka fitochemiczna świdośliwy

Bardzo ważne w diecie każdego człowieka są związki zawarte w pokarmach roślinnych, do których zalicza się m.in. liczną grupę polifenoli wykazujących wysoką aktywność antyoksydacyjną. Są to organiczne związki chemiczne należące do grupy tzw. wtórnych metabolitów roślinnych o bardzo zróżnicowanej strukturze, masie cząsteczkowej oraz właściwościach fizycznych, chemicznych i biologicznych.

Polifenole zbudowane są z przynajmniej dwóch grup hydroksylowych przyłączonych do jednego lub więcej pierścieni aromatycznych. Mechanizm ich działania jest wielokierunkowy i prowadzi do neutralizowania aktywności wolnych rodników i reaktywnych form tlenu (RFT), które działają niszcząco na struktury komórkowe i tkankowe. Szczególnie podkreśla się zdolność przeciwutleniaczy do hamowania reakcji z tlenem lub ozonem, polegającą na wiązaniu niektórych prooksydantów [25].

Działanie przeciwutleniające polifenoli odbywa się według różnych mechanizmów, wśród których można wyróżnić:

- oddanie elektronu lub atomu wodoru (właściwości redukujące);
- stabilizację i delokalizację niesparowanego elektronu;
- stabilizację wolnych rodników powstających w reakcjach oksydacyjnych;
- terminację przerywającą łańcuchowe reakcje rodnikowe;
- chelatację jonów metali enzymów katalizujących reakcje utleniania;
- inhibicję oksydaz.

Związki polifenolowe występują tylko w organizmach roślinnych, które w przeciwieństwie do zwierzęcych, zdolne są do wytworzenia pierścieni aromatycznych. Gromadzone są one w różnych częściach roślin: korzeniach, liściach, kwiatach czy owocach [26, 27]. Szczególnie bogate w te związki są owoce roślin z rodziny różowatych, takich jak: aronia, truskawka, poziomka, malina i jeżyna czy roślin z rodziny wrzosowatych, jak np. borówka [28-31]. Bardzo dobrym źródłem związków polifenolowych są owoce aronii czarnoowocowej (*Aronia melanocarpa*), które zawierają ich od 3440-3760 mg/100 g (np. odmiana 'Nero') do 4210 mg/100 g (np. odmiana 'Viking') suchej masy owoców [32-35].

Poza istotną aktywnością przeciwutleniającą, związki te pełnią też rolę ochronną przed szkodliwym promieniowaniem ultrafioletowym oraz różnymi drobnoustrojami chorobotwórczymi. Różnorodne właściwości chemiczne, fizyczne i biologiczne, a także ich wielokierunkowa aktywność biologiczna, są wynikiem bardzo zróżnicowanej struktury związków polifenolowych. Substancje te wykazują ponadto aktywność przeciwzapalną, przeciwalergiczną, antymutageną, przeciwnowotworową i przeciwmiażdżycową [26, 27, 36].

Najliczniejszą i najbardziej zróżnicowaną grupę polifenoli występujących w roślinach stanowią flawonoidy, które występują w postaci wolnych cząsteczek (aglikony) lub w formie związanej z cukrami (glikozydy) [37]. W zależności od położenia pierścienia fenolowego i stopnia utlenienia pierścienia piranowego związki te podzielono na następujące grupy: flawony, flawanony, flawan-3-ole, izoflawony, antocyjany oraz chalkony [38]. Listę najważniejszych związków polifenolowych zidentyfikowanych w owocach świdoliwy zestawiono w tabeli 3 [39].

Tabela 3. Związki polifenolowe zidentyfikowane w owocach i liściach świdoliwy (*Amelanchier Medik.*) odmian ‘Smoky’, ‘Thiessen’, ‘Honeywood’ i ‘Northline’ [39]

GRUPA POLIFENOLI	ZIDENTYFIKOWANE ZWIĄZKI	OWOCE	LIŚCIE
Antocyjany	cyjanidyno-3-galaktozyd	+	-
	cyjanidyno-3-glukozyd	+	-
	cyjanidyno-3-arabinozyd	+	-
	cyjanidyno-3-ksylozyd	+	-
Flawonole	3-galaktozyd kwercetyny	+	+
	3-glukozyd kwercetyny	+	+
	3-arabinozyd kwercetyny	+	+
	3-ksylozyd kwercetyny	+	+
	3-rutynozyd kwercetyny	+	-
	diarabinoglukuronid kwercetyny	-	+
	arabinoglukuronid kwercetyny	-	+
	arabinoglukozyd kwercetyny	+	+
	glikozyd kwercetyny	+	+
	diglikozyd kwercetyny	-	+
	3-glukozyd kamferolu	-	+
	kamferol (pochodne)	-	+
	monokumaroiolo-izokwercetyna	-	+

Flawanole, proanto-cyjanidyny	katechina (pochodna)	+	+
	epikatechina	-	+
	procyjanidyna (pochodne)	+	-
	proantocyjanidyny	+	+
Lignany	neolignany (pochodne)	-	+
Kwasy fenolowe	kwasy protokatechowy	+	+
	kwasy neochlorogenowy	+	+
	kwasy chlorogenowy	+	+
	kwasy cynamonowy (pochodne)	+	+

W licznych pracach wykazano, że w zależności od gatunku, owoce świdosiwy charakteryzuje zróżnicowana zawartość polifenoli w przeliczeniu na świeżą masę. Całkowita zawartość tych związków waha się od 2,52 do 3,82 g równoważnika kwasu galusowego/kg świeżej masy owoców [17]. Wartości te są porównywalne z zawartością polifenoli w owocach np. śliwki (3,48-4,95 g/kg ś.m.), borówki (3,00-4,89 g/kg ś.m.) i czarnej porzeczki (średnio 5,33 g/kg ś.m.) [17, 40-42].

Na podstawie analiz chromatograficznych ekstraktów uzyskanych z owoców różnych odmian świdosiwy ('Smoky', 'Thiessen', 'Honeywood' i 'Northline') wykazano obecność kilkunastu związków polifenolowych, wśród których wyróżniono flawonoidy (m.in. antocyjany, flawanole, flawanole) oraz kwasy fenolowe i proantocyjanidyny (tab. 3) [17, 39].

Owoce świdosiwy są bogatym źródłem antocyjanów, głównie cyjanidyno-3-galaktozydu, cyjanidyno-3-glukozydu, cyjanidyno-3-arabinozydu oraz cyjanidyno-3-ksylozydu. Związki te stanowią około 63% wszystkich związków polifenolowych. Badania *Amelanchier alnifolia* wykazały, iż całkowita zawartość antocyjanów jest najwyższa w owocach odmiany 'Northline', a najniższa w owocach odmiany 'Smoky' wynosząc odpowiednio 5,179 i 2,587 mg/g świeżej masy owoców (1300-2490 mg/100 g suchej masy owoców). Dominującymi związkami tej frakcji są cyjanidyno-3-galaktozyd i cyjanidyno-3-glukozyd, które występują w największych ilościach u wszystkich badanych odmian stanowiąc odpowiednio około 60% i 20% wszystkich antocyjanów [39, 43]. Warto podkreślić, że zawartość antocyjanów występujących w owocach świdosiwy jest porównywalna z zawartością tych związków w owocach borówki amerykańskiej, bzu czarnego (*Sambucus nigra*) oraz aronii czarnoowocowej, przez co roślina ta może być traktowana jako jedno z najcenniejszych źródeł antocyjanów spośród wielu przebadanych dotychczas gatunków sadowniczych, takich jak: morwa czarna (*Morus nigra*), dereń jadalny (*Cornus mas*), tarnina (*Prunus spinosa*) czy jarzębina (*Sorbus aucuparia*) [44-46]. Frakcja flawonoli zawiera 7 związków (pochodnych glikozydowych kwercetyny), których całkowita zawartość waha się od 44 mg/100 g ('Smoky') do 92,3 mg/100 g ('Thiessen') świeżej masy owoców [39]. Ponadto wykazano, że owoce *Amelanchier alnifolia* cechuje stosunkowo wysoka zawartość kwasów fenolowych (1,084-1,704 mg/g świeżej masy), z których najliczniej zidentyfikowano kwasy hydroksycynamonowe (dominującym związkiem tej frakcji

był kwas chlorogenowy) stanowiące 18-26% tej frakcji, a w znacznie mniejszych ilościach występowały kwasy hydroksybenzoesowe (kwas protokatechowy i jego pochodne w postaci estrów i glikozydów) [39, 43].

Analizy ekstraktów uzyskanych z liści czterech odmian świdośliwy ('Smoky', 'Thiessen', 'Honeywood' i 'Northline') również wykazały obecność kilkunastu związków polifenolowych (tab. 3), wśród których wyróżniono: (i) flawonoidy tj., flawonole (ok. 42% wszystkich związków polifenolowych), flawanole (katechiny, ok. 18%); (ii) kwasy fenolowe (ok. 36%); a także (iii) proantocyjanidyny oraz (iv) lignany. Poszczególne odmiany różnią się w niewielkim stopniu akumulacją tych związków w liściach: np. odmianę 'Smoky' cechuje najniższa, a 'Honeywood' najwyższa całkowita zawartość polifenoli wynosząca odpowiednio 184,7 i 198,9 mg/g suchej masy liści. Całkowita zawartość kwercetyny i jej pochodnych zidentyfikowanych w liściach świdośliwy jest stosunkowo wysoka i waha się od 24 mg/g ('Northline') do 32 mg/g ('Honeywood') suchej masy liści [39]. Warto zwrócić uwagę, iż liście świdośliwy (jak również czarnej porzeczki czy borówki amerykańskiej) zawierają większe ilości flawonoli (kwercetyny, kamferolu) i kwasów hydroksycynamonowych w porównaniu do owoców [47, 48]. Zatem liście roślin jagodowych mogą być szerzej rozpatrywane i w efekcie wykorzystywane jako funkcjonalne składniki żywności o cennych właściwościach przeciwutleniających.

Świdośliwę cechuje ponadto stosunkowo wysoka zawartość wielkocząsteczkowych proantocyjanidyn, które w owocach stanowiły około 3% suchej masy i 46-69% wszystkich zidentyfikowanych polifenoli, a w liściach odpowiednio 10-14% i 64-70% [39]. Należy jednak zwrócić uwagę, że całkowita zawartość tych związków jest wyższa w liściach niż w owocach, co sugeruje, że są one potencjalnie lepszym źródłem bioaktywnych proantocyjanidyn.

## **6. Podsumowanie**

Świdośliwa (*Amelanchier* Medik.; ang. *saskatoon*) to owocodajny wieloletni krzew lub drzewo należące do rodziny różowatych (*Rosaceae* Juss.), którego uprawa staje się w Polsce coraz bardziej popularna dzięki niewielkim wymaganiom klimatycznym i glebowym, niezwykłym walorom smakowym owoców i wysokiej zawartości związków biologicznie czynnych.

Zarówno owoce, jak i liście świdośliwy są bogatym źródłem związków polifenolowych porównywalnym do owoców niektórych borówek *Vaccinium* spp., jeżyn *Rubus* spp. i porzeczek *Ribes* spp. [49, 50]. Dzięki dużej zawartości szczególnie antocyjanów (owoce) i flawonoli (liście), wykazują one wysoką aktywność antyoksydacyjną przez co powinny być traktowane jako cenny składnik diety prozdrowotnej, np. w sokach, herbatach ziołowych czy suplementach diety.

## **Literatura:**

1. Bishop B.H., Nelson S.H., *Propagation and transplanting of Saskatoon (Amelanchier alnifolia Nutt.) softwood cuttings*, Canadian Journal of Plant Science, 60, 1980, s. 883-890.
2. Mazza G., *Anthocyanins and other phenolic compounds of saskatoon berries (Amelanchier alnifolia Nutt.)*, Journal of Food Science, 51, 1986, s. 1260-1264.
3. Mazza G., *Compositional and functional properties of saskatoon berry and blueberry*, International Journal of Fruit Science, 5, 2005, s. 101-120.
4. Seliga L., Pluta S., *Ocena wzrostu i plonowania kilku genotypów świdośliwy olcholistnej (Amelanchier alnifolia Nutt.) w centralnej Polsce*, Zeszyty Naukowe Instytutu Ogrodnictwa, 24 (2016), s. 109-119.

5. Ozga J.A., Saeed A., Reinecke D.M., *Anthocyanins and nutrient components of saskatoon fruits (Amelanchier alnifolia Nutt.)*, Canadian Journal of Plant Science, 86, 2006, s. 193-197.
6. Ozga J.A., Saeed A., Wismer W., Reinecke D.M., *Characterization of cyanidin- and quercetin-derived flavonoids and other phenolics in mature saskatoon fruits (Amelanchier alnifolia Nutt.)*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55 2007, s. 10414-10424.
7. Konopacka D., Piecko J., Mieszczakowska-Frac M., Markowski J., Rutkowski K., Kruczynska D., Buczek M., *Świdośliwa – mało znany gatunek owoców-wstępna ocena przydatności dla przetwórstwa*, Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny, 11 2017, s. 8-11.
8. Lachowicz S., Oszmianski J., *Świdośliwa – cenny surowiec dla przetwórstwa*, Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny, 6, 2016, s. 25-27.
9. Danielewicz W., Wiatrowska B., *The most invasive tree and shrub species in Polish forests*, Peckiana, 9, 2014, s. 59-67.
10. Tokarska-Guzik B., Dajdok Z., Zając M., Zając A., Urbisz A., Danielewicz W., Hołdyński C., *Rośliny obcego pochodzenia w Polsce*, Generalna Dyrekcja Ochrony Środowiska, Warszawa, 2012.
11. Tokarska-Guzik B., Bzdęga K., Nowak T., Urbisz A., Węgrzynek B., Dajdok Z., *Propozycja listy roślin gatunków obcych, które mogą stanowić zagrożenie dla przyrody Polski i Unii Europejskiej*. Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego, Katowice, 2015.
12. Zatylny A.M., Ziehl W.D., St-Pierre R.G., *Physicochemical properties of fruit of 16 saskatoon (Amelanchier alnifolia Nutt.) cultivars*, Canadian Journal of Plant Science, 85, 2005, s. 933-938.
13. Pruski K., Mohyuddin M., Grainger G., *Saskatoon (Amelanchier alnifolia Nutt.)*, [w:] Bajaj Y.P.S. (red.), *Trees III. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Springer, Berlin, Heidelberg 1991, s. 164-179.
14. Zatylny A.M., St-Pierre R.G., *Revised international registry of cultivars and germplasm of the genus Amelanchier*, Small Fruits Review, 2, 2003, s. 51-80.
15. Rogiers S.Y., Knowles N.R., *Physical and chemical changes during growth, maturation, and ripening of saskatoon (Amelanchier alnifolia) fruit*, Canadian Journal of Botany, 75, 1997, s. 1215-1225.
16. McGarry R., Ozga J.A., Reinecke D.M., *The effects of ethephon on saskatoon (Amelanchier alnifolia Nutt.) fruit ripening*, Journal of the American Society for Horticultural Science, 130, 2005, s. 12-17.
17. Rop O., Mlcek J., Jurikova T., Sochor J., Kizek, R., *Antioxidant properties of saskatoon berry (Amelanchier alnifolia Nutt.) fruits*, Fruits, 68, 2013, s. 435-444.
18. Żurawicz E., Pluta S., Kucharska D., *Amelanchier-a new berry crop in Poland with good potential for commercial cultivation*, ISHS Acta Horticulturae: X International Symposium on Vaccinium and Other Superfruits, 1017, 2012, s. 251-255.
19. Meczarska K., Cyboran-Mikolajczyk S., Wloch A., Bonarska-Kujawa D., Oszmianski J., Kleszczynska H., *Polyphenol content and bioactivity of Saskatoon (Amelanchier alnifolia Nutt.) leaves and berries*. Acta Poloniae Pharmaceutica, 74, 2017, s. 660-669.
20. Finn, C., *Temperate berry crops*, [w:] Janick J. (red.), *Perspectives on new crops and new uses*, ASHS Press, Alexandria, VA 1999, s. 324-334.
21. Vertucci C.W., Stushnoff C., *The state of water in acclimating vegetative buds from Malus and Amelanchier and its relationship to winter hardiness*, Physiologia Plantarum, 86, 1992, s. 503-511.
22. Pluta S., Seliga L., Żurawicz E., *Wstępna ocena wzrostu i plonowania dwóch genotypów świdośliwy olcholistnej (Amelanchier alnifolia Nutt.) posadzonych w różnej rozstawie*, Zeszyty Naukowe Instytutu Ogrodnictwa, 25, 2017, s. 95-104.
23. Sarwa A., Świdośliwa, [w:] Kot W. (red.), *Sad inny niż wszystkie – szlachetne i dzikie drzewa, krzewy i pnącza owocowe w ogródku i na działce*, Armoryka, Sandomierz 2009, s. 196-198.
24. Badowska-Czubik T., Bielicki P., Bryk H., Buler Z., Danelski W., Głowacka A.,

- Goszczyńska D.M., Grzyb Z.S., Koziński B., Kruczyńska D., Morgaś H., Olszewski T., Rabcewicz J., Sekrecka M., Rozpara E., Wójcik-Seliga J., *Technologia Ekologicznej Produkcji Owoców*, [w:] Rozpara E. (red.), InHort, Skierniewice 2014, s. 10-15, 63-71.
25. Gruia M.I., Opera E., Gruia I., Negoita V., Farcasanu I.C., *The antioxidant response induced by Lonicera caerulea berry extracts in animals bearing experimental solid tumor*, *Molecules*, 13, 2008, s. 1195-1206.
26. Williamson G., Manach C., *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies*, *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 2005, s. 243S-255S.
27. Kosiorek A., Oszmiański J., Golański J., *Podstawy do zastosowania polifenoli roślinnych jako nutraceutyków o właściwościach przeciwpłytkowych*, *Postępy Fitoterapii*, 2, 2013, s. 108-117.
28. Szajdek A., Borowska J., *Właściwości przeciwutleniające żywności pochodzenia roślinnego*, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 4, 2004, s. 5-28.
29. Cieślík E., Sikora E., *Występowanie przeciwutleniaczy w owocach jagodowych*, [w:] Grajek W. (red.), *Przeciwutleniacze w żywności: aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, 2007, s. 201-209.
30. Wolski T., Kalisz O., Prasał M., Rolski A., *Aronia czarnoowocowa – zasobne źródło antyoksydantów*, *Postępy Fitoterapii*, 3, 2007, s. 145-154.
31. Gheribi E., *Związki polifenolowe w owocach i warzywach*, *Medycyna Rodzinna*, 4, 2011, s. 111-115.
32. Kähkönen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M., *Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1999, s. 3954-3962.
33. Kolesnikov M.P., Gins V.K., *Phenolic substances in medicinal plants*, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37, 2001, s. 392-399.
34. Kähkönen M.P., Hopia A.I., Heinonen M., *Berry phenolics and their antioxidant activity*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2001, s. 4076-4082.
35. Hudec J., Bakoš D., Mravec D., Kobida L.U., Burdová M., Turianica I., Hlušek J., *Content of phenolic compounds and free polyamines in black chokeberry (Aronia melanocarpa) after application of polyamine biosynthesis regulators*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2006, s. 3625-3628.
36. Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Rémésy C., *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies*, *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 2005, s. 230S-242S.
37. Seo O.N., Kim G., Park S., Lee J.H., Kim Y., Lee S.Y., Kim C.Y., Jin J.S., Choi S.K., Shin S.C., *Determination of polyphenol components of Lonicera japonica Thunb. using liquid chromatography – tandem mass spectrometry: contribution to the overall antioxidant activity*, *Food Chemistry*, 134, 2012, s. 572-577.
38. King A., Young G., *Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals*, *Journal of the American Dietetic Association*, 99, 1999, s. 213-218.
39. Lavola A., Karjalainen R., Julkunen-Tiitto R., *Bioactive polyphenols in leaves, stems, and berries of Saskatoon (Amelanchier alnifolia Nutt.) cultivars*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 2012, s. 1020-1027.
40. Rop O., Jurikova T., Mlcek J., Kramarova D., Sengee Z., *Antioxidant activity and selected nutritional values of plums (Prunus domestica L.) typical of the White Carpathian Mountains*, *Scientia Horticulturae*, 122, 2009, s. 545-549.
41. You Q., Wang B.W., Chen F., Huang Z.L., Wang X., Luo P.G., *Comparison of anthocyanins and phenolics in originally and conventionally grown blueberries in selected cultivars*, *Food Chemistry*, 125, 2011, s. 201-208.
42. Lugasi A., Hovari J., Kadar G., Denes S., *Phenolics in raspberry, blackberry and currant cultivars grown in Hungary*, *Acta Alimentaria*, 40, 2011, s. 52-64.
43. Jin A.L., Ozg J. A., Kennedy J.A., Koerner-Smith J.L., Botar G., Reinecke D.M.,

- Developmental profile of anthocyanin, flavonol, and proanthocyanidin type, content, and localization in Saskatoon fruits (Amelanchier alnifolia Nutt.)*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63, 2015, s. 1601-1614.
44. Nakajima J.I., Tanaka I., Seo S., Yamazaki M., Saito K., *LC/PDA/ESI-MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries*, BioMed Research International, 2004, s. 241-247.
45. Wu X., Gu L., Prior R.L., McKay S., *Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and their antioxidant capacity*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 2004, s. 7846-7856.
46. Veberic R., Slatnar A., Bizjak J., Stampar F., Mikulic-Petkovsek M., *Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species*, LWT-Food Science and Technology, 60, 2015, s. 509-517.
47. Riihinen K., Jaakola L., Kärenlampi S., Hohtola A., *Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (Vaccinium myrtillus) and 'northblue' blueberry (Vaccinium corymbosum x V. angustifolium)*, Food Chemistry, 110, 2008, s. 156-160.
48. Tabart J., Kevers C., Evers D., Dommes J., *Ascorbic acid, phenolic acid, flavonoid, and carotenoid profiles of selected extracts from Ribes nigrum*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 2011, s. 4763-4770.
49. Szakiel A., Pączkowski C., Huttunen S., *Triterpenoid content of berries and leaves of bilberry Vaccinium myrtillus from Finland and Poland*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60, 2012, s. 11839-11849.
50. Szakiel A., Pączkowski C., Koivuniemi H., Huttunen S., *Comparison of the triterpenoid content of berries and leaves of lingonberry Vaccinium vitis-idaea from Finland and Poland*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60, 2012, s. 4994-5002.

### **Netografia:**

- [www.1]: <https://www.in-vitro.pl/en/>
- [www.2]: <https://www.bylands.com/>
- [www.3]: <https://www.millcreeknursery.ca/>
- [www.4]: <https://www.atlas-roslin.pl/index.html>
- [www.5]: <https://www.plantsystematics.org/index.html>
- [www.6]: <https://www.ediblewildfood.com/>
- [www.7]: <https://www.calgaryplants.com/>
- [www.8]: <https://terra-boreal.com/en/produit/northline-saskatoon-berry/>
- [www.9]: <https://saskatoonberryinstitute.org>



## **Morfologia, uprawa i charakterystyka fitochemiczna świdośliwy (*Amelanchier Medik.*)**

### Streszczenie

Świdośliwa (*Amelanchier Medik.*) to wieloletnia roślina owocodajna należąca do rodziny różowatych (*Rosaceae Juss.*). Najbardziej popularne są dwa gatunki: świdośliwa olcholistna (*Amelanchier alnifolia*) i świdośliwa lamarcka (*Amelanchier lamarckii*) znana także jako świdośliwa kanadyjska (*Amelanchier canadensis*). Liczne analizy chromatograficzne ekstraktów uzyskanych z owoców i liści różnych odmian świdośliwy ('Smoky', 'Thiessen', 'Honeywood' i 'Northline') wykazały obecność kilkunastu związków polifenolowych, wśród których wyróżniono flawonoidy, kwasy fenolowe i proantocyjanidyny. Uprawa świdośliwy staje się obecnie coraz bardziej popularna ze względu na smaczne owoce (w smaku podobne do borówki amerykańskiej), wyjątkową odporność na mróz i potencjalne właściwości lecznicze, np. przeciwzapalne.

Słowa kluczowe: *Amelanchier*, świdośliwa, polifenole, uprawa

## **Morphology, cultivation and phytochemical characteristic of saskatoon (*Amelanchier Medik.*)**

### Abstract

The saskatoon (*Amelanchier Medik.*) is a perennial fruit-bearing plant belonging to the family *Rosaceae Juss.* The two most popular species *Amelanchier alnifolia* and *Amelanchier lamarckii* are also known as *Amelanchier canadensis*. Numerous chromatographic analyzes of extracts obtained from fruits and leaves of various cultivars of saskatoon ('Smoky', 'Thiessen', 'Honeywood' and 'Northline') have shown the presence of several polyphenolic compounds, among which flavonoids, phenolic acids and proanthocyanidins have been distinguished. Cultivation of saskatoon is currently becoming more and more popular due to tasty fruits (similar in taste to the blueberry), exceptional frost resistance and potential medicinal properties, e.g. anti-inflammatory.

Keywords: *Amelanchier*, saskatoon, polyphenols, cultivation

## Wybrane rośliny lecznicze i przyprawowe stosowane w pielęgnacji i diecie małego dziecka

### 1. Wstęp

Rośliny lecznicze i przyprawowe towarzyszą człowiekowi od tysięcy lat. W żywieniu rośliny stanowią cenne źródło łatwo przyswajalnych witamin i minerałów oraz innych bioaktywnych składników. Właściwie dobrane i zastosowane są wykorzystywane zarówno w leczeniu, jak i kosmetyce oraz pielęgnacji. Z roślin leczniczych i przyprawowych warto korzystać zwłaszcza w przypadku wrażliwego organizmu małego dziecka, który jest bardzo podatny na czynniki zewnętrzne. Rośliny u małych dzieci znajdują zastosowanie zarówno w celach leczniczych, jak i higienicznych oraz profilaktycznych, działają bowiem łagodnie i wielokierunkowo. Wykorzystanie roślin przyprawowych u małych dzieci w celach dietetycznych jest rekomendowane przez specjalistów żywienia, gdyż nie tylko dostarczają one cennych składników odżywczych i poprawiają smak potraw, ale przede wszystkim pozwalają ograniczyć sól i cukier w diecie dziecka, których stosowanie może zwiększać ryzyko wystąpienia chorób dietozależnych w wieku dorosłym.

Stosowanie roślin leczniczych i przyprawowych u małych dzieci wymaga jednak wiedzy zarówno na temat samych roślin i ich składników, jak i prawidłowego wykorzystania ich cennych właściwości. Wiedza ta może być pomocna zarówno dla rodziców, jak i osób zajmujących się żywieniem, pielęgnacją i opieką nad małym dzieckiem.

Celem pracy było przedstawienie wykorzystania wybranych roślin leczniczych i przyprawowych w diecie oraz pielęgnacji małego dziecka w oparciu o analizę literatury z tego zakresu. W krajowych monografiach i artykułach naukowych znaleźć można wiele informacji na temat roślin leczniczych i przyprawowych, jednak tych traktujących o ich wykorzystaniu u małych dzieci jest stosunkowo niewiele. Niniejszy artykuł może tę lukę uzupełnić.

Wybrane rośliny lecznicze i przyprawowe przedstawiono według schematu: krótka historia stosowania rośliny, jej lecznicze zastosowanie, najważniejsze bioaktywności, możliwości zastosowania w pielęgnacji i żywieniu małego dziecka. W rozdziale pierwszym scharakteryzowano ogólnie rośliny zielne (zioła) i ich składniki, najczęściej stosowane postacie leków ziołowych oraz zasady zbioru i ich przechowywania. W rozdziale drugim omówiono wybrane rośliny lecznicze stosowane w pielęgnacji małego dziecka, a w trzecim – rośliny przyprawowe, które mogą być stosowane w diecie dzieci w wieku 1-3 lata.

### 2. Rośliny lecznicze

Rośliny lecznicze, zgodnie ze słownikową definicją słowa leczniczy, mają właściwości leczące, uzdrawiające [1]. Nazywane są także roślinami zielarskimi lub ziołami [2]. Od słowa zioła pochodzi określenie zielarstwo, które dotyczy głównie

---

<sup>1</sup> Jolanta.Kamecka-Krupa@gwsh.pl, Wydział Medyczny, Górnośląska Wyższa Szkoła Handlowa im. W. Korfańskiego w Katowicach.

pozyskiwania surowców zielarskich oraz produkcji otrzymywanych z nich specyfików. Odrębną dziedziną jest ziołolecznictwo, zajmujące się stosowaniem ziół w leczeniu chorób [2].

Rośliny zielarskie (ziola) należą do różnych grup botanicznych i w zależności od celu, w jakim są używane, w różny też sposób wyodrębnia się ich grupy. Najczęściej rośliny zielarskie dzieli się na lecznicze i przyprawowe [2, 3]. Jest to jednak podział umowny, gdyż wiele roślin przyprawowych należy jednocześnie do kategorii roślin leczniczych i odwrotnie. Inny podział wyróżnia rośliny lecznicze oraz rośliny przyprawowe, a te dzieli na zioła przyprawowe (np. bazylia, cząber, majeranek, tymianek, estragon, hyzop), przyprawy warzywne (np. cebula, czosnek, szczypiorek, pietruszka) oraz przyprawy aromatyczne (np. pieprz, imbir, goździk, wanilia) [3, 4]. Jeszcze inny podział wyodrębnia rośliny typowo lecznicze oraz przyprawowe, pokarmowe, kosmetyczne i profilaktyczne. Zioła profilaktyczne, które zmniejszają ryzyko wystąpienia różnych chorób, najczęściej mają charakter spożywczych (pokarmowych) i przyprawowych, np. kurkuma [5].

Stosowanie roślin zielarskich w ziołolecznictwie, kosmetyce i kuchni nie wyczerpuje ich możliwości wykorzystania. Niektóre zioła lub ich mieszanki mogą służyć do odstraszenia owadów, np. bazylia, cząber ogrodowy, lawenda, mięta, piołun, rozmaryn. Inne poprawiają zapach w naszych domach i mieszkaniach – lawenda, rumianek, macierzanka, oregano, mięta, rozmaryn, lubczyk, melisa, szałwia. Z roślin zielarskich można wyrabiać kadzidła i świece, mogą być również źródłem bardzo trwałych barwników roślinnych – mniszek, pokrzywa, pietruszka, cebula, wrotycz. Większość ziół ma także duże walory estetyczne i dekoracyjne. Do upraw domowych polecane są zarówno gatunki jednoroczne (bazylia pospolita, majeranek ogrodowy, cząber ogrodowy), jak i wieloletnie (hyzop lekarski, lebidka pospolita, melisa lekarska, mięta pieprzowa, rozmaryn lekarski, szałwia lekarska, tymianek pospolity) [2, 4, 6].

### **3. Składniki roślin zielnych**

Wszystkie rośliny zielne zawierają związki biologicznie czynne, którym zawdzięczają swoje działanie. Mają one często charakter metabolitów wtórnych i występują w różnych częściach roślin i w różnych ilościach. Najczęściej pozyskuje się je z tych organów, w których nagromadzona jest ich największa ilość, dlatego surowcem zielarskim mogą być kłącza, korzenie, pędy, kora, liście, kwiaty, owoce, nasiona, pączki oraz ziele – cała nadziemna część roślin niezdrewniałych [2, 3, 6, 7].

Składniki roślin zielnych działają wielokierunkowo, kompleksowo i korzystnie na szereg narządów i układów. Dostarczają podstawowych składników odżywczych, antyoksydantów, uzupełniają minerały i witaminy, wpływają korzystnie na przemianę materii. Cenną zaletą większości tego typu surowców jest łagodne działanie, brak toksyczności i działań ubocznych [5, 7].

Składnikami roślin zielnych jest wiele związków, z których w kosmetyce i pielęgnacji wykorzystuje się m.in. olejki eteryczne, oleje roślinne, barwniki roślinne, garbniki, saponiny, kumaryny [7].

#### **3.1. Olejki eteryczne**

Są wydzielinami roślinnymi o niewyjaśnionej w pełni roli fizjologicznej. Mają wyraźnie określony, zwykle bardzo silny zapach. Są substancjami lotnymi,

nierozpuszczalnymi w wodzie, za to dobrze rozpuszczają się w spirytusie, glicerolu i lipidach. Znajdują się w roślinach w stanie ciekłym, skąd można je wydobyć za pomocą ekstrakcji. W skład jednego olejku lotnego może wchodzić kilkadziesiąt, a niekiedy nawet 200-300 i więcej różnych związków chemicznych. Olejki w różnym stopniu działają przeciwbakteryjnie, przeciwwirusowo, odkażająco, przeciwzapalnie. Pobudzają metabolizm komórkowy, przyspieszają procesy regeneracyjne, poprawiają strukturę i ukrwienie skóry, regulują wydzielanie substancji tłuszczowych. Właściwie zastosowane pobudzają układ odpornościowy organizmu, poprawiają krążenie, działają przeciwbólowo. Olejki eteryczne znano od dawna jako zapachowe substancje roślinne stosowane do celów kosmetycznych, dezynfekcyjnych i leczniczych. Obecnie używane są do wyrobu perfum i wielu kosmetyków oraz w aromaterapii – do masażu kąpieli i inhalacji [2, 7-10].

### 3.2. Oleje roślinne

Są bogatym źródłem niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych – linolowego, linolenowego i arachidonowego. Oleje roślinne zawierają także witaminy rozpuszczalne w tłuszczach (A, D i E). W roślinach tłuszcze występują w różnych organach, ale najobficiej w nasionach. Największe ilości tłuszczów zawierają nasiona roślin oleistych m.in. rzepak *Brassica napus*, len zwyczajny *Linum usitatissimum*, konopie siewne *Cannabis sativa*, słonecznik zwyczajny *Helianthus annuus*, pestki dyni *Cucurita pepo*. Oleje roślinne otrzymuje się również z różnych owoców, np. orzecha włoskiego *Juglans regia*, orzechów laskowych *Corylus avellana*, orzechów arachidowych *Arachis hypogaea*, oliwek *Olea europaea*. Najlepszą jakość mają tłuszcze tłoczone na zimno, które są szczególnie zalecane do pielęgnacji skóry. Oleje z wiesiołka *Oenothera* i ogórecznika lekarskiego *Borago officinalis* znajdują zastosowanie jako lecznicze preparaty farmaceutyczne. W kosmetyce oleje roślinne są wykorzystywane do natłuszczenia, odżywiania i regeneracji naskórka. Mają działanie lecznicze, odprężające, tonizujące. Tworzą na powierzchni skóry zabezpieczający film, zapewniając skórze właściwe napięcie i jędrność. Bywają zaliczane do grupy emolientów, charakteryzujących się zdolnością wygładzania i zmiękczenia skóry. Do skóry wrażliwej można stosować olej sezamowy (*Sesamum indicum*), morelowy (*Prunus Armeniaca*) i z rokitnika zwyczajnego (*Hippophaë rhamnoides*). Do każdego typu skóry, w tym również delikatnej skóry dziecięcej, polecany jest olej ze słodkich migdałów (*Amygdalus communis*), który ze względu na dobre wchłanianie, chętnie wykorzystuje się do masażu u dzieci [2, 7-10].

### 3.3. Barwniki

Stanowią zróżnicowaną grupę związków organicznych nadających barwy roślinom. Są to m.in. chlorofil, karotenoidy, flawonoidy, antocyjaniny [2, 7, 10].

Chlorofil do celów kosmetycznych pozyskuje się np. z liści pokrzywy zwyczajnej *Urtica dioica* i nagietka lekarskiego *Calendula officinalis*. Działa antybakteryjne, przeciwzapalnie i łagodząco. W kosmetyce jest wykorzystywany do kremów odżywczych i nawilżających, past do zębów oraz emulsji kąpielowych [2, 7, 10].

Karotenoidy to żółte, pomarańczowe, czerwone i fioletowe barwniki występujące u wszystkich organizmów fotosyntetyzujących. Do surowców roślinnych zawierających czynne biologicznie karotenoidy o dużym znaczeniu kosmetycznym należą kwiaty nagietka *Calendula officinalis*. Pozyskiwany z niego  $\beta$ -karoten warunkuje prawidłowy

wzrost nabłonka, przeciwdziała nadmiernemu złuszczeniu naskórka, przyspiesza gojenie się uszkodzeń skóry, przeciwdziała rozwojowi zmian nowotworowych oraz chroni przed szkodliwym wpływem warunków zewnętrznych (UV). Stosowany jest do produkcji kremów, emulsji do pielęgnacji ciała, płynów kąpielowych i środków do pielęgnacji włosów [2, 7, 10, 11].

Flawonoidy najczęściej występują w formie glikozydów. Są silnymi antyutleniaczami wobec wolnych rodników, które skutecznie niszczą, przez co odgrywają ogromną rolę w profilaktyce wielu schorzeń. Uszczelniają i wzmacniają ściany naczyń krwionośnych, zapobiegają krwawieniom, wybroczynom, wspomagają leczenie krwawień podskórnych (np. rutyna występująca w rucie *Ruta graveolens*, ziele fiołka trójbarwnego *Viola tricolor*, kwiecie bzu czarnego *Sambucus nigra*). Działają też przeciwzapalnie (np. flawonoidy koszyczka rumianku *Chamomilla anthodium*, kwiatostanu lipy *Tiliae inflorescentia*) oraz przeciwalergiczenie (flawonoidy w koszyczku rumianku *Chamomilla anthodium*) [2, 7, 10, 11].

Antocyjaniny to barwne związki fenolowe zaliczane do flawonoidów, które występują powszechnie w roślinach, zwykle w postaci glikozydów. Antocyjany spełniają rolę enzymów oddechowych, wywierają korzystny wpływ na naczynia włosowate i ostrość widzenia. Wykazują działanie przeciwzapalne, przeciwalergiczne, przeciwwysiękowe, wzmacniają ściany naczyń krwionośnych i poprawiają krążenie krwi w naczyniach włosowatych. W związki te bogate są m.in. kwiaty chabra bławatka *Centaurea cyanus*, kwiaty malwy *Althaea* sp., owoc borówki czernicy *Vaccinium myrtillus*, owoc bzu czarnego *Sambucus nigra* [2, 7, 8, 10, 11].

### 3.4. Garbniki

To związki wielkocząsteczkowe powstałe w wyniku kondensacji kwasu galusowego i glukozy. Wykazują działanie ściągające, przeciwzapalne, bakteriobójcze, grzybobójcze, wirusobójcze. Biorą udział w uszczelnianiu ścianek kapilar, hamują przenikanie płynu przesiękowego z kapilar do otaczających je tkanek, unieczynnijają histaminę odpowiedzialną za występowanie zmian uczuleniowych. Stosowane zewnętrznie znoszą uczucie bólu, pieczenia i swędzenia, dlatego wykorzystywane są m.in. w minimalizowaniu skutków ukąszeń przez owady. Garbników używa się zwykle w postaci 5-10% wyciągów wodnych lub nalewek alkoholowych do płukanek i przemywań skóry oraz błon śluzowych przy zranieniach, otarciach, oparzeniach, odmrożeniach, egzemach, opryszczce, stanach zapalnych dziąseł, obrzękach i alergiach. Odwary, napary oraz wyciągi z surowców garbnikowych stosuje się do okładów, płukanek, kąpeli. Surowce garbnikowe mają zastosowanie do produkcji mydeł i szamponów przeciwłupieżowych, maseczek kosmetycznych, kremów chroniących skórę przed promieniowaniem UV i balsamów do masażu. Źródłem garbników jest wiele roślin, m.in. brzoza brodawkowata *Betula pendula*, bazylija pospolita *Ocimum basilicum*, szalwia lekarska *Salvia officinalis*, macierzanka piaskowa *Thymus serpyllum* [2, 7, 10].

### 3.5. Saponiny

Są szeroko wykorzystywane w pielęgnacji i kosmetyce, gdyż ułatwiają przenikanie do skóry innych składników. Służą do produkcji szamponów, płynów kąpielowych, past do zębów. Dodaje się je do kąpeli leczniczych przy atopowym zapaleniu skóry, wykwitach skórnych oraz do płukanek do włosów. Źródłem saponin jest np. nagietek

lekarski *Calendula officinalis*, stokrotka pospolita *Bellis perennis*, bazylija pospolita *Ocimum basilicum*, tymianek pospolity *Thymus vulgaris* [2, 7, 10].

### 3.6. Kumaryny

Należą do roślinnych związków fenolowych, wywodzących się z pochodnych kwasu cynamonowego. Występują w postaci wolnej lub związanej, najczęściej jako glikozydy, czasem są także składnikami olejków eterycznych. Gromadzone są w różnych organach roślin, głównie w owocach i kwiatach rodzin selerowatych, rutowatych, bobowatych, oliwkowatych, astrowatych i wiechlinowatych. Niektóre z nich mają właściwości rozkurczowe, przeciwgorączkowe, przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze. Do roślin zawierających kumaryny należą m.in. świetlik łąkowy *Euphrasia rostkoviana*, kasztanowiec zwyczajny *Aesculus hippocastanum*, pietruszka zwyczajna *Petroselinum crispum* [2, 7, 10].

## 4. Postacie leków ziołowych

Produktem wyjściowym do sporządzenia leku ziołowego jest surowiec roślinny świeży lub suchy, poddany ewentualnemu rozdrobniению, stosowany pojedynczo lub w zestawach (mieszkankach). Zasadą tworzenia różnych postaci ziół jest ściśle określona doza/dawka rozdrobnionego surowca (jednorodnego lub mieszanki) oraz wody, której używa się do ich przygotowania. Postaciami leków ziołowych są napary, odwary, wywary, maceraty, wyciągi olejowe, proszki, przysypki, zasyпки oraz soki ze świeżych owoców i warzyw, gotowane z cukrem syropy, wyciągi spirytusowe (nalewki), powidła [2, 11-22].

### 4.1. Napar

Jest najczęściej spotykaną formą leku ziołowego. Przygotowanie naparu ma na celu wydobyć z danego surowca roślinnego ciała czynnych. Napary sporządza się z surowców łatwo dających się ekstrahować wodą – liści, kwiatów, drobnych nasion. Napar przygotowuje się podobnie, jak herbatę, dlatego często jest nazywany herbatką ziołową. Dobrze rozdrobniony surowiec roślinny (najczęściej w ilości 1-2 łyżek) zalewa się wrzątkiem (najczęściej w ilości 200-250 ml) i pozostawia na pewien czas pod przykryciem (około 15-20 minut). Naczynie w którym parzymy zioła powinno być przykryte. Napary są nietrwałe i w cieple szybko mętnieją. Należy przygotować taką ilość naparu, jaka będzie spożyta w ciągu 24 godzin, a latem – w ciągu 12 godzin. Napary stosowane są zarówno do użytku wewnętrznego, jak i zewnętrznego [2, 8, 11-14, 15, 22].

### 4.2. Odwar

Sporządza się z surowców roślinnych trudno dających się ekstrahować, jak kora, korzenie, kłącza, grube nasiona, cebule, bulwy, surowce krzemionkowe. Rozdrobniony surowiec zalewa się zimną wodą i gotuje 10-40 minut, co jest uzależnione od rodzaju surowca i wskazań. Przygotowany odwar odstawia się na 20-30 minut pod przykryciem, po czym filtruje. Odwar powinno się zużyć zaraz po przygotowaniu, choć można go przechowywać w lodówce przez 3 dni. Odwary używane są wewnętrznie lub zewnętrznie [2, 8, 11-15, 22].

### 4.3. Macerat

To wodny wyciąg sporządzony z surowców roślinnych zawierających składniki wrażliwe na wysoką temperaturę. Wyciąg zimny jest otrzymywany przez zalanie ziół

zimną lub letnią wodą i pozostawiony na jakiś czas (najczęściej na noc), by w wodzie rozpuściły się zawarte w roślinie substancje. Rozdrobniony surowiec zalewa się wodą o temperaturze 20-22°C i pozostawia pod przykryciem na 8-12 godzin, potem filtruje. Maceraty można przechowywać w lodówce przez 3 dni [2, 8, 11-15, 22].

#### **4.4. Wyciągi olejowe**

Uzyskuje się poprzez zalanie pogniecionych, rozdrobnionych świeżych surowców roślinnych bogatych w olejki eteryczne olejem (słonecznikowym, sojowym, winogronowym lub oliwą). Zawsze na 1 część surowca dajemy taką samą 1 część oleju (stosunek 1:1). Oleje należy przechowywać w ciemnych i w chłodnych miejscach (lodówka). Oleje ziołowe mogą być używane do kąpieli, nacierañ, okładów oraz do użytku wewnętrznego zastępując w pewnym stopniu olejki eteryczne. Oleje ziołowe zawierają w swym składzie nie tylko olejki eteryczne, ale także składniki balastowe, które rozpuszczają się w tłuszczach, np. chlorofil, karoteny, ksantofile, enzymy, witaminy rozpuszczalne w tłuszczach, żywice, woski, kwasy tłuszczowe, alkaloidy [2, 7, 23-25].

#### **4.5. Proszki, przysypki, zasyпки**

Proszki uzyskujemy po silnym rozdrobieniu suchego surowca zielarskiego, np. w młynku do kawy. Sproszkowane zioła można zażywać doustnie lub mieszać z miodem. Proszki do użytku zewnętrznego nazywane są przysypkami lub zasypkami. Przysypki składają się z jednego lub więcej ciał leczniczych oraz podłoża, które ma na celu nadanie zasypcie odpowiedniej postaci i lepszej przyczepności do skóry. Najlepszym podłożem do przysypek jest talk, skrobia pszenna, mąka ziemniaczana, glina koalinowa. Sproszkowane zioła można używać do wyrobu maści, past, zawiesin i galaretek ziołowych [2, 13-15].

### **5. Zbiór i przechowywanie ziół**

Czas zbioru rośliny decyduje o wartości surowca. Właściwości lecznicze roślin czy poszczególnych ich organów, zmieniają się w okresie wegetacji, dlatego należy zwrócić uwagę na porę roku, porę dnia, warunki pogodowe, sposób zbioru, czystość surowca. Zioła alkaloidowe najlepiej pozyskiwać wiosną i wczesnym latem, gdyż wtedy ilość alkaloidów w wakuolach jest maksymalna. Najlepszym czasem zbioru dla roślin olejkowych jest początek kwitnienia, dla korzeniowych – koniec wegetacji. Igliwie świerkowe i sosnowe powinno się zbierać w styczniu lub w lutym, gdyż właśnie w tych miesiącach zawiera najwięcej witaminy C (ok. 200 mg/100 g), podczas gdy w okresie letnim stężenie kwasu askorbinowego w igliwiu zmniejsza się o połowę [2, 3, 13-15].

Naczelną zasadą w przypadku samodzielnego zbierania ziół jest dokładna znajomość botaniczna zbieranych roślin. Powinno się zbierać rośliny w dni pogodne, suche, w godzinach południowych i wczesnych popołudniowych (po obeschnięciu rosy lub przed rosą wieczorną), gdyż wówczas jest największe stężenie olejków eterycznych i glikozydów w komórkach roślinnych. W dni pogodne, suche i słoneczne rośliny są lekko przywędnięte, co jest spowodowane spadkiem poziomu nawodnienia tkanek (obniżeniem turgoru) i zebrane wówczas surowce zielarskie szybko schną i odznaczają się wysoką wartością składników. Zioła powinno się zbierać do koszy wiklinowych lub worków wykonanych z materiałów przewiewnych, np. płóciennych

i lnianych. Surowiec roślinny układa się luźno, nie wolno go ugniatać, gdyż ulegnie zaparzeniu [2, 3]. Ziół nie należy zbierać ze stanowisk będących blisko ruchliwych ulic, ścieków, wysypisk śmieci, fabryk, pól uprawnych, na których dokonywano lub dokonuje się opryski środkami ochrony roślin. Niedopuszczalne jest wyrwanie roślin leczniczych z korzeniami – zielarz dokonuje zbioru ziół zawsze z poszanowaniem zasad ochrony przyrody [2, 3].

Zioła lub utrwalone leki roślinne należy przechowywać w szczelnych, zamykanych opakowaniach, najlepiej szklanych lub puszkach. Każde opakowanie powinno być odpowiednio oznaczone – nazwą i datą, gdyż zioła mają swój określony czas przechowywania, najczęściej 1 rok. Zioła nie powinny być przechowywane w temperaturze wyższej niż pokojowa ani w środowisku wilgotnym [2, 3].

## **6. Stosowanie roślin leczniczych**

Powinno się stosować leki ziołowe o znanym działaniu, dokładnie oznaczone, pochodzące z pewnego źródła (sklepy zielarskie i apteki, zebrane samodzielnie) i w prawidłowy sposób przyrządzone. Nie wolno stosować ziół nieznanego pochodzenia, nie oznaczonych, po terminie ważności, wykazujących jakiegokolwiek różnicę w stosunku do stanu pierwotnego (chyba, że producent o takich zmianach poinformował i uznał za normalne). Najczęściej leki ziołowe stosuje się doustnie, ale można je stosować także zewnętrznie – do okładów, kompresów, nacierań, lewatyw, kąpieeli, pędzlowania i płukania np. jamy ustnej i gardła [2, 3, 13-15].

## **7. Rośliny lecznicze stosowane w pielęgnacji małego dziecka**

Spośród wielu roślin leczniczych, istotne miejsce zajmują te, które przeznaczone do stosowania u małych dzieci. Dziecięca fitoterapia wymaga jednak przestrzegania pewnych zasad.

Bardzo ważny jest właściwy wybór surowca zielarskiego. Musi on być standaryzowany, o najwyższych wymaganiach jakościowych i normach czystości, pochodzący z kontrolowanych, ekologicznych i atestowanych plantacji [12-15, 27-28].

Rośliny lecznicze u małych dzieci stosuje się z powodzeniem zarówno w celach profilaktycznych, jak i wielu chorobach. Należy jednak pamiętać, że wszelkie problemy zdrowotne muszą być konsultowane z lekarzem pediatrą i tylko za jego zgodą można stosować domowe przetwory ziołowe czy gotowe roślinne środki farmaceutyczne. Leki roślinne mogą bowiem wchodzić w interakcje z lekami, które dziecko w tym czasie przyjmuje i osłabiać lub nasilać ich działanie [12-15, 27-29].

Organizm małego dziecka jest bardzo wrażliwy i charakteryzuje się wieloma odrębnościami morfologicznymi, fizjologicznymi oraz różnicami aktywności enzymatycznej i metabolicznej w porównaniu do dzieci starszych i osób dorosłych. Występuje przewaga procesów przyswajania nad wydalaniem, są znacznie mniejsze zdolności detoksykacyjne. Dlatego małym dzieciom należy podawać zioła w ściśle określonych dawkach, które powinny być ustalone przez lekarza w oparciu o wiek dziecka, masę ciała i aktywność fizyczną [27, 29]. Dawka często jest też podana na opakowaniu surowca roślinnego. W przypadku wątpliwości, przyjmuje się, że u dzieci od 1 do 3 roku życia, sporządzony napar z 1 łyżki ziół i 1 szklanki wrzątku, powinien być rozcieńczony wodą w ten sposób, że 2 części naparu rozcieńcza się 3 częściami wody [15].



Stosowanie roślin leczniczych u małych dzieci powinno rozpoczynać się od podawania ich pojedynczo i w niewielkich ilościach, obserwując uważnie dziecko, czy nie pojawiły się niepokojące objawy świadczące np. o uczuleniu na daną roślinę [12-15, 27, 29].

Nie wolno podawać małym dzieciom roślin o silnym działaniu leczniczym w postaci wyciągów alkoholowych, np. nalewek. Naparów i odwarów z ziół nie należy słodzić cukrem. Dla poprawienia smaku można ewentualnie dodać miód pszczele, który można stosować u małych dzieci po ukończeniu pierwszego roku życia pod warunkiem, że dziecko nie jest uczulone na produkty pszczele. Ważne jest także właściwe przetworzenie i przygotowanie odpowiedniej formy podania przetworu ziołowego zarówno do użytku wewnętrznego, jak i zewnętrznego [12-15, 27-29].

W terapii pediatrycznej stosuje się wiele roślin leczniczych. W schorzeniach układu oddechowego z trudnością w odkrztuszaniu zaleca się roślinne preparaty wykrztuśne, sekretolityczne i przeciwzapalne (wyciągi z ziela tymianku, korzenia pierwiosnka, liści bluszczu pospolitego), a także zioła o działaniu osłaniającym (porost islandzki, liść babki lancetowatej, liść podbiału, korzeń prawoślazu) [12-15, 24, 27-31, 39]. Leki roślinne znajdują również uznanie jako środki pomocnicze w profilaktyce i leczeniu chorób skóry i dróg moczowych. Wykazują działanie dezynfekujące, przeciwzapalne i akwaretyczne (zwiększające klirens wody, jednocześnie oszczędzające potas). Zalecane najczęściej surowce roślinne, to owoc żurawiny, liść mącznicy, brusznicy i brzozy, ziele nawłoci oraz naowocnia fasoli [12-15, 27, 30, 32-37, 40-41]. Wiele roślin można stosować w zaburzeniach psychosomatycznych u dzieci. Mogą być przyjmowane w stanach niepokoju, stanach lękowych, trudnościach w zasypianiu. Zastosowanie w pediatrii mają np. przetwory z kozłka lekarskiego, preparaty z szyszek chmielu, liści melisy lekarskiej, kwiatu lawendy [12-15, 27, 30, 42, 43].

Rośliny zielarskie aktywizują mechanizmy odpornościowe, ułatwiają przyswajanie składników pokarmowych, dostarczają witamin, soli mineralnych, antyoksydantów i wielu innych cennych substancji, niezmiernie istotnych dla zdrowia dziecka. Są też lepiej tolerowane niż syntetyczne leki i drogeryjne środki do pielęgnacji. Dlatego właściwe i rozważne stosowanie roślin leczniczych u małych dzieci jest zalecaną i bezpieczną formą zarówno profilaktyki, jak i terapii oraz pielęgnacji małych dzieci [12-15, 31].

W pielęgnacji małego dziecka stosuje się różne zabiegi, które są pomocne nie tylko w zachowaniu codziennej higieny, ale także w łagodzeniu wielu dolegliwości. Wykorzystuje się do nich wiele roślin leczniczych. W tabeli 1 przedstawiono wybrane rośliny lecznicze stosowane w zabiegach pielęgnacyjnych, natomiast w tabeli 2 działanie farmakologiczne wybranych roślin stosowanych w celach pielęgnacyjnych u małych dzieci.

Tabela 1. Wybrane rośliny lecznicze stosowane w zabiegach pielęgnacyjnych u małych dzieci

Problemy i dolegliwości	Zabiegi pielęgnacyjne	Rośliny lecznicze
Zapalenie jamy ustnej, afty, pleśniawki	Pędzłowanie, przymoczki, płukanki	Bazylia, rozmaryn, szalwia, rumianek, tymianek, macierzanka, nagietek
Niepokój, pobudzenie, problemy z zasypianiem	Aromaterapia, inhalacje	Melisa, lawenda, majeranek, rumianek
Wykwity skórne, świąd skóry	Zmywania, przemywania, okłady, kompresy, kąpiele	Rumianek, koper włoski, lawenda, rumianek, szalwia, tymianek, nagietek, macierzanka, bazylia
Gorączka	Okłady, zawijania, kąpiele	Rumianek
Ból ucha	Kompresy, aromaterapia	Bazylia, rumianek, tymianek
Ból głowy	Kompresy, aromaterapia	Lawenda
Kaszel	Inhalacje, aromaterapia	Rumianek, anyż, bazylia, koper włoski, majeranek, tymianek, melisa, szalwia, macierzanka, lawenda, babka lancetowata
Nieżyt nosa, katar, katar sienny	Inhalacje, aromaterapia	Majeranek, natka pietruszki, rumianek, tymianek, szalwia, koper włoski, pokrzywa, macierzanka, lawenda, babka lancetowata,
Dolegliwości żołądkowe	Masaż, okłady, kąpiele	Anyż, koper włoski, majeranek, rumianek
Pielęgnacja włosów	Płukanie, masaż	Bazylia, natka pietruszki, rumianek, szalwia
Pielęgnacja oczu	Przemywanie, okłady, kompresy	Rumianek, koper włoski, nagietek, babka lancetowata

Skaleczenia, zadrapania	Przemywanie, okłady, kompresy	Lawenda, rozmaryn, rumianek, szalwia, tymianek, babka lancetowata
Ukąszenia przez owady	Zmywania, przemywania, okłady, kompresy	Bazylija, lawenda, rumianek, szalwia, babka lancetowata

Źródło: Opracowanie własne na podstawie literatury [2, 12-15, 21]

Tabela 2. Działanie farmakologiczne wybranych roślin stosowanych w celach pielęgnacyjnych u małych dzieci

Działanie	Roślina
Działanie aseptyczne/dezynfekujące	Rumianek pospolity, tymianek pospolity, macierzanka piaskowa, szalwia lekarska; olejek: tymiankowy, lawendowy, rumiankowy, rozmarynowy, szalwiowy
Działanie ściągające	Szałwia lekarska
Działanie przeciwzapalne	Rumianek pospolity, nagietek lekarski, szalwia lekarska, babka lancetowata, rozmaryn lekarski, lawenda wąskolistna
Działanie łagodzące i gojące	Nagietek lekarski, rumianek pospolity, babka lancetowata, szalwia lekarska
Działanie regenerujące	Szałwia lekarska, nagietek lekarski
Działanie pobudzające krążenie	Szałwia lekarska, lawenda wąskolistna
Działanie uszczelniające i uelastyczniające naczynia krwionośne	Lawenda wąskolistna
Działanie napinające i ujędrniające skórę	Szałwia lekarska, babka lancetowata
Działanie sebestatyczne	Nagietek lekarski, babka lancetowata, pietruszka zwyczajna; olejek: macierzankowy, fenkułowy
Działanie promieniochronne	Rumianek pospolity

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [7, 12-15]

Do wykonywanych najczęściej zabiegów pielęgnacyjnych należą zabiegi hydroterapeutyczne – kąpiele, obmywania, okłady, zawijania, kompresy. W zabiegach tych stosuje się rośliny lecznicze, które mają nie tylko dobry wpływ na wrażliwą skórę dziecka, ale i łagodzą wiele dolegliwości – zmniejszają stany zapalne, łagodzą świąd skóry, pomagają obniżyć gorączkę [12-15, 25, 33-37].

Do kąpieli wykorzystać można zarówno suszone surowce roślinne, jak i sporządzone z nich napary, odwary i olejki eteryczne. Odpowiednio przygotowany i odcedzony napar lub odwar wlewa się do przygotowanej na kąpiel ciepłej wody. Susz ziołowy można włożyć do specjalnie w tym celu uszytych woreczków płóciennych lub gazy, zawiązać i wrzucić do kąpieli. Zmienione chorobowo miejsca na skórze można dodatkowo delikatnie obmywać saszetką z ziołami [8, 12-15].

Kompresy i okłady mogą być stosowane zarówno na zimno, jak i na ciepło. Ciepłe działają rozluźniająco na mięśnie, łagodzą ból, poprawiają krążenie. Zimne – zmniejszają obrzęk i stan zapalny, obniżają gorączkę, łagodzą bóle głowy, zalecane są w urazach i siniakach. Do kompresów i okładów wykorzystuje się bawełniane lub lniane ściereczki, gazę lub saszetki z ziołami. Okłady przygotowuje się ze świeżych lub suszonych ziół, z których po zalaniu wodą otrzymuje się papkę, którą nakłada się na przykrytą gazą skórę. Okład okrywa się drugą warstwą gazy lub bawełnianą ściereczką albo ceratką [8, 12-15].

W stanach zapalnych jamy ustnej, aftach i pleśniawkach u małych dzieci rośliny lecznicze wykorzystywane są do pędzlowania, przymoczków i płukanek [12-15]. Zioła wykorzystać można także do przemywania, kompresów i okładów powiek, zarówno profilaktycznie, jak i przy stanach zapalnych i schorzeniach oczu [12-15].

Napary z ziół wykorzystuje się do inhalacji. Para wodna i substancje zawarte w ziołach nawilżają skórę i błony śluzowe dróg oddechowych, działają oczyszczająco i odkażająco. Stosuje się je, np. w infekcjach układu oddechowego, przy katarze i kaszlu [12-15]. W inhalacjach często wykorzystuje się także olejki eteryczne, których składniki mogą działać bezpośrednio na drogi oddechowe lub po wchłonięciu przez błony śluzowe wraz z krwiobiegiem dostać się do innych narządów. Inhalacja z olejkami polega na wkropieniu do ciepłej wody około 2-5 kropli olejku, a następnie wdychaniu unoszących się oparów. Dla zwiększenia wydajności można wykonywać tę czynność pod ręcznikiem. Alternatywną metodą jest skrapianie porowatej ceramiki czy pościeli. Olejkiem można również skropić ściereczki, które rozwiesić można w pokoju, gdzie przebywa dziecko. Istnieją również specjalne urządzenia, tzw. odparowywacze służące do inhalacji [21, 35, 36, 39].

Olejki eteryczne są często wykorzystywane w artoterapii [12-15, 21, 39]. Podawane są przede wszystkim drogą wziewną (inhalacje, aerozole) lub przez skórę (balsamy, maści, kąpiele aromatyczne) oraz błony śluzowe (płyny aromatyczne do płukania jamy ustnej i gardła) [12-15, 21, 39]. Prosta i skuteczną formą leku zewnętrznego, działającego przez skórę, stosowanego u dzieci powyżej pierwszego roku życia, są balsamy. Wciera się je w skórę klatki piersiowej i pleców, ale nie naciera się skóry szyi, twarzy ani ciała na dużym obszarze. Stosowanie olejków aromatycznych może spowodować wystąpienie działań niepożądanych, z których najczęstszymi są różnorodne reakcje skórne: podrażnienie, reakcja alergiczna czy indukcja okresowej nadwrażliwości na promienie UV. Przy stosowaniu olejków eterycznych konieczne jest wykonanie próby przez wtarcie odrobiny środka aromatycznego w zgięcie łokciowe i kilkuminutową obserwację, czy nie występuje w tym miejscu zaczerwienienie bądź obrzęk czy swędzenie [12-15, 21, 35, 36, 39]. Najczęściej drażniącymi bądź alergizującymi skórę olejkami są: cynamonowy, goździkowy, z trawy cytrynowej, cytrusowy, dlatego nie powinno się ich używać u małych dzieci [21, 35, 36, 39]. Do natarcia skóry dziecka nie używa się nigdy czystego, nierozcieńczonego olejku eterycznego. Stosuje się roztwory olejku eterycznego (3-5 kropli) w oliwie, neutralnym oleju roślinnym (oleju jadalnym, migdałowym, jojoba, z wiesiołka) lub w innej podstawie tłuszczowej (apteczne podstawy maściowe, stałe tłuszcze zwierzęce) [12-15, 39]. Oleje stosowane do rozcieńczania olejków aromatycznych muszą być świeże i bez zapachu. Artoterapię stosuje się często u dzieci w celu uspokajającym,

przeciwstresowym. W tym celu wykorzystywany jest głównie olejek lawendowy, melisowy, rozmarynowy. Zapach wydzielany przez rośliny można wykorzystać także, ustawiając w pomieszczeniu, gdzie przebywa dziecko, doniczki z uprawianymi roślinami, np. melisą, tymiankiem, lawendą [12-15, 21].

Olejki aromatyczne wykorzystuje się również do masażu u dzieci, pamiętając, że bezpośrednio na skórę nie należy stosować olejków nierozcieńczonych. Masaż ma działanie relaksujące, poprawia ukrwienie skóry, co ułatwia wchłanianie olejku, jego głębszą penetrację i szybsze działanie. Masaż aromaterapeutyczny może być masażem ogólnym całego ciała i/lub masażem miejscowym, w zależności od celu zabiegu. We wszystkich przypadkach do masażu stosuje się mieszaniny olejku rozpuszczonego w naturalnych olejach roślinnych. Do jednego masażu zużywa się mniej więcej 2-3 krople mieszaniny olejków rozpuszczonych w łyżce stołowej oleju roślinnego [12-15, 21, 35, 36, 38].

Roślin leczniczych wykorzystywanych w pielęgnacji małych dzieci jest bardzo dużo, dlatego na potrzeby niniejszej pracy wybrano i omówiono te z nich, które nie tylko posiadają cenne właściwości zdrowotne, ale jednocześnie są łagodne i odpowiednie dla małych dzieci.

### 7.1. Rumianek (*Matricaria chamomilla* L.)

Doniesienia o medycznym zastosowaniu rumianku sięgają starożytnego Egiptu oraz Grecji i Rzymu. Jego właściwości opisywali już Hipokrates oraz Dioskurides, który zalecał rumianek do łagodzenia bóli brzucha i jako środek przeciwzapalny. Przez wieki zalecano stosowanie rumianku w bezsenności, nerwobólach, bólach głowy, reumatyzmie, stanach zapalnych skóry, niestrawności, wzdęciach [10, 12-15, 31, 35, 36, 46, 47].

Obecnie rumianek jest jedną z najszerzej stosowanych i najlepiej udokumentowanych medycznie roślin leczniczych na świecie. Surowcem zielarskim są kwiaty (koszyczki) rumianku, a głównym składnikiem leczniczym jest olejek eteryczny (0,5-1,5%). W jego skład wchodzi m.in. chamazulen, bisabolol, mircen, kadenin, chamawiolina i spatulenol. Chamazulen wykazuje działanie przeciwzapalne, polegające na hamowaniu wyzwolania endogennej histaminy, pobudzaniu czynności układu makrofagów oraz wzmaganiu aktywności fagocytowej leukocytów. Działa przeciwalergicznie, przeciwskurczowo, wiatropędnie, bakteriobójczo. Stosowany jest powszechnie w wielu stanach chorobowych, w tym o podłożu alergicznym, np. astmie oskrzelowej, katarze siennym, alergicznym zapaleniu skóry [8, 12-15, 31, 35, 36, 46, 47].

Składnikami rumianku są kumaryny: umbeliferon i herniaryna oraz flawonoidy, m.in. 7-glukozydy: apigeniny (około 0,5%), tj. kosmosyna, luteoliny, kwercetyny, patuletyny, chryzospitenetyna, chryzoeriol. Istotną rolę odgrywają też cholina oraz śluz (0,5-17%), galaktoza, glukoza, ksyloza, ramnoza i fruktan. [10, 46].

Rumianek może być używany zarówno wewnętrznie jak i zewnętrznie. Wewnętrznie, w postaci naparów, stosowany jest w stanach zapalnych przewodu pokarmowego, nadmiernej fermentacji, wzdęciach, odbijaniu, zgadze, niestrawności, bólach brzucha, braku łaknienia, nudnościach, wymiotach, biegunkach, stanach skurczowych żołądka i jelit oraz zapaleniu dróg moczowych, przeziębieniach, alergii, w przypadkach niepokoju, bezsenności i innych problemów ze snem. Wykazuje właściwości przeciwbakteryjne i grzybobójcze względem odpowiednio bakterii Gram-

dotadnich i *Candida albicans* [8, 10, 12-15, 46].

Zewnętrznie rumianek stosowany jest w postaci naparu w przypadku zadrapań i skaleczeń, wyprysków skórnych, bólów reumatycznych, do płukania przy stanach zapalnych jamy ustnej i gardła. Napar można używać też do zimnych kompresów i okładów przy bólach głowy, do obniżenia gorączki, zmniejszenia obrzęku i bólu przy urazach, do przecierania skóry przy egzemie i trądziku, swędzących wysypkach, ukąszeniach owadów. Ciepłe kompresy działają kojąco na zmęczone, opuchnięte i podrażnione powieki. Kąpiele rumiankowe łagodzą stany zapalne skóry i obniżają napięcie nerwowe [8, 10, 12-15, 46].

W pielęgnacji małych dzieci rumianek ma wiele zastosowań. Używa się go w postaci naparu do przemywania skóry w wypryskach alergicznych, w AZS, pokrzywce, podrażnieniach (również po przebywaniu na słońcu), wyprzeniach, pieluszkowym zapaleniu skóry, a także do okładów na miejsca ukąszone przez owady [8, 10, 12-15, 46]. Kąpiele z dodatkiem rumianku stosuje się zarówno profilaktycznie, jak i w stanach zapalnych skóry [12-15].

Świeżo przygotowane napary rumiankowe stosuje się do przemywania oczu zdrowych (w celach higienicznych i prewencyjnie dla ochrony przed bakteriami) lub przy zapaleniu spojówek. Napary z rumianku mogą służyć do pędzlowania, przemoczków i płukania jamy ustnej przy aftach, pleśniawkach, stanach zapalnych i bolesnych nadżerkach [12-15]. Napar do okładów, płukania jamy ustnej i przemywania skóry oraz oczu sporządza się z ½-1 łyżki koszyczków rumianku, a do kąpeli używa się 30-50 g surowca na wanienkę wody [8, 12].

W stanach zapalnych górnych dróg oddechowych można stosować inhalacje z rumianku. Gdy dziecko ma kaszel, sapkę, jest przeziębione lub gorączkuje, dobrze jest dla dezynfekcji powietrza rozwieszać w pobliżu łóżeczka dziecka (ale nie nad nim) pieluszkę lub gazę zmoconą w gorącym, parującym naparze rumiankowym, aby dziecko oddychało lotnymi substancjami surowca. Można też usiąść z dzieckiem na kolanach obok naczynia z parującą wodą, do której dodano kilka kropli olejku rumiankowego, okryć głowę prześcieradłem lub ręcznikiem kąpielowym i poodychać przez kilka minut (wspólnie z dzieckiem), aromatyczną parą rumiankową, działającą przeciwbakteryjnie [12]. Można także używać olejku rumiankowego lub saszetek z suszonymi kwiatami do aromatoterapii [12].

U dzieci, tak jak i u dorosłych, dość często spotykane jest uczulenie na pyłki lub kontakt (dotyk) z roślinami z rodziny *Compositae*. Najczęściej powodem tych uczuleń są bylice z rodzaju *Artemisia*, np. bylica zwyczajna *Artemisia vulgaris* lub piołun *Artemisia absinthium*. U dzieci, u których stwierdza się nadwrażliwość na rośliny z rodziny *Compositae*, nie zaleca się podawania rumianku lekarskiego, gdyż możliwe jest wystąpienie alergii krzyżowej [12].

## 7.2. Babka lancetowata (*Plantago lanceolata* L.)

Babka lancetowata (zwana także babką wąskolistną lub jęczyczkami polnymi) była rośliną leczniczą stosowaną od wieków w starożytnych Chinach. W medycynie ludowej używano jej jako środka przeciwbakteryjnego, przeciwzapalnego, w leczeniu chrypki, suchego, przewlekłego kaszlu, nieżytów przewodu pokarmowego, dróg moczowych. Okłady ze świeżych liści babki pomagały na trudno gojące się rany, złamania i opuchlizny [10, 17, 49].

Liście babki lancetowatej zawierają flawonoidy, garbniki, kwasy organiczne (askorbinowy, fumarowy, benzoesowy, cynamonowy, wanilinowy), substancje śluzowe, pektyny oraz sole mineralne (związki krzemu, żelaza, magnezu, potasu, cynku) i witaminy (A, C, K). W liściach występują także glikozydy irydoidowe oraz propionowe i fenylotanoidowe. Zawartość poszczególnych składników chemicznych zależy od pory zbioru rośliny. Surowcem leczniczym babki lancetowatej są liście lub cała roślina, rzadziej stosuje się korzeń lub nasiona [10, 12, 49-52].

Babka ma bardzo szerokie działanie: przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, wykrztuśne, przeciwkaszlowe, przeciwzapalne, osłaniające, regulujące przemianę materii, uodparniające. Prócz tego przyspiesza gojenie się ran, pobudza wydzielanie soków trawiennych, zwiększa łaknienie [10, 12]. W kosmetyce wykorzystuje się jej właściwości przeciwzapalne, antyseptyczne i regenerujące do produkcji lotionów, kremów i maseczek do skóry tłustej ze skłonnością do trądziku oraz problematycznej. W kuchni można używać surową babkę do sałatek jako dodatek do kanapek oraz w postaci naparu do kuracji wzmacniających i odtruwających [10, 13, 14]. Napar i sok z babki zalecany jest w zaburzeniach trawienia i przemiany materii, nieżytach dróg oddechowych, stanach zapalnych dróg moczowych [10, 12, 53].

Zewnętrznie babka stosowana jest u małych dzieci w postaci naparów i soku, a także świeżych liści do okładów na skaleczenia, otarcia i oparzenia. Okłady i przemywania wykorzystywane są w zapaleniu spojówek, i po ukąszeniu owadów, a napary do pędzlowania i płukania jamy ustnej [10, 12-15]. Napar do okładów oraz przemywań skóry i oczu przygotowuje się z 1 łyżki rozdrobnionych suchych liści, zalanych szklanką wrzącej wody i rozcieńczony wodą 1:1 [12].

### 7.3. Nagietek lekarski (*Calendula officinalis* L.)

O nagietku jako roślinie leczniczej pisali już w starożytności Dioskurides, Teofrast i Pliniusz. W czasach średniowiecza uprawiano go w ogrodach klasztornych. Zalecano kwiaty nagietka jako skuteczne przy zbytnej żółci oraz przy ciężkim oddychaniu, zaostreniu wzroku [2, 10]. W czasach renesansu na Śląsku nagietek był uprawiany dla pozyskiwania przyprawy korzennej, zastępującej szafran. Barwiono nim masło i farbowano nici do szycia [2, 10].

Nagietek zawiera wiele substancji czynnych, z których ważną grupą są antyoksydanty – saponozydy triterpenowe, flawonoidy, triterpeny. W kwiatostanach nagietka występują olejek eteryczny (0,02%), poliacetyleny, karotenoidy – głównie likopen i ksantofil oraz polisacharydy ramnoarabinogalaktyny i arabinogalaktyny, także fitosterole, kwasy fenolowe i sole manganu [54].

Obecnie nagietek jest szeroko wykorzystywany w kosmetyce – do pielęgnacji skóry zniszczonej, suchej i bardzo wrażliwej. Dodany do kąpieeli, działa przeciwzapalnie i odprężająco. Wchodzi w skład past do zębów, mydeł i szamponów. Olejek nagietkowy wykorzystywany jest w aromaterapii [10, 54, 55]. Alkoholowe i olejowe wyciągi przyspieszają ziarninowanie i bliznowacenie wszelkich uszkodzeń skóry. Stosowane są do gojenia ran i blizn po zabiegach operacyjnych, łagodzą stany zapalne. Wyniki wielu prac wskazują na skuteczne działanie wyciągów z kwiatów nagietka przeciw bakteriom, wirusom i grzybom. Aktywność antyutleniająca kwiatów nagietka ma istotne znaczenie w łagodzeniu skutków uszkodzeń skóry przez promieniowanie UV i różnego rodzaju naświetlania [56].

Kwiaty nagietka przyspieszają regenerację komórek naskórka, łagodzą stany zapalne, działają przeciwbakteryjnie, przeciwgrzybiczo i przeciwwirusowo. Nagietek stosowany jest leczniczo w stanach zapalnych skóry oraz błon śluzowych jamy ustnej i gardła. Przyspiesza proces gojenia w przypadku oparzeń termicznych oraz zranień skóry. Nagietek stosowany jest wewnętrznie głównie w postaci naparów, wyciągów wodnych i alkoholowych, a zewnętrznie głównie jako napar lub wykorzystuje się świeże rośliny [10, 12-15, 17, 25, 35, 36, 54, 55].

U małych dzieci napar sporządza się z 1/2-1 łyżki wysuszonych kwiatów na szklaną wrzącą wodę i rozcieńczony wodą w stosunku 1:1. Można go używać do kąpieli, przemywania oczu, okładów i obmywań skóry oraz pędzlowania, tamponowania i płukania jamy ustnej przy aftach, opryszczkowym zapaleniu jamy ustnej [12-15].

Z kwiatów nagietka sporządzać można również macerat (do bezpośredniego stosowania na podrażnioną skórę, rozstępy, blizny, do masażu), maść (na otarcia, zadrapania, siniaki, łagodne oparzenia, do masażu) oraz ocet nagietkowy (łagodzi oparzenia i podrażnienia, ukąszenia owadów). Macerat sporządza się napełniając słoik suszonymi kwiatami nagietka i zalewa olejem (oliwa z oliwek, olej słonecznikowy, olej ze słodkich migdałów). Słoik odstawić należy w ciemne, ciepłe miejsce na sześć tygodni i codziennie wstrząsać. Gotowy macerat przelewa się do ciemnej butelki i przechowuje w lodówce. Można go także wykorzystać do sporządzenia maści. Macerat (100 ml olejowego maceratu nagietkowego) i воск pszczeli (15 g) wlewa się do miseczki, którą umieszcza się w kąpeli wodnej, na niewielkim ogniu (temp. 60-80 stopni, woda nie może się gotować!) i pozostawia do całkowitego rozpuszczenia się wosku. Płyn przelewa się do niewielkich pojemników, pozostawiając je otwarte do zastygnięcia maści. Tak przygotowany preparat przechowuje się w lodówce. Do przygotowania octu napełnia się słoik (najlepiej z kłamrą, typu weck) świeżymi kwiatami nagietka i zalewa octem np. jabłkowym i odstawia w ciemne miejsce na około cztery tygodnie (regularnie należy potrząsać słoikiem – najlepiej raz dziennie). Po upływie miesiąca ocet przelewa się do butelki i przechowuje w lodówce. Przed użyciem do przemywań skóry należy zmieszać łyżkę octu z 2-3 łyżkami wody i przelać do niewielkiej butelki z atomizerem [55, 57].

#### **7.4. Pokrzywa zwyczajna (*Urtica dioica* L.)**

Pokrzywa, pomimo swoich wielu cennych właściwości, była (i jest nadal) rośliną niedocenianą i traktowaną jako uciążliwy chwast. Wartość pokrzywy znano i opisywano już w starożytności. Pisał o jej leczniczym działaniu m.in. Hipokrates, Pedanios Dioskurydes i Pliniusz Starszy. Stosowano pokrzywę jako środek do tamowania krwotoków, leczenia zatruc i oparzeń. Sok z pokrzywy zalecany był na żółtaczkę, astmę, gruźlicę i kolki. Rzymianie stosowali zabieg zwany utricatio, polegający na biczowaniu pokrzywami i przypisywali mu niezwykłą skuteczność w leczeniu wielu chorób, w tym cholery [10, 13-15, 58, 59, 60]. W średniowieczu opisywała lecznicze zastosowanie pokrzywy Hildegarda z Bingen, a także Paracelsus. W leczeniu zaburzeń nefrologicznych (m.in. kolki nerkowej i krwimoczu) stosował pokrzywę Mikołaj Kopernik, opierając się głównie na pracach Awicenny [2, 61]. W Rosji i w Afryce pokrzywa była stosowana przy obrzękach, bieguncie i robaczycy. W lecznictwie ludowym w Polsce pokrzywę stosowano przy schorzeniach skóry, pielęgnacji włosów i łupieżu, astmie, kaszlu, w chorobach układu pokarmowego i krwionośnego oraz przy



przeziębieniach. W końcu XX wieku pokrzywa zyskała ponownie na znaczeniu wraz z rozwojem wiedzy o jej właściwościach żywieniowych, kosmetycznych i leczniczych [2, 15, 59, 60].

Wszystkie części pokrzywy, ale w największym stopniu liście, zawierają kwas pantotenowy, krzemowy i mrukowy oraz flawonoidy, garbniki, związki aminowe, fitosterol, lecytynę, sole mineralne (żelazo, magnez, mangan, fosfor, miedź, potas, krzem, wapń) oraz witaminy (A, E, K, C, B, kwas foliowy) [2, 10, 15, 59-60]. Włoski parzące zawierają serotoninę, acetylocholinę, histaminę i prawdopodobnie leukotrieny. Serotonina i histamina biorą udział w zwiększaniu poziomu czynnika wzrostu nerwów, który aktywuje neurony odbierające wrażenie bólu. Ten mechanizm analgezji, przez parzące działanie pokrzywy, w wyniku silnej stymulacji receptorów urazowych, odbierających bodźce negatywne, jest podobny do mechanizmu działania kapsaicyny i akupunktury [2, 10, 59, 60].

Z uwagi na cenne bioskładniki pokrzywę wykorzystuje się obecnie zarówno w medycynie, jak i kosmetyce oraz w kuchni. Zaliczana jest do roślin określanych, jako jedzenie, które leczy [2, 10, 14-15, 59]. Dodaje się ją do sałatek warzywnych, sporządza z niej pesto, gotuje się z niej zupy, zakwasza jak kapustę [2, 10, 14-15, 59]. W kosmetyce służy do produkcji mydeł, kremów, lotionów przeznaczonych do cery tłustej i wrażliwej. Odwary z korzenia używane są do stymulacji wzrostu oraz pielęgnacji włosów, zwalczania łojotoku i łupieżu. Kąpiele i parówki z dodatkiem pokrzywy mają działanie tonizujące i oczyszczające [2, 10, 14-15, 58-60].

Lecznico pokrzywa ma zastosowanie wewnętrzne i zewnętrzne. Napary i wyciągi wodne stosuje się w schorzeniach dróg moczowych, obrzękach, niezżytach żołądkowo-jelitowych, zaburzeniach metabolicznych, niedokrwistości, zaburzeniach miesiączkowania, chorobie reumatycznej, schorzeniach skórnych. Jest środkiem pomocniczym w leczeniu cukrzycy. Wpływa dodatnio na procesy przemiany materii, pobudza działalność gruczołów wydzielania wewnętrznego i zwiększa ilość krwinek czerwonych. Wzmacnia organizm, wzbogaca w witaminy i sole mineralne, działa detoksykacyjnie usuwając z organizmu szkodliwe produkty przemiany materii. Poprawia pracę wątroby i trzustki, pobudza perystaltykę jelit, pobudza apetyt, pomaga w biegunkach [2, 10, 14-15, 58-60].

W pielęgnacji małych dzieci pokrzywa ma wiele zastosowań. Napary i odwary wykorzystuje się do przemywań, okładów i kąpeli w chorobach i urazach skóry [13-15]. Można ją stosować do płukania i przemywania włosów i skóry głowy. W skład pokrzywowej płukanki wchodzi: ½ szklanki sproszkowanych liści pokrzywy oraz 4 łyżki rozmarynu, 5 łyżek liści brzozy, 5 łyżek szalwii lekarskiej. Składniki miesza się i wsypuje do pojemnika. Z 2 łyżek mieszanki i 2 litrów wody przygotowuje się odwar, którym płucze się włosy po ich umyciu [13-15, 60]. Do mycia włosów dziecka można użyć też samego soku z pokrzywy, który miesza się z szamponem, używanym do mycia włosów dziecka. Dodaje się 1 łyżkę soku do takiej ilości szamponu, jaką stosuje się do jednorazowego umycia włosów. Włosy myje się tą mieszanką około 3 minut, delikatnie masując skórę głowy [2, 13-15, 60]. Do wzmocnienia włosów służyć może także tonik pokrzywowy. Do jego sporządzenia wykorzystuje się około 50 ml soku z pokrzywy, 15 łyżek soku z brzozy, 10 ml nalewki z miłorzębu japońskiego i 5 ampulek Biostyminy (wyciąg z aloesu). Składniki wlewa się do ciemnej szklanej

butelki i odstawia na tydzień. Otrzymany tonik rozcieńcza się pół na pół z ciepłą wodą i wciera lub wmasowuje w skórę głowy. Tonik poprawia ukrwienie skóry, wzmacnia i regeneruje włosy [2, 13-15, 60].

### **7.5. Lawenda wąskolistna, lekarska (*Lavandula officinalis*)**

Zapach lawendy towarzyszył ludziom od najdawniejszych czasów. Nazwa *Lavandula* pochodzi od łacińskiego słowa *lavo*, *lavare* znaczy myć, kąpać się. W starożytnej Rzymie i Grecji kwiaty lawendy były ulubionym dodatkiem do kąpieli, a dym ze spalanych gałązek traktowano jak kadzidło. Wierzono, że lawenda zapobiega chorobom zakaźnym – w średniowieczu używano jej do walki z dżumą. Lawenda była ulubionym zapachem królowej Elżbiety I, a woda lawendowa *lavender water* stała się narodowym pachnidłem Anglików. Hildegarda z Bingen oraz Paracelsus zalecali lawendę jako lek działający uspokajająco, przeciwświądowo i nasennie [2, 10, 40].

Surowcem zielarskim są kwiaty lawendy oraz otrzymywany z nich olejek lawendowy. Zawierają one: linalol (do 30%), octan linalolu (do 60%), limonen, β-ocymen, eukaliptol, kamforę, terpineol, borneol, tlenek kariofilenu, związki alifatyczne, kwasy fenolowe, triterpeny, kumaryny, flawonoidy, sterole, sole mineralne [2, 10, 13-15, 62-67].

Olejek lawendowy łagodzi podrażnienia skóry, działa oczyszczająco, antyseptycznie, regenerująco i odmładzająco na skórę. Niszczy bakterie, które powodują infekcje skóry, obniża nadprodukcję łoju, zapobiega występowaniu blizn. Stosuje się go do leczenia zmian skórnych i trądziku. Wpływa też na skórę głowy, pomagając przy regeneracji włosów, ogranicza też ich wypadanie. Polecany jest dla skóry wrażliwej, również u dzieci. Jest szeroko wykorzystywany w przemyśle kosmetycznym do wyrobu perfum, wód kolońskich, płynów do kąpieli, mydeł, kremów, toników i do nadawania zapachu wielu innym produktom kosmetycznym. Lawenda stosowana jest również do produkcji środków odstraszających owady [2, 10, 13-15, 62-67].

W medycynie lawenda stosowana jest wewnątrznie i zewnątrznie. Wewnątrznie – najczęściej w postaci naparów. Działa uspokajająco w pobudzeniu nerwowym, atakach paniki i hysterii, bezsenności, lękach, depresji. Olejek lawendowy ułatwia też trawienie, reguluje zaburzenia gastryczne, kolki, wzdęcia, nudności, działa wiatropędnie i przeciwskurczowo oraz znieczulająco w obrębie przewodu pokarmowego. Zalecany jest przy przeziębieniu, katarze, zapaleniu gardła, astmie. Działa przeciwbólowo przy reumatyzmie, migrenie, bólach głowy, zapaleniu ucha [2, 10, 13-15, 62-67]. Zewnątrznie naparów z lawendy używa się do pędzlowania oraz płukania jamy ustnej i gardła, do nacierania przy bólach mięśniowych i przeziębieniu. Napary lawendowe i olejek zaleca się do kąpieli i parówek, inhalacji przy schorzeniach górnych dróg oddechowych oraz mazideł i balsamów łagodzących bóle mięśniowe i stawowe. Stosowane są także do smarowania skóry po ukąszeniach owadów i oparzeniach słonecznych. Masaż olejkami lawendowym relaksuje i ułatwia zasypianie [2, 10, 13-15, 62-67].

U małych dzieci zalecane są kąpiele z dodatkiem lawendy do codziennej pielęgnacji oraz przy problemach ze skórą, a także przy moczeniu nocnym. Do takiej kąpieli przygotowuje się mieszanekę z kwiatów lawendy, ziela tymianku i krwawnika (po 100 g ziół na jedną kąpiel), którą zalewa się zimną wodą na noc, a przed kąpielą podgrzewa się i dodaje do kąpieli. Kąpiel lawendowa zalecana jest również u dzieci przy

problemach z zasypianiem, w łagodzeniu lęku i stresu. Do kąpieli wykorzystujemy ½-¾ szklanki suszonych kwiatów lawendy oraz 10 kropli olejku lawendowego i 2 l wody. Kwiaty lawendy wsypuje się do garnka, zalewa wodą i gotuje pod przykryciem (na małym ogniu) około 5 minut. Następnie odstawia się na pół godziny, nie zdejmując pokrywki. Odwar odcedza się i wlewa do wody przygotowanej do kąpieli. Tuż przed kąpielą wkropić można olejek lawendowy. Kąpiel powinna trwać około 15 minut i być powtarzana 1-2 razy w tygodniu, przed snem [2, 10, 13-15, 62-67].

Przy infekcjach układu oddechowego u dzieci stosować można inhalacje z wykorzystaniem kwiatów lawendy lub olejku lawendowego, a także masaż z użyciem balsamu z olejkiem. Wciera się delikatnie 3-12 kropli balsamu w skórę klatki piersiowej lub/i okolice międzyłopatkową i masuje okrężnymi ruchami palców. Po masażu dziecko należy ciepło okryć. Zabieg ten można powtarzać 2-3 razy dziennie przez 2-5 dni [2, 10, 13-15, 62-67]. Przy stanach zapalnych i bólach uszu można stosować ciepłe woreczki wypełnione suchymi kwiatami lawendy (również innymi ziołami, np. rumiankiem) i przykładane na bolące ucho. Na problemy z zasypianiem i łagodzenie skutków stresu u dzieci świetnie działa także aromaterapia. Zapach lawendy obniża napięcie nerwowe, wpływa na pozytywny nastrój, ułatwia zasypianie i działa antyseptycznie. Do tego celu można również wykorzystać tę roślinę uprawiając ją w doniczce lub zawieszając woreczki wypełnione suszonymi kwiatami w różnych miejscach w mieszkaniu, zwłaszcza tam, gdzie dziecko bawi się lub śpi [2, 10, 13-15, 62-67].

## 7.6. Szałwia lekarska (*Salvia officinalis* L.)

Nazwa łacińska szalwii – *salvia* – pochodzi od łacińskiego słowa *salvare*, co znaczy leczyć, uzdrowiać i nadana została tej roślinie w hołdzie dla jej wielu zalet leczniczych. W starożytnej Grecji i Rzymie przypisywano szalwii wszechstronne, wręcz cudowne właściwości. Wykorzystywano ją do przygotowywania wielu leków a jako przyprawę dodawano do potraw. Napar z liści i kwiatów zalecano jako środek wzmacniający i żołądkowy, leczono szalwią bóle kręgosłupa, urazy, udary, porażenia, napady padaczkowe, znużenie i nadmierną senność [2, 10, 68]. W średniowieczu wierzono, że szalwia ma siłę nadprzyrodzoną – może chronić przed demonami i gorączką, a nawet śmiercią. Używano jej do kąpieli niemowląt, jedzono w czasach epidemii (3 listki szalwii rankiem żute miały chronić na cały dzień przed morowym powietrzem). O szalwii pisała Hildegarda z Bingen i Paracelsus. Szalwia pochodzi z rejonu Morza Śródziemnego, a obecnie uprawia się ją w całej Europie. Ma zastosowanie w lecznictwie, kosmetyce, kuchni, jako roślina ozdobna. Uważna jest za jedną z ważniejszych roślin olejkowych [2, 10, 68].

Surowcem zielarskim są liście szalwii oraz ulistnione szczyty pędów. Ziele szalwii służy do otrzymywania olejku eterycznego. Liście i ziele zawierają te same substancje czynne, ale w różnych ilościach. Ze względu na różnorodność związków biologicznie czynnych, liść szalwii lekarskiej uważany jest za lek roślinny o wszechstronnym działaniu. Zawiera olejek eteryczny (1-2,5%) bogaty w tujon, cyneol, kamforę, garbniki, fenolokwasy, saponiny, trójterpeny, flawonoidy, związki goryczkowe, żywice, sole mineralne (potas, wapń, fosfor, sód, mangan, cynk, bor, miedź, molibden, żelazo, magnez), witaminy (B1, C, A). Skład chemiczny olejku jest zmienny, w zależności od terminu zbioru surowca [2, 10, 68-71].

Olejek szałwiowy ma działanie przeciwzapalne, ściągające, odkażające, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe. Zwiększa wydzielanie soków trawiennych, działa wiatropędnie, hamuje nadmierne pocenie się. Leczy trądzik i opryszczkę, likwiduje ropne zapalenie mieszków włosowych. Zmniejsza przepuszczalność naczyń włosowatych, ma działanie ściągające i przeciwkrwotoczne. Stosowany jest w zapaleniu oskrzeli jako środek aseptyczny i przeciwzapalny [2, 10, 13-15, 68-71]. Liść szałwii jest jednym z ważniejszych surowców polecanych w profilaktyce i leczeniu schorzeń stomatologicznych, zapaleniu dziąseł, aftach [72]. Szałwia jest skuteczna w problemach żołądkowych, wzdęciach i w bieguncie. Stosowana jest w nadmiernej potliwości różnego pochodzenia, nadpobudliwości nerwowej, zatruciach [2, 10, 13-15, 68-71]. Zewnętrznie stosuje się szałwię do pędzlowania i płukania jamy ustnej, dziąseł i gardła, do przemywania, okładów i kąpeli. Okłady z naparu stosuje się na trudno gojące się rany, oparzenia, odmrożenia oraz po użądleniu przez owady.

W kosmologii szałwia lekarska ma wiele zastosowań dzięki właściwościom dezynfekującym, ściągającym i przeciwzapalnym. Olejek stosowany jest do past do zębów, płynów do płukania ust, dezodorantów, mydeł, szamponów, preparatów łagodzących podrażnienia skóry, a w przemyśle perfumeryjnym – w kompozycjach wód kolońskich i toaletowych. Odwar z szałwii wzmacnia cebulki włosów i zapobiega ich wypadaniu [2, 10, 13-15, 68-71].

U małych dzieci w postaci naparów i odwarów stosuje się szałwię do przemywania skóry oraz kąpeli, a także do smarowania miejsc po ukąszeniach owadów. Napar zalecany jest również do pędzlowania, przymoczków i płukania jamy ustnej w stanach zapalnych i pleśniawkach oraz do inhalacji w schorzeniach dróg oddechowych [13-15].

### **7.7. Macierzanka piaskowa (*Thymus serpyllum*)**

Surowcem zielarskim jest ziele oraz otrzymany z niego olejek. Macierzanka zawiera olejki eteryczne (tymol, cyneol, karwakrol), garbniki, flawonoidy, związki goryczkowe, kwasy organiczne, sole mineralne. Olejek macierzankowy działa przeciwzapalne, bakteriobójcze, wykrztuśne, spasmolitycznie [10, 65].

Macierzanka ma działanie dezynfekujące, wykrztuśne, przeciwzapalne.. Wykorzystywana jest w ziołolecznictwie wewnętrznie w postaci naparu, który stosowany po jedzeniu poprawia trawienie, działa wiatropędnie, rozluźnia mięśnie układu pokarmowego i łagodzi wzdęcia. Napar zalecany jest także przy nieżytach górnych dróg oddechowych (łagodzi suchy, uporczywy kaszel) oraz schorzeniach dróg moczowych. Zewnętrznie naparu używa się do pędzlowania i płukania jamy ustnej i gardła, a także do okładów na trudno gojące się rany, po ukąszeniach owadów, oparzeniach i bólach reumatycznych. Służy też do przemywania i kąpeli – łagodzi świąd i wykwyty skóry. Stosuje się napar macierzankowy także przy uszkodzeniach skóry, owrzodzeniach, liszajach i egzemie. Ma też działanie wzmacniające i regenerujące organizm – używana jest do kąpeli u rekonwalescentów, chorych dzieci i osób starszych [10, 66]. W kosmetyce jest składnikiem kremów, płynów do przemywania twarzy, mydeł. Jest też używana do pielęgnacji włosów, zwłaszcza słabych, wypadających, ze skłonnością do łupieżu [10].

Macierzankę w pielęgnacji małych dzieci, z uwagi na jej właściwości przeciwbakteryjne, stosuje się głównie w postaci naparów do pędzlowania i płukania jamy ustnej, do przemywania i okładów na skórę oraz kąpeli. Kąpiele mają też wpływ wzmacniający i uspokajający [12]. Macierzanka zalecana jest także do inhalacji – działa rozkurczająco na mięśnie gładkie oskrzeli i ułatwia oddychanie. Olejek można stosować także jako formę aromaterapii [13-15].

### 7.8. Koper włoski, fenkuł (*Foeniculum vulgare*)

Nazwa łacińska *foeniculum* oznacza pachnące siano, natomiast słowiańskiej nazwie koper przypisuje się pochodzenie od słowa kopeć, co znaczy zapach [2]. Fenkuł to jedna z najstarszych roślin leczniczych, znana w medycynie chińskiej, staroegipskiej, greckiej, rzymskiej i arabskiej. Zaliczany był do siedmiu świętych roślin, a stosowano go w chorobach przewodu pokarmowego oraz jako środek moczopędny, wiatropędny i wzmacniający wzrok [2, 8, 10]. Egipcjanie spożywali go po posiłkach, by poprawić trawienie. W średniowieczu znano około 200 recept na jego stosowanie. W medycynie ludowej wywar ze sproszkowanych nasion kopru uważano za środek ogólnie wzmacniający. Stosowano go do przemywania oczu i ran oraz nacierania głowy [2, 10]. W dawnej Polsce kopru włoskiego używano jako wykwentnej przyprawy i wszechstronnie działającego leku, stosowanego m.in. przy gorączce, bólach głowy, napotnie i wzmacniająco [2].

Surowcem zielarskim są owoce kopru oraz otrzymany z nich olejek koprowy (koperkowy). Owoce prócz olejku zawierają substancje białkowe, flawonoidy, związki kumarynowe, cukry, sole mineralne. Olejek koperkowy ma charakterystyczny, przyjemny zapach i słodkawy smak. Zawiera anetol, safranol, aldehyd anyżowy, cytral, metylochawikol, fenchon, pinen oraz metyloizoeugenol, kamforę i limonen [2, 10, 64].

Olejek stosuje się w kosmetyce do aromatyzowania perfum, mydeł i past do zębów. Wywar z kopru służy do wcierania w skórę głowy, jako środek pobudzający wzrost włosów, a także nadaje im połysk i przyjemny zapach. Napar stosuje się do przemywania skóry twarzy i całego ciała [2, 10]. Olejek koprowy wykorzystuje się jako tonik do skóry oraz do masażu (usprawnia krążenie limfy) [8]. Owoce kopru działają wiatropędnie, żółciopędnie, przeciwbakteryjnie, przeciwpasożytniczo, przeciwgrzybiczo, napotnie i moczopędnie. Pobudzają apetyt, łagodzą zaburzenia gastryczne, zwiększają wydzielanie soku żołądkowego i jelitowego, podwyższają kwasowość treści żołądkowej, wywierają wpływ spazmolityczny na miocyty gładkie (rozkurczowo). Poprawiają gospodarkę płynami ustrojowymi (cellulit, otyłość) i działają na system hormonalny kobiet (menopauza) [64].

Koper włoski stosowany jest głównie w pediatrii, jako lek pobudzający trawienie i perystaltykę jelit oraz działający korzystnie w spastycznych zaparciach i kolkach niemowlęcych, ułatwiając usuwanie gazów jelitowych. Jest też dobrym lekiem wykrztuśnym, używanym często w postaci naparu oraz miodu koperkowego (po 1 roku życia) [73].

W pielęgnacji małych dzieci koper włoski ma wielorakie zastosowanie. Napary z owoców kopru stosować można do tamponowania, pędzlowania i płukania jamy ustnej oraz przemywania oczu w stanach zapalnych. Zalecany jest także do przymoczków i pędzlowania jamy ustnej przy aftach [10, 13, 14]. Właściwości przeciwzapalne

i przeciwbakteryjne olejku koprowego wykorzystuje się do inhalacji w leczeniu ostrych i przewlekłych nieżytów dróg oddechowych. Inhalacja działa nawilżająco i dezynfekująco na zmienione zapalnie błony śluzowe, upłynnia zalegającą wydzielinę, ułatwiając oddychanie [8, 10, 12-15]. Olejek koprowy stosować można także do masażu brzuszka u małych dzieci, jako jeden ze składników oliwki, w skład której wchodzi: 1-2 łyżki olejku migdałowego i po 1 kropli olejku koperkowego, kminkowego i rumiankowego. Oliwka znosi napięcie mięśniowe przewodu pokarmowego, działa rozkurczająco na jelita, a prócz tego uspokaja i ułatwia zasypianie [10, 12]. Izolowany olejek koprowy nie może być stosowany u niemowląt i małych dzieci ze względu na działania uboczne ze strony układu oddechowego, m. in. stany skurczowe krtani [74].

## **8. Rośliny przyprawowe stosowane w diecie małego dziecka**

Rośliny przyprawowe są obecne w diecie człowieka od wielu tysięcy lat. Były wykorzystywane jako substancje wzbogacające smak i zapach żywności, zwiększające jej trwałość i wartość odżywczą, a także ze względu na korzystne działanie zdrowotne. Właściwości przypraw, podobnie jak i ziół leczniczych, uwarunkowane są obecnością w nich substancji biologicznie czynnych. Są to m.in. alkaloidy, glikozydy, śluzy, gorycze, olejki eteryczne, flawonoidy, enzymy, hormony roślinne, witaminy. Wiele składników surowców roślinnych, jak błonnik, kwas foliowy, chlorofilina mają działanie ochronne w wielu schorzeniach nowotworowych. Rośliny i ich wyciągi są także cennym źródłem wielu mikroelementów (Fe, Cu, Zn, Mo, Co, Mn, Cr). Forma, w jakiej występują one w ziołach, jest łatwo przyswajalna dla organizmu człowieka. Przyprawy mogą działać uspokajająco (melisa, bazylia), przeciwzapalnie (majeranek), mogą obniżać ciśnienie krwi (melisa), pobudzać wydzielanie soku żołądkowego i ułatwiać przyswajanie pokarmów. Rośliny przyprawowe, które zawierają fitoncyny, odznaczają się właściwościami bakteriobójczymi i uodparniającymi (cebula, czosnek, papryka, chrzan). Szczególnie interesujące są właściwości antyoksydacyjne ziół. Zawarte w ziołach związki takie, jak fenylopropanoidy, terpeny, flawonoidy i antocyjany poprawiają metabolizm cholesterolu, działają bakterio- i wirusobójczo (kuminaldehyd zawarty w kminie rzymskim, eugenol w goździkach, cynamal w cynamonie, czosnek). Obiecujące są wyniki badań nad właściwościami przeciwnowotworowymi związków zawartych w ziołach przyprawowych oraz ich wpływem na rozwój cukrzycy typu 2 i funkcje poznawcze. Wraz ze wzrostem stosowania alternatywnych środków dla niesteroidowych leków przeciwzapalnych w leczeniu przewlekłego stanu zapalnego wzrasta również zainteresowanie przeciwzapalnymi właściwościami ziół [6, 74-85].

Zioła przyprawowe mogą być pomocne przy utrwalaniu wielu produktów spożywczych, co pozwala na zmniejszenie bądź zastąpienie dodatku chemicznych środków konserwujących. Stosowanie ziół przyprawowych sprzyja ograniczeniu dodawania do potraw składników, takich jak sól czy cukier, które w nadmiarze są niekorzystne dla zdrowia. Zawarte w roślinach przyprawowych lotne związki aromatyczne zwiększają odczucie smaku słonego, a dodanie niektórych przypraw (np. cynamonu, wanilii, goździków, anyżu) do potraw słodkich pozwala na mniejszy dodatek do nich cukru. Mając na uwadze dobroczynny wpływ ziół przyprawowych na zdrowie, eksperci Instytutu Żywności i Żywienia opracowując Piramidę Zdrowego Żywienia i Aktywności Fizycznej, która została opublikowana i upowszechniona w roku 2016, zdecydowali się uwzględnić w niej również zioła przyprawowe. Piramida

ta w większym stopniu niż wcześniejsze zalecenia żywieniowe, podkreśla znaczenie roślin, w tym przyprawowych dla zdrowia i wskazuje, że powinny być one podstawą prawidłowego żywienia, również u dzieci [86, 87].

Odpowiednia dla wieku małego dziecka dieta z uwzględnieniem roślin przyprawowych nie tylko dostarcza wielu cennych składników odżywczych, ale umożliwia także przygotowanie szerokiego i zróżnicowanego asortymentu potraw bez dodatku soli i cukru. Jest to niezmiernie istotne, gdyż pierwsze trzy lata życia to okres krytyczny dla rozwoju określonych preferencji i nawyków żywieniowych, które utrwalają się i mają ogromny wpływ nie tylko na wrażliwy organizm małego dziecka, ale i na jego zdrowie w przyszłości. Badania dotyczące wpływu żywienia na organizm człowieka dowodzą, że największą rolę w prewencji chorób cywilizacyjnych odgrywa sposób i jakość żywienia w okresie prenatalnym oraz podczas trzech pierwszych lat życia. Za tę zależność odpowiada tzw. programowanie żywieniowe oraz kształtowanie zwyczajów i nawyków żywieniowych we wczesnym dzieciństwie. Programowanie żywieniowe zakłada, że różne narządy i układy organizmu charakteryzują się specyficznymi okresami krytycznymi w rozwoju, podczas których istnieje możliwość programowania metabolizmu poprzez odpowiednie żywienie. Szczególne potrzeby niemowląt i małych dzieci wynikają z niedojrzałości układów, zwłaszcza nerwowego, pokarmowego i odpornościowego oraz zmniejszonej zdolności detoksykacyjnej organizmu. Dlatego nieodpowiedni poziom składników odżywczych może w sposób trwały zmienić (przeprogramować) metabolizm i przebieg procesów fizjologicznych, a przez to wpłynąć negatywnie nie tylko na rozwój psychofizyczny dziecka, ale także zwiększyć predyspozycje do wystąpienia w przyszłości wielu chorób, m.in. otyłości, zaburzeń gospodarki węglowodanowej i lipidowej, cukrzycy typu 2, nadciśnienia tętniczego, chorób serca, chorób neurodegeneracyjnych i nowotworowych [88-92].

W rekomendacjach żywieniowych zaleca się stosowanie w diecie małych dzieci takich dodatków, jak pestki dyni, słonecznika, wiórki kokosowe, migdały, orzechy, sezam, siemię lniane oraz świeże i suszone zioła: bazylię, majeranek, miętę, kolendrę, pieprz, pieprz cytrynowy, pieprz ziołowy, kminek mielony, ziele angielskie, liść laurowy, kmin rzymski, cynamon, gałkę muszkatołową, curry, kurkumę, imbir, zioła prowansalskie i inne przyprawy lub mieszanki ziołowe bez soli i glutaminianu sodu. Dozwolone dla dzieci w wieku 1-3 lata są również herbatki owocowe i ziołowe w saszetkach, np. z rumianku, mięty [88-92].

Wprowadzanie roślin przyprawowych do diety małego dziecka wymaga jednak ostrożności, dlatego powinno się je wprowadzać stopniowo, zgodnie z zasadą, że każdy nowy składnik diety wprowadzamy osobno i w minimalnych ilościach, obserwując reakcję dziecka [28, 93-96]. W potrawach dla małych dzieci powinno się unikać przypraw ostrych i produktów lub surowców roślin egzotycznych, pochodzących z innej strefy klimatycznej (np. ziół azjatyckich), mieszanek ziołowych o bardzo zróżnicowanym składzie jakościowym (mieszanek złożonych z wielu różnych ziół) oraz mieszanek ziołowych zawierających sól lub glutaminian sodu. Najlepsze są zioła świeże, uprawiane w sposób ekologiczny. Można uprawiać je w przydomowym ogródku, w domu lub na balkonie. Można również stosować zioła suszone [28, 93-96].

Zioła i rośliny przyprawowe można wykorzystać w żywieniu małego dziecka w różny sposób jako dodatek do:

- kanapek – bazyliia, koperek, pietruszka naciowa, pieprz;
- twarożków – anyż, bazyliia, kminek, czarnuszka, oregano, lubczyk, pietruszka naciowa, seler naciowy, tymianek, pieprz, imbir, wanilia;
- zup – bazyliia, kminek, kolendra, lubczyk, pietruszka naciowa, seler naciowy, pieprz;
- dań z jajek – bazyliia, koper włoski, oregano, majeranek, pietruszka naciowa, tymianek, czosnek, pieprz;
- mięsa – bazyliia, gorczyca biała, kminek, kolendra, koper włoski, oregano, lubczyk, majeranek, pietruszka naciowa, seler naciowy, tymianek, liść laurowy, czosnek, pieprz;
- sałatek i surówek – anyż, bazyliia, gorczyca biała, kminek, kolendra, koper włoski, oregano, lubczyk, pietruszka naciowa, seler naciowy, goździki, pieprz, imbir;
- sosów – bazyliia, kolendra, koper włoski, oregano, lubczyk, majeranek, pietruszka naciowa, seler naciowy, tymianek, liście laurowe, czosnek, pieprz, papryka;
- deserów i wypieków – cynamon, anyż, kardamon, imbir, gałka muszkatołowa, wanilia [28, 93-96].

Walory dietetyczne mogą mieć także niektóre surowce zielarskie, używane w terapii, np. liść i korzeń pokrzywy, liść oraz korzeń i kwiaty mniszka lekarskiego, korzeń i liście prawoślazu lekarskiego, kwiaty ślazu dzikiego, liście babki lancetowatej i wiele innych. Z surowców tych w niektórych krajach (np. Czechy, Austria, Włochy, Szwajcaria) przygotowuje się smaczne zupy, leguminy, a nawet desery dla dzieci [28, 13-15, 93-96].

W niniejszym opracowaniu do szerszego opisanie wybrano rośliny uprawiane i stosowane od wielu lat w naszym kraju, zalecane w diecie małego dziecka: pietruszkę, majeranek, koperek, lubczyk, tymianek, bazylię, cząber, kminek, cynamon.

### **8.1. Pietruszka zwyczajna (*Petroselinum crispum*)**

Pietruszka pochodzi z południa Europy. Do Polski sprowadzona została przez królową Bonę (1518 r.). Dzisiaj jest uważana za klasyczne polskie warzywo, ale pierwotnie była uprawiana przede wszystkim w celach leczniczych. Stosowano napary z korzenia w chorobach dróg moczowych, zaburzeniach trawienia (wzdęcia i bóle brzucha), jako środek rozkurczowy i antyseptyczny [2, 10].

Dobroczynne właściwości pietruszki zostały potwierdzone współczesnymi badaniami [2, 10, 97]. Zarówno korzenie, jak i nasiona wywierają pobudzający wpływ na drogi moczowe i zwiększają wydzielanie moczu, poprawiają czynność skóry, uszczelniają naczynia krwionośne, obniżają napięcie mięśniowe żołądka i jelit. Stosowanie pietruszki zaleca się przy zmniejszonym wydalaniu moczu i kamicy moczowej, schorzeniach dróg moczowych. Pietruszka działa oczyszczająco i odtruwająco, przeciwwzapalnie, rozkurczowo, antyseptycznie, wiatropędnie, pobudza wydzielanie śliny i soku żołądkowego, ułatwia trawienie, zmniejsza wzdęcia i kolki. Świetnie wpływa na wzrok i cerę [2, 6, 10, 13, 14, 97].

Pietruszka zawiera wiele substancji biologicznie czynnych. Korzeń zawiera białko, tłuszcze, węglowodany, flawonoidy, związki śluzowe, furanokumaryny, składniki mineralne – wapń, fosfor, żelazo, magnez, witaminę A, C, PP, B1 i B2. Owoce zawierają około 7% olejku eterycznego, flawonoidy, furanokumaryny, fitosterole, żywice i sole mineralne. Szczególnie bogata w witaminy jest natka pietruszki – w 100 g jest 5 mg



żelaza i 177 mg witaminy C (więcej niż w cytrusach), 5510 µg beta-karotenu, 3,1 mg witaminy E, 170 µg kwasu foliowego. Natka obfituje w sole mineralne – magnez, wapń, potas, fosfor, cynk, miedź i mangan. Do gotowanych potraw (zupy, ziemniaki i inne warzywa) powinno się dodawać natkę pietruszki już na talerzu, by nie tracić zawartych w niej witamin. Natkę pietruszki można wprowadzić do diety dziecka już od 6 miesiąca życia [6, 13, 14, 97].

## 8.2. Majeranek (*Origanum majorana*)

Ojczyzną majeranku jest Azja i północna Afryka. Jako cenna roślina lecznicza i przyprawowa używany był już w starożytnym Egipcie. W Europie jest rośliną powszechną w uprawie, cenioną jako roślina przyprawowa, choć wykorzystuje się ją również do celów leczniczych. W Polsce majeranek pojawił się w ogrodach przydomowych już w XVI wieku. Uważano, że wączanie rozartego majeranku wywołuje kichanie, a to odpędza katar, oczyszcza głowę, ostrzy rozum i przywraca pamięć. Był też dodatkiem do maści rozgrzewających. Obecnie majeranek jest używany jako przyprawa, roślina lecznicza i kosmetyczna. Stanowi komponent pieprzu ziołowego [2, 6, 10, 13, 14, 98-100].

Majeranek działa rozkurczająco, wiatropędnie, żółciotwórczo, łagodzi bóle brzucha, zwiększa wydzielanie soku żołądkowego, ułatwia trawienie, hamuje procesy utleniania tłuszczów. Ma właściwości przeciwzapalne, łagodzi katar i kaszel, działa rozgrzewająco, dlatego warto sięgać po majeranek u dzieci w czasie sezonu na infekcje. Zawiera dużo witamin – A, E, K, C, B6, tiaminę, ryboflawinę, niacynę, kwas foliowy oraz minerałów – wapnia, żelaza, magnezu, fosforu, potasu, cynku. Młode, świeże pędy zawierają rutynę i kwas askorbinowy. Majeranek stosowany jest głównie do przyprawiania potraw i jako dodatek do wielu zup (grochowej, fasolowej, kartoflanki, żurku), niektórych rodzajów pieczywa, przetworów z warzyw i wędlin, naleśników, sosów ziołowych, sałatek, farszów pierogowych, ryb. Do celów przyprawowych nadaje się zarówno majeranek świeży, jak i suszony. Suszony majeranek ma mocniejszy aromat niż świeże liście, dlatego najlepiej dodawać go na początku gotowania i w mniejszej ilości niż majeranek świeży (1 łyżka suszonego majeranku = 3 łyżki świeżego majeranku). Majeranek można stosować po ukończeniu 8 miesiąca życia dziecka [13, 14, 96, 98-101].

## 8.3. Koper ogrodowy (*Anethum graveolens* L.)

Pochodzi prawdopodobnie z południowo-zachodniej Azji. Jest rośliną powszechnie uprawianą w Europie i Ameryce Północnej. Surowcem zielarskim jest cała roślina ze szczególnym uwzględnieniem liści i nasion. Wszystkie części rośliny zawierają olejek eteryczny, m.in. karwon, felandren, limonen. Koper posiada również flawonoidy i kumaryny. Jest zasobny w sole mineralne (wapń, żelazo, fosfor, potas) oraz witaminy – zawiera bardzo duże ilości witaminy C, prowitaminę A, witaminę D, E, K, B1, B2, B6, B12, H. Pędy wraz z baldachami stanowią istotny składnik podczas kiszenia ogórków. Napar z liści lub nasion działa lekko uspokajająco i delikatnie obniża ciśnienie krwi. Koperek wspomaga procesy trawienia i usuwa wzdęcia, dlatego polecany jest dla małych dzieci cierpiących z powodu kolki jelitowej i problemów gastrycznych. Świeże listki dodaje się do sałatek, ziemniaków, jaj, mielonego mięsa, zup i ryb. Stanowi świetny dodatek do twarogu oraz serów i kanapek [2, 10, 13, 14, 96].

#### 8.4. Lubczyk ogrodowy (*Levisticum officinale*)

Pochodzi z Afganistanu i Iranu. Był używany jako aromatyczna przyprawa u ludów południowoeuropejskich, w starożytnej Grecji i Rzymie. Jest uprawiany w wielu rejonach świata, również w Polsce. Swoją popularność zawdzięcza wielu właściwościom i szerokiemu zastosowaniu. Już w średniowieczu znane były jego aromaty, które wykorzystywano w kuchni. Stosowano go także przy leczeniu różnych schorzeń i w kosmetyce jako dodatek do kąpieli [2, 10, 102, 103].

Lubczyk zawiera olejek lotny (terpeinol, estry, kwas octowy, kwas walerianowy), skrobię, cukry, żywice, kumarynę, kwasy organiczne, związki ftalidowe (pochodne kwasu ftalowego – butyloftalidy), kumaryny i furanokumaryny (m.in. bergapten i psolaren), kwasy polifenolowe (m.in. kwas kawowy i chlorogenowy), fitosterole [2, 10, 102, 103].

Lubczyk działa moczopędne, wiatropędne, wykrztuśne, detoksykująco, antybakteryjnie. Polecany jest w chorobach dróg moczowych oraz schorzeniach przebiegających ze zmniejszeniem wydalania moczu. Obniża poziom cholesterolu we krwi, zapobiega miażdżycy. Jest bogaty w antyoksydanty, wzmacnia odporność, wykazuje działanie wykrztuśne, dzięki czemu wspomaga leczenie uporczywego kaszlu. Korzystnie wpływa na przebieg procesów fermentacyjnych, działając łagodnie bakteriobójczo na występujące w przewodzie pokarmowym bakterie saprofityczne. Pozytywny wpływ preparatów zawierających lubczyk odnotowano w leczeniu stanów nieżytowych żołądka, niestrawności i braku łaknienia [2, 10, 13, 14, 102, 103].

Lubczyk można dodać do potraw w całości lub posiekać. Najlepiej komponuje się jako dodatek do różnego rodzaju sałatek, kanapek, twarożku, ziemniaków i innych warzyw, sosów, dań mięsnych, rybnych i warzywnych. Stanowi doskonały dodatek do chleba o obniżonej zawartości soli, korzystnie wpływa na cechy wypiekowe mąki i ciasta oraz jakość uzyskanego pieczywa. Wchodzi w skład wielu mieszanek ziołowych, przyprawy Maggi i kostek bulionowych [2, 10, 13, 14, 102, 103].

#### 8.5. Tymianek pospolity (*Thymus vulgaris* L.)

Znany jest też pod nazwą macierzanka tymianek, włoska macierzanka, tymianek ogrodowy. Pochodzi z zachodniej części Basenu Morza Śródziemnego, przede wszystkim z południowych Włoch. Do Europy został przeniesiony prawdopodobnie przez Rzymian, a do Polski dotarł za czasów królowej Bony, za pośrednictwem zakonników. Świeży tymianek, prażony na patelni i przykładany na bolesne miejsca stanowił lek przy artretyzmie i reumatyzmie [2, 10, 99, 104].

Wyciągi wodne tymianku wzmagają wydzielanie śluzu w górnych drogach oddechowych. Stosowane są jako środki wykrztuśne, zwłaszcza u dzieci (*Sirupus Thymi compositus*). Do celów leczniczych stosuje się też napar z tymianku, który wspomaga leczenie kaszlu, zapalenia gardła, oskrzeli i infekcji układu moczowego. Tymianek służyć może jako środek przeczyszczający i działa wspomagająco w różnych dolegliwościach układu pokarmowego, takich jak wzdęcia. Zażywa się go również w celu usunięcia z organizmu pasożytów. Ze względu na silne właściwości odkażające napar z tymianku stosuje się także zewnętrznie do przemywania ran oraz leczenia infekcji w obrębie jamy ustnej. Olejek tymiankowy ma zastosowanie zewnętrzne jako składnik niektórych preparatów przeciwreumatycznych. Działa silnie bakteriobójczo na wszystkie niemal drobnoustroje chorobotwórcze. Tymol wyizolowany z olejku,

wykorzystuje się w stomatologii, wchodzi w skład past do zębów i płukanek do ust. Suszone ziele tymianku zawiera do 3,5 do 5,4% olejku eterycznego. W olejku znajduje się 20-50% pochodnych fenolowych – tymolu i karwakrolu – oraz cyneol, cymen, pinen, linalol, octan linalolu, borneol i octan bornylu. W ziele stwierdzono też zawartość garbników (do 10%), kwasów polifenolowych (kawowy, chlorogenowy), związki trójterpenowe (kwas ursolowy i oleanolowy), flawonoidy, substancje gorzkie, saponiny i składniki mineralne ze znaczną ilością litu [2, 10, 13, 14, 99, 104].

Jako przyprawa nadaje potrawom wyrazisty smak i aromat. Nadaje się doskonale do przyprawiania mięsa i ryb, jajek, zup i sosów, potraw warzywnych, zwłaszcza z pomidorów i warzyw strączkowych. Jest nieodzownym składnikiem bulionów jarzynowych. Tymianek pobudza apetyt i ułatwia trawienie, dlatego poleca się go u dzieci przy braku apetytu. Przyprawą do wielu potraw może być także olej tymiankowy. Gałązkę świeżego tymianku należy włożyć do butelki, zalać oliwą z oliwek lub olejem słonecznikowym, dodać kilka ziarenek pieprzu i odstawić w ciemne miejsce na 2 tygodnie. Olej ten można stosować np. do sałatek warzywnych [2, 10, 13, 14, 99, 104].

### 8.6. Bazylia (*Ocimum basilicum*)

Bazylija pochodzi z Azji Południowej, Środkowego Wschodu i Afryki. Do Polski przywędrowała w XVI w., prawdopodobnie z Włoch. Dziś uprawia się ją na całym świecie w 150 odmianach [2, 10].

Bazylija wspomaga pracę układu trawiennego – stymuluje proces wydzielania soku żołądkowego, poprawia trawienie i ułatwia przyswajanie składników odżywczych z pokarmu. Działa rozkurczająco, zapobiega skurczom żołądka, niweluje nadmiar gazów, dlatego można ją stosować w przypadku niestrawności i przy wzdęciach. Wykazuje skuteczność w zwalczaniu braku apetytu. Stosuje się ją jako środek zapobiegający wymiotom i nudnościom. Posiada właściwości przeciwzapalne i przeciwgorączkowe – łagodnie obniża wysoką temperaturę i rozgrzewa organizm. Ma działanie przeciwdepresyjne, poprawia nastrój, pomaga zwalczyć bezsenność, zmniejsza nadpobudliwość. Wpływa pozytywnie na kondycję skóry [2, 10, 13, 14].

Bazylija zawiera witaminę A, B6, B12, kwas askorbinowy oraz wapń, żelazo, magnez. Olejek bazyliowy (*Oleum Basilici*) jest głównym składnikiem czynnym surowca bazylii. Ma lekko żółtawe zabarwienie i silny korzenny zapach. Jego zawartość w suchym ziele wynosi 0,5-1,5%, w świeżym – 0,02-0,51%. W olejku występuje metylochawikol – do 60%, L-linalol – do 40%, eugenol – do 40%, cineol – do 2,5%, metylocjamid – do 15%, terpen olefinowy. Poza olejkiem surowiec zawiera związki garbnikowe (ok. 5%), saponiny (ok. 0,13%), glikozydy, substancje mineralne (ok. 9%) – zwłaszcza potasu, fosforu, magnezu i wapnia. Olejek bazyliowy jest wykorzystywany w aromaterapii jako środek działający pobudzająco i wzmacniająco przy zmęczeniu [2, 10, 105].

Bazylija jest jednym z najpopularniejszych ziół używanych w kuchni. Swoim wyjątkowym aromatem podkreśla zapach i smak potraw. Dodaje się ją do zup, jajek, omletów, potraw z warzyw strączkowych, cukinii, ogórka, szpinaku, sałaty i innych. Jest najlepszą przyprawą do wszelkiego rodzaju potraw z pomidorem. Gałązka świeżej bazylii dodana do zupy porowej lub ziemniaczanej nadaje im delikatnej zielonkawej barwy. Bazylija, razem z rozmarynem, bazylią, tymiankiem, szalwią, miętą pieprzową,

cząbrem ogrodowym i majerankiem, należy do ziół prowansalskich. Jest też jednym z głównych składników włoskiego sosu pesto [2, 10, 105].

W żywieniu małych dzieci bazylię można stosować po 9 miesiącu życia jako dodatek twarożków, past jajecznych, makaronów, kanapek, pulpetów, ryb, warzyw [96].

### **8.7. Cząber (*Satureja hortensis* L.)**

Cząber pochodzi z rejonu basenu Morza Śródziemnego, Azji Mniejszej i Indii Wschodnich. Przez stulecia cząber odgrywał rolę pożytecznej przyprawy kuchennej, stosowanej w różnych krajach, zwłaszcza w Grecji i w Rzymie. W Polsce jego uprawa i stosowanie do wielu potraw znane są od XI w. W medycynie ludowej stosowany był jako środek pobudzający wydzielanie soków żołądkowych, w nieżytach przewodu pokarmowego, przeciwbiegunkowy, moczopędny, przeciw pasożytniczy, napotny. Aczkolwiek współcześnie roślina odgrywa stosunkowo małą rolę jako środek leczniczy, ale zaleca się go dla poprawy trawienia, przy braku apetytu, w lekkich nieżytach przewodu pokarmowego i nadmiernej fermentacji jelitowej. Podobne działanie lecznicze (środek pobudzający wydzielanie soku żołądkowego, moczopędny, przeciwbakteryjny i przeciwbiegunkowy) przejawia cząber spożywany jako przyprawa. Przeciwdziała nadmiernej fermentacji jelitowej, działa lekko obstrukcyjnie i przeciwbiegunkowo, ma działanie przeciwzapalne, antyseptyczne i wiatropędne [2, 10, 106].

Cząber cechuje się niską kalorycznością i wysoką zawartością składników mineralnych i witamin. Jest bogaty w witaminę A, C, witaminy z grupy B (głównie witaminę B6) oraz cynk, potas i żelazo. Zawiera garbniki, żywice, śluzy i olejki eteryczne, m.in. cymol, karwakrol, kariofyllen, terpineol i pinen. Cząber może być stosowany zarówno w stanie świeżym, jak i po wysuszeniu. Charakteryzuje się silnym, dość ostrym aromatem i korzennym smakiem, zbliżonym nieco do pieprzu. Jest doskonałą przyprawą do wszelkich potraw z warzyw strączkowych (fasola, soczewica, groch), stąd jego nazwa ziele fasolowe. Dodaje smaku zupom o mdłym zapachu – ziemniaczanej, krupnikowi, grochówce. Doskonale łączy się z pomidorem, jest dobrą przyprawą do ziemniaków, ryb, mięsa, sałatek. Wchodzi w skład popularnej przyprawy czubrzyicy, ziół prowansalskich i pieprzu ziołowego. Cząber dodaje się pod koniec przyrządzania potraw, gdyż długo gotowany gorzknieje (wyzwala gorycze) i traci zapach. Cząber świetnie sprawdza się w towarzystwie tymianku. Można nim aromatyzować ocet i olej [107].

### **8.8. Kminek zwyczajny (*Carum carvi* L.)**

Kminek jest jedną z najdawniej uprawianych roślin w Europie, Azji i Afryce. Znany był już w starożytnym Egipcie, Grecji i Rzymie jako środek ułatwiający trawienie potraw z nasion roślin strączkowych. W Polsce używany był jako przyprawa już w czasach Piastów, znalazł się także na listach przypraw miasta Gdańska z roku 1410. Medycyna ludowa w wielu regionach świata zaleca owoce kminku do leczenia różnych dolegliwości. Według starych systemów medycznych Indii kminek jest lekiem wiatropędnym, przeciwskurczowym, ściągającym, leczy biegunkę, dyspepsję i ból głowy. W Rosji stosowany jest w zapaleniu płuc, w Wielkiej Brytanii jako lek żołądkowy i wiatropędny, w Indonezji w stanach zapalnych skóry. W Polsce jest zalecany w doległościach układu pokarmowego, którym towarzyszą stany skurczowe, we wzdęciach, uczuciu pełności, niestrawności i braku apetytu. Związki czynne surowca

działają rozkurczająco na mięśnie gładkie jelit i przewodów żółciowych, wzmagają wydzielanie soku żołądkowego, działają wiatropędnie. Kminek obniża także poziom trójglicerydów, cholesterolu, glukozy. Owoce kminku hamują również wzrost patogenów układu pokarmowego oraz pomagają utrzymać prawidłową masę ciała [2, 10, 108].

Owoce kminku zawierają 3-7% olejku eterycznego z głównymi składnikami: karwonem (50-65%) i limonenem (35-45%). Inne składniki to olej tłusty (10-18%), zawierający kwasy petroselinowy, linolenowy, olejowy i palmitynowy, białko (20%), węglowodany (ok. 15%), kwasy fenolowe, głównie kawowy, i śladowe ilości flawonoidów – kwercetyny, kemferolu i ich glikozydów. Kminek jest cenną przyprawą używana do poprawy smaku potraw oraz aromatyzowania artykułów spożywczych i napojów. Ma charakterystyczny ostry, korzenny smak i zapach. Stosowany jest do przyprawiania sałatek, past i serów, pieczywa, gotowanych warzyw, zup, pieczonych jabłek, mięsa i ryb. U dzieci powinno się stosować kminek mielony, by zminimalizować ryzyko zakrzepienia. Można go podawać po 8 miesiącu życia [27, 96, 108].

## 8.9. Cynamon

Cynamon to popularna przyprawa produkowana z wysuszonej kory cynamonowca cejlońskiego (*Cinnamomum zeylanicum* Blume), który jest wiecznie zielonym, niewysokim drzewem z rodziny wawrzynowatych (*Lauraceae*). Występuje głównie na Cejlonie, Wyspach Szeszelskich, Madagaskarze i Mauritiusie i tam też jest uprawiany. Polskie określenie cynamon wywodzi się z łacińskiego *cinnamomum*, które wcześniej zapożyczono z greckiego *kinnamomon*. Współcześnie w Indonezji i na Malajach cynamon określany jest jako *kayu manis* – słodkie drewno [2, 10, 31, 109].

Zmielone nasiona cynamonowca cejlońskiego używane są w kosmetyce, a olej znalazł zastosowanie w przemyśle perfumeryjnym. Z kory korzeni cynamonowca otrzymuje się kamforę. Olejki cynamonowe z kory i liści stosowane są w aromaterapii. Olejek z kory zawiera aldehyd cynamonowy (65-75%), eugenol (około 10%), kariofilen, kwas cynamonowy, linalol i wykazuje silne właściwości bakteriobójcze oraz grzybobójcze. Wykorzystywany jest w farmacji, stomatologii, a w lecznictwie stosowany jest wewnętrznie przy braku łaknienia, w lekkich stanach skurczowych żołądka i jelit, we wzdęciach i biegunkach. Antyseptyczne właściwości olejku zapobiegają zatruciom pokarmowym i niestrawności, co uzasadnia szerokie używanie kory cynamonowca jako przyprawy. Olejek daje też dobre efekty przy terapii wszelkiego rodzaju przeziębień, infekcji wirusowych, schorzeniach skóry. Stosuje się go w mieszankach przeciwreumatycznych, w zwalczaniu pasożytów skóry (wszy, świerzbu) oraz przewodu pokarmowego. W mieszankach aromatycznych olejek cynamonowy można stosować zarówno do masażu, kąpieli, kompresów, inhalacji [79, 109].

Cynamon stosowany jest w dolegliwościach trawiennych, przy braku łaknienia, uczuciu pełności, wzdęciach, stanach skurczowych żołądka. Wchodzi w skład preparatów poprawiających trawienie (Digesan, Ziola szwedzkie) oraz preparatów o działaniu przeciwbakteryjnym (Aromatol, Amol). Służy do poprawiania smaku i zapachu wielu preparatów farmaceutycznych, zwłaszcza leków zawierających związki o gorzkim smaku, gdyż nadaje im lekko słodki smak. Spożywanie cynamonu redukuje poziom glukozy we krwi, poziom trójglicerydów, LDL cholesterolu i cholesterolu

całkowitego. Włączenie cynamonu do diety może redukować ryzyko czynników związanych z cukrzycą i chorobami sercowo-naczyniowymi [79, 109, 110].

## 9. Podsumowanie

Rośliny zielarskie od wieków były wykorzystywane przez człowieka do różnych celów. Były pożywieniem, surowcem przemysłowym (gatunki barwierskie, włóknodajne i celulozowe), stosowano je do pielęgnacji ciała, w łagodzeniu dolegliwości i leczeniu różnych chorób.

Z uwagi na uznane i szerokie spektrum działania biologicznego i farmakologicznego, rośliny zielarskie odgrywają także współcześnie ogromną rolę w życiu człowieka, co ma też swoje odzwierciedlenie w zgromadzonej i cytowanej w pracy literaturze przedmiotu.

Szerokie zastosowanie w medycynie, farmacji i weterynarii znalazły zwłaszcza rośliny lecznicze, które są surowcem i składnikiem wielu leków. Bez ich udziału trudno też sobie wyobrazić dzisiejszą kosmetologię i kosmetykę. Rośliny lecznicze stosowane są do zabiegów higienicznych i codziennej pielęgnacji. Mają bardzo pozytywny wpływ na skórę, włosy i paznokcie. Pomagają łagodzić podrażnienia skóry i skutki ukąszeń owadów. Surowce zielarskie, zwłaszcza olejkodajne, szeroko wykorzystuje się w lecznictwie i kosmetyce, aromaterapii, a także do aromatyzowania produktów spożywczych.

Rośliny przyprawowe, które kiedyś stanowiły głównie dodatek smakowy i zapachowy do potraw, obecnie wykorzystuje się również z uwagi na ich walory lecznicze oraz dietetyczne. Stanowią cenne źródło witamin, minerałów, antyoksydantów oraz innych związków, które potęgują ich działanie. Ich stosowanie ułatwia trawienie i przyswajanie składników pokarmowych, poprawia apetyt i smak potraw, pozwala wyeliminować z diety sól i cukier.

Właściwie dobrane i zastosowane w odpowiedniej dawce rośliny zielarskie wpływają na organizm człowieka łagodnie i wielokierunkowo. Wspomagają leczenie, przywracają równowagę, poprawiają ogólną kondycję organizmu i na ogół nie dają niekorzystnych skutków ubocznych.

Wymienione powyżej cenne właściwości roślin zielarskich sprawiają, że ich stosowanie jest szczególnie istotne u dzieci, zwłaszcza małych, których organizm jest bardzo delikatny i wrażliwy na działanie różnych czynników zewnętrznych.

Na wzrost zainteresowania roślinami zielarskimi ma wpływ coraz bardziej powszechne w społeczeństwie zainteresowanie zdrowym stylem życia. Żyjemy bowiem w czasach, w których z jednej strony mamy możliwość czerpania z bogactwa różnych produktów reklamowanych i oferowanych nam przez producentów, a z drugiej strony coraz częściej zadajemy sobie pytania o jakość oferowanych nam produktów. Czytamy etykiety, sprawdzamy certyfikaty, rozumiemy eko-znaki, pytamy o pochodzenie np. żywności i kosmetyków, stajemy się coraz bardziej świadomi tego, co zagraża naszemu zdrowiu. Zaczynamy rozumieć, że aby zachować zdrowie, musimy unikać czynników, które mają negatywny wpływ na nasz organizm i prowadzić zdrowy styl życia. A zdrowy styl życia to aktywność fizyczna, poszanowanie praw przyrody, zbilansowana dieta oparta na naturalnych składnikach i świadomy wybór kupowanych produktów, w tym kosmetyków. Zasady zdrowego stylu życia szczególnie powinny dotyczyć małych dzieci, gdyż są one zależne od postawy i świadomych wyborów swoich rodziców i opiekunów. To oni decydują, co dziecko je, czym się bawi, gdzie chodzi na spacer, w jaki sposób i za pomocą czego jest pielęgnowane.

Skóra dziecka jest delikatna i podatna na działanie czynników zewnętrznych. Odpowiedni dobór środków do pielęgnacji jest kluczowy, a wśród kosmetyków drogeryjnych trudno znaleźć jest taki, który ma idealnie dopasowany skład do wrażliwej skóry małego dziecka. Nawet w szeroko reklamowanych produktach dedykowanych dla dzieci znaleźć można wiele składników syntetycznych, w szczególności konserwantów, barwników, drażniących związków myjących, olejów silikonowych. Alternatywą są kosmetyki oparte na składnikach naturalnych (np. mydlnicy lekarskiej, olejku migdałowym, ekstraktach roślinnych), posiadające odpowiednie certyfikaty. Jednak jeszcze lepszym, prostszym i tańszym rozwiązaniem jest stosowanie roślin leczniczych do pielęgnacji małych dzieci w warunkach domowych. Wykorzystać je można do kąpieli – zarówno w celach profilaktycznych, jak i w łagodzeniu wysypek i wykwitów skórnych – oraz do okładów, zmywań i przemywań, płukanek, inhalacji oraz aromaterapii.

Roślin przyprawowych powinno się używać zamiast cukru i soli, których spożycie jest niebezpiecznie wysokie. Problem związany z nadmierną ilością cukru i soli w diecie dotyczy zarówno dorosłych, jak i dzieci, ale to u małych dzieci jest bardzo istotny, gdyż zaburza programowanie żywieniowe i powoduje odległe skutki zdrowotne, zwiększając ryzyko pojawienia się w przyszłości wielu chorób cywilizacyjnych, jak np. cukrzycy, nadciśnienia tętniczego, nowotworów.

W wielu raportach z badań, których celem była ocena sposobu żywienia niemowląt oraz dzieci w wieku 1-3 lata znaleźć można informacje na temat istotnych błędów dietetycznych w tym zakresie [88-91]. Szczególną uwagę zwraca się właśnie na dosalanie i dosładzanie potraw dla dzieci oraz spożywanie przez nie słodczy i potraw z dorosłego stołu. Badania wykazały, że tylko 7% mam małych dzieci stosowało się do obowiązujących zaleceń żywieniowych, a jednocześnie aż 85% uważało, że posiada wystarczającą wiedzę żywieniową, by właściwie karmić swoje dzieci. W efekcie około 60% dzieci w wieku 12 miesięcy zbyt wcześnie otrzymywało żywność, która nie była im dedykowana. Wśród dzieci w wieku od 5. do 36. miesięcy aż 83% dzieci otrzymywało posiłki dosalane, a 75% – spożywało nadmierną ilość cukru w diecie. Nieprawidłowo żywione są także małe dzieci w placówkach opiekuńczo-wychowawczych, np. żłobkach, gdyż analiza jadłospisów wykazuje zbyt wysoką kaloryczność racji pokarmowych oraz zawyżoną podaż białka, soli i cukru. Wyniki badań wykazały również inną przyczynę popełnianych błędów żywieniowych przez rodziców i opiekunów. Był to spadek lub brak zainteresowania z ich strony problematyką żywienia dzieci w wieku 13-36 miesięcy. Postawa taka wynikała z przekonania, że dzieci w tym wieku nie wymagają już takich restrykcji dietetycznych, jak niemowlęta i mogą spożywać takie same posiłki i potrawy, jak dorosłe osoby w rodzinie lub gotowe produkty przeznaczone dla dorosłych. Rodzice i opiekunowie sprawdzając smak przygotowywanych posiłków, a nawet gotowych dań dedykowanych małym dzieciom, często oceniają je na podstawie własnych doznań smakowych. Jest to błąd, gdyż małe dzieci akceptują bez problemu niesłodzone i niesolone potrawy dotąd, dopóki tych smaków nie poznają. Potem nieprawidłowe nawyki się utrwalają i dzieci niechętnie spożywają, np. warzywa czy potrawy i napoje bez cukru lub soli. Biorąc pod uwagę ujemny wpływ zwiększonego spożycia soli i cukru na zdrowie, w żywieniu małych dzieci powinno się z nich zrezygnować podczas przygotowywania potraw w domu lub placówkach opiekuńczo-wychowawczych, a także ograniczać ich spożycie, nie podając dzieciom w tym wieku produktów dla nich nieprzeznaczonych.

Rodzice i opiekunowie, personel placówek opiekuńczo-wychowawczych oraz personel medyczny muszą być świadomi zależności między sposobem żywienia oraz stosowaniem produktów do pielęgnacji małych dzieci a zdrowiem dziecka.

Konieczna jest edukacja w zakresie żywienia oraz pielęgnacji małych dzieci z wykorzystaniem roślin leczniczych i przyprawowych, zarówno wśród rodziców, jak i personelu placówek opiekuńczo-wychowawczych. Wiedza w tym zakresie powinna być przekazywana studentom nie tylko na kierunkach medycznych i pielęgniarstwie, ale także pedagogicznych i opiekuńczo-wychowawczych. Jest to o tyle istotne, że ukształtowane nieprawidłowe nawyki w wieku dziecięcym, mogą mieć poważne konsekwencje zdrowotne, społeczne i ekonomiczne w wieku dorosłym.

## Literatura:

1. Sobol E. (red.), *Słownik języka polskiego*, PWN, Warszawa 2002.
2. Tyszyńska-Kownacka D., Starek T., *Ziola w polskim domu*, Wydawnictwo Watra, Warszawa 1988.
3. Jadczyk D., Grzeszczuk M., *Zbiór i konserwacja ziół*, Panacea Nr 4 (17), październik-grudzień 2006, s. 28-31.
4. Zawiślak G., *Lecznicze przyprawy z parapetów okiennych*, Panacea Nr 1 (22), styczeń – marzec 2008, s. 22-23.
5. Różański H., [https://www.biznesstyl.pl/lifestyle/zdrowie/3830\\_moda-na-ziola-i-leki-naturalne-trwa-od-zawsze.html](https://www.biznesstyl.pl/lifestyle/zdrowie/3830_moda-na-ziola-i-leki-naturalne-trwa-od-zawsze.html), dostęp 3.03.2020.
6. Jadczyk D., Grzeszczuk M., *Ziola przyprawowe w kuchni i w apteczce*, Panacea Nr 3 (8), lipiec 2004, s. 16-18.
7. Jędrzejko K., Kowalczyk B., Żbikowska-Bacler B., *Rośliny kosmetyczne*, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Katowice 2012.
8. Kynes S., *Ziołowy ogród*, Wydawnictwo Vivante, Białystok, 2018.
9. Miśkowiec A., *Związki biologiczne czynne w warzywach*, Panacea Nr 4 (41), październik – grudzień 2012, s. 16-17.
10. Wielgosz T., *Wielka księga ziół polskich*, Wydawnictwo ELIPSA, Poznań 2008.
11. Kaczmarczyk M., *Ziola dla smaku, zdrowia i urody*, Wydawnictwo Samo Sedno, Warszawa, 2017.
12. Olechnowicz-Stępień W., Lamer-Zarawska E., *Rośliny lecznicze stosowane u dzieci*, PZWL, Warszawa 1992.
13. Schultz J., Überhuber E., *Leki z Bożej apteki*, Wydawnictwo Nowe Spojrzenia, Warszawa 2017.
14. Schultz J., Überhuber E., *Leki z Bożej apteki dzieciom*, Wydawnictwo Nowe Spojrzenia, Warszawa 2015.
15. Nowak Z.T., *Ziola dla zdrowia dzieci*, Wydawnictwo AA, Kraków 2016.
16. Nowak Z.T., *Ziola z polskich łąk*, Wydawnictwo AA, Kraków 2017.
17. Lewkowicz-Mosiej T., *Leksykon roślin leczniczych*, Świat Książki, Warszawa 2003.
18. Senderski M.E., *Ziola. Praktyczny poradnik o ziołach i ziołolecznictwie*, K.E.Liber, Warszawa 2009.
19. Kowalska-Wochna E., *Kosmetyki z łąk i pól*, Panacea, 2 (27), 2009, s. 18-19.
20. Kowalska-Wochna E., *Kosmetyki z ogrodu*, Panacea, 3 (29), 2009, s. 24-26.
21. Zdrojewicz Z., Minczakowska K., Klepacki K., *Rola aromaterapii w medycynie*, Family Medicine Primary Care Rewiev 2014, 16,4, s. 387-391.
22. Sentkowska A., Drózd P., Pyrzyńska K., *Napary ziołowe jako źródło związków polifenolowych*, [w:] Maciąg M., Szklarczyk M., (red.), *Rośliny w medycynie, farmacji i przemyśle*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2016, s. 111-133.
23. Mancini P., Baldo E., *Aromaty i smaki z pól i łąk*, Wydawnictwo Jedność, Kielce, 2017.
24. Nowak Z.T., *Naturalne antybiotyki z Bożej apteki*, Wydawnictwo AA, Kraków 2017.
25. Lutomski J., *Surowce zielarskie w zewnętrznym leczeniu skóry*, Wiadomości Zielarskie 2002, 44(7), s. 4-6.



26. Gajewska M., Czajkowska-Mysiek A., *Ocena zawartości kadmu i ołowiu w ziołach i przyprawach dostępnych w sprzedaży detalicznej*, *Bromat. Chem. Toksykol.* – XLIX, 2016, 2, s. 203-209
27. Baraniak J., Kania M., *Surowce roślinne i inne wybrane składniki preparatów prozdrowotnych przeznaczone do stosowania u dzieci*, *Postępy Fitoterapii* 1/2014, s. 48-53
28. Lamer-Zarawska E., *Leki roślinne w pediatrii*, *Panacea* Nr 2 (11), kwiecień-czerwiec 2005, s. 8-13
29. Lamer-Zarawska E., *Zioła dla niemowląt*, *Panacea* Nr 3 (12), lipiec-wrzesień 2005, s. 10-13.
30. Horoszkiewicz-Hassan M., *Stosowanie leków roślinnych w praktyce pediatrycznej*, *Pediatr Med Rodz*, 2010, 6 (4), s. 328-331
31. Ciach A., *Antybiotyk nie jest dobry na wszystko*, *Panacea* Nr 1 (62), styczeń – kwiecień 2018, s. 10-11.
32. Grys A., Łowicki Z., Gryszczyńska A., Kania M., Parus A., *Rośliny zielarskie w leczeniu chorób skóry – bezpieczeństwo i zastosowanie*, *Postępy Fitoterapii* 3/2011.
33. Maleszka R., *Praktyczne zastosowanie leków ziołowych w dermatologii*, *Post Fitoter* 2002, Nr 3-4, s. 53-63.
34. Ożarowski A., *Wspomaganie regeneracji skóry za pomocą doustnych wyciągów roślinnych*, *Postępy Fitoterapii* 2003, Nr 3-4, s. 45-9.
35. Lamer-Zarawska E., *Fitoterapia w chorobach alergicznych cz.1*, *Panacea* Nr 3 (16), lipiec – wrzesień 2006, s. 22-25.
36. Lamer-Zarawska E., *Fitoterapia w chorobach alergicznych cz.2*, *Panacea* Nr 4 (17), październik – grudzień 2006, s. 8-10.
37. Kowalczyk B., *Rośliny leczą blizny*, *Panacea* 2007, Nr 3(20).
38. Senderski M.E., *Zioła. Praktyczny poradnik o ziołach i ziołolecznictwie*, K.E.Liber, Warszawa 2009.
39. Lamer-Zarawska E., *Profilaktyka schorzeń infekcyjnych układu oddechowego u dzieci*, *Panacea* Nr 1 (18), styczeń – marzec 2007, s. 12-15.
40. Radosz A., Klasik-Ciszewska S., Duda-Grychtoł K., *Kosmetyczne i lecznicze zastosowanie roślin ozdobnych*, *Medycyna Rodzinna* 1a/2018, s. 65-71
41. Wyszowska-Kolatko M., Koczurkiewicz P., Wójcik K., Pękała E., *Rośliny lecznicze w terapii chorób skóry*, *Postępy Fitoterapii* 2015, 3, s. 186-187.
42. Makowska H., *Lawenda koi i odpręża*, *Zdrowie z natury* 2016, 3, s. 16-17.
43. Adaszyńska M., Swarczewicz M., *Skład chemiczny i aktywność biologiczna lawendy lekarskiej*, *Wiadomości chemiczne* 2014, 68, s. 1079-1086.
44. Olbracka A., *Nagietek na stany zapalne*, *Zdrowie z natury* 2016, 3, s. 12-13.
45. Grys A., Łowicki Z., Gryszczyńska A., Kania M., Parus A., *Rośliny zielarskie w leczeniu chorób skóry – bezpieczeństwo i zastosowanie*, *Postępy Fitoterapii* 3/2011.
46. Kludel I., *Rumianek*, *Panacea* Nr 3 (12), lipiec – wrzesień 2005, s. 6-9.
47. Terlecka P., Tomaszewski M., Iwaniuk P., Makuch M., Terlecki K., *Fitoterapia w zapaleniu błony śluzowej gardła i migdałków podniebiennych*, [w:] Maciąg M., Maciąg K., (red.), *Właściwości prozdrowotne roślin i ich metabolitów wtórnych*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2018, s. 152-160.
48. Różański H., Iwiński H., *Leksykon ziół część I*, Laboratorium Zielarza 2019.
49. Parus A., Grys A., *Babka lancetowata (Plantago lanceolata L.) – właściwości lecznicze*, *Postępy Fitoterapii* 3/2010, s. 162-165.
50. Andrzejewska-Golec E., *Babka lancetowata – tradycja i współczesne zastosowanie w leczeniu*, *Panacea* 2008, 3 (24).
51. Lamer-Zarawska E., Kowal-Gierczak B., Niedworok J., *Fitoterapia i leki roślinne*, PZWL, Warszawa 2007.
52. Kalinowska J., *Lecznicze babki*, *Wiadomości Zielarskie* 2002; 44(5), s. 6-7.
53. Makowska M., Alkiewicz J. *Leki roślinne w leczeniu schorzeń dróg oddechowych*, *Wiadomości Zielarskie* 2001, 43(3).
54. Nartowska J., *Kwiat, który liczy dni*, *Panacea* Nr 2 (35), kwiecień – czerwiec 2011, s. 5-7.

55. Znajdek-Awiżeń P., *Nagietek lekarski i kilka przepisów na jego wykorzystanie* <http://www.herbzone.pl>, 30.04.2020.
56. Jakubiak I., *Fitoterapia w pielęgnacji cery tłustej* Panacea Nr 3 (52), lipiec – wrzesień 2015, s. 22-23.
57. Nartowska J., *Pokrzywa zwyczajna-właściwości niezwykłe*, Panacea Nr 3 (20), lipiec – wrzesień 2007, s. 6-9.
58. Owińska P., <https://ulicaekologiczna.pl/umysl-i-cialo/jedzenie-ktore-leczy-cz-18> pokrzywa, 20.04.2020.
59. Kaczmarczyk P., *Pokrzywa ciągle niedoceniona*, Panacea Nr 3/4 (60/61), lipiec – grudzień 2017, s. 26-28.
60. Strehlow W., *Program zdrowia Hildegardy Bingen*, Esprit, Kraków 2010.
61. Czapska A., *Lawenda wąskolistna – roślina lecznicza i przemysłowa*, Wiadomości Zielarskie, nr 11/92, s. 3-4.
62. Jakubiak I., *Fitoterapia w pielęgnacji cery tłustej*, Panacea Nr 3 (52), lipiec – wrzesień 2015, s. 22-23.
63. Kowalczyk B., *Co się tyczy zapachów cz.4*, Panacea Nr 2 (11), kwiecień – czerwiec 2005, s. 24-27.
64. Kowalczyk B., *Co się tyczy zapachów cz.11*, Panacea Nr 3 (8), lipiec 2004, s. 12-15.
65. Nartowska J., *Lawenda – nie tylko pachnidło*, Panacea Nr 3 (40), lipiec – wrzesień 2012, s. 5-7.
66. Kustosz D., *Lawendowa Chorwacja* Panacea Nr 3 (48), lipiec – październik 2014, s. 20-22.
67. Zawiślak G., *Szałwia nie tylko lekarska*, Panacea Nr 3 (28), lipiec – wrzesień 2009, s. 6-8.
68. Czerpak R., Jabłońska-Trypuć A., *Roślinne surowce kosmetyczne*, MedPharm Polska, Wrocław 2008.
69. Krauze-Baranowska M., *Właściwości lecznicze szalwii – wyniki badań*, Panacea Nr 1 (10), styczeń – marzec 2005, s. 18-19.
70. Kowalczyk B., *Co Się Tyczy Zapachów, część 10*, Panacea Nr 4 (17), październik – grudzień 2006, s. 11.
71. Szyrka A., *Ziela w stomatologii*, Panacea Nr 3 (32), lipiec – wrzesień 2010, s. 10-12.
72. Lamer-Zarawska E., *Fitoterapia w przeziębieniach u dzieci*, Panacea Nr 1 (14), styczeń – marzec 2006, s. 6-11.
73. Krauze-Baranowska M., *Działanie lecznicze olejków eterycznych*, Panacea Nr 2 (11), kwiecień – czerwiec 2005, s. 32-33.
74. Zawiślak G., *Lecznice przyprawy z parapetów okiennych*, Panacea Nr 1 (22), styczeń – marzec 2008, s. 22-23.
75. Czerwińska D., *Korzenne aromaty*, Przegląd Gastronomiczny 2005, 9 (59), s. 8-9.
76. *Ziela i rośliny przyprawowe – znaczenie w żywieniu i wykorzystanie w kuchni*, CDR Brwinów, <https://www.cdr.gov.pl/aktualnosci/57-cdr-informuje/2865-ziela-i-rosliny-przyprawowe-znaczenie-w-zywieniu?highlight=WyJyb1x1MDE1YmxpbmkiLCJwcnp5cHJhd293ZSIsInJvc2xpbmkgcHJ6eXBvYXZvd2UiXQ==>, 20.04.2020.
77. Jadczyk D., Grzeszczuk M., *Ziela przyprawowe w kuchni i w apteczce*, Panacea Nr 2 (23), kwiecień – czerwiec 2008, s. 15-17.
78. Kardas M., Toczyńska K., Grochowska-Niedworok E., *Naturalne przyprawy roślinne – skład chemiczny i właściwości prozdrowotne. Charakterystyka przypraw*, Przemysł Spożywczy, 2016, T. 70, nr 12, s. 36-40.
79. Kudelka W., Kosowska A., *Składniki przypraw i ziół przyprawowych determinujące ich funkcjonalne właściwości oraz ich rola w żywieniu człowieka i zapobieganiu chorobom*, Zeszyty naukowe nr 781 Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie, 2008.
80. Martyniak-Przybyszewska B., *Rośliny przyprawowe*, Wydawnictwo UWM Olsztyn, 2001.
81. Sztaba D., *Barwa szafranu, aromat cynamonu, smak kaparów – właściwości lecznicze biblijnych przypraw*, Farmacja Polska, T. 65, nr 1 2009, s. 29-40.
82. Czapska A., Bałasińska B., Szczawiński J., *Działanie przeciwbakteryjne i przeciwutleniające ekstraktów przypraw żywnościowych*, Medycyna Weterynaryjna, 62 (3), 2006, s. 302-305.

83. Olesińska K., Sugier D., Luchowska K., *Znaczenie gospodarcze roślin leczniczych* [w:] Maciąg M., Szklarczyk M., (red.), *Rośliny w medycynie, farmacji i przemyśle*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2016, s. 17-32.
84. Kozłowska-Lewicka M., Borowiecka J., *Zawartość oleju eterycznego w surowcach przyprawowych wykorzystywanych w kulinariach*, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, XLIV (2), 2011, s. 217-222.
85. Markowska J., Polak E., Kasprzyk I., *Ziołowe surowce przyprawowe w przetwórstwie żywności*, *Przemysł Spożywczy*, 69 (11), 2015, s. 21-25.
86. Jarosz M., Rychlik E., Anna Wojtasik A., Anna Taraszewska A., Katarzyna Stoś K., IŻŻ, <https://ncez.pl/aktualnosci/dlaczego-ziola-znalazly-sie-w-piramidzie-zdrowego-zywienia-i-aktywnosci-fizycznej>, 14.04.2020.
87. Jarosz M., Rychlik E., *Piramida Zdrowego Żywienia i Aktywności Fizycznej*, [w:] Ślisz D., Mamcarz A. (red), *Medycyna stylu życia*, PZWL Wydawnictwo Lekarskie, Warszawa, 2018, s. 103-117.
88. Socha P., Mojska H., Stoś K., Przygoda B., *Bezpieczeństwo żywności a potrzeby żywieniowe niemowląt i małych dzieci*, Raport przygotowany przez Centrum Matki i Dziecka dzięki współpracy i wsparciu Fundacji NUTRICIA w ramach partnerstwa w programie *1 000 pierwszych dni dla zdrowia. Zdrowe Pokolenia*, Stowarzyszenie Promocji Zdrowego Żywienia Dzieci, Warszawa 2015.
89. Weker H., Barańska M [red.]. *Kompleksowa ocena sposobu żywienia dzieci w wieku od 5 do 36 miesiąca życia – badanie ogólnopolskie 2016 rok. Raport z badania*, PITNUTS 2016., Warszawa 2017.
90. Weker H., Strucińska M., Barańska M., *Modelowa racja pokarmowa dziecka w wieku poniemowlęcym – uzasadnienie wdrożenia*, *Standardy Medyczne/Pediatria* 2013, 10, s. 815-830.
91. Mika M., Matuszczyk P., *Kształtowanie prawidłowych nawyków żywieniowych u niemowląt i małych dzieci*, *Standardy Medyczne Pediatria*, 2017, T.14, s. 733-738.
92. Dobrzańska A., Charzewska J., Weker H., *Normy żywienia zdrowych dzieci w 1-3. roku życia – stanowisko Polskiej Grupy Ekspertów. Część I – Zapotrzebowanie na energię i składniki odżywcze. Część II – Omówienie poszczególnych składników odżywczych*, *Standardy Medyczne/Pediatria* 2012, 9, s. 313-316; 319-324
93. *Bezpieczne zioła dla dzieci*, <https://parenting.pl/bezpieczne-ziola-dla-dzieci> 17.04.2020.
94. Kazimierzczak R., Hallmann E., Sokołowska O., Rembiałkowska E., *Zawartość związków bioaktywnych w roślinach zielarskich z uprawy ekologicznej i konwencjonalnej*, *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, Tom Vol. 56, nr 3, 2011.
95. Baran I., *Przyprawy zamiast soli*, <https://dietetycy.org.pl/przyprawy-zamiast-soli/>, 15.09.2019.
96. *Przyprawy dla dzieci*, <https://parenting.pl/przyprawy-ktore-moze-jesc-dziecko/2>, 8.04.2020.
97. Miśkowiec A., *Pietruszka – warzywo i lek*, *Panacea* Nr 1 (46), styczeń – marzec 2014, s. 30-31.
98. Jadczyk D., Grzeszczuk M. Majeranek, *Panacea* Nr 2 (15), kwiecień – czerwiec 2006, s. 20-21.
99. Podgórcy B. i A., *Polski zielnik kulinarny*, Wydawnictwo Kurpisz, Poznań 2002.
100. Surzycka-Kucharczuk Z., *Kuchnia Polska*, Polskie Wydawnictwo Ekonomiczne, Warszawa 2005.
101. Newerli-Guz J., *Przeciwutleniające właściwości majeranku ogrodowego Origanum majorana L.*, *Problemy Higieny i Epidemiologii* 2012, nr 93(4).
102. Andruszczak S., *Lubczyk ogrodowy – cenna przyprawa i roślina lecznicza*, *Panacea* Nr 3 (32), lipiec – wrzesień 2010, s. 5-7.
103. Forycka A., *Rośliny zielarskie w apteczce domowej i w kuchni. Lubczyk*, *Wiadomości Zielarskie* 5/2002.
104. Jadczyk D., Grzeszczuk M., *Tymianek*, *Panacea* Nr 3 (16), lipiec-wrzesień 2006, s. 30-31.
105. Jadczyk D., Grzeszczuk M., *Bazylija*, *Panacea* Nr 2 (11), kwiecień-czerwiec 2005, s. 28-30.
106. Jadczyk D., Grzeszczuk M., *Cząber*, *Panacea* Nr 3 (12), lipiec – wrzesień 2005, s. 18-20

107. Masna M., *Czqber – wlaściwości zdrowotne i zastosowanie*, <https://www.poradnikzdrowie.pl/diety-i-zywienie/co-jesz/czaber-wlasciwosci-zdrowotne-i-zastosowanie-aa-W1vs-phnu-kntM.html>, 10.04.2020.
108. Nartowska J., *Kminek zwany karolkiem*, *Panacea* Nr 4/1 (57/58), listopad 2016 – marzec 2017, s. 12-15.
109. Jadcak D., Grzeszczuk M., *Cynamon*, *Panacea* Nr 1 (10), styczeń – marzec 2005, s. 34-36.
110. Anderson R.A., *Cynamon jako preparat przeciwcukrzycowy. Problemy terapii*, *Lek w Polsce* 2004, 14, s. 12.

## Wybrane rośliny lecznicze i przyprawowe stosowane w pielęgnacji i diecie małego dziecka

### Streszczenie

Rośliny lecznicze i przyprawowe są bogatym źródłem wielu biologicznie aktywnych substancji i charakteryzują się różnorodnym działaniem leczniczym. Ułatwiają przyswajanie składników pokarmowych, dostarczają witamin i składników mineralnych. Z uwagi na ich cenne właściwości są szeroko wykorzystywane w kosmetologii i przemyśle spożywczym, a przede wszystkim w zapobieganiu i leczeniu wielu schorzeń. Rośliny te mają również swoje zastosowanie w pediatrii. Jednak ze względu na istotne różnice i odrębności anatomiczne, fizjologiczne oraz metaboliczne pomiędzy organizmami dziecka i osoby dorosłej, stosowanie roślin leczniczych i przyprawowych u dzieci wymaga nie tylko wiedzy na temat ich działania, ale także znajomości dawek podawanych roślin, stosownie do wieku dziecka i jego stanu fizycznego. Celem niniejszego opracowania było przedstawienie wykorzystania wybranych roślin leczniczych i przyprawowych w pielęgnacji oraz diecie małego dziecka w taki sposób, by zebrane w literaturze przedmiotu informacje stanowiły źródło wiedzy nie tylko dla osób zainteresowanych tą tematyką, ale również dla rodziców i osób zajmujących się żywieniem, pielęgnacją i opieką nad małym dzieckiem. Właściwe zastosowanie roślin leczniczych i przyprawowych u małych dzieci pozwala łagodzić objawy wielu schorzeń, podnosić odporność organizmu, a także poprawiać smak potraw oraz ograniczać sól i cukier w diecie dziecka.

Słowa kluczowe: rośliny lecznicze, rośliny przyprawowe, pielęgnacja małego dziecka, żywienie małego dziecka, dieta

## Selected medicinal and spice plants used in the care and diet of a young child

### Abstract

Medicinal and spice plants are a rich source of many biologically active substances and have a variety of healing effects. They facilitate the absorption of nutrients, provide vitamins and minerals. Due to their valuable properties, they are widely used in cosmetology and food industry, and above all in the prevention and treatment of many diseases. These plants are also used in paediatrics. However, due to significant anatomical, physiological and metabolic differences between the organisms of a child and an adult, the use of medicinal and spice plants in children requires not only knowledge of their effects, but also knowledge of the doses of the plants administered, according to the age of the child and its physical condition. The aim of this study is to present the use of selected medicinal and spice plants in the care and diet of a young child in such a way as to make the information collected in the literature on the subject a source of knowledge not only for people interested in this subject, but also for parents and people involved in the nutrition, nursing and care of a young child. Proper use of medicinal and spice plants in young children helps to alleviate the symptoms of many diseases, increase the body's immunity, improve the taste of food and reduce salt and sugar in the child's diet.

Keywords: medicinal plants, spice plants, care of a young child, nutrition of a young child, diet

# Rośliny kosmetyczne w zbiorowiskach nieleśnych Masywu Ochodzitej w Beskidzie Śląskim i możliwości ich wykorzystania

## 1. Wstęp

Masyw Ochodzitej w Beskidzie Śląskim jest obszarem, na którym obserwuje się różnorodne przejawy antropopresji. Krajobraz masywu kształtują pola uprawne oraz łąki. Działalność człowieka przyczyniła się do zwiększenia różnorodności fitocenotycznej. W wyniku antropopresji na badanym terenie wykształciły się cenne zbiorowiska roślinne [1].

Celem niniejszej pracy było opisanie roślin o znaczeniu kosmetycznym (roślin kosmetycznych) występujących w zbiorowiskach nieleśnych Masywu Ochodzitej, wytypowanie zbiorowisk, w których zidentyfikowano najwięcej gatunków roślin kosmetycznych oraz opisanie możliwości wykorzystania tych roślin. Rośliny kosmetyczne to „rośliny użytkowe, głównie o działaniu leczniczym, mające duże zastosowanie w kosmetyce lub w kosmetologii. Służą do produkcji preparatów utrzymujących i przywracających urodę ciała (głównie twarzy, włosów i rąk)” [2].

## 2. Teren i metody badań

Przeważająca część terenu badań położona jest w gminie Istebna, która wchodzi w skład powiatu cieszyńskiego w województwie śląskim. Gmina Istebna jest gminą wiejską. Zlokalizowana jest przy granicy Czech i Słowacji, na tzw. „Trójstyku”, z którymi graniczy od południa i zachodu. Od północy sąsiaduje z miejscowością uzdrowiskową Wisła, a na wschodzie styka się z Kamesznicą (gmina Milówka). W obrębie Masywu Ochodzitej występują dwa wyraźne wzniesienia: Ochodzita (894 m n.p.m.) i Koczy Zamek (847 m n.p.m.) [1].

Gatunki roślin kosmetycznych wytypowano na podstawie badań fitosocjologicznych przeprowadzonych w latach 2010-2015 [1]. Badania fitosocjologiczne prowadzono metodą Braun-Blanqueta (1964) [3], wykonując zdjęcia fitosocjologiczne na powierzchniach, których wielkość dobierano kierując się wytycznymi Fukarka (1967) [4]. Identyfikację zespołów roślinnych i ich klasyfikację wykonano przy zastosowaniu „Przewodnika do oznaczania zbiorowisk roślinnych Polski” [5]. W przypadku jednostek nieujętych w tych opracowaniach przyjęto przynależność taksonów, systematykę i nazewnictwo zgodnie z następującymi pracami [1]: klasy *Montio-Cardaminetea* za Valachović [6], rzędu *Convovuletalia sepium* i związku *Petasition hybridi* za Zamfirescu i in. [7] oraz Láníková i in. [8], przynależność zespołu *Hypno-Polypodietum* za Świerkoszem [9], zespołu *Rumicetum obtusifolii* za Brzegiem i Wojterską [10], zespołu *Impatienti glanduliferae-Convovuletum sepium* za Ratyńską [11], zespołu *Holcetum mollis* za Mirkiem [12], zespołu *Chaerophyllo hirsuti-Calthetum palustris* za Hájková [13], zbiorowiska z *Reynoutria japonica* za Brzegiem

<sup>1</sup> Katarzyna.Wytyczak@gwsh.pl, Wydział Medyczny, Górnośląska Wyższa Szkoła Handlowa im. W. Korfańskiego w Katowicach

[14]. Systematykę i ujęcie zespołów: *Anthoxantho-Agrostietum*, *Carlino-Dianthetum deltooidis* i *Hypericum maculatum* przyjęto za Wilczkiem [15]. Oznaczenie roślin naczyniowych wykonano za pomocą „Klucza do oznaczania roślin naczyniowych Polski niżowej” [16]. Nazewnictwo roślin naczyniowych przyjęto za „Flowering plants and pteridophytes of Poland. A checklist” [17]. Stałość i współczynnik pokrycia gatunku w zidentyfikowanych zbiorowiskach roślinnych przyjęto za Pawłowskim [18]. Gatunki podlegające ochronie podano według aktualnie obowiązującego rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 9 października 2014 r. w sprawie ochrony gatunkowej roślin (Dz. U. poz. 1409) [19]. Klasyfikację form życiowych według Raunkiaera przyjęto zgodnie z opracowaniem Zarzyckiego i in. [20].

Otrzymane wyniki porównano z zestawieniem roślin kosmetycznych flory Polski podanych w opracowaniu „Rośliny o właściwościach kosmetycznych we florze Polski” [21]. Działania farmakologiczne roślin stosowanych w kosmetyce podano na podstawie opracowania „Rośliny kosmetyczne” [22]. Charakterystykę wybranych gatunków roślin kosmetycznych przyjęto za Jędrzejko i in. [22], Czerpak, Jabłońska-Trypuć [23]. Wykorzystanie roślin w pielęgnacji podano za: Dąbrowska i in. [21], Jędrzejko i in. [22] oraz Czerpak, Jabłońska-Trypuć [23].

### 3. Analiza wyników

W wyniku badań fitosocjologicznych przeprowadzonych na terenie Masywu Ochodzitej w Beskidzie Śląskim stwierdzono występowanie gatunków roślin o znaczeniu kosmetycznym w 43 zespołach oraz w 20 zbiorowiskach nieleśnych masywu, o następującej przynależności syntaksonomicznej [1]:

#### I. *ASPLENIETEA TRICHOMANIS* (BR.-BL. 1934 in MEIER et BR.-BL. 1934) OBERD. 1977

*Potentilletalia caulescentis* BR.-BL. in BR.-BL. et JENNY 1926

*Cystoperidion* (NORDH. 1960) J.L.RICH. 1972

##### 1. zbiorowisko *Asplenium viride*

*Androsacetalia vandellii* BR.-BL. in MEIER et BR.-BL. 1934 corr. BR.-BL. 1948

*Hypno-Polypodium vulgaris* MUCINA 1993

##### 2. *Hypno-Polypodietum* JURKO et PECIAR 1963

#### II. *ISOËTO-NANOJUNCETEA* BR.-BL. ET R.TX. 1943

Zbiorowisko o dyskusyjnej przynależności syntaksonomicznej:

##### 3. Zbiorowisko *Juncus bufonius*

#### III. *STELLARIETEA MEDIAE* R.TX., LOHM. et PRSG, 1950

*Centauretalia cyani* R.TX. 1950

*Aperion spicae-venti* R.TX. et J.TX. 1960

*Aphanenion arvensis* R.TX. et J.TX. 1960

##### 4. *Vicietum tetraspermae* (KRUSEM. ET Vlieg. 1939) KORNAŚ 1950

*Polygono-Chenopodietalia* (R.TX.et LOHM. 1950) J.TX. 1961

*Panico-Setarion* SISS. 1946

##### 5. *Echinochloo-Setarietum* KRUSEM. et Vlieg (1939) 1940

*Polygono-Chenopodion* SISS. 1946

##### 6. *Galinsogo-Setarietum* (R.TX. et BECK. 1942) R.TX. 1950

*Sisymbrietalia* J.TX.1961

*Sisymbrium officinalis* R.TX., LOHM, PRSG 1950

##### 7. *Senecioni-Tussilaginetum* MÖLLER 1949

**IV. EPILOBIETEA ANGUSTIFOLII** R.TX. et PRSG 1950

*Atropetalia* VLIEG. 1937

*Epilobion angustifolii* (RÜBEL 1933) Soó 1933

**8. *Senecini sylvatici-Epilobietum angustifolii*** (HUECK 1931) R.TX.1950

**9. *Calamagrostietum epigeji*** JURASZEK 1928

*Sambuco-Salicion* R.TX. et NEUM 1950

**10. *Senecionetum fuchsii*** (KAISER 1926) PREIFF. 1936 em. OBERD.1973

**11. *Rubetum idaei*** PREIFF. 1936 em. OBERD.1973

**12. *Sambucetum racemosae*** (NOIRE.1949) OBERD.1973

**13. *Epilobio-Salicetum capreae*** OBERD. 1957

**14.** zbiorowisko *Sorbus aucuparia*

**V. ARTEMISIETEA VULGARIS** LOHM., PRSG et R.TX. in R.TX. 1950

*ARTEMISIENEA VULGARIS*

*Onopordetalia acanthii* BR.-BL. et R.TX. 1943 em. GÖRS 1966

*Onopordion acanthii* BR.-BL. 1926

*Dauco-Melilotenion* GÖRS 1966

**15. *Artemisio-Tanacetetum vulgaris*** BR.-BL. 1931 corr. 1949

*Artemisietalia vulgaris* LOHM. in R.TX. 1947

*Arction lappae* R.TX.1937 em.1950

**16. *Chenopodietum boni-henrici*** TH.MÜLLER in SEYBOLD et MÜLLER 1972

**17. *Rumicetum obtusifolii*** KULCZ. 1928 corr. BRZEG et PAWLAK 1998

*GALIO-URTICENEA* (PASS. 1967)

*Glechometalia hederaceae* R.TX. in R.TX. et BRUN-HOOL 1975

*Aegopodion podagrariae* R.TX. 1967

**18. *Chareophylletum aromatici*** GUTTE 1963

*Alliarion* OBERD. (1957)1962

**19. *Epilobio-Geranium robertiani*** LOHM. in OBERD. 1967 ex GÖRS & MÜLL. 1969

*Convolvuletalia sepium* R.TX. 1950

*Petasition hybridi* SILLINGER 1933

**20. *Petasitetum hybridi*** Imchenetzky 1926

*Senecionion fluviatilis* R. TX. 1950 ex LOHMEYER 1953

**21. *Impatienti glanduliferae-Convolvuletum sepium*** (MOOR 1958) HILBIG 1972

*Convolvulion sepium* R.TX. 1947 em. Müll. 1981

**22.** zbiorowisko *Reynoutria japonica*

Zbiorowiska o dyskusyjnej przynależności syntaksonomicznej:

**23.** zbiorowisko *Barbarea vulgaris*

**24.** zbiorowisko *Helianthus tuberosus*

**25.** zbiorowisko *Rubus caesius-Arctium tomentosum*

**26.** zbiorowisko *Urtica dioica*

**VI. MONTIO-CARDAMINETEA** BR.-BL. et R. TX. 1943

*Montio-Cardaminetalia* PAWL.1928

*Cardamino-Montion* BR. – BL.1925

**27. *Cardamino-Chrysosplenietum alternifolii*** MAAS 1959 p.p.

**28. *Caricetum remotae*** (Kästner 1941) SCHWICK. 1944

**VII. PHRAGMITETEA** R. TX. et PRSG.1942

*Phragmitetalia* KOCH 1926

*Phragmition* KOCH 1926

**29. *Equisetetum fluviatilis*** STEFFEN 1931

**VIII. MOLINIO-ARRHENATHERETEA** R.Tx. 1937

*Plantaginetalia majoris* R.Tx. (194) 1950

*Polygonion avicularis* BR.-BL. 1939 ex AICH.1933

**30. *Lolio-Polygonetum arenastri*** BR.-BL. 1930 em. LOHM. 1975

**31. *Bryo-Saginetum procumbentis*** DIEM., SISS. et WESTH. 1940 n.inv. OBERD. 1983

**32. *Prunello-Plantaginetum*** FALIŃSKI 1963

**33. *Juncetum tenuis*** (DIEM., SISS. et WESTH. 1940) SCHWICK. 1944 em. R.Tx. 1950

*Trifolio fragiferae-Agrostietalia stoloniferae* R.Tx. 1970

*Agropyro-Rumicion crispi* NORDH. 1940 em. R.Tx. 1950

**34. *Potentilletum anserinae*** RAPATIS 1927 em. PASS. 1927

*Molinietalia caeruleae* W. KOCH 1926

*Filipendulion ulmariae* SEGAL 1966

**35. *Filipendulo ulmariae-Menthetum longifoliae*** ZLINSKA 1989

*Calthion palustris* R. Tx. 1936 em. OBERD. 1957

**36. *Cirsietum rivularis*** NOWIŃSKI 1927

**37. *Scirpetum sylvatici*** RALSKI 1932

**38. *Chaerophyllo hirsuti-Calthetum palustris*** BALÁTOVÁ-TULÁČKOVÁ 1985

*Arrhenatheretalia* PAWL. 1928

*Arrhenatherion elatioris* (BR.-BL.1925) KOCH 1926

**39. *Arrhenatheretum elatioris*** BR.-BL. ex SCHERR.1925

**40. *Gladiolo-Agrostietum capillaris*** (BR.-BL. 1930) PAWL. et WAL. 1949

**41. *Holcetum mollis*** MIREK 1997

*Cynosurion* R. Tx. 1947

**42. *Lolio-Cynosuretum*** R.Tx..1937

**43. *Anthoxantho-Agrostietum*** SILLINGER 1933 em. JURKO 1969

Zbiorowiska o dyskusyjnej przynależności syntaksonomicznej:

44. zbiorowisko *Anthyllis vulneraria*

45. zbiorowisko *Athyrium filix-femina*

46. zbiorowisko *Cirsium arvense-Vicia cracca*

47. zbiorowisko *Juncus effuses*

48. zbiorowiska łąk antropogenicznych

49. zbiorowisko *Prunella vulgaris-Tussilago farfara*

50. zbiorowisko *Hypericum maculatum*

**IX. SCHEUCHZERIO-CARICETEA NIGRAE** (NORDH. 1937) R.Tx. 1937

*Caricetalia nigrae* KOCH 1926 em. NORDH. 1937

*Caricion nigrae* KOCH 1926 em. KLIKA 1934

**51. *Carici canescentis-Agrostietum caninae*** R.Tx. 1937

*Caricetalia davalliana* BR.-BL. 1949

*Caricion davalliana* KLIKA 1934

**52. *Valeriano-Caricetum flavae*** PAWL. (1949 n. n.) 1960

**X. NARDO-CALLUNETEA** PRSG 1949

*Nardetalia* PRSG 1949



*Nardion* BR.-BL. 1926 em. OBERD. 1959

**53. Hieracio-Nardetum** KORNAŚ 1955 n.n. em. BALCERK.. 1984

**54. Carlino-Dianthetum deltoideis** DUB., STACH., GAW. 1999

**XI. BETULO-ADENOSTYLETEA** BR.-BL. 1948

*Calamagrostietalia villosae* PAWL. et all. 1928

*Adenostylion alliariae* BR.-BL. 1925

**55. Petasitetum albi** ZLATN. 1928

**56. Petasitetum kablikiani** WAL. 1933

*Calamagrostion* LUQU. 1926

**57.** zbiorowisko *Calamagrostis villosa*

**XII. RHAMNO-PRUNETEA** RIVAS GODAY et GARB. 1961

*Prunetalia spinosae* R.Tx. 1952

*Pruno-Rubion fruticostis* R.Tx. 1952

**58. Frangulo-Rubetum plicati** NEUM. in R.Tx. 1952 em. OBERD. 1983

Zbiorowiska o dyskusyjnej przynależności syntaksonomicznej:

**59.** zbiorowisko *Pruno Coryletum*

**60.** zbiorowisko *Rosa canina*

**XIII. ALNETEA GLUTINOSAE** BR.-BL. et R.Tx.1943

*Alnetalia glutinosae* R.Tx. 1937

*Alnion glutinosae* (MALC.1929) MEIJER DREES 1936

Grupa zbiorowisk zaroślowych

**61. Salicetum pentandro-cinereae** (ALMQ. 1929) PASS. 1961

**XIV. VACCINIO-PICEETEA** BR.-BL. 1939

*Vaccinio-Piceetalia* BR.-BL. 1939

*Piceion abietis* PAWL. et all. 1928

**62.** zbiorowisko *Vaccinium myrtillus*

Zbiorowiska nieleśne o nieokreślonej przynależności syntaksonomicznej:

**63.** zbiorowisko *Ceratodon purpureus-Marchantia polymorpha*

**64.** zbiorowisko *Phacelia tanacetifolia*

W sumie, w zbiorowiskach nieleśnych Masywu Ochodzitej stwierdzono 69 gatunków roślin kosmetycznych. 63 gatunki roślin kosmetycznych, to gatunki, które zostały zidentyfikowane we florze Polski [21], 5 gatunków: *Avena sativa* L., *Brassica napus* L. ssp. *napus*, *Calendula officinalis* L., *Cucurbita pepo* L., *Potentilla erecta* (L.) Rausch. zostało opisanych przez Jędrzejko i in. [22], a jeden gatunek – *Phacelia tanacetifolium* Benth. – przez Czerpak, Jabłońska-Trypuć [23].

Gatunki roślin kosmetycznych występujące w zbiorowiskach nieleśnych na badanym terenie wraz z ich charakterystyką ekologiczną przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Wykaz i charakterystyka ekologiczna roślin kosmetycznych zbiorowisk nieleśnych Masywu Ochodzitej

Lp.	Nazwa gatunku po łacinie	Nazwa gatunku po polsku	Liczba zbiorowisk w których opisano gatunek	Forma życiowa
1.	<i>Abies alba</i> Miller	jodła pospolita	3	M
2.	<i>Achillea millefolium</i> L.	krwawnik pospolity	36	H
3.	<i>Acorus calmus</i> L.	tatarak zwyczajny	1	Hy
4.	<i>Alcea rosea</i> L.	malwa ogrodowa	1	H
5.	<i>Alchemilla monticola</i> Opiz	przywrotnik pasterski	31	H
6.	<i>Anemone nemorosa</i> L.	zawilec gajowy	4	G
7.	<i>Anthyllis vulneraria</i> L.	przelot pospolity	2	H
8.	<i>Armoracia rusticana</i> G., M. et Sch.	chrzan pospolity	3	G
9.	<i>Avena sativa</i> L.	owies zwyczajny	3	T
10.	<i>Bellis perennis</i> L.	stokrotka pospolita	6	H
11.	<i>Betula pendula</i> Roth	brzoza brodawkowata	9	M
12.	<i>Bidens tripartita</i> L.	uczep trójlistkowy	4	T
13.	<i>Brassica napus</i> L.ssp. <i>napus</i>	kapusta rzepak, rzepak	2	T
14.	<i>Calendula officinalis</i> L.	nagietek lekarski	2	T
15.	<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Med.	tasznik pospolity	4	T,H
16.	<i>Carum carvi</i> L.	kminek zwyczajny	6	H
17.	<i>Corylus avellana</i> L.	leszczyna pospolita	3	N
18.	<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	głóg jednoszyjkowy	1	N
19.	<i>Cucurbita pepo</i> L.	dynia zwyczajna	1	T
20.	<i>Daucus carota</i> L.	marchew zwyczajna	1	H
21.	<i>Elymus repens</i> (L.) Gould	perz właściwy	22	G
22.	<i>Equisetum arvense</i> L.	skrzyp polny	13	G
23.	<i>Fagus sylvatica</i> L.	buk pospolity	8	M
24.	<i>Fragaria vesca</i> L.	poziomka pospolita	14	H
25.	<i>Fraxinus excelsior</i> L.	jesion wyniosły	5	M
26.	<i>Galeopsis tetrahit</i> L.	poziewnik szorstki	4	T
27.	<i>Galium odoratum</i> (L.) Scop.	przytulia wonna	2	H
28.	<i>Glechoma hederacea</i> L.	bluszcz kurdybanek	5	G,H
29.	<i>Hypericum perforatum</i> L.	dziurawiec zwyczajny	1	H
30.	<i>Juniperus communis</i> L.	jałowiec pospolity	1	N
31.	<i>Lamium album</i> L.	jasnota biała	1	H
32.	<i>Larix decidua</i> Mill.	modrzew europejski	1	M
33.	<i>Linaria vulgaris</i> L.	lnica pospolita	1	G

*Rośliny kosmetyczne w zbiorowiskach nieleśnych Masywu Ochodzitej  
w Beskidzie Śląskim i możliwości ich wykorzystania*

34.	<i>Malus domestica</i> Borkh.	jabłoń domowa	2	M
35.	<i>Matricaria chamomilla</i> L.	rumianek pospolity	2	T
36.	<i>Phacelia tanacetifolia</i> Benth	facelia błękitna	1	T
37.	<i>Pimpinella saxifraga</i> L.	biedrzyca mniejszy	11	H
38.	<i>Plantago lanceolata</i> L.	babka lancetowata	23	H
39.	<i>Plantago major</i> L.	babka zwyczajna	22	H
40.	<i>Polygonum aviculare</i> L.	rdest ptasi	5	T
41.	<i>Populus tremula</i> L.	topola osika	13	M
42.	<i>Potentilla erecta</i> (L.) Rausch.	pięciornik kurze-ziele	20	H
43.	<i>Prunus avium</i> L.	wiśnia ptasia, czereśnia	6	M
44.	<i>Prunus spinosa</i> L.	śliwa tarnina	1	N
45.	<i>Quercus robur</i> L.	dąb szypułkowy	1	M
46.	<i>Rosa canina</i> L.	dzika róża	11	N,li
47.	<i>Rubus idaeus</i> L.	malina właściwa	19	N
48.	<i>Rubus plicatus</i> Weihe et Nees	jeżyna fałdowana	8	N
49.	<i>Rumex acetosa</i> L.	szczaw zwyczajny	33	H
50.	<i>Rumex acetosella</i> L.	szczaw polny	9	G,H
51.	<i>Salix purpurea</i> L.	wierzba purpurowa	1	N
52.	<i>Sambucus nigra</i> L.	bez czarny	3	N
53.	<i>Sanicula europea</i> L.	żankiel zwyczajny	2	H
54.	<i>Solidago virgaurea</i> L.	nawłoc pospolita	2	H
55.	<i>Sorbus aucuparia</i> L.	jarzab pospolity	17	M,N
56.	<i>Symphytum officinale</i> L.	żywakost lekarski	1	G,H
57.	<i>Tanacetum vulgare</i> L.	wrotycz pospolity	5	H
58.	<i>Taraxacum officinale</i> (L.) Weber ex F.H. Wigg.	mniszek pospolity	34	H
59.	<i>Thymus pulegioides</i> L.	macierzanka zwyczajna	8	C
60.	<i>Tilia cordata</i> Mill.	lipa drobnolistna	3	M
61.	<i>Trifolium pratense</i> L.	koniczyna łąkowa	15	H
62.	<i>Trifolium repens</i> L.	koniczyna biała	25	C,H
63.	<i>Tussilago farfara</i> L.	podbiał pospolity	14	G
64.	<i>Urtica dioica</i> L.	pokrzywa zwyczajna	28	H
65.	<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	borówka czarna	12	Ch
66.	<i>Veratrum lobelianum</i> L.	ciemniżyca zielona	1	H
67.	<i>Veronica officinalis</i> L.	przetacznik leśny	7	C
68.	<i>Viola arvensis</i> Murray	fiołek polny	2	T
69.	<i>Viola tricolor</i> L.	fiołek trójbarwny	4	T

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [1]

Na badanym terenie, wśród roślin kosmetycznych, rośliny zarodnikowe są reprezentowane przez 1 gatunek: *Equisetum arvense* L., rośliny nagozalążkowe reprezentują 3 gatunki: *Abies alba* Miller, *Juniperus communis* L., *Larix decidua* Mill. 94% gatunków roślin kosmetycznych, to rośliny okrytozalążkowe, wśród których 3 gatunki to rośliny jednoliścienne: *Acorus calamus* L., *Avena sativa* L. oraz *Elymus repens* (L.) Gould. Pozostałe 62 gatunki zidentyfikowanych z terenu badań roślin kosmetycznych należą do roślin dwuliściennych.

Wykaz zbiorowisk nieleśnych Masywu Ochodzitej, w których stwierdzono występowanie gatunków roślin kosmetycznych wraz z liczbą ich występowania w danym zbiorowisku przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Liczba gatunków roślin kosmetycznych w zbiorowiskach nieleśnych Masywu Ochodzitej

Lp.	Zbiorowiska nieleśne Masywu Ochodzitej	Liczba gatunków roślin kosmetycznych
1.	<i>Hypno-Polypodietum</i>	3
2.	zbiorowisko <i>Juncus bufonius</i>	2
3.	<i>Vicietum tetraspermae</i>	17
4.	<i>Galinsogo-Setarietum</i>	20
5.	<i>Echinochloo-Setarietum</i>	
6.	<i>Senecioni-Tussilaginetum</i>	15
7.	<i>Senecioni sylvatici-Epilobietum angustifolii</i>	2
8.	<i>Calamagrostietum epigeji</i>	14
9.	<i>Senecionetum fuchsii</i>	15
10.	<i>Rubetum idaei</i>	8
11.	<i>Sambucetum racemosae</i>	15
12.	<i>Epilobio-Salicetum capreae</i>	15
13.	zbiorowisko <i>Sorbus aucuparia</i>	24
14.	<i>Artemisio-Tanacetetum vulgaris</i>	13
15.	<i>Chenopodietum boni-henrici</i>	4

16.	<i>Rumicetum obtusifolii</i>	10
17.	<i>Chareophylletum aromatici</i>	7
18.	<i>Epilobio-Geranium robertiani</i>	7
19.	<i>Petasitetum hybridi</i>	10
20.	<i>Impatiens glanduliferae-Convolutetum sepium</i>	17
21.	zbiorowisko <i>Reynoutria japonica</i>	2
22.	zbiorowisko <i>Barbarea vulgaris</i>	7
23.	zbiorowisko <i>Helianthus tuberosus</i>	7
24.	zbiorowisko <i>Rubus caesius-Arctium tomentosum</i>	4
25.	zbiorowisko <i>Urtica dioica</i>	13
26.	<i>Cardamino-Chrysosplenietum alternifolii</i>	3
27.	<i>Caricetum remotae</i>	3
28.	<i>Equisetetum fluviatilis</i>	1
29.	<i>Lolio-Polygonetum arenastri</i>	13
30.	<i>Bryo-Saginetum procumbentis</i>	8
31.	<i>Prunello-Plantaginetum</i>	10
32.	<i>Juncetum tenuis</i>	8
33.	<i>Potentilletum anserinae</i>	5
34.	<i>Filipendulo ulmariae-Menthetum longifoliae</i>	4
35.	<i>Cirsietum rivularis</i>	14
36.	<i>Scirpetum sylvatici</i>	7
37.	<i>Chaerophyllo hirsuti-Calthetum palustris</i>	4

38.	<i>Arrhenatheretum elatioris</i>	9
39.	<i>Gladiolo-Agrostietum capillaris</i>	19
40.	<i>Holcetum mollis</i>	6
41.	<i>Lolio-Cynosuretum</i>	9
42.	<i>Anthoxantho-Agrostietum</i>	18
43.	zbiorowisko <i>Anthyllis vulneraria</i>	8
44.	zbiorowisko <i>Athyrium filix-femina</i>	7
45.	zbiorowisko <i>Cirsium arvense-Vicia cracca</i>	4
46.	zbiorowisko <i>Juncus effuses</i>	5
47.	zbiorowiska łąk antropogenicznych	16
48.	zbiorowisko <i>Prunella vulgaris-Tussilago farfara</i>	13
49.	zbiorowisko <i>Hypericum maculatum</i>	14
50.	<i>Carici canescentis-Agrostietum caninae</i>	3
51.	<i>Valeriano-Caricetum flavae</i>	3
52.	<i>Hieracio-Nardetum</i>	13
53.	<i>Carlino-Dianthetum deltoidis</i>	17
54.	<i>Petasitetum albi</i>	3
55.	<i>Petasitetum kablikiani</i>	1
56.	zbiorowisko <i>Calamagrostis villosa</i>	3
57.	<i>Frangulo-Rubetum plicati</i>	23
58.	zbiorowisko <i>Pruno Coryletum</i>	5
59.	zbiorowisko <i>Rosa canina</i>	5

60.	<i>Salicetum pentandro-cinereae</i>	3
61.	zbiorowisko <i>Vaccinium myrtillus</i>	13
62.	zbiorowisko <i>Ceratodon purpureus-Marchantia polymorpha</i>	5
63.	zbiorowisko <i>Phacelia tanacetifolia</i>	1

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [1]

Najwięcej gatunków roślin kosmetycznych opisano w zbiorowisku zaroślowym *Sorbus aucuparia* – 26 gatunków. Zbiorowisko to ma charakter krzewiasty. Zwarcie warstwy krzewów osiąga 50-90%. Dominuje w niej *Sorbus aucuparia* (V stopień stałości). Do gatunków wpływających na fizjonomię warstwy krzewów należą: *Fagus sylvatica*, *Betula pendula*, *Tilia cordata* i *Cerasus avium*. Warstwa zielna jest bardzo dobrze rozwinięta. Zdecydowanym dominantem jest *Vaccinium myrtillus*, osiągający IV stopień stałości [1]. W zespole zarośli *Frangulo-Rubetum plicati* zidentyfikowano 22 gatunki roślin kosmetycznych. Warstwa krzewów, osiąga zwarcie do 60%. Występują w niej takie gatunki, jak: *Sorbus aucuparia*, gatunek wyróżniający *Frangulo-Rubetum plicati* oraz *Rosa canina*, gatunek charakterystyczny dla klasy *Rhamno-Prunetea*. W bujnej warstwie zielnej bardzo licznie występują gatunki z *Molinio-Arrhenatheretea*, wśród których najliczniej stwierdzono obecność: *Achillea millefolium*, osiągający IV stopień stałości [1]. W zbiorowiskach chwastów roślin okopowych: *Echinochloa-Setarietum* i *Galinsogo-Setarietum* stwierdzono występowanie w sumie 20 gatunków, a w *Vicietum tetraspermae* – 17 gatunków roślin kosmetycznych. W opisywanych fitocenozach chwastów roślin okopowych stwierdzono występowanie gatunków roślin uprawnych, mających znaczenie kosmetyczne: *Avena sativa* i *Brassica napus*. Stwierdzono również *Galeopsis tetrahit* z klasy *Stellarietea mediae* oraz gatunek wyróżniający z rzędu *Polygono-Chenopodietalia* – *Capsella bursa-pastoris*. Na fizjonomię opisywanych płatów mają również wpływ gatunki z klasy *Molinio-Arrhenatheretea*, szczególnie: *Achillea millefolium* (V stopień stałości), *Taraxacum officinale* (IV stopień stałości) i *Elymus repens* (III stopień stałości). W fitocenozach *Vicietum tetraspermae* warstwa zielna osiąga pokrycie 90-100%. Dominuje w niej *Avena sativa*, osiągająca V stopień stałości. We wszystkich opisywanych płatach stwierdzono występowanie gatunków z *Molinio-Arrhenatheretea*, szczególnie: *Trifolium repens* (V stopień stałości), *Achillea millefolium* (IV stopień stałości) oraz *Taraxacum officinale* (III stopień stałości) [1].

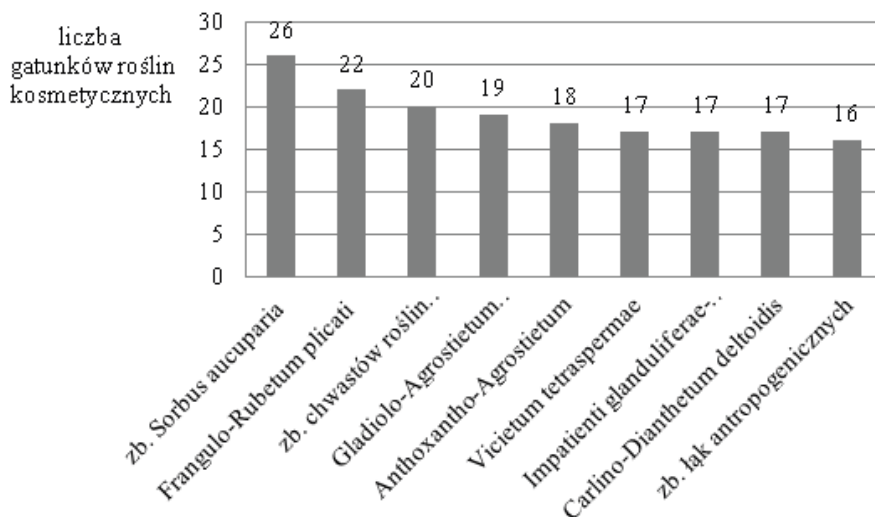
Dużą liczbę roślin kosmetycznych stwierdzono w zbiorowiskach łąkowych. Zbiorowiska te w wyniku działalności człowieka podlegają przemianom, które wyrażają się zmniejszeniem się powierzchni zajętej przez półnaturalną roślinność łąkową, ustępowaniem rodzimych gatunków, pojawianiem się gatunków obcych. Zmiany te prowadzą do zubożenia gatunkowego roślinności łąkowej [1]. 19 gatunków roślin kosmetycznych opisano w zespole *Gladiolo-Agrostietum capillaris*. Na uwagę zasługuje gatunek charakterystyczny dla zespołu *Alchemilla monticola* (V stopień stałości) oraz takie gatunki, jak: *Rumex acetosa* (IV stopień stałości), *Achillea*

*millefolium*, *Plantago lanceolata* i *Trifolium repens* (III stopień stałości). 18 gatunków roślin o znaczeniu kosmetycznym zidentyfikowano w zespole rajgrasu wyniosłego *Anthoxantho-Agrostietum*, będącego przykładem zbiorowiska antropogenicznego, którego skład florystyczny uzależniony jest od sposobu użytkowania. Do gatunków roślin kosmetycznych występujących w tym zbiorowisku należą między innymi: *Trifolium repens* (IV stopień stałości), *Pimpinella saxifraga* (II stopień stałości), *Achillea millefolium* i *Rumex acetosa* (IV stopień stałości). Na badanym terenie stwierdzono występowanie łąk, które podsiewane są różnymi gatunkami, między innymi *Trifolium pratense*. Zostały one opisane [1], jako zbiorowiska łąk antropogenicznych. Zidentyfikowano w nich 16 gatunków roślin kosmetycznych.

17 gatunków roślin kosmetycznych stwierdzono w zespole *Carlino-Dianthetum deltoidis*. Licznie reprezentowana jest grupa roślin łąkowych o znaczeniu kosmetycznym, wśród których z V stopniem stałości występuje *Achillea millefolium* oraz gatunek towarzyszący: *Thymus pulegioides*. W obrębie tego zespołu opisano wariant z *Vaccinium myrtillus*, wyróżniający się występowaniem *Vaccinium myrtillus*. Na uwagę zasługuje również zbiorowisko okrajków nitrofilnych *Impatiens glanduliferae-Convolutum sepium*, w którym zidentyfikowano 17 gatunków roślin kosmetycznych, wśród których wyróżnia się *Urtica dioica*, osiągająca V stopień stałości.

Zbiorowiska, w których stwierdzono największe liczby różnych gatunków roślin kosmetycznych przedstawiono na wykresie 1.





Wykres 1. Zbiorowiska nieleśne Masywu Ochodzitej o największej liczbie gatunków roślin kosmetycznych [1]

W tabeli 3 przedstawiono najczęściej występujące gatunki roślin kosmetycznych, których obecność stwierdzono przynajmniej w 20 różnych zbiorowiskach nieleśnych Masywu Ochodzitej oceniając ich udział za pomocą stopnia stałości i współczynnika pokrycia.

Tabela 3. Gatunki roślin kosmetycznych najczęściej występujące w zbiorowiskach nieleśnych Masywu Ochodzitej

Gatunek Zbiorowisko	<i>Achillea millefolium</i>	<i>Taraxacum officinale</i>	<i>Rumex acetosa</i>	<i>Alchemilla monticola</i>	<i>Urtica dioica</i>	<i>Trifolium repens</i>	<i>Plantago lanceolata</i>	<i>Elymus repens</i>	<i>Plantago major</i>	<i>Potentilla erecta</i>
zb. <i>Sorbus aucuparia</i>	II <sup>293</sup>	I <sup>2</sup>	II <sup>3</sup>	II <sup>3</sup>	I <sup>625</sup>				I <sup>0</sup>	II <sup>85</sup>
<i>Frangulo-Rubetum plicati</i>	IV <sup>146</sup>	I <sup>0</sup>	II <sup>3</sup>	I <sup>0</sup>	I <sup>268</sup>	I <sup>36</sup>	II <sup>2</sup>	II <sup>37</sup>	I <sup>36</sup>	II <sup>394</sup>
zb. chwastów roślin okopowych	V <sup>202</sup>	IV <sup>6</sup>	I <sup>0</sup>	I <sup>0</sup>	I <sup>0</sup>	II <sup>2</sup>	II <sup>2</sup>	III <sup>197</sup>	II <sup>2</sup>	
<i>Gladiolo-Agrostietum capillaris</i>	III <sup>311</sup>	II <sup>3</sup>	IV <sup>178</sup>	V <sup>1366</sup>		III <sup>138</sup>	III <sup>5</sup>	I <sup>0</sup>		II <sup>322</sup>
<i>Anthoxantho-Agrostietum</i>	IV <sup>7</sup>	I <sup>150</sup>	IV <sup>122</sup>	III <sup>6</sup>		IV <sup>1751</sup>	III <sup>5</sup>			I <sup>1</sup>
<i>Carlino-Dianthetum deltoidis</i>	V <sup>309</sup>		I <sup>0</sup>	I <sup>0</sup>		III <sup>466</sup>	II <sup>4</sup>			III <sup>447</sup>
<i>Impatienti glanduliferae-Convulvuletum sepium</i>			I <sup>2</sup>	I <sup>0</sup>	V <sup>1585</sup>		I <sup>2</sup>	III <sup>3</sup>	I <sup>0</sup>	
<i>Vicetium tetraspermae</i>	IV <sup>269</sup>	III <sup>29</sup>	I <sup>0</sup>	I <sup>1</sup>		V <sup>417</sup>	II <sup>3</sup>	II <sup>52</sup>	I <sup>0</sup>	
zb. łąk antropogenicznych	III <sup>233</sup>	IV <sup>274</sup>		III <sup>4</sup>		II <sup>230</sup>	II <sup>230</sup>	I <sup>1</sup>	I <sup>1</sup>	
<i>Epilobio-Salicetum capreae</i>	I <sup>71</sup>		III <sup>4</sup>	II <sup>3</sup>	I <sup>0</sup>			I <sup>1</sup>		I <sup>250</sup>
<i>Sambucetum racemosae</i>			I <sup>125</sup>		I <sup>438</sup>					
<i>Senecionetum fuchsii</i>		I <sup>1</sup>	I <sup>50</sup>		III <sup>527</sup>			I <sup>51</sup>		
<i>Senecioni-Tussilaginetum</i>	I <sup>3</sup>	I <sup>3</sup>	I <sup>3</sup>	I <sup>3</sup>	I <sup>438</sup>	I <sup>438</sup>			I <sup>125</sup>	
<i>Calamagrostietum epigeji</i>	I <sup>2</sup>			I <sup>292</sup>			I <sup>2</sup>		I <sup>0</sup>	
<i>Cirsietum rivularis</i>	I <sup>0</sup>	I <sup>0</sup>	IV <sup>255</sup>	II <sup>40</sup>		II <sup>270</sup>	III <sup>137</sup>	I <sup>1</sup>		III <sup>42</sup>
zb. <i>Hypericum maculatum</i>	II <sup>128</sup>	I <sup>0</sup>	II <sup>3</sup>	II <sup>128</sup>		I <sup>0</sup>	I <sup>3</sup>			I <sup>3</sup>
<i>Artemisio-Tanacetum vulgaris</i>	III <sup>130</sup>	II <sup>5</sup>	I <sup>0</sup>		II <sup>563</sup>		I <sup>0</sup>	II <sup>250</sup>		
<i>Hieracio-Nardetum</i>	II <sup>138</sup>		II <sup>137</sup>	I <sup>1</sup>		I <sup>1</sup>	II <sup>2</sup>			V <sup>1404</sup>
<i>Lolio-Polygonetum arenastris</i>	II <sup>3</sup>	III <sup>503</sup>		II <sup>3</sup>		V <sup>1144</sup>	II <sup>3</sup>		V <sup>3071</sup>	
zb. <i>Prunella vulgaris-Tussilago farfara</i>	I <sup>0</sup>	II <sup>10</sup>	I <sup>0</sup>	I <sup>0</sup>		I <sup>5</sup>	I <sup>5</sup>		I <sup>0</sup>	I <sup>5</sup>
zb. <i>Urtica dioica</i>	I <sup>1</sup>	II <sup>5</sup>	I <sup>1</sup>		V <sup>7091</sup>			III <sup>1410</sup>		
zb. <i>Vaccinium myrtillus</i>	II <sup>3</sup>	I <sup>0</sup>	II <sup>3</sup>							V <sup>580</sup>
<i>Petasitetum hybridi</i>				I <sup>45</sup>	IV <sup>1073</sup>			I <sup>45</sup>		

*Rośliny kosmetyczne w zbiorowiskach nieleśnych Masywu Ochodzitej  
w Beskidzie Śląskim i możliwości ich wykorzystania*

<i>Prunello-Plantaginetum</i>	II <sup>3</sup>	II <sup>2</sup>		III <sup>5</sup>		V <sup>590</sup>			V <sup>2000</sup>	I <sup>1</sup>
<i>Rumicetum obtusifolii</i>	III <sup>452</sup>	II <sup>102</sup>	III <sup>202</sup>	II <sup>4</sup>	IV <sup>1452</sup>	I <sup>350</sup>		II <sup>752</sup>	I <sup>0</sup>	
<i>Arrhenatheretum elatioris</i>	III <sup>375</sup>	II <sup>5</sup>	III <sup>8</sup>	II <sup>5</sup>		II <sup>440</sup>	III <sup>130</sup>			
<i>Lolio-Cynosuretum</i>	IV <sup>454</sup>	III <sup>104</sup>	II <sup>4</sup>	IV <sup>802</sup>		V <sup>5250</sup>	I <sup>2</sup>		III <sup>4</sup>	I <sup>2</sup>
zbiorowisko <i>Anthyllis vulneraria</i>						I <sup>500</sup>			I <sup>0</sup>	
<i>Bryo-Saginetum procumbentis</i>	I <sup>2</sup>	V <sup>554</sup>		I <sup>0</sup>		III <sup>6</sup>	I <sup>0</sup>	I <sup>2</sup>	V <sup>456</sup>	
<i>Juncetum tenuis</i>		II <sup>3</sup>	I <sup>0</sup>	II <sup>3</sup>		V <sup>1359</sup>	I <sup>71</sup>		IV <sup>574</sup>	I <sup>1</sup>
<i>Rubetum idaei</i>	I <sup>2</sup>	I <sup>2</sup>			IV <sup>793</sup>			IV <sup>170</sup>		
zb. <i>Athyrium filix-femina</i>	I <sup>3</sup>		I <sup>0</sup>	I <sup>3</sup>	I <sup>3</sup>					I <sup>3</sup>
zb. <i>Barbarea vulgaris</i>	I <sup>5</sup>	I <sup>250</sup>		I <sup>0</sup>	I <sup>0</sup>			I <sup>875</sup>		
<i>Chareophylletum aromatici</i>	I <sup>1</sup>	I <sup>1</sup>	III <sup>66</sup>	I <sup>1</sup>	III <sup>534</sup>			II <sup>281</sup>		I <sup>1</sup>
<i>Epilobio-Geranium robertiani</i>	I <sup>0</sup>	I <sup>10</sup>			I <sup>0</sup>	I <sup>10</sup>		I <sup>10</sup>	I <sup>1750</sup>	
zb. <i>Helianthus tuberosus</i>	I <sup>10</sup>	I <sup>10</sup>	I <sup>10</sup>		I <sup>1750</sup>		I <sup>10</sup>	I <sup>500</sup>		
<i>Holcetum mollis</i>	III <sup>173</sup>		III <sup>173</sup>							
<i>Scirpetum sylvatici</i>			I <sup>0</sup>		I <sup>0</sup>					I <sup>175</sup>
zb. <i>Ceratodon purpureus-Marchantia polymorpha</i>									I <sup>0</sup>	
zb. <i>Cirsium arvense-Vicia cracca</i>	I <sup>10</sup>	I <sup>0</sup>	I <sup>0</sup>					I <sup>10</sup>		
zb. <i>Juncus effuses</i>		I <sup>10</sup>		I <sup>10</sup>					I <sup>0</sup>	
<i>Potentilletum anserinae</i>		III <sup>173</sup>		II <sup>7</sup>		II <sup>1253</sup>			III <sup>1257</sup>	
zb. <i>Pruno Coryletum</i>	I <sup>500</sup>									
zb. <i>Rosa canina</i>	II <sup>10</sup>				I <sup>1875</sup>			II <sup>2750</sup>		
<i>Chenopodietum bonihenrici</i>		I <sup>10</sup>					I <sup>10</sup>		I <sup>0</sup>	
<i>Chaerophyllo hirsuti-Calthetum palustris</i>										
<i>Filipendulo ulmariae-Menthetum longifoliae</i>			III <sup>6</sup>	II <sup>73</sup>	IV <sup>930</sup>			II <sup>251</sup>		
zb. <i>Rubus caesius-Arctium tomentosum</i>	I <sup>500</sup>	I <sup>10</sup>		I <sup>0</sup>			I <sup>10</sup>			
<i>Valeriano-Caricetum flavae</i>			I <sup>0</sup>			I <sup>0</sup>	II <sup>4</sup>			IV <sup>1800</sup>
zb. <i>Calamagrostis villosa</i>					I <sup>5</sup>					
<i>Cardamino-Chrysosplenietum alternifolii</i>					I <sup>0</sup>					
<i>Caricetum remotae</i>					I <sup>0</sup>					
<i>Carici canescentis-Agrostietum caninae</i>						I <sup>3</sup>				I <sup>3</sup>

<i>Hypno-Polypodium</i>		I <sup>10</sup>			I <sup>500</sup>					
<i>Petasitetum albi</i>					III <sup>573</sup>					
<i>Salicetum pentandrocinereae</i>					II <sup>1880</sup>					
zb. <i>Juncus bufonius</i>						I <sup>10</sup>			I <sup>5</sup>	
zb. <i>Reynoutria japonica</i>	I <sup>0</sup>	I <sup>5</sup>								
<i>Senecioni sylvatici-Epilobietum angustifolii</i>					I <sup>500</sup>					
<i>Equisetum fluviatilis</i>					I <sup>250</sup>					
<i>Petasitetum kablikiani</i>					I <sup>500</sup>					
Liczba wystąpień	36	34	33	31	28	25	23	22	22	20

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [1]

Do gatunków roślin kosmetycznych najczęściej występujących w zbiorowiskach nieleśnych Masywu Ochodzitej należą: *Achillea millefolium* (36), *Taraxacum officinale* (34), *Rumex acetosa* (33), *Alchemilla monticola* (31), *Urtica dioica* (28), *Trifolium repens* (25), *Plantago lanceolata* (23), *Elymus repens* (22), *Plantago major* (22), *Potentilla erecta* (20). Roślinami kosmetycznymi wykazującymi największy stopień stałości i współczynniki pokrycia są: *Rubus idaeus* (V<sup>8333</sup>) w *Rubetum idaei*, *Vaccinium myrtillus* (V<sup>8000</sup>) w zbiorowisku *Vaccinium myrtillus*, *Urtica dioica* (V<sup>7091</sup>) w zbiorowisku *Urtica dioica*, *Trifolium repens* (V<sup>5250</sup>) w *Lolio-Cynosuretum*, *Sorbus aucuparia* (V<sup>4583</sup>) w zbiorowisku *Sorbus aucuparia* oraz *Plantago major* (V<sup>3071</sup>) w *Lolio-Polygonetum arenastri*.

#### 4. Zastosowanie roślin kosmetycznych zbiorowisk nieleśnych Masywu Ochodzitej

W wyniku przeprowadzonych badań na terenie Masywu Ochodzitej zidentyfikowano 69 gatunków roślin mających zastosowanie w kosmetyce. Zawierają one szereg substancji biologicznie czynnych, które mogą być wykorzystane nie tylko w kosmetyce, ale również w fitoterapii [23].

Działanie farmakologiczne roślin stosowanych w kosmetyce [22] przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Działania farmakologiczne roślin stosowanych w kosmetyce. Wybrane przykłady

Nazwa gatunku rośliny po łacinie	Działanie
<i>Achillea millefolium</i> L.	dezynfekujące, ściągające, przeciwzapalne, łagodzące i gojące
<i>Acorus calamus</i> L.	pobudzające krążenie i antykoagulacyjne
<i>Alcea rosea</i> L.	łagodzące i gojące
<i>Avena sativa</i> L.	regenerujące, uszczelniające i uelastyczniające naczynia krwionośne, napinające i ujędrniające skórę, promieniochronne
<i>Betula pendula</i> Roth	ściągające, regenerujące, rozjaśniające, wybielające
<i>Calendula officinalis</i> L.	przeciwzapalne łagodzące i gojące, immunostymulujące, uszczelniające i uelastyczniające naczynia krwionośne, sebstatyczne
<i>Corylus avellana</i> L.	regenerujące, promieniochronne
<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	pobudzające krążenie i antykoagulacyjne, nawilżające
<i>Daucus carota</i> L.	przeciwzapalne
<i>Equisetum arvense</i> L.	uszczelniające i uelastyczniające naczynia krwionośne, napinające i ujędrniające skórę, sebstatyczne
<i>Hypericum perforatum</i> L.	dezynfekujące, przeciwzapalne, łagodzące i gojące, przyciemniające, fotouczulające
<i>Juniperus communis</i> L.	ściągające, uszczelniające i uelastyczniające naczynia krwionośne, sebstatyczne
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	dezynfekujące, przeciwzapalne, łagodzące i gojące, promieniochronne, barwiące
<i>Plantago lanceolata</i> L.	przeciwzapalne, łagodzące i gojące, napinające i ujędrniające skórę, sebstatyczne
<i>Polygonum aviculare</i> L.	ściągające
<i>Potentilla erecta</i> (L.) Rausch.	ściągające, sebstatyczne
<i>Quercus robur</i> L.	ściągające, sebstatyczne
<i>Rosa canina</i> L.	przeciwzapalne, regenerujące
<i>Rubus idaeus</i> L.	sebstatyczne, promieniochronne
<i>Salix purpurea</i> L.	sebstatyczne
<i>Sambucus nigra</i> L.	ściągające, uszczelniające i uelastyczniające naczynia krwionośne

<i>Tanacetum vulgare</i> L.	dezynfekujące
<i>Tilia cordata</i> Mill.	nawilżające
<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	uszczelniające i uelastyczniające naczynia krwionośne, nawilżające
<i>Viola arvensis</i> Murray	uszczelniające i uelastyczniające naczynia krwionośne
<i>Viola tricolor</i> L.	sebastatyczne

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [22]

Rośliny kosmetyczne dostarczają różnorodnych związków chemicznych [22, 23], które spełniają istotne funkcje w kosmetykach i pozytywnie wpływają na skórę [24]. Są wykorzystywane np.: do natłuszczenia, regeneracji skóry, do aromaterapii oraz do jej pielęgnacji.

W tabeli 5 przedstawiono związki chemiczne dostarczane przez wybrane gatunki roślin zbiorowisk nieleśnych Masywu Ochodzitej.

Tabela 5. Związki chemiczne dostarczane przez wybrane gatunki roślin kosmetycznych zbiorowisk nieleśnych Masywu Ochodzitej

Nazwa związku chemicznego	Nazwa gatunku rośliny po łacinie
tłuszcze	<i>Brassica napus</i> L. ssp. <i>napus</i> , <i>Corylus avellana</i> L.
olejki eteryczne	<i>Acorus calamus</i> L., <i>Matricaria chamomilla</i> L., <i>Juniperus communis</i> L., <i>Rosa canina</i> L.
żywice, balsamy, gummy i gumożywice	<i>Prunus avium</i> L.
węglowodany	<i>Avena sativa</i> L., <i>Crataegus monogyna</i> Jacq., <i>Fragaria vesca</i> L., <i>Malus domestica</i> Borkh., <i>Sambucus nigra</i> L.
śluzki	<i>Plantago lanceolata</i> L., <i>Sambucus nigra</i> L.
barwniki	<i>Achillea millefolium</i> L., <i>Alcea rosea</i> L., <i>Calendula officinalis</i> L., <i>Daucus carota</i> L., <i>Hypericum perforatum</i> L., <i>Matricaria chamomilla</i> L., <i>Sambucus nigra</i> L., <i>Sorbus aucuparia</i> L., <i>Tilia cordata</i> Mill., <i>Vaccinium myrtillus</i> L., <i>Viola tricolor</i> L.
garbniki	<i>Betula pendula</i> Roth, <i>Polygonum aviculare</i> L., <i>Potentilla erecta</i> (L.) Rausch., <i>Quercus robur</i> L., <i>Rubus idaeus</i> L., <i>Solidago virgaurea</i> L., <i>Tussilago farfara</i> L., <i>Vaccinium myrtillus</i> L., <i>Veronica officinalis</i> L., <i>Viola tricolor</i> L.

saponiny	<i>Anthyllis vulneraria</i> L., <i>Bellis perennis</i> L., <i>Calendula officinalis</i> L., <i>Solidago virgaurea</i> L., <i>Veronica officinalis</i> L., <i>Viola tricolor</i> L.
kumaryny	<i>Galium odoratum</i> (L.) Scop.
hydroksykwas	<i>Malus domestica</i> Borkh., <i>Rubus idaeus</i> L., <i>Sambucus nigra</i> L., <i>Sorbus aucuparia</i> L., <i>Vaccinium myrtillus</i> L.
fitohormony	<i>Malus domestica</i> Borkh.
witamina i sole mineralne	<i>Cucurbita pepo</i> L., <i>Daucus carota</i> L., <i>Equisetum arvense</i> L., <i>Prunus avium</i> L.

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [22]

## 5. Dyskusja

Substancje chemiczne zawarte w roślinach są wykorzystywane w medycynie, farmacji i w kosmetologii. Mają działanie lecznicze: przeciwdrobnoustrojowe, przeciwzapalne, regulujące pracę hormonów [25]. Obecnie rośliny są jednym z podstawowych źródeł substancji leczniczych, szczególnie w krajach rozwijających się [26]. Wzrasta również zainteresowanie kosmetykami roślinnymi. Są one bogatym źródłem substancji biologicznie czynnych o wszechstronnym działaniu. Kosmetyki roślinne są coraz bardziej popularne również dlatego, że nie powodują działań ubocznych i nie działają szkodliwie na organizm człowieka [27].

W różnych strefach klimatyczno-geograficznych stwierdzono występowanie ponad 500 gatunków roślin mających znaczenie kosmetyczne, terapeutyczne [23]. Wyniki analizy roślin kosmetycznych zbiorowisk nieleśnych Masywu Ochodzitej można zestawić i porównać z roślinami kosmetycznymi flory Polski [21]. We florze Polski opisano występowanie 150 gatunków roślin kosmetycznych. Udział gatunków kosmetycznych w rodzimej florie jest porównywalny z florą Europy środkowej, zachodniej i północnej [21]. W zbiorowiskach nieleśnych Masywu Ochodzitej zidentyfikowano 69 gatunków roślin kosmetycznych, co stanowi 46% flory Polski. Wśród opisanych gatunków z Masywu Ochodzitej, tylko jeden gatunek *Veratrum lobelianum* L. podlega ochronie prawnej, a we florze Polski 11 gatunków jest chronionych.

Udział poszczególnych form życiowych wg Raunkiaera roślin kosmetycznych w badanych zbiorowiskach oraz we florze Polski [21] jest podobny. Zarówno we florze Polski, jak i w zbiorowiskach nieleśnych Masywu Ochodzitej przeważają hemikryptofity i fanerofity. Różnica dotyczy ilości terofitów. Porównanie udziału form życiowych wśród roślin kosmetycznych zbiorowisk nieleśnych Masywu Ochodzitej oraz flory Polski przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Zestawienie udziału form życiowych wg Raunkiaera wśród roślin kosmetycznych zbiorowisk nieleśnych Masywu Ochodzitej i flory Polski

Forma życiowa wg Raunkiaera	Liczba gatunków w %	
	Zbiorowiska nieleśne Masywu Ochodzitej	Flora Polski
Fanerofity	29	31

Chamefity	4	6
Hemikryptofity	34	35
Kryptofity	10	9
Terofity	16	9
Inne formy	7	10

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [21]

Udział bylin jest podobny i wynosi w zbiorowiskach Masywu Ochodzitej 48%, a we florze Polski 50% [21].

70% roślin kosmetycznych flory Polski występuje na stanowiskach naturalnych, w większości łąkowych [21]. Z przeprowadzonej analizy wynika, że większość roślin kosmetycznych na badanym terenie występuje w zbiorowiskach o charakterze antropogenicznym. W zbiorowiskach o charakterze naturalnym stwierdzono występowanie pojedynczych gatunków roślin kosmetycznych (1-3 gatunki).

## 6. Podsumowanie

Na terenie Masywu Ochodzitej w zbiorowiskach nieleśnych stwierdzono występowanie 69 gatunków roślin, które mogą być wykorzystane w kosmetyce.

Najwięcej gatunków roślin kosmetycznych zidentyfikowano w zbiorowiskach o charakterze antropogenicznym.

Zbiorowiskiem, w którym opisano najwięcej gatunków roślin kosmetycznych jest zbiorowisko zaroślowe *Sorbus aucuparia* – 26 gatunków.

Do gatunków roślin kosmetycznych występujących najczęściej na badanym terenie należą: *Achillea millefolium* L., *Taraxacum officinale* (L) Weber ex F.H. Wigg., *Rumex acetosa* L., *Alchemilla monticola* Opiz., *Urtica dioica* L.

Roślinami kosmetycznymi wykazującymi największy stopień stałości i współczynniki pokrycia są: *Rubus idaeus* (V<sup>8333</sup>) w *Rubetum idaei*, *Vaccinium myrtillus* (V<sup>8000</sup>) w zbiorowisku *Vaccinium myrtillus*, *Urtica dioica* (V<sup>7091</sup>) w zbiorowisku *Urtica dioica*.

Wśród roślin kosmetycznych, które zostały zidentyfikowane na badanym terenie dominują byliny (48%).

Gatunki roślin kosmetycznych zidentyfikowane na badanym terenie wykazują różnorodne działanie i mogą być wykorzystywane do: aromaterapii, natłuszczenia oraz regeneracji i pielęgnacji skóry.

## 7. Wniosek

Mając na uwadze piękno krajobrazu Masywu Ochodzitej oraz występowanie gatunków roślin kosmetycznych w zbiorowiskach nieleśnych masywu, warto wyznaczyć i opisać przyrodniczą ścieżkę dydaktyczną uwzględniającą stanowiska roślin kosmetycznych. Dzięki temu możliwe byłoby spopularyzowanie wiedzy na temat gatunków roślin kosmetycznych oraz możliwości ich pozyskiwania dla celów kosmetycznych i farmaceutycznych.

## Literatura:

1. Wytyczak K., *Zróżnicowanie roślinności Masywu Ochodzitej w Beskidzie Śląskim jako następstwo antropopresji*, (m-pis), WBiOŚ UŚ, Katowice 2015.
2. *Encyklopedia Gazety Wyborczej*, tom 8. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
3. Braun-Blanquet J., *Pflanzensoziologie, Grundzüge der Vegetationskunde*. 3 Aufl.



- (Phytosociology, the basis of vegetation science, Vol. 3). Springer Verl., Wien-New York, 1964.
4. Fukarek F., *Fitosocjologia*, PWRiL., Warszawa 1967.
  5. Matuszkiewicz W., *Przewodnik do oznaczania zbiorowisk roślinnych Polski*, PWN, Warszawa 2008.
  6. Valachovič M., *Montio-Cardaminetea*, [w:] Valachovič M. (Ed.). *Plant communities in Slovakia. 3. Wetland Vegetation*, Veda, Publisher House Slovak Academy of Sciences. Bratislava 2001.
  7. Zamfirescu O., Mânzu C., Chifu T., *Contributions to the Study of the Ruderal Vegetation from the Ceahlău Mountain*, Analele științifice ale Universității „Al. I. Cuza” Iași, Biologie vegetală s. II, 54(2), 2008.
  8. Láníková D., Kočí M., Sádlo J., Šumberová K., Hájková P., Hájek M., Petřík P., *Nitrofilní vytrvalá vegetace vlhkých a mezických stanovišť*, [w:] Chytrý M. (red.). *Vegetace České republiky. 2. Ruderální, plevelová, skalní a suťová vegetace*. Wyd. Academia, Praha 2009.
  9. Świerkosz K., *Notes on the syntaxonomy of the Asplenietea trichomanis class in Poland*. Polish Botanical Journal 49(2), 2004.
  10. Brzeg A., Wojterska M., *Zespoły roślinne Wielkopolski. Ich stan poznania i zagrożenie*, [w:] Wojterska M., (red.). *Szata roślinna Wielkopolski i Pojezierza Południowopomorskiego. Przewodnik sesji terenowych 52*, Zjazd PTB w Poznaniu, 2001.
  11. Ratyńska H., *Roślinność Poznańskiego Przełomu Warty i jej antropogeniczne przemiany*, Wydaw. Akademii Bydgoskiej im. Kazimierza Wielkiego, Bydgoszcz 2001.
  12. Mirek Z., *Distribution and communities of Holcus mollis in the Polish Tatra mountains and northern sub-Tatra region*, Oecologica Montana 6, 1997.
  13. Hájková P. 2007. *MAE Calthion palustris Tüxen 1937*, [w:] Janišová M. (red.). *Travninobylinná vegetácia Slovenska – elektronický expertný systém na identifikáciu syntaxónov*, Botanický ústav SAV, Bratislava 2007.
  14. Brzeg A., *Przegląd systematyczny zbiorowisk okrajkowych dotąd stwierdzonych i mogących występować w Polsce*, *Fragm. Flor. Geobot.* 34(3-4), 1989.
  15. Wilczek Z., *Fitosocjologiczne uwarunkowania ochrony przyrody Beskidu Śląskiego (Karpaty Zachodnie)*, *Prace Naukowe UŚl.* 2418, Katowice 2006.
  16. Rutkowski L., *Klucz do oznaczania roślin naczyniowych Polski niżowej*, PWN, Warszawa 2006.
  17. Mirek Z., Piękoś-Mirkowa, Zając A., Zając M., 2002. *Flowering plants and pteridophytes of Poland. A checklist. – Krytyczna lista roślin naczyniowych Polski*, *Biodiversity of Poland* 1, 2002.
  18. Pawłowski B., *Skład i budowa zbiorowisk roślinnych i metody ich badania*, [w:] Szafer W., Zarzycki K. (red.), *Szata roślinna Polski. T. I*, PWN, Warszawa 1977.
  19. *Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 października 2014 w sprawie ochrony gatunkowej roślin*, *Dziennik Ustaw* (2014), poz. 1409.
  20. Zarzycki K., Trzcńska-Tacik H., Różański W., Szelaż Z., Wołek J., Korzeniak U. 2002. *Ecological indicator values of vascular plants of Poland*, W. Szafer Institute of Botany, PAS, Kraków 2002.
  21. Dąbrowska A., Chernetskyy M., Sawicki R., Szymczak G., *Rośliny o właściwościach kosmetycznych we florze Polski*, [w:] Kiełtyka-Dadasiewicz A. (red.), *Rośliny w nowoczesnej w nowoczesnej kosmetologii. Monografia naukowa*, Wydawnictwo Akademickie Wyższej Szkoły Społeczno-Przyrodniczej im. Wincentego Pola w Lublinie, Lublin 2016.
  22. Jędrzejko K., Kowalczyk B., Bacler B., *Rośliny kosmetyczne*, Śląska AM, Katowice 2012.
  23. Czerpak R., Jabłońska-Trypuć A., *Roślinne surowce kosmetyczne*, MedPharm Polska, Wrocław 2008.
  24. Jabłońska-Trypuć A., Czerpak R., *Surowce kosmetyczne i ich składniki. Część teoretyczna i ćwiczenia laboratoryjne*, MedPharm Polska, Wrocław 2008.

25. Wyszowska-Kolatko M., Koczurkiewicz P., Wójcik K., *Rośliny lecznicze w terapii chorób skóry*, Postępy Fitoterapii, 3,2015, 184-192.
26. Challoner. J., Coyne C., Harrar S., McCall B., McGhee K., Thomas A., *Niezwykłe lecznicze dary natury*, Reader's Digest, Warszawa 2014.
27. Jankowiak. W., Schaschner K., *Surowce roślinne w kosmetyce – fitokosmetyki*, Kosmetologia estetyczna, 4(2), 2013, 239-241.

## **Rośliny kosmetyczne w zbiorowiskach nieleśnych Masywu Ochodzitej w Beskidzie Śląskim i możliwości ich wykorzystania**

### Streszczenie

Celem pracy było opisanie roślin o znaczeniu kosmetycznym, występujących w zbiorowiskach nieleśnych Masywu Ochodzitej, który położony jest w południowej części Beskidu Śląskiego na pograniczu polsko-czesko-słowackim. Gatunki roślin kosmetycznych opracowano na podstawie analizy badań fitosocjologicznych przeprowadzonych w latach 2010-2015. Analizie poddano 43 zespoły i 21 zbiorowisk nieleśnych występujących na terenie Masywu Ochodzitej, gdzie zaobserwowano różnorodne przejawy antropopresji. Opisano gatunki o znaczeniu kosmetycznym występujące w różnych zbiorowiskach nieleśnych. Wytypowano zbiorowiska nieleśne, w których stwierdzono występowanie największej liczby roślin kosmetycznych oraz podano gatunki roślin kosmetycznych podlegających ochronie prawnej. Otrzymane wyniki porównano z zestawieniem roślin kosmetycznych flory Polski.

Słowa kluczowe: Masyw Ochodzitej, rośliny kosmetyczne, zbiorowiska nieleśne

## **Cosmetic plants in non-forest communities of the Ochodzita Massif in the Silesian Beskids and possibilities of their use**

### Abstract

The purpose of this article was to describe plants of cosmetic importance occurring in non-forest communities of the Ochodzita Massif in the southern part of the Silesian Beskids, on the Polish-Czech-Slovak border.

Cosmetic plant species have been described based on the analysis of phytosociological studies carried out in 2010-2015.

The analysis includes 43 plant associations and 21 non-forest communities occurring in the Ochodzita Massif, where various manifestations of anthropopressure have been observed.

Species of cosmetic significance occurring in various non-forest communities have been characterized. Non-forest communities have been identified in which the largest number of cosmetic plants have been found. Protected species of cosmetic plants have been presented.

The obtained results have been compared with the list of cosmetic plants of the Polish flora.

Keywords: the Ochodzita Massif, cosmetic plants, non-forest communities

## Biosurfaktanty w bioremediacji

### 1. Wstęp

Jakość życia na Ziemi jest nierozzerwalnie związana ze stanem środowiska, które nas otacza. Nieustannie rosnące, globalne zanieczyszczenie gleb, wód gruntowych i powierzchniowych, osadów oraz powietrza niebezpiecznymi oraz toksycznymi związkami chemicznymi wpływa negatywnie na florę i faunę wielu dotkniętych siedlisk. Co więcej, część zanieczyszczeń jest pobieranych i akumulowanych w łańcuchach pokarmowych organizmów, prowadząc ostatecznie do wielu zaburzeń zdrowotnych u ludzi [1-3]. Konwencjonalne środki rekultywacji skażonych terenów związane są często z transportem zanieczyszczeń na specjalne wysypiska lub z zamykaniem i izolowaniem zanieczyszczonego terenu. Obie te metody nie zapewniają jednak szybkiej i efektywnej degradacji odpadów, a jedynie zabezpieczają przed ich rozprzestrzenianiem. Zdecydowanie lepszym rozwiązaniem jest kompletna utylizacja zanieczyszczeń lub przekształcanie ich w nieszkodliwe pochodne. Remediacja tego typu obejmuje spalanie w wysokiej temperaturze oraz różnego typu obróbki chemiczne. Metody te jednak są mało ekonomiczne i co za tym idzie, najczęściej nieopłacalne. Ponadto mogą one wtórnie generować dodatkowe zanieczyszczenia [3]. Ekologiczną alternatywą dla wspomnianych metod jest bioremediacja. W przeciwieństwie do konwencjonalnych metod rekultywacji, bioremediacja polega na wykorzystaniu aktywności biologicznej żywych organizmów. W ostatnich latach wyizolowano ogromną ilość mikroorganizmów zdolnych do rozkładu wielu typów zanieczyszczeń, w tym związków wcześniej uznanych za nieodegradowalne. Sugeruje to duży udział presji selekcyjnej środowiska w kierunku wykorzystania wszechobecnych zanieczyszczeń i wszelkiego rodzaju ksenobiotyków jako źródeł węgla i energii dla bakterii. Co istotne, bakterie rozwinęły szereg cech adaptacyjnych umożliwiających im wykorzystanie potencjalnych zanieczyszczeń – między innymi produkcję specyficznych metabolitów wtórnych, takich jak biosurfaktanty. W niniejszej pracy przedstawiono rolę bakteryjnych związków powierzchniowo czynnych w degradacji zanieczyszczeń środowiska [3, 4].

### 2. Skażenie związkami ropopochodnymi

Emisja związków ropopochodnych jest jedną z głównych przyczyn globalnego zanieczyszczenia. Ze względu na zdolność migracji zanieczyszczeń do gleb, wód gruntowych czy powietrza, zanieczyszczenia tego typu stanowią poważne zagrożenie dla życia wielu organizmów. Źródła niekontrolowanego uwalniania ropy naftowej mogą być różne i obejmują między innymi: wycieki podczas transportu (drogą morską i lądową), wydobywanie i przetwarzanie, a także emisję z zakładów przemysłowych przy produkcji np. tworzyw sztucznych, rozpuszczalników, kosmetyków czy leków [5]. Ropa naftowa składa się głównie z trzech frakcji węglowodorowych. Najliczniejszą frakcją jest zwykle parafina, która zawiera liniowe i rozgałęzione węglowodory alifatyczne. Z kolei frakcja zawierająca nafteny charakteryzuje się

<sup>1</sup> mstyczynski@biol.uw.edu.pl, Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, <http://ddg.biol.uw.edu.pl/>.

obecnością alicyklicznych węglowodorów złożonych z nasyconych pierścieni (często z bocznymi rozgałęzieniami alifatycznymi). Frakcja aromatyczna natomiast składa się z węglowodorów zawierających co najmniej jeden pierścień aromatyczny [6]. Do najczęściej spotykanych węglowodorów ropopochodnych należą alkanany alifatyczne, rozgałęzione i cykloalifatyczne, a także monocykliczne i policykliczne węglowodory aromatyczne (WWA). WWA obejmują związki takie jak: naftalen, fluoren, fenantren, antracen, fluoranten, piren, benzoantracen i benzopiren [6]. Na szczególną uwagę zasługują lotne węglowodory aromatyczne z grupy węglowodorów nazywanych BTEX (od nazw: benzen, toluen, etylobenzen i ksylen) obecne przede wszystkim w lekkiej frakcji benzyny po obróbce ropy naftowej. W wyniku badań przeprowadzonych na wybranych skażonych terenach okazało się, że około 90% węglowodorów, pochodzących z benzyny uwolnionej do środowiska należało do grupy BTEX. Należy podkreślić, że węglowodory należące do tej grupy mają szczególną zdolność migracji do wody (w tym wody pitnej) [6-8]. Innym przykładem emisji zanieczyszczeń są zakłady petrochemiczne i rafinerie, gdzie powstają tzw. stałe odpady olejowe (nawet 10000 m<sup>3</sup> dziennie) klasyfikowane jako odpady niebezpieczne, które nie mogą być ponownie użyte lub poddane recyklingowi [6, 7].

### 2.1. Katastrofy ekologiczne

Blisko połowa światowej produkcji ropy naftowej (około 3 miliardów ton rocznie) transportowana jest drogą morską. Główne źródło zanieczyszczeń związkami ropopochodnymi w oceanach pochodzi z rutynowego mycia statków, naturalnych wycieków z dna morskiego, a także na skutek katastrof ekologicznych podczas poszukiwań i wydobywania ropy naftowej. W ciągu ostatnich kilkunastu lat miało miejsce kilka ogromnych katastrof ekologicznych. Jedną z największych miała miejsce 13 listopada 2002 roku, kiedy tankowiec „Prestige” zatonął w okolicy Galicji wylewając ponad 19 tysięcy ton oleju bunkrowego. Inną tragiczną katastrofą ekologiczną był wyciek ropy po wybuchu platformy wiertniczej w 2010 roku w Zatoce Meksykańskiej (USA). Po zatonięciu platformy otwarte kanały w obszarze wiercenia (głębokość 1,5 km), zanim ostatecznie zostały zamknięte, nadal wylewały olej do morza przez okres trzech miesięcy. Oficjalne raporty wskazują na uwolnienie ponad tysiąca baryłek ropy dziennie, przy szacowanej łącznej ilości od trzech do czterech milionów baryłek ropy. Kolejna katastrofa, w 2011 roku, miała miejsce na platformie wiertniczej w Campos Bay (Brazylia), na skutek której wyciekło około 5943 litrów ropy naftowej, pokrywając teren obejmujący blisko 163 km<sup>2</sup>. Warto podkreślić, że węglowodory aromatyczne stanowią ogromne zagrożenie ze względu na ich właściwości toksyczne, mutagenne i rakotwórcze [6, 7].

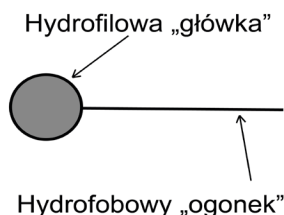
### 3. Skażenie metalami ciężkimi

Metale ciężkie stanowią również bardzo poważne źródło zanieczyszczeń. Mimo, że metale i metaloidy są naturalnie występującymi pierwiastkami w skorupie ziemskiej, większość zanieczyszczeń środowiska wynika z działalności antropogenicznej. Główne źródła skażenia to przemysł wydobywczy i przetwórczy metali, ale także spalanie węgla w elektrowniach, przetwarzanie ropy naftowej, działanie elektrowni jądrowych i linii wysokiego napięcia, wytwarzanie i niewłaściwa obróbka tworzyw sztucznych, przemysł tekstylny czy wszelkiego rodzaju impregnaty. Antropogeniczne źródła emisji metali ciężkich i metaloidów są praktycznie wszechobecne. Należy

jednak pamiętać o naturalnych źródłach zanieczyszczeń, jakimi są erupcje wulkanów czy wietrzenie skał [9, 10]. Warto podkreślić, że jednym z głównych źródeł zanieczyszczeń są kopalnie (na ogół porzucone), gdzie istotnym problemem jest zjawisko zwane kwaśnym wymywaniem ścieków (ang. *acid mine drainage*, AMD). Wody przepływające przez kopalnie oraz odpady kopalniane, są często ekstremalnie kwaśne. Zakwaszone wody stanowią dodatkowe zagrożenie dla środowiska, ponieważ zawierają często podwyższone stężenia metali, m.in. żelaza, glinu i manganu oraz metaloidów, z których arsen jest największy problemem [11]. Gdy minerały siarczkowe narażone są na działanie tlenu (atmosfery), utlenianie siarczku w wodzie powoduje wytwarzanie kwasu siarkowego i prowadzi do uwolnienia metali ciężkich i innych zanieczyszczeń do środowiska. Cechą AMD jest to, że jej źródła mogą pozostawać aktywne przez dziesięciolecia, a nawet stulecia po zamknięciu kopalni [12].

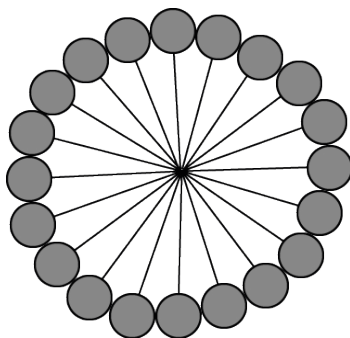
#### 4. Biosurfaktanty

Biosurfaktanty zdefiniować można jako produkowane przez mikroorganizmy związki powierzchniowo aktywne [13]. Biosurfaktanty mają wiele zalet nad syntetycznymi surfaktantami. Są one przede wszystkim: biodegradowalne, wykazują niską toksyczność, ich działanie jest specyficzne, a także wykazują aktywność w niskich i wysokich temperaturach oraz szerokim spektrum pH i zasolenia. Biosurfaktanty są amfipatycznymi cząsteczkami złożonymi z hydrofobowych i hydrofilowych struktur umożliwiających im oddziaływanie na granicach faz olej/woda i woda/olej (rys. 1).



Rysunek 1. Schematyczna budowa cząsteczki biosurfaktantu. Źródło: (opracowanie własne)

Tego typu budowa pozwala surfaktantom tworzenie miceli – zamkniętych kuliście cząsteczek związku (rys. 2). Dzięki temu zmniejszają one napięcie powierzchniowe zwiększając jednocześnie biodostępność (i umożliwiając degradację) związków nierozpuszczalnych w wodzie (np. węglowodorów) [7, 14]. Niepolarne ugrupowanie jest często łańcuchem węglowodorowym, podczas gdy polarna „główka” może być jonowa (kationowa lub anionowa), niejonowa lub amfoteryczna [14]. Cechy te sprawiają, że zainteresowanie biosurfaktantami nieustannie rośnie. Naturalne surfaktanty stosowane są w wielu różnych gałęziach przemysłu – od spożywczego, farmaceutycznego po wydobywczy, np. ropy naftowej. Mogą być one stosowane jako, między innymi, emulgatory, środki zwilżające czy środki spieniające. Zdolność do międzyfazowego zmniejszania napięcia powierzchniowego stanowi również szczególnie istotny czynnik w bioremediacji skażonych obszarów [13, 15].



Rysunek 2. Schematyczna struktura miceli – hydrofilowe struktury skierowane są na zewnątrz kuli.  
Źródło: (opracowanie własne)

Surfaktanty powstałe na drodze syntezy chemicznej klasyfikowane są zazwyczaj według ich stopnia polarności. Biosurfaktanty natomiast klasyfikowane są według ich pochodzenia mikrobiologicznego oraz natury chemicznej [13, 15]. Ich struktury składają zwykle się z jednej lub kilku klas związków, w tym kwasów glikolipidów (ramnolipidy, soforolipidy, trehalolipidy), lipoprotein i lipopeptydów (surfaktyna, wiskozyzna), fosforolipidów, czy polimerów (emulsan, liposan, alasan, lipomanan) [16-19]. W bioremediacji stosowane są przede wszystkim bakterie produkujące ramnolipidy (*Pseudomonas* sp.), surfaktynę i wiskozyzę (*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp.), trehalolipidy (*Rhodococcus* sp.) i emulsan (*Acinetobacter* sp.) [20].

## 5. Produkcja biosurfaktantów

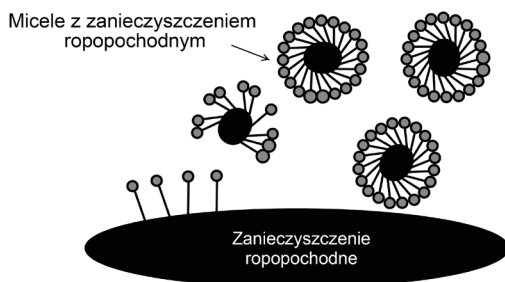
Produkcja bakteryjnych biosurfaktantów zachodzi głównie w momencie osiągnięcia przez bakterie stacjonarnej fazy wzrostu. Wykazano, że wytwarzanie biosurfaktantów indukowane jest najczęściej przez sygnały molekularne zaangażowane w wykrywanie quorum sensing. Co więcej, we wszystkich badanych przypadkach produkcja biosurfaktantów różnego typu była proporcjonalna do wzrostu gęstości komórek [21]. Podczas biosyntezy naturalnych surfaktantów, hydrofilowe substraty organiczne obecne w podłożu wykorzystywane są przez bakterie do wytworzenia polarnego ugrupowania cząsteczki, natomiast hydrofobowe związki służą do wytworzenia niepolarnego fragmentu surfaktantu. W zależności od typu biosurfaktantów, w ich syntezie biorą udział różne szlaki metaboliczne, które są silnie zależne od dostępnych źródeł węgla w pożywce/środowisku. Synteza biosurfaktantów może zachodzić według czterech głównych strategii: I) syntetyzowana jest zarówno część lipidowa jak i hydrofilowa, II) wytwarzane są części hydrofilowe, natomiast część hydrofobowa zależy od dostępnych prekursorów, III) syntetyzowana jest część hydrofobowa, a część hydrofilowa zależy od dostępnych w pożywce substancji; IV) hydrofobowe i hydrofilowe prekursory łączone są metabolicznie w bakterii w biosurfaktanty. Obecność odpowiednich związków w pożywce lub w środowisku jest zatem bardzo istotna w przypadku produkcji naturalnych związków powierzchniowo czynnych [10].

Bioremediacja może być przeprowadzana na miejscu skażenia (*in situ*) lub poza miejscem skażenia (*ex situ*), co wiąże się z przemieszczeniem zanieczyszczeń i uprawianiem tzw. land farmingu. W obu przypadkach bakterie żyjące natywnie na

skażonych terenach mogą być dodatkowo stymulowane do produkcji biosurfaktantów poprzez wprowadzenie odpowiednich związków odżywczych – np. melasy czy oleju sojowego. Powszechnie stosowana jest również metoda bioaugmentacji, czyli wprowadzania wyselekcjonowanych i namnożonych wtórnie bakterii na dany obszar. Co więcej, obie wspomniane metody są znacznie bardziej skuteczne niż zastosowanie samych oczyszczonych biosurfaktantów. Szczególnie istotne są również czynniki, limitujące produkcję metabolitów. Niedostateczna ilość tlenu, węgla i innych związków odżywczych silnie ogranicza produkcję naturalnych surfaktantów i tym samym cały proces bioremediacji. Dodatkowo, w celu zwiększenia produkcji biosurfaktantów przez bakterie na skażonych terenach, stosowane są nawozy ze stosunkowo tanich związków odpadowych lub ubocznych, takich jak ekstrakt drożdżowy czy wszelkiego rodzaju odpadowe oleje smażalnicze. Aby zapewnić odpowiednią ilość tlenu, stosowane są najczęściej zabiegi fizyczne, takie jak mieszanie gleby, czy tworzenie wszelkiego rodzaju drenaży. Niekiedy stosowane są również związki chemiczne, jednak mogą być one szkodliwe dla większości bakterii (np. woda utleniona) [22, 23].

## 6. Bioremediacja przy udziale biosurfaktantów

Niska rozpuszczalność związków ropopochodnych, w tym szczególnie niebezpiecznych wielonienasyconych węglowodorów aromatycznych, stanowi wyzwanie dla mikroorganizmów i jest potencjalnym problemem w bioremediacji skażonych terenów. Biosurfaktanty poprawiają biodostępność hydrofobowych skażeń poprzez ich mobilizację ze struktur glebowych i / lub zwiększając ich rozpuszczalność w wodzie. Dzieje się to na skutek silnego obniżenia napięcia międzyfazowego substancji. Związki powierzchniowo czynne o niskiej masie cząsteczkowej i niskim krytycznym stężeniu micelizacji (micele pojawiają się już przy niskim stężeniu surfaktantu) zwiększają rozpuszczalność węglowodorów poprzez włączenie ich do hydrofobowych miceli (rys. 3) [7, 24]. Warto dodać, że dla bakterii rosnących w obecności hydrofobowych substancji, wzrost może być znacznie ograniczony na skutek międzyfazowej przestrzeni pomiędzy fazą wodną i olejem. W celu poprawy wzrostu w takich warunkach, bakterie produkują biosurfaktanty m.in. o właściwościach emulgujących. Dzięki temu wytwarzają one emulsję umożliwiającą im dostęp do hydrofobowego źródła węgla i energii. Należy jednak podkreślić, że bakterie często wytwarzają substancje emulgujące w bezpośrednim sąsiedztwie swoich komórek, co przekłada się na zależność (proporcjonalną) ilości bakterii i substancji emulgującej [21, 25].



Rysunek 3. Niepolarne zanieczyszczenia ropopochodne zamykane są w micelach biosurfktantu. Źródło: (opracowaniwe własne)

Podobnie jak w przypadku związków ropopochodnych, zanieczyszczenie środowiska metalami ciężkimi stanowi poważny i globalny problem. W przeciwieństwie do wielu niebezpiecznych składników organicznych, nie są one biodegradowane i tym samym nie mogą zostać zneutralizowane poprzez degradację ich struktury. Co istotne, zanieczyszczenia metalami ciężkimi w środowisku są zwykle ściśle związane z cząsteczkami koloidalnymi i materią organiczną [26]. Powolna kinetyka desorpcji metali z różnego typu struktur stanowi problem przy standardowej metodzie wypłukiwania zanieczyszczeń z gleb i skutkuje tym samym długotrwałą procedurą oczyszczania. Wydajność płukania można znacznie poprawić stosując odpowiednie środki desorpcyjne – między innymi biosurfaktanty. Związki powierzchniowo czynne produkowane przez bakterie cechują się dobrą rozpuszczalnością w wodzie, są stabilne w różnych warunkach fizykochemicznych, nie wiążą się silnie z cząsteczkami gleby, a niektóre (np. surfaktyna) mają powinowactwo do metali ciężkich. Cechy te umożliwiają im desorpcję metali związanych z cząsteczkami podłoża i ułatwiają ich transport przez struktury gleby. Biosurfaktanty stosowane są do usuwania ze środowiska m.in. kadmu, miedzi, lantanu, ołowiu czy cynku [27].

Usuwanie metali przy wykorzystaniu jonowych biosurfaktantów zachodzi według pewnej teoretycznej kolejności: 1) sorpcja biosurfaktantu do powierzchni gleby i utworzenie kompleksu z metalem; 2) oderwanie metalu od cząsteczki gleby i przeniesienie go do roztworu; 3) uwięzienie metalu w micelach poprzez działanie elektrostatyczne surfaktantu. Co istotne, metale ciężkie można wyodrębnić następnie metodą strącania lub rozdziału membranowego. W przypadku anionowych biosurfaktantów, metale ciężkie wiążą się z nimi wiązaniami jonowymi. Ze względu na silne kompleksy biosurfaktant-metal, kompleksy te odrywane są od cząsteczki gleby na skutek oddziaływania międzyfazowego. Kationowe biosurfaktanty prowadzą natomiast do wymiany jonowej metal/surfaktant (działając na zasadzie konkurencji o negatywnie naładowane elementy gleby) [10].

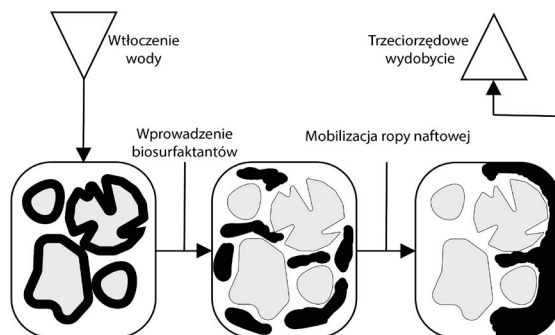
## 7. Wspomagane mikrobiologicznie odzyskiwanie oleju

W celu przeprowadzenia optymalnego i jak najmniej stratnego pozyskania ropy naftowej powszechnie stosowane są trzy podstawowe etapy jej wydobywania. Pierwszym etapem jest tzw. odzysk pierwotny: 12-15% oleju z szybu naftowego odzyskiwane jest bez potrzeby wprowadzania pomocniczych substancji. Drugim etapem jest odzysk wtórny: szyb naftowy jest zalewany wodą lub innymi substancjami w celu pozyskania dodatkowych 15-20% ropy naftowej. Trzecim etapem jest tzw. trzeciorzędowy odzysk i jest on wykonywany różnymi technikami, w tym tzw. metodą MEOR – mikrobiologicznym wspomaganie odzyskiwania ropy naftowej (ang. *microbial enhanced oil recovery*). Trzeciorzędowy etap umożliwia wydobywanie nawet do 11% dodatkowej ropy naftowej [28].

Główne mechanizmy odpowiedzialne za uwalnianie ropy z porowatych złóż za pośrednictwem bakterii obejmują procesy takie jak: rozpuszczanie nieorganicznych soli węglanowych, wytwarzanie gazów (które zmniejszają lepkość ropy), a także zdolność do produkcji biosurfaktantów i środków zwilżających [29]. Bakterie produkujące związki powierzchniowo czynne prowadzą do mobilizacji pozostałości ropy naftowej w ziemi. Wtłoczona pod ciśnieniem woda prowadzi do wypłukania



związków ropopochodnych w kierunku szybu naftowego (rys. 4). Warto również podkreślić, że biosurfaktanty zastosowane w rurociągach transportujących ropę naftową (jako emulsję wodno-olejową), a także w zbiornikach przeznaczonych do czyszczenia osadów, pozwalają na doczyszczenie i dodatkowy odzysk ropy naftowej. Co więcej, bakterie stosowane w MEOR posiadają często dodatkowe atrybuty, np. zdolność do odsiarczania i produkcji biopolimerów, co również jest pożądane w wielu aspektach wydobywczych [30].



Rysunek 4. Trzeciorzędowy odzysk ropy naftowej przy wykorzystaniu MEOR i biosurfaktantów. Źródło: (opracowanie własne)

## 8. Podsumowanie

Nieustannie rosnące skażenie środowiska wymaga ciągłego rozwoju technik remediacyjnych. Obecnie biotechnologia pozwala na świadome wykorzystanie mikroorganizmów zdolnych do rozkładu i/lub neutralizacji większości zanieczyszczeń w procesach bioremediacyjnych. Co istotne, coraz bardziej wydajne i opłacalne metody pozyskiwania metabolitów wtórnych bakterii umożliwiają zastosowanie ich jako alternatywnych dla często agresywnej chemii. Biosurfaktanty, w przeciwieństwie do syntetycznych związków powierzchniowo czynnych, są bezpieczne dla środowiska, wykazują wysoką stabilność chemiczną, a także cechują się wysoką wydajnością przy usuwaniu związków ropopochodnych i metali ciężkich. Zastosowanie bakterii produkujących biosurfaktanty pozwala na skuteczną i ciągłą bioremediację skażonych terenów nie obciążając przy tym dodatkowo środowiska [31].

## Literatura:

1. Pieper D.H., Reineke W., *Engineering bacteria for bioremediation, Current opinion in biotechnology*, 11(3), 2000, s. 262-70.
2. Boopathy R., *Factors limiting bioremediation technologies*, *Bioresource technology*, 74(1), 2000, s. 63-7.
3. Vidali M., *Bioremediation. an overview*, *Pure and Applied Chemistry*, 73(7), 2001, s. 1163-1172.
4. Elliot R., Singhal N., Swift S., *Surfactants and bacterial bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil – unlocking the targets*, *Critical reviews in environmental science and technology*, 41(1), 2010, s. 78-124.

5. Silva F., Almeida D.G., Rufino R.D., Luna J.M., Santos V.A., Sarubbo L.A., *Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills*, International journal of molecular sciences, 15(7), 2014, s. 12523-12542.
6. Fuentes S., Méndez V., Aguila P., Seeger M., *Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications*, Applied microbiology and biotechnology, 98(11), 2014, s. 4781-4794.
7. Souza E.C., Vessoni-Penna T.C., de Souza Oliveira R.P., *Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview*, International biodeterioration & biodegradation, 89, 2014, s. 88-94.
8. Farhadian M., Vachelard C., Duchez D., Larroche C., *In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: a review*, Bioresource technology, 99(13), 2008, s. 5296-5308.
9. Duruibe J.O., Ogwuegbu M., Egwurugwu J., *Heavy metal pollution and human biotoxic effects*, International Journal of physical sciences, 2(5), 2007, s. 112-118.
10. Santos D.K.F., Rufino R.D., Luna J.M., Santos V.A., Sarubbo L.A., *Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century*, International journal of molecular sciences, 17(3), 2016, s. 401-432.
11. Johnson D.B., Hallberg K.B., *Acid mine drainage remediation options: a review*, Science of the total environment, 338(1-2), 2005, s. 3-14.
12. Sheoran A., Sheoran V., *Heavy metal removal mechanism of acid mine drainage in wetlands: a critical review*, Minerals engineering, 19(2), 2006, s. 105-116.
13. Vijayakumar S., Saravanan V., *Biosurfactants-types, sources and applications*, Research Journal of Microbiology, 10(5), 2015, s. 181-192.
14. Pacheco G.J., Ciapina E.M.P., Gomes E.B., Pereira Junior N., *Biosurfactant production by Rhodococcus erythropolis and its application to oil removal*, Brazilian Journal of Microbiology, 41(3), 2010, s. 685-693.
15. Mulligan C.N., Gibbs B.F., *Types, production and applications of biosurfactants*, Proceedings-Indian National Science Academy Part B, 70(1), 2004, s. 31-56.
16. Cameotra S.S., Bollag J.M., *Biosurfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons*, Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 33(2), 2003, s. 111-126.
17. Shao Z., *Trehalolipids*, Biosurfactants, Springer, Berlin 2011, s. 121-143.
18. Liu G., Zhong H., Yang X., Liu Y., Shao B., Liu Z., *Advances in applications of rhamnolipids biosurfactant in environmental remediation: A review*, Biotechnology and bioengineering, 115(4), 2018, s. 796-814.
19. De Rienzo M.A.D., Banat I.M., Dolman B., Winterburn J., Martin P.J., *Sphorolipid biosurfactants: possible uses as antibacterial and antibiofilm agent*, New biotechnology, 32(6), 2015, s. 720-726.
20. Karlapudi A.P., Venkateswarulu T., Tammineedi J., Kanumuri L., Ravuru B.K., Dirisala V., *Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review*, Petroleum, 4(3), 2018, s. 241-249.
21. Ron E.Z., Rosenberg E., *Biosurfactants and oil bioremediation*, Current opinion in biotechnology, 13(3), 2002, s. 249-262.
22. Ahmad Z., Crowley D., Arshad M., Imran M., *Biosurfactants and bioemulsifiers for treatment of industrial wastes*, Advances in Biodegradation and Bioremediation of Industrial Waste, CRC Press, USA 2015, s. 127-154.
23. Mulligan C.N., *Environmental applications for biosurfactants*, Environmental pollution, 133(2), 2005, s. 183-198.
24. Bordoloi N., Konwar B., *Bacterial biosurfactant in enhancing solubility and metabolism of petroleum hydrocarbons*, Journal of Hazardous Materials, 170(1), 2009, s. 495-505.
25. Bognolo G., *Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons*, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 152(1-2), 1999, s. 41-52.

26. Juwarkar A.A., Dubey K.V., Nair A., Singh S.K., *Bioremediation of multi-metal contaminated soil using biosurfactant – a novel approach*, Indian journal of microbiology, 48(1), 2008, s. 142-146.
27. Juwarkar A.A., Nair A., Dubey K.V., Singh S., Devotta S., *Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils*, Chemosphere, 68(10), 2007, s. 1996-2002.
28. Khire J., *Bacterial biosurfactants, and their role in microbial enhanced oil recovery (MEOR)*, Biosurfactants, Springer, Nowy Jork 2010, s. 146-57.
29. Kowalewski E., Rueslåtten I., Steen K., Bødtker G., Torsæter O., *Microbial improved oil recovery – bacterial induced wettability and interfacial tension effects on oil production*, Journal of Petroleum science and Engineering, 52(1-4), 2006, s. 275-286.
30. Lazar I., Petrisor I., Yen T., *Microbial enhanced oil recovery (MEOR)*, Petroleum Science and Technology, 25(11), 2007, s. 1353-1366.
31. Adams G.O., Fufeyin P.T., Okoro S.E., Ehinomen I., *Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review*, International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation, 3(1), 2015, s. 28-39.

## Biosurfaktanty w bioremediacji

### Streszczenie

Nieustannie rosnące zanieczyszczenie środowiska wymusza ciągły rozwój metod rekultywacji skażonych terenów. Bakterie żyjące na skażonych obszarach są w stanie rozkładać lub neutralizować większość niebezpiecznych substancji i metali ciężkich. Technika bioremediacji bazuje na wykorzystaniu mikroorganizmów i ich metabolitów, przy czym jest bezpieczna dla środowiska i stosunkowo ekonomiczna. Biosurfaktanty produkowane przez bakterie wykazują szereg właściwości umożliwiających wydajną mobilizację zanieczyszczeń ze skażonych terenów i tym pełnią kluczową rolę w bioremediacji, a nawet w przemyśle wydobywczym ropy naftowej.

Słowa kluczowe: bioremediacja, biosurfaktanty, bakterie, zanieczyszczenia, MEOR

## Biosurfactants in bioremediation

### Abstract

Constantly increasing environmental pollution forces continuous development of methods of recultivation of contaminated areas. Bacteria living in contaminated areas are able to metabolise or neutralize most of the hazardous substances and heavy metals. The bioremediation technique is based on the use of microorganisms and their metabolites, while it is safe for the environment and relatively economical. Biosurfactants produced by bacteria exhibit a number of properties that enable efficient mobilization of pollutions from contaminated sites and thus play a key role in bioremediation and even in the crude oil industry.

Keywords: bioremediation, biosurfactant, bacteria, pollution, MEOR

## Roślinne substancje bioaktywne a profilaktyka i terapia cukrzycy typu 2

### 1. Wprowadzenie

Cukrzyca to obecnie jedno z największych wyzwań zdrowotnych. Szacuje się, że około 382 milionów ludzi na świecie choruje na cukrzycę, a do 2035 roku liczba ta może nawet wzrosnąć o ponad 200 milionów, jeśli nie zostaną wprowadzone odpowiednie środki zapobiegawcze. Bardzo niepokojący jest również fakt, że nawet 175 milionów osób chorych na cukrzycę wciąż pozostaje niezdiagnozowanych [1]. Cukrzyca z uwagi na zróżnicowany przebieg występuje w kilku typach (typ 1, typ 2, wtórna i ciążowa). W przebiegu cukrzycy typu 1 uszkodzeniu ulegają komórki B trzustki, co prowadzi do zmniejszenia produkcji insuliny. Pacjenci są więc w pełni zależni od egzogennej podawania insuliny. Jednak dominującą formą (około 85% przypadków) jest cukrzyca typu 2 (T2D), w przebiegu której obserwuje się obwodową insulinooporność, co prowadzi do zmniejszenia wrażliwości na insulinę mięśni szkieletowych, tkanki tłuszczowej i wątroby.

Podstawą leczenia cukrzycy typu 2 jest odpowiednia dieta. Często jednak dodatkowo postępowanie dietetyczne jest wspomagane także postępowaniem farmakologicznym. Jednym ze sposobów wspomagania leczenia cukrzycy, szczególnie na początku jej rozwoju, jest włączenie do żywienia preparatów ziołowych. Wyrazem zainteresowania bioaktywnymi substancjami roślinnymi jest pojawienie się coraz większej liczby publikacji naukowych dotyczących badań fitochemicznych i farmakologicznych, a w konsekwencji powstanie na rynku farmaceutycznym wielu preparatów roślinnych o potwierdzonych właściwościach leczniczych [2]. Jak wykazują badania przeprowadzone m.in. przez WHO nawet 70-80% światowej populacji polega na niekonwencjonalnych lekach [1].

Prace badawcze na przełomie lat wykazały, że niektóre rośliny mogą mieć właściwości hipoglikemizujące. Za te właściwości odpowiadają fitoskładniki o właściwościach hipoglikemicznych często zbiorczo zwane glikokininami (glukoninami), ale nie tylko takie. Ze względu na złożone podłoże cukrzycy, uwagę w badaniach zwraca się także na te związki, które modyfikują procesy trawienia i metabolizmu zarówno węglowodanów jak i tłuszczu oraz wykazują działanie antyoksydacyjne i przeciwzapalne. W cukrzycy typu 1 stosowanie surowców pochodzenia roślinnego jest sporne, gdyż substancje czynne zawarte w roślinach musiałyby wykazywać działanie podobne do insuliny. Przy obecnym stanie wiedzy takie działanie wykazuje niewiele roślin. Jednak stosowanie ziół może mieć znacznie większy potencjał w cukrzycy typu 2, ponieważ przebieg i rozwój choroby jest odmienny. Niestety tylko dla niewielkiej grupy roślin istnieją dowody naukowe potwierdzające aktywność hipoglikemizującą [3]. Mechanizm preparatów ziołowych wspomagających w leczeniu cukrzycy opiera się głównie na:

- spowolnieniu wchłanianiu cukrów w przewodzie pokarmowym;

<sup>1</sup> edyta.kowalczuk@up.lublin.pl, Zakład Fizjologii Żywienia i Bromatologii, Instytut Żywienia Zwierząt i Bromatologii, Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie.

- zwiększeniu wydzielania insuliny z komórek  $\beta$  wysp Langerhansa w trzustce;
- poprawie tolerancji glukozy przez komórki organizmu za pośrednictwem receptorów insuliny;
- zwiększeniu syntezy glikogenu [2].

Jednym z kluczowych czynników mogących wpływać na skuteczność stosowania roślin leczniczych jest znajomość mechanizmów ich działania i wykorzystanie ich na różnych etapach rozwoju cukrzycy. Jak zauważa Chowdhury i in. [4], badania pokazują, że niektóre rośliny lub ich związki wykazują silniejsze działanie w zależności od etapu rozwoju choroby, np. kurkumę proponuje się stosować w początkowym etapie w celu zapobiegania postępowi choroby T2D [5], cynamon – może być bardziej skuteczny u pacjentów z cukrzycą, którzy mają współistniejące nadciśnienie [6], a np. aloes może zwiększać stężenie insuliny w zregenerowanych komórkach  $\beta$  trzustki [7-8]. Z drugiej strony przyjmowanie równocześnie preparatów roślinnych o działaniu hipoglikemizującym i jednocześnie przyjmowanie farmaceutyków o tym samym kierunku działania może doprowadzić do hipoglikemii, stanu równie niebezpiecznego dla cukrzyków. Takie wspomagające działanie wykazano np. dla spożycia cynamonu i stosowania sitagliptyny – leku alternatywnego dla metforminy o działaniu inkretynowym [9]. Zatem znajomość tych zależności i ich powiązanie z historią choroby pacjenta może być kluczowe dla wsparcia terapii dietetycznej. Wymaga rozważań, zindywidualizowania i holistycznego spojrzenia na każdy przypadek.

Wśród roślin o potencjale terapeutycznym w kierunku regulacji metabolizmu węglowodanów i leczenia cukrzycy wymienia się wiele roślin rodzimych, jak i tych bardziej egzotycznych, m.in. cynamonowiec (cynamon), ostrzyż długi (kurkuma), żeń-szeń, aloes, mniszek lekarski, szalwię, imbir, czosnek, aronię, ostropest plamisty, morwę białą, kozieradkę pospolitą, gorzki melon, gurmar, opuncja figowa (nopal), estragon rosyjski czy fasolę pospolitą. Celem niniejszego artykułu przeglądowego jest podsumowanie aktualnego stanu wiedzy i wyjaśnienie możliwych mechanizmów działania bioaktywnych związków roślinnych oraz ich roli w profilaktyce i leczeniu cukrzycy.

## **2. Rośliny lecznicze w badaniach**

Poniżej przedstawiono właściwości i mechanizm działania kilku wybranych roślin wykazujących działanie wspomagające profilaktykę i leczenie cukrzycy.

### **2.1. Cynamonowiec (*Cinnamomum*)**

Cynamon, obecnie jedna z najpopularniejszych przypraw, otrzymywany jest z kory cynamonowców. Oprócz charakterystycznych właściwości aromatyzujących, jest on obecnie stosowany jako dodatek zapobiegawczy i terapeutyczny w wielu dolegliwościach, w tym na zespole metabolicznym, hiperlipemii, insulinoporności, cukrzycy typu 2 oraz zapaleniu stawów [10]. Jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za poprawę gospodarki węglowodanowej jest regulacja glukoneogenezy przy jednoczesnej aktywacji receptorów insulinowych i pobudzenie wychwytu glukozy przez transporter GLUT-4, co poprawia insulinowrażliwość komórek [11, 12]. Obecne w cynamonie związki mogą także wpływać na glikemię poposiłkową poprzez spowalnianie wchłaniania glukozy z jelita cienkiego, m.in. przez inhibicję wydzielania oraz aktywności enzymów jelitowych odpowiedzialnych za metabolizm węglowodanów (tj.  $\alpha$ -amylazy trzustkowej,  $\alpha$ -glukozydazy) [12-14].

Przeciwcukrzycowe właściwości cynamonu potwierdzono zarówno w badaniach na modelach zwierzęcych, jak i próbach klinicznych [15]. Prace naukowe na modelach zwierzęcych wskazują, iż podawanie ekstraktu z kory cynamonowca we wzrastających dawkach przez 6 tygodni spowodowało obniżenie cukru we krwi w sposób zależny od dawki w porównaniu z próbą kontrolną. Ponadto nastąpił wzrost stężenia cholesterolu HDL i insuliny we krwi, przy spadku stężenia cholesterolu całkowitego, trójglicerydów i glikozydazy jelitowej [3].

U osób cierpiących na cukrzycę typu 2 cynamon wpływa normalizująco na poziom glukozy we krwi [13, 9]. Dodatkowo jak wskazują m.in. Bolin i in. [9] i Koppikar i in. [16] działanie obniżające stężenia hemoglobiny glikowanej przypisywane cynamonowi, wpływa na zmniejszenie ryzyka wystąpienia powikłań towarzyszących cukrzycy, takim jak retinopatia, nefropatia oraz makroangiopatia.

Safdar i in. [14] stwierdzili, że wdrożenie do diety cynamonu u osób chorych na cukrzycę przyczyniło się do wyrównania cukrzycy. Dodatkowo podanie cynamonu powodowało m.in. zmniejszenie stężenia glukozy o 18-29%, trójglicerydów o 23-40% cholesterolu całkowitego o 12-26% i cholesterolu LDL o 7-27%. Ciekawe może wydać się również stwierdzenie, że stopień obniżenia glukozy synchronizował dodatkowo z wyjściowym stężeniem glukozy w osoczu. Oznacza to, że im wyższa wyjściowa glikemia, tym następuje większe obniżenie pod wpływem cynamonu [17].

Kolejnym aspektem, które warto zauważyć jest, iż skutki hipoglikemiczne są zależne od gatunku cynamonu. Chen i in. [18] podali, że ekstrakt z *Cinnamomum cassisa* prawdopodobnie sprzyja akumulacji lipidów w wątrobie oraz tkance tłuszczowej. Przeciwnie działanie wykazuje ekstrakt *Cinnamomum tamala*, poprawia głównie stężenie insuliny we krwi i trzustce. Ta sama analiza wykazała, że różne składniki oligomeru procyanidyny w ekstrakcie cynamonu wywołują działanie przeciwcukrzycowe. Odnotowano m.in. poprawę wrażliwości na insulinę i metabolizm lipidów w przypadku wodnego wyciągu z cynamonu. Inne badania *in vivo* i *in vitro* objaśniają, iż cynamon w postaci wodnego ekstraktu i suszonego proszku może poprawić metabolizm glukozy w komórkach. Wydaje się, że za ten efekt odpowiada wiele mechanizmów, a zwłaszcza zwiększenie syntezy receptora GLUT-4, translokacji błon, syntezy glikogenu w wątrobie, jak i hamowanie amylazy trzustkowej, jelitowej oraz glikozydazy [10].

Dane z różnych badań prowadzonych na zwierzętach i ludziach, uzasadniają dalsze analizy nad korzyściami wynikającym z stosowania i suplementacji różnych ekstraktów cynamonu w zapobieganiu i leczeniu cukrzycy typu 2.

## 2.2. Ostryż długi (*Curcuma longa* L.)

Kurkuma to pochodząca z Indii przyprawa, która otrzymywana jest z kłaczy ostryżu długiego. Ostatnie lata przyniosły jej ogromną popularność w badaniach naukowych, ale jest także coraz popularniejszą przyprawą także w kuchni polskiej. Najbardziej aktywnym składnikiem kurkumy jest polifenol kurkumina – związek o bardzo szerokim spektrum działania. Lecznicy wpływ tej rośliny w aspekcie cukrzycy polega głównie na obniżaniu glikemii i hiperlipidemii [19-21].

Kurkumina istotnie wpływa na obniżenie poziomu glukozy we krwi. Kurkumina była skuteczna w obniżaniu podwyższonego poziomu glukozy we krwi na czczo, cukru w moczu oraz objętości moczu u tych samych szczurów [19]. Mechanizm,

w jaki sposób kurkumina wpływa na glikemię w cukrzycy, może być różnorodny. W pierwszej kolejności może osłabić poziom czynnika martwicy nowotworów (TNF $\alpha$ ) oraz wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu (NEFA). Hamuje także aktywację czynnika jądrowego kappa B (NF-kB), peroksydacji lipidów, białkowych pochodnych karbonylowych oraz aktywności enzymów liposomalnych [19, 21].

Ponadto kurkumina istotnie wpływa na poprawę funkcji komórek  $\beta$  trzustki. Po pierwsze substancje aktywne kurkumy zwiększają żywotność wysepek oraz opóźniają produkcję reaktywnych form tlenu na wysepkach trzustkowych, co pośredniczy w hamowaniu aktywacji polimeryzacji poli (ADP-rybozy) (uszkodzenie wywołane przez streptozotocynę). Włączenie jej do żywienia zwiększyło liczbę małych wysepek trzustkowych oraz zmniejszyła naciek limfocytów w wysepkach. Ponadto zastosowanie kurkuminy do przeszczepu szpiku kostnego zwiększyło regenerację wysepek i wydzielanie insuliny. Stymulujące działanie związku kurkumy na komórki  $\beta$  trzustki może przyczynić się do hipoglikemii w cukrzycy [19].

Podsumowując, badania naukowe potwierdzają ważność kurkumy w zapobieganiu oraz leczeniu cukrzycy, a także powikłań z nią związanych. Składniki kurkumy mogą wpływać na większość głównych procesów patofizjologicznych, będących przyczyną schorzenia, a zwłaszcza insulinooporność, hiperlipidemię, hiperglikemię, martwicę wysp trzustkowych, ale także w zapobieganiu szkodliwym powikłaniom [19-21]. Jednak bardzo potrzebne są dalsze badania, wyjaśniające mechanizm wpływu i potwierdzające efektywności kurkuminy w ograniczeniu rozwoju cukrzycy i innych powiązanych zaburzeń.

### **2.3. Żeń-szeń (*Panax ginseng*)**

Na rynku istnieje 11 odmian żeń-szenia, jednak tylko dwie odmiany są powszechnie stosowane i jest to żeń-szeń amerykański oraz azjatycki. Aktywnym składnikiem rośliny są triterpenowe  $\beta$ -glikozydy spotykane jako ginsenozydy lub panaksozydy. Ginsenozydy zawarte w korzeniu mogą pomagać w utrzymaniu homeostazy glukozy u pacjentów z cukrzycą. Również jagody i liście żeń-szenia mogą wykazywać właściwości obniżające poziom glukozy we krwi oraz zmniejszać masę ciała [22].

Wyniki przedstawione przez Gui i in. [22], Wu i in. [23] i Kim [24] dowodzą, iż terapia żeń-szeniem skutecznie wpływa na poposiłkowy poziom insuliny, wskaźnik HOMA-IR (wskaźnik służący do rozpoznania insulinooporności), a także poziom trójglicerydów, frakcji HDL i LDL cholesterolu u pacjentów borykających się z cukrzycą typu 2 lub zaburzoną tolerancją glukozy. Zauważono również, że terapia żeń-szeniem wpływała na poziom hemoglobiny glikowanej oraz glikemii na czczo u osób, które nie przyjmowały wcześniej leków przeciwcukrzycowych. Stosowanie żeń-szenia może być więc bardziej skuteczne u nieleczonych wcześniej pacjentów z cukrzycą niż jako terapia wspomagająca chorych przyjmujących leki przeciwcukrzycowe.

Obecne w roślinie ginsenozydy aktywują szlak AMPK, tym samym prowadząc do zahamowania glukoneogenezy w wątrobie oraz chroniąc ją przed stłuszczeniem [20]. Inne badania wskazują, iż proponowanym mechanizmem modulacji procesów metabolicznych przez ginsenozydy jest ich aktywacja receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów, które regulują metabolizm glukozy i lipidów [25]. Dodatkowe skutki zdrowotne przyjmowania ginsenozydów obejmują m.in. działanie przeciwzapalne, przeciwalergiczne, przeciwmiażdżycowe, przeciwnowotworowe,

przeciwiśnieniowe, immunostymulujące, a także wpływ na ośrodkowy układ nerwowy [26]. Jako bezpieczną i skuteczną dawkę tradycyjna medycyna chińska zaleca 3 g dziennie żeń-szenia [22].

#### **2.4. Aloes zwyczajny (*Aloe vera* L.)**

Aloes jest sukulentem należącym do rodziny *Liliaceal*, posiadającym liczne właściwości lecznicze. Początkowo jego zastosowanie dotyczyło dermatologii i kosmetologii jako składnika aktywnego o działaniu przeciwzapalnym i kojącym żeli i maści w przemyśle farmaceutycznym. Obecnie właściwości aloesu wiąże się z przeciwdziałaniem otyłości i cukrzycy. Ponadto, jest on stosowany jako żywność funkcjonalna w przemyśle spożywczym [8, 27].

Działanie lecznicze aloesu wynika z jego wpływu na funkcjonowanie m.in. wątroby czy trzustki. Przede wszystkim wspomaga on gospodarkę lipidową i węglowodanową poprzez obniżenie akumulacji tłuszczu w wątrobie oraz wzrost syntezy glikogenu przy jednoczesnej stymulacji trzustki do syntezy i sekrecji insuliny [8].

Hipoglikemiczne działanie aloesu zostało zbadane przez różnych badaczy. Alinejad-Mofrad i in. [28] w swoich badaniach zbadali wpływ ekstraktu z aloesu w różnych przedziałach czasowych na poziom glukozy we krwi oraz lipidów u osób chorych na cukrzycę. Wyniki tych badań wykazały, że kapsułki zawierające aloes w dawce 300 i 500 mg w przeciągu jednego i dwóch miesięcy znacznie obniżyły poziom glukozy we krwi na czczo. Badania te wskazały też, że ekstrakt z aloesu jest skuteczny w podwyższaniu wrażliwości na insulinę, zmniejszaniu poziomu glukozy we krwi na czczo u obniżaniu poziomu HbA1C u pacjentów ze stanem przedcukrzycowym w przeciągu ośmiu tygodni.

W badaniach prowadzonych na zwierzętach laboratoryjnych z cukrzycą typu 1 wskazano, że ekstrakt z aloesu ma podobny wpływ na poziom glukozy we krwi jak glibenklamid (lek stosowany w cukrzycy pochodna sulfonilomocznika II generacji). Co więcej u osób, które nie zareagowały na lek, spożywanie samego aloesu przez 2 tygodnie, spowodowało szybkie obniżenie poziomu glukozy. Aloes zawiera również inne związki, takie jak fitosterole i glukomannany, które również posiadają właściwości obniżające poziom cukru we krwi. Alinejad-Mofrad i in. [28] wykazali również, że składniki aloesu mają również zdolność obniżania poziomu cholesterolu całkowitego, cholesterolu LDL-C, trójglicerydów a także mogą znacznie zwiększać poziom cholesterolu HDL-C.

#### **2.5. Mniszek lekarski (*Taraxacum officinale*)**

Mniszek lekarski należy do rodzaju *Taraxacum*, od dawna stosowany jako roślina lecznicza. Bioaktywne składniki mniszka lekarskiego wykazują szereg działań przeciwcukrzycowych, które wynikają z ich farmakologicznego działania. Najważniejszymi i kompleksowo zbadanymi bioaktywnymi składnikami mniszka lekarskiego są kwas chlorogenowy, kwas cykoriowy, laktony, taraksasterole, seskwiterpeny. Składniki te mają ogromny potencjał jako leki przeciwcukrzycowe i nutraceutyki pomocne w regulacji poziomu cukru [29-32].

W korzeniu mniszka lekarskiego obecna jest, należąca do fruktanów, inulina. Jest to złożony węglowodan, pełniący funkcje prebiotyczne. Spożywanie inuliny sprzyja więc rozwojowi bifidobakterii w przewodzie pokarmowym, stabilizując tym samym florę jelitową. Ponadto może pomóc w normalizacji poziomu cukru we krwi.



Inulina, należąca do frakcji rozpuszczalnej błonnika, spowalnia wchłanianie cukru z pożywienia do krwi i obniża indeks glikemiczny spożytego pokarmu. Według naukowców ekstrakt wodny z mniszka lekarskiego, zmniejsza hiperglikemię, a także wpływa na insulinę i jej wrażliwość. Badania nad ekstraktami wykazały, że może on stymulować uwalnianie insuliny z komórek  $\beta$  trzustki, co w rezultacie przeciwdziała skutkom hiperglikemii [1].

Mechanizm za pomocą, którego związki pochodzenia roślinnego wykazują działanie przeciwcukrzycowe polega m.in. na obniżaniu poziomu cukru we krwi, zmniejszaniu aktywności enzymów węglowodanowych ( $\alpha$  amylazy z  $\beta$  galaktozydazą oraz  $\alpha$  glukozydazą), hamowanie przepływu kanału potasowego (trzustkowe kanały KATP są ogniwem łączącym stężenie glukozy w surowicy krwi z szybkością wydzielania insuliny) a także nerkowej reabsorpcji glukozy [1]. Dlatego też prawdopodobnym mechanizmem wpływu mniszka lekarskiego na cukrzycę typu 2 może być interakcja z czynnikami zaangażowanymi w zespół metaboliczny (metabolizm glukozy, lipidów, białek a także nieprawidłowe funkcjonowanie komórek  $\alpha$  i  $\beta$  trzustki) [29, 31]. Ponadto obecne w mniszku lekarskim fenolokwasy, jak kwas chlorogenowy oraz kwas cykoriowy, zwiększają wychwyty glukozy w komórkach mięśniowych [32].

Niemniej jednak mimo obecnej wiedzy konieczne są dalsze badania z udziałem ludzi chorych na cukrzycę, które z łatwością określiłyby mechanizmy wpływu składników mniszka lekarskiego w cukrzycy typu 2.

## 2.6. Szałwia lekarska (*Salvia officinalis* L.)

Kolejną popularną w rośliną o dużym potencjale w leczeniu wielu chorób i ich objawów jest szalwia (*Salvia officinalis*) [33-35]. Szalwia była wykorzystywana jako tradycyjny środek przeciwko cukrzycy w wielu krajach, a jej działanie obniżające poziom glukozy wykazano w badaniach przeprowadzonych na zwierzętach. W pracach naukowych stwierdzono, iż ekstrakty alkoholowe szalwii, istotnie obniżają poziom cukru w surowicy u szczurów z cukrzycą typu 1, bez jakiegokolwiek wpływu na produkcję insuliny trzustkowej.

Ekstrakt wodny szalwii ma działanie podobne do insuliny [33, 35]. Spożywanie naparu z herbaty szalwiowej w ilości 300 mg dwa razy dziennie było tak samo skuteczne jak przyjmowanie doustnego leku przeciwcukrzycowego metforminy. Mechanizm korzystnego oddziaływania polegał na zmniejszaniu produkcji glukozy w wątrobie. Ponadto picie herbaty szalwiowej poprawia profil lipidowy a także wzrost obrony przeciwutleniającej organizmu, co może przyczynić się do wyrównania wskaźników cukrzycy [33].

## 2.7. Ostropest plamisty (*Silybum marianum*)

Ostropest znany jest już od ponad 2000 tysięcy lat jako ziołowy lek na wiele schorzeń [36]. Ostropest ma długą historię zastosowania leczniczego najczęściej jako środek wspomagający pracę wątroby, detoksykację, system antyoksydacyjny organizmu a także wykazuje potencjał w terapii cukrzycy [37].

Nasiona ostropestu zawierają związki zwane flawonolignanami, dlatego też uważany jest jako silny środek przeciwko powstaniu insulinooporności i hiperglikemii wywołaną cukrzycą. Badania dowodzą, iż podawanie pacjentom chorym na cukrzycę i alkoholową marskość wątroby codziennie sylimaryny w dawce 600 mg przez 6 miesięcy, spowodowało istotne obniżenie glukozy we krwi na czczo oraz średniego

dziennego poziomu glukozy. Zapotrzebowanie na insulinę również zostało zmniejszone o 20%, co sugeruje, że sylimaryna pozytywnie wpływa na insulinooporność. Zaobserwowano także znaczny spadek hemoglobiny glikowanej o 0,5%. Dla porównania podawania sylimaryny w dawce 200 mg przez cztery miesiące przed każdym posiłkiem nastąpiło istotne obniżenie poziomu glukozy we krwi. Również poziom cholesterolu całkowitego i LDL, trójglicerydów znacznie obniżył się [38]. Sylimaryna (dawka 210 mg) wykazuje działanie synergiczne z alkaloidem pochodzącym z *Berberis aristata* (dawka 1000 mg), taka kombinacja dwóch substancji skutecznie poprawia profil lipidowy i glikemiczny w cukrzycy [39].

Mechanizm działania ostropestu plamistego w przypadku kontroli glikemii nie jest w pełni poznany. Ekstrakt z nasion ostropestu zawiera głównie sylimarynę – kompleks flawonolignanów, wśród których najbardziej aktywne związki to sylibina (izomery A i B), sylidiamina, sylikrystyna. Sylimaryna zmniejsza odporność na insulinę a także może działać ochronnie na trzustkę poprzez właściwości przeciwutleniające. Glikoliza indukowana przez węglowodany jest zmniejszana sylibininę poprzez hamowanie kinazy pirogronianowej [37].

## 2.8. Morwa biała (*Morus alba* L.)

Liście morwy (gatunek drzew *Morus alba* pochodzący z Chin) były stosowane na szeroką skalę już od czasów starożytnych. Są spożywane jako herbata ziołowa w krajach azjatyckich. Sam gatunek *Morus* jest bogatym źródłem związków fenolowych, w tym antocyjanów i flawonoidów, które działają jako ważne przeciwutleniacze o korzystnym wpływie na zdrowie ludzi [40]. Są także bogate w iminosacharydy – analogi cukru zawierające grupy aminowe, którym przypisuje się korzystny wpływ leczniczy [41]. Wykazano, że morwa może być skutecznym suplementem w leczeniu cukrzycy typu 2 ze względu na działanie hipoglikemiczne [42-44].

Działanie hipoglikemiczne wyciągu z liści morwy białej wynika z zawartości dezoksymannoijirymycyny (monosacharyd), która jest inhibitorem  $\alpha$ -glukozydaz m.in. maltazy i sacharazy [44]. Zahamowanie wymienionych enzymów blokuje rozkład dwucukrów do monosacharydów, a przez to wchłanianie cukrów prostych z przewodu pokarmowego do krwi. Mechanizm ten powoduje obniżenie hiperglikemii po posiłku. Mówi się więc, że ekstrakt z liści morwy białej ma działanie podobne do leków z grupy akarboz [3].

Ponadto wysoka zawartość polisacharydów w liściach zwiększa wrażliwość na insulinę oraz chroni wysepki trzustkowe przed powstawaniem cukrzycy, poprawiając metabolizm glukozy oraz chroniąc organizm przed stresem oksydacyjnym. Poza tym poprawia metabolizm lipidów – ich degradacja powoduje bowiem zmiany poziomu insuliny i metabolizmu glukozy [44]. U pacjentów leczonych liśćmi morwy obserwuje się też m.in. spadek cholesterolu całkowitego w surowicy krwi, trójglicerydów, frakcji VLDL cholesterolu [3].

Warto przy tym zwrócić uwagę na białko Moran 20K, obecne w ekstrakcie z kory korzeni morwy, które również wykazuje działanie obniżające poziom cukru we krwi. Zostało to potwierdzone w badaniach na mysim modelu hiperglikemii wywołanej za pomocą streptozotomicyny [45, 46].

Dostępne wyniki badań mogą uzasadnić skuteczność ekstraktu z liści morwy i jego aktywnych składników jak suplement diety czy środki farmaceutyczne do poprawy poposiłkowej kontroli glikemii u osób cierpiących na zaburzenia metaboliczne [41].

## 2.9. Imbir (*Zingiber officinale* Rosc.)

Imbir należy do rodziny *Zingiberaceae*, a jego kłącze jest stosowane jako przyprawa na całym świecie ze względu na swój typowy aromat oraz szczególną ostrość. Jest jednym z najsylniejszych ziół leczniczych w dawnej medycynie chińskiej i indyjskim ajurwedyjskim systemie medycyny od wieków. Tradycyjnie stosowany jest jako lek ziołowy w leczeniu reumatyzmu, żołądka, bolesnym miesiączkowaniu, nudnościami spowodowanymi chemioterapią lub ciążą a zwłaszcza w leczeniu cukrzycy [47]. Jego składniki: gingerole, shogaole, paradole i zingiberene, wykazują działanie przeciwutleniające, obniżające stężenie glukozy i lipidów, jak i działanie przeciwzapalne, immunomodulujące, przeciwapoptozie [48].

Zhu i in. [47] w swoich badaniach wykazali, że imbir może znacznie obniżyć poziom glukozy we krwi na czczo i hemoglobiny glikowanej (HbA1c). Ponadto wskaźnik czynności trzustki, insulinooporności i insulina na czczo uległy znacznie poprawie po spożyciu imbiru. Oprócz tego większość czynników ryzyka przyczyniających się do powstania zespołu metabolicznego zostały złagodzone przez preparaty zawierające imbir. Ci sami badacze objaśniają, iż korzystny wpływ imbiru w cukrzycy (tj. obniżenie poziomu glukozy na czczo) może być bardziej widoczny u pacjentów z hiperglikemią niż bez. Podstawowy mechanizm polegał na hamowaniu  $\alpha$ -glukozydazy i  $\alpha$ -amylazy, które są kluczowymi enzymami w trawieniu i absorpcji złożonego węglowodanu.

Badania z 2014 roku wykazały, iż imbir może zmniejszać całkowity cholesterol oraz trójglicerydy, a także zmniejszenie białka C-reaktywnego i prostaglandyny E2 u pacjentów cierpiących na cukrzycę typu 2 [49]. Dla porównania nowsze badania kliniczne na osobach, które nie przyjmowały insuliny, wykazały, że suplementacja imbiru znacznie zmniejsza poziom trójglicerydów w surowicy oraz ma niewielki korzystny wpływ na poziom glukozy w surowicy [50].

## 2.10. Czosnek zwyczajny (*Allium sativum* L.)

Przeciwcukrzycowe właściwości prozdrowotne czosnku obejmują działanie hipoglikemiczne, hipocholesterolemiczne, hipotriglicerydemiczne oraz hiperinsulinemiczne a także właściwości przeciwglukacyjne i przeciwutleniające białek i tłuszczów [51].

Głównym bioaktywnym składnikiem czosnku jest allicyna, która występuje w wodnym ekstrakcie lub homogenacie surowego czosnku. W wyniku siekania czosnku lub kruszenia enzym allinazy jest aktywowany i produkuje allicynę z alliiiny [52].

Wiele badań przeprowadzone na modelach zwierzęcych wykazało, że czosnek poprawia wrażliwość na insulinę. Prace badawcze dowodzą, iż zwiększone wydzielanie insuliny po podaniu czosnku, wyciągów czy preparatów czosnkowych może być wynikiem działania alliksiny, S-allylocysteiny sulfotlenku, disiarczku diallilu, trisiarczku diallilu [53, 54]. Najnowsze badania sugerują, iż to S-allil cysteina, główna bioaktywna cząsteczka siarki organicznej w wyciągu dojrzałego czosnku wykazuje właściwości przeciwcukrzycowe, neuroprotektoryjne, przeciwzapalne czy przeciwutleniające. Wprawdzie, jak naukowcy twierdzą podawanie metforminy oraz czosnku u pacjentów chorych na cukrzycę typu 2 zmniejszyło stężenie glukozy na czczo. Jednak bardziej zauważalne zmiany są przypadku metforminy, uzupełnionej czosnek niż po podaniu samej metforminy. Donoszono również, że wyciągi z czosnku skutecznie zmniejszą insulinooporność [52].

Badanie prowadzone na zwierzętach oraz wstępna badania na ludziach wykazały korzystny wpływ czosnku i wyciągów z czosnku w leczeniu cukrzycy i pokrewnych zaburzeń metabolicznych. Jednakże konieczne są dalsze badania kliniczne w celu zbadania zalet czosnku u pacjentów z cukrzycą typu 2.

### **2.11. Aronia czarna (*Aronia melanocarpa*)**

Aronia czarna, znana też jako czarnoowocowa, jest rośliną zasobną w związki polifenolowe, zwłaszcza procyjanidyny, antocyjaniny oraz kwas chlorogenowy [55]. W diecie cukrzyka zmniejsza stres oksydacyjny oraz redukuje powikłania towarzyszące chorobie. Przetwory aronii zwłaszcza sok ma zdolność obniżania indeksu glikemicznego posiłków [55]. Obecność naturalnych polifenoli w owocach zmniejsza stany zapalne trzustki [56]. Duża zawartość atocyjanów i kwasu chlorogenowego pobudza wydzielanie insuliny, a obecne związki katechinowe znacznie zmniejszają stężenie glukozy we krwi. Występowanie tanin utrudnia powstawanie emulsji tłuszczowej, która jest niezbędna do jej trawienia oraz obniża wchłanianie białek. Czynniki te wpływają na obniżenie masy ciała zwłaszcza u osób chorych na cukrzycę typu 2 [55].

### **2.12. Fasola pospolita (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Surowcem przeznaczonym na cele farmaceutyczne są wysuszone strąki fasoli pozbawione nasion tzw. naowocnia. Zawiera trygonelinę, cholinę, aminokwasy (asparagina, argininę, lizynę, leucynę) a także kwas piperolinowy, alatoninę, kwasy fenolowe, glikoproteiny, sole mineralne ( m.in. związki chromu).

Wyciągi ze strąków fasoli pospolitej wykazują niewielkie działanie hipoglikemiczne m.in. poprzez wpływ na zmniejszenie poziom enzymów glukoneogennych [57]. Dzięki takiemu działaniu surowiec może być wykorzystywany w początkowym okresie rozwoju cukrzycy typu 2. Uważa się, że obecność soli chromu w naowocni fasoli, zapobiega wahaniom glukozy we krwi poprzez zwiększenia działania insuliny. Chrom wchodzi również w skład związku biologicznie aktywnego, nazywanego czynnikiem tolerancji glukozy (GFT). Czynnikiem ten jest połączeniem wyżej wymienionego pierwiastka z kwasem nikotynowym oraz glutaminowym a także glicyną i cysteiną. Poza tym GFT zwiększa oddziaływanie insuliny z receptorami tkankowymi [3].

Ochronne działanie roślin strączkowych w cukrzycy typu 2 może wpływać na wiele aspektów biologicznych a zwłaszcza obniżanie wskaźnika glikemicznego spożywanych posiłków czy zwiększanie zawartości błonnika. Ponadto rośliny zawierają izoflawony oraz lignany, które wykazują działanie przeciwutleniające a w ten sposób mogą ochraniać przed rozwojem cukrzycy typu 2. Wyniki badań sugerują, że spożycie białka sojowego i izoflawonu poprawia wrażliwość na insulinę [58].

Naukowcy badali aktywność wpływ wodnego ekstraktu z owocni fasoli na szczurach z indukowaną streptozotocyną cukrzycą. Badanie obejmowało podawanie wyciągu w dawce 200 mg/kg masy ciała przez 45 dni. Po tym czasie zaobserwowano obniżenie stężenia glukozy, hemoglobiny glikowanej a także wzrost poziomu insuliny w porównaniu do grupy kontrolnej [57]. Inne badania przeprowadzone na tych samych szczurach wykazało, że podawane ekstraktu z naowocni fasoli przyczynia się do obniżenia poziomu trójglicerydów, cholesterolu całkowitego oraz frakcji VLDL oraz LDL. Te same wyniki badań pokazują, że oprócz działania przeciwcukrzycowego ekstrakt ma również właściwości przeciwutleniające, przeciwhiperlipidemiczne.

Stwierdzono również, że wodny wyciąg z fasoli pospolitej może być równie skuteczny jak glibenklamid (lek przeciwcukrzycowy, pochodna sulfonilomocznika II generacji) [59].

W literaturze można spotkać także doniesienia i wyniki prac z wykorzystaniem takich roślin jak przepęklą ogórkowata (tzw. gorzki melon) (*Momordica charantia*) [60-63], gurmar (*Gymnema sylvestre*) [64-66], opuncja figowa (*Opuntia ficus-indica*; nopal) [48, 67-68], bylica draganek (*Artemisia dracuncululus* L.) [58-59] czy berberys (*Berberis* L.) i inne rośliny będące źródłem berberyny (alkaloidu izochinolinowego o właściwościach podobnych do pochodnych sulfonomocznika i metforminy w obniżaniu poziomu glukozy u osób cierpiących na cukrzycę typu 2) [37, 71, 72].

### 3. Podsumowanie

Jak wykazują cytowane badania mechanizm działania poszczególnych roślin na funkcjonowanie organizmu jest różny (tab. 2), niestety w dużej mierze nadal nie do końca wyjaśniony. Wiele z nich wykazuje holistyczny wpływ na organizm, nie tylko bezpośrednio wpływając na gospodarkę węglowodanową, ale także na gospodarkę lipidową i potencjał antyoksydacyjny organizmu, co ma istotne znaczenie w przypadku osób będących w grupie ryzyka i dotkniętych cukrzycą. Stąd odpowiedź na pytanie o dokładny wpływ poszczególnych roślin jest trudna i wymaga dalszych badań.

Tabela 1. Wybrane rośliny i ich rola w regulowaniu gospodarki węglowodanowej

Roślina	Surowiec leczniczy	Główne składniki	Działanie	Źródło
Cynamonowiec <i>Cinnamomum</i>	kora	taniny, flawonoidy (szczególnie proantocyjanidyna typu A), glikozydy, terpenoidy (cyncejanol i jego pochodna cyncejanina), kumaryny i antrachinony, olejek eteryczny (głównie aldehyd cynamonowy, aldehyd kuminowy, fenole, w tym eugenol i metyloeugenol, pinen, felandren, cymen i $\beta$ -kariofyllen, linalol), związki mineralne (w tym chrom)	Uwrażliwienie komórek na działanie insuliny Zwiększenie produkcji insuliny	3, 9-18
Ostryż długi <i>Curcuma longa</i> L.	kłącze	kurkuminoidy (niezależnie do grupy związków fenolowych): kurkuimna, cyklokurkumina, demetoksykurkumina, bisdemetoksykurkumina; olejek eteryczny (zawierający m.in. turmeron, atlanton i zingiberon)	Działanie regenerujące na wysepkę Langerhansa w trzustce	5, 19-21
Żeń-szeń <i>Panax ginseng</i>	kłącze	saponozydy zwane ginsenozydami (z grupy pochodnych protopankasadiolu ginsenozyd Rb1 i Rg1), związki fenolowe, panaksany, flawonoidy i poliacetyleny	Działanie ochronne i regenerujące dla komórek trzustki Wyrównanie parametrów lipidowych	4, 22-26

Aloes zwyczajny <i>Aloe vera L.</i>	liście	antrachinony i ich pochodne (kwas chryzofranowy, estry kwasu cynamonowego, aloina (barbaloina, izobarbaloina), emodyna, antracen, antranol (barbaloina), fitosterole (lofenol i cykloartenol), węglowodany (glukomannan, acemannan)	Zwiększanie wrażliwości na insulinę Poprawa parametrów lipidowych	4, 8, 27-28
Mniszek lekarski <i>Taraxacum officinale</i>	kwiaty, liście, korzeń	fenolokwasy, jak kwas chlorogenowy oraz kwas cykoriowy, laktony, taraksasterol, seskwiterpeny	Stymulacja uwalniania insuliny w komórkach $\beta$ trzustki Zmniejszanie aktywności enzymów węglowodanowych, Hamowanie przepływu kanału potasowego, a także nerkowej reabsorpcji glukozy	1, 29-32
Szałwia lekarska <i>Salvia officinalis L.</i>	liście	olejek eteryczny (tujon, cyncol, kamfora i pinen); garbniki; kwasy fenolowe (kwas rozmarynowy, kwas chlorogenowy, kwas kawowy), flawonoidy (apigenina, luteolina); terpenoidy (karnozol, kwas ursolowy, kwas oleanolowy, kwas karnozowy, rosmanol, germanikol); kwasy organiczne (kwas fumarowy); substancje gorzkie (pikrosalwina)	Zwiększanie działania insuliny Poprawa profilu lipidowego	33-35
Ostropest plamisty <i>Silybum marianum</i>	nasiona	flawonolignany (sylimaryna, w tym sylibina, sylikrystyna i sylidianina); flawonoidy (taksyfolina, luteolina, kwercytyna); fitosterole (m.in. stigmasterol i kampesterol); olejek eteryczny; betaina;	Zmniejszenie odporności na insulinę Poprawa profilu lipidowego Działanie ochronne na zmieniono chorobowo trzustkę	36-39
Morwa biała <i>Morus alba L.</i>	liście	polifenole, w tym flawonoidy (kwercetyna, rutyna, kempferol, astragalina), kwasy fenolowe, w tym kwas chlorogenowy, antocyjany; związki o działaniu przeciwbakteryjnym: albanol, kuwanony C, E i G, halkomoracyne, morusynę oraz sanggenony B i D; polihydroksyalkaloidy (1-dezoksyno-jirimycyna)	Hamowanie trawienia i wchłaniania cukrów z przewodu pokarmowego	3, 40-46

Imbir <i>Zingiber officinale</i> Rosc.	kłącze	olejek eteryczny (monoterpeny (cytral, a – i b-felandren, limonen, linalol, kamfen, a – i b-pinen), seskwiterpeny (zingiberen, kurkumen, b-bisabolen))	Poprawa pracy trzustki Zmniejszenie insulinooporności	47-50
Czosnek zwyczajny <i>Allium sativum</i> L.	cebula	alliina, allicyna (ajoen i winyloditiina), związki siarkowe (siarczki, disiarczki, sulfotlenki, glikozydy izosiarkocyjanowe, tiole i tiosulfiny), saponiny (escyna); flawonoidy	Zmniejszanie insulinooporności Działanie hipcholesterolemiczne, hipotriglicerydemiczne, hiperinsulinemiczne	4, 51-54
Aronia czarna <i>Aronia melanocarpa</i>	owoce	związki fenolowe: antocyjany, taniny oraz fenolokwasy (kwasy chlorogenowy);	Obniżanie stężenie glukozy we krwi Obniżanie indeksu glikemicznego posiłków Zmniejszanie stanów zapalnych trzustki	55-56
Fasola pospolita <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	owocnia	trygonelina, cholina, kwas pipekolinowy, alatonina, kwasy fenolowe, glikoproteiny, sole mineralne (m.in. związki chromu), aminokwasy	Zwiększenia wrażliwość tkanek na insulinę Obniżanie indeksu glikemicznego posiłków	3, 57-59
Przepękla ogórkowata (tzw. gorzki melon) <i>Momordica charantia</i>	owoc	kwasy fenolowe: galusowy, protokatechowy i p-hydroksybenzoesowy, chlorogenowy, syringowy, p-kumarowy, ferulowy, a także synapowy; katechiny: rutyna i mirycetyna; triterpenoidy: charantynę, momordycynę I-III, kuguacynę A-S i karawilageninę A-E; saponiny triterpenowe (momordikozydów M, N, L i O); polipeptyd-p (tzw. roślina insulina)	Zwiększenie produkcji insuliny Zwiększenie wychwytu glukozy i stymulacja syntezy glikogenu w komórkach wątroby, mięśni oraz w komórkach tłuszczowych Hamują glukoneogenezy Hamowanie wchłaniania jelitowego glukozy	4, 60-63
Gurmar <i>Gymnema sylvestre</i>	liście	saponiny triterpenowe (kwasy gymnemowe oraz gymnemasaponina, gymnemazydy); glikozydy kemferolu, stigmasterol, kwercytol, konduritól A oraz antrachinony	Działanie regulujące pracę trzustki Zwiększanie produkcji i uwalniania insuliny	64-66
Opuncja figowa (nopal) <i>Opuntia ficus-indica</i>	owoc	flawonoidy (kemferol, luteolina); karotenoidy, laktony, terpeny, alkaloidów i betalainy	Poprawa wrażliwości komórek na insulinę Poprawa parametrów lipidowych	39, 67-68
Bylica draganek <i>Artemisia dracunculoides</i> L.	ziele	olejek eteryczny (zawierający m.in. estragol, anetol, beta-ocimen i limonen); kumaryny;	Zwiększona sekrecja insuliny z komórek $\beta$ trzustki	69-70

## Literatura:

1. Wirngo F.E., Lambert M.N., Jeppesen P.B., *Physiological effects of dandelion (Taraxacum officinale) in type 2 diabetes*, The Review of Diabetic Studies, 13 (2-3), 2016, s. 113-131.
2. Rudkowska E., Smutkiewicz A., Han-Marek M., *Ziola w terapii wspomagającej leczenie cukrzycy*, Postępy Fitoterapii 3, 2006, s. 155-162.
3. Zielińska-Pisklak M., Szeleszczuk Ł., Młodzianka A., *Rośliny o działaniu hipoglikemizującym*, Lek w Polsce, 9, 2013, s. 55-63.
4. Chowdhury B.R., *Diabetes Reversal by Plant-Based Diet*, Journal of Metabolic Syndrome, 6, 2017, s. 1-8.
5. Chuengsamarn S., Rattanamongkolgul S., Luechapudiporn R., Phisalaphong C., Jirawatnotai S., *Curcumin extract for prevention of type 2 diabetes*, Diabetes Care, 35, 2012, s. 2121-2127.
6. Howard M.E., White N.D., *Potential benefits of cinnamon in type 2 diabetes*, 7(1), 2013, s. 23-26.
7. Rajasekaran S., Ravi K., Sivagnanam K., Subramanian S., *Beneficial effects of Aloe vera leaf gel extract on lipid profile status in rats with streptozotocin diabetes*, Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 33, 2006, s. 232-237.
8. Pothuraju R., Sharma R.K., Onteru S.K., Singh S., Hussain S.A., *Hypoglycemic and hypolipidemic effects of Aloe vera extract preparations: a review*, Phytotherapy Research, 30, 2016, s. 200-207.
9. Bolin Q., Panickar K.S., Anderson R.A., *Cinnamon: Potential role in the prevention of insulin resistance, metabolic syndrome, and type 2 diabetes*, Journal of Diabetes Science and Technology, 4(3), 2010, s. 685-693.
10. Medagama A.B., *The glycaemic outcomes of cinnamon, a review of the experimental evidence and clinical trials*, Nutrition Journal, 14 (108), 2014, s. 1-28.
11. Kreydiyyeh S.I., Usta J., Copti R., *Effect of cinnamon, clove and some of their constituents on the Na<sup>+</sup> – K<sup>+</sup> – ATPase activity and alanine absorption in the rat jejunum*, Food and Chemical Toxicology, 38(9), 2000, s. 755-762.
12. Jarvill-Taylor K.J., Anderson R.A., Graves D.J., *A hydroxychalcone derived from cinnamon functions as a mimetic for insulin in 3T3-L1 adipocytes*, Journal of the American College of Nutrition, 20(4), 2001, s. 327-336.
13. Khan A., Safdar M., Khan M.M.A., Khattak K.N., Anderson R.A., *Cinnamon improves glucose and lipids of people with type 2 diabetes*, Diabetes Care, 26(12), 2003, s. 3215-3218.
14. Safdar M., Khan A., Khan-Khattak M.M.A., Siddique M., *Effect of various doses of cinnamon on blood glucose in diabetic individuals*, Pakistan Journal of Nutrition, 3(5), 2004, s. 268-272.
15. Kaławaj K., Lemieszek M.K., *Prozdrowotne właściwości cynamonu*, Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu, 21(3), 2015, s. 328-331.
16. Koppikar S.J., Choudhari A.S., Suryavanshi S.A., Kumari S., Chattopadhyay S., Kaul-Ghanekar R., *Aqueous cinnamon extract (ACE-c) from the bark of Cinnamomum cassia causes apoptosis in human cervical cancer cell line (SiHa) through loss of mitochondrial membrane potential*, BMC Cancer 10, 2010, doi:10.1186/1471-2407-10-210.
17. Figura B., *Cynamon w leczeniu cukrzycy*, Świat Farmacji, 2007, s. 14-15.
18. Chen L., Sun P., Wang T., Chen K., Jia Q., Wang H., Li Y., *Diverse mechanisms of antidiabetic effects of the different procyanidin oligomer types of two different cinnamon species on db/db mice*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 36, 2012, s. 9144-9150.
19. Zhang D., Fu M., Gao S., Liu J., *Curcumin and diabetes: a systematic review*, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013, 2013:636053.
20. Przybylska S., *Kurkumina – prozdrowotny barwnik kurkumy*, Problemy Higieny i Epidemiologii, 96, 2, 2015, s. 414-420.
21. Ashraf K., *A comprehensive review on Curcuma longa Linn.: Phytochemical*,



- pharmacological, and molecular study*, International Journal of Green Pharmacy, 11 (4), 2017, s. S671-S685.
22. Gui Q., Xu Z., Xu K., Yang Y., *The efficacy of ginseng-related therapies in type 2 diabetes mellitus*, Medicine (Baltimore), 95(6), 2016, s. e2584.
  23. Wu Y., Xia Z., Dou J., Zhang L., Xu J., Zhao B., Lei S., Liu H., *Protective effect of ginsenoside Rb1 against myocardial ischemia/reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats*. Molecular Biology Reports 38, 2011, s. 4327-4335.
  24. Kim J.H., *Pharmacological and medical applications of Panax ginseng and ginsenosides: a review for use in cardiovascular diseases*, Journal of Ginseng Research, 2018, 42, s. 264-269.
  25. Yoon M., Lee H., Jeong S., Kim J., Nicol C.J., Nam K.W., Kim M., Cho B.G., Oh G.T., *Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  is involved in the regulation of lipid metabolism by ginseng*, British Journal of Pharmacology, 138(7), 2003, s. 1295-1302.
  26. Christensen L.P., *Chapter 1 Ginsenosides: chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects*, Advances in Food and Nutrition Research, 55, 2008, s. 1-99.
  27. Hamman J.H., *Composition and applications of Aloe vera leaf gel*, Molecules, 13(8), 2008, s. 1599-616.
  28. Alinejad-Mofrad S., Foadoddini M., Alireza Saadatjoo S., Shayesteh M., *Improvement of glucose and lipid profile status with Aloe vera in pre-diabetic subjects: a randomized controlled-trial*, Journal of Diabetes and Metabolic Disorders, 14(22), 2015, s. 1-7, doi:10.1186/s40200-015-0137-2.
  29. Grundy S. M., Brewer Jr H.B., Cleema J.I., Smith Jr S.C., Lenfant C., *Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition*, Circulation, 109(3), 2004, s. 433-438.
  30. Schütz K., Carle R., Schieber A., *Taraxacum – a review on its phytochemical and pharmacological profile*, Journal of Ethnopharmacology 2006, 107(3), s. 313-323.
  31. Sarkodie J.A., Debrah P., Kitcher C., Frimpong-Manso S., Oppong Bekoe E., Winston O., Akoto G., Hasford C., Asiedu-Gyekye I., Banga K.B.N., Kwadwo Nyarko A.K., *Glucose-lowering effect and anti-inflammatory activity of aqueous leaf extract of Taraxacum officinale in Wistar rats*, International Journal of Pharmacology and Phytopharmacology Research 11(4), 2019, s. 250-258.
  32. Tusch D., Lajoix A., Eric Hosi E., Azay-Milhau J., Ferrare K., Jahannault C., Cros G., Petit P., *Chicoric acid, a new compound able to enhance insulin release and glucose uptake*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1, 2008, s. 131-135.
  33. Hamidpour M., Hamidpour R., Hamidpour S., Shahlari M., *Chemistry, pharmacology, and medicinal property of sage (Salvia) to prevent and cure illnesses such as obesity, diabetes, depression, dementia, lupus, autism, heart disease, and cancer*, Journal of Traditional and Complementary Medicine, 2, 2014, s. 82-88.
  34. Behradmanesh S., Derees F., Rafieian-kopaei M., *Effect of Salvia officinalis on diabetic patients*, Journal of Renal Injury Prevention 2(2), 2013, s. 51-54.
  35. Lima C.F., Azevedo M.F., Araujo R., Fernandes-Ferreira M., Pereira-Wilson C., *Metformin-like effect of Salvia officinalis (common sage): is it useful in diabetes prevention?*, British Journal of Nutrition 96, 2006, s. 326-333.
  36. Bijak M., *Silybin, a major bioactive component of milk thistle (Silybum marianum L. Gaernt.) – chemistry, bioavailability, and metabolism*, Molecules, 11, 2017, s. 1942, doi: 10.3390/molecules22111942.
  37. McKennon S.A., *Non-pharmaceutical intervention options for type 2 diabetes: diets and dietary supplements (Botanicals, Antioxidants, and Minerals)* [Updated 2018 Jun 18]. W: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, i in., (red.). Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.
  38. Christos E., Kazazis C.E., Evangelopoulos A.A., Kollas A., Vallianou N.G., *The therapeutic potential of milk thistle in diabetes*, Journal of the Society for Biomedical

- Diabetes Research, 2, 2014, s. 167-174.
39. Di Piero F., Putignano P., Villanova N., Montesi L., Moscatiello S., Marchesini G., *Preliminary study about the possible glycemical advantage in using a fixed combination of Berberis aristata and Silybum marianum standardized extracts versus only Berberis aristata in patients with type 2 diabetes*, Clinical Pharmacology: Advances and Applications, 5, 2013, s. 167-174.
  40. Grześkowiak J., Łochyńska M., *Związki biologicznie aktywne morwy białej (Morus alba L.) i ich działanie lecznicze*, Postępy Fitoterapii, 18(1), 2017, s. 31-35.
  41. Asai A., Nakagawa K., Higuchi O., Toshiyuki Kimura T., Kojima Y., Kariya J., Miyazawa T., Oikawa S., *Effect of mulberry leaf extract with enriched 1-deoxyxojirimycin content on postprandial glycemical control in subjects with impaired glucose metabolism*, Journal of Diabetes Investigation, 4, 2011, s. 318-323.
  42. Da Villa G., Ianiro G., Mangiola F., Del Toma E., Vitale A., Gasbarrini A., Gasbarrini G., *White mulberry supplementation as adjuvant treatment of obesity*, Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents, 28(1), 2014, s. 141-145.
  43. Banu S., Jabir N.R., Manjunath N.C., Khan M.S., Ashraf G.M., Kamal M.A., Tabrez S., *Reduction of post-prandial hyperglycemia by mulberry tea in type-2 diabetes patients*, Saudi Journal of Biological Science, 22(1), 2015, s. 32-36, doi:10.1016/j.sjbs.2014.04.005.
  44. Rodrigues E.L., Marcelino G., Torres Silva G., Figueiredo P.S., Garcez W.S., Corsino J., Guimarães R. de C.A., Freitas K. de C., *Nutraceutical and medicinal potential of the Morus species in metabolic dysfunctions*, International Journal of Molecular Sciences-Open Access Journal, 2, 2019, s. 301.
  45. Andallu B, Varadacharyulu N., *Antioxidant role of mulberry (Morus indica L. cv. Anantha) leaves in streptozotocin-diabetic rats*, Clinica Chimica Acta, 338, 2003, s. 3-10, doi:10.1016/s0009-8981(03)00322-x.
  46. Hansawasdi C., Kawabata J., *Alpha-glucosidase inhibitory effect of mulberry (Morus alba) leaves on Caco-2*, Fitoterapia, 77(7-8), 2003, s. 568-573.
  47. Zhu J., Chen H., Song Z., Wang X., Sun Z., *Effects of ginger (Zingiber officinale Roscoe) on type 2 diabetes mellitus and components of the metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2018, s. 5692962, doi:10.1155/2018/5692962.
  48. Ota A., Ulrich N. P., *An overview of herbal products and secondary metabolites used for management of type two diabetes*, Frontiers in Pharmacology, 8, 2017, s. 436.
  49. Arablou T., Aryacian N., Valizadeh M., Sharifi F., Hosseini A., Djalali M., *The effect of ginger consumption on glycemical status, lipid profile and some inflammatory markers in patients with type 2 diabetes mellitus*, International Journal of Food Sciences and Nutrition, 4, 2014, s. 515-520.
  50. Shidfar F., Rajab A., Rahideh T., Khandouzi N., Hosseini S., Shidfar S., *The effect of ginger (Zingiber officinale) on glycemical markers in patients with type 2 diabetes*, Journal of Complementary and Integrative Medicine, 2, 2015, s. 165-170.
  51. Thomson M., Al-Qattan K.K., Divya J.S., Ali M., *Anti-diabetic and anti-oxidant potential of aged garlic extract (AGE) in streptozotocin-induced diabetic rats*, BMC Complementary Alternative Medicine, 16:17, 2016, doi: 10.1186/s12906-016-0992-5.
  52. Bayan L., Koulivand P. H., Gorji A., *Garlic: a review of potential therapeutic effects*, Avicenna Journal of Phytomedicine, 1, 2014, s. 1-14.
  53. Eidia A., Eidi M., Esmailia E., *Antidiabetic effect of garlic (Allium sativum L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats*, Phytomedicine, 9-10, 2006, s. 624-629.
  54. Padiya R., Banerjee S.K., *Garlic as an anti-diabetic agent: recent progress and patent reviews*, Bentham Science, 2, 2013, s. 105-127.
  55. Gawryś M., Zawada K., Wawer K., *Aronia w diecie diabetyków. Diabetologia Kliniczna*, 5, 2012, s. 196-200.
  56. Badescu M., Badulescu O., Badescu L., Ciocoiu M., *Effects of Sambucus nigra and Aronia melanocarpa extracts on immune system disorders within diabetes mellitus*,

- Pharmaceutical Biology, 4, 2014, s. 533-539.
57. Pari L., Venkateswaran S., *Protective role of phaseolus vulgaris on changes in the fatty acid composition in experimental diabetes*, Journal of Medicinal Food, 2, 2004, s. 204-209.
  58. Villegas R., Gao Y., Yang G., Li H., Elasy T.A., Zheng W., Shu X. O., *Legume and soy food intake and the incidence of type 2 diabetes in the Shanghai women's health study*, 1, 2008, s. 162-167.
  59. Venkateswaran S., Pari L., Saravanan G., *Effect of Phaseolus vulgaris on circulatory antioxidants and lipids in rats with streptozotocin-induced diabetes*, Journal of Medicinal Food, 2, 2002, s. 97-103.
  60. Basch E., Gabardi S., Ulbricht C., *Bitter melon (Momordica charantia): a review of efficacy and safety*, American Journal of Health-System Pharmacy, 4, 2003, s. 356-359.
  61. Kulczyński B., Gramza-Michałowska A., Kmieciak D., Kobus-Cisowska J., *Właściwości prozdrowotne gorzkiego melona*, Problemy Higieny i Epidemiologii, 98(3), 2017, s. 233-239.
  62. Joseph B., Jini D., *Antidiabetic effects of Momordica charantia (bitter melon) and its medicinal potency*, Asian Pacific Journal of Tropical Diseases 3(2), 2013, s. 93-102.
  63. Nkambo W., Anyama N.G., Onegi B., *In vivo hypoglycemic effect of methanolic fruit extract of Momordica charantia L.*, African Health Sciences, 4, 2013, s. 933-939.
  64. Baskaran K., Ahamath B. K., Shanmugasundaram K.R., Shanmugasundaram E. R. B., *Antidiabetic effect of a leaf extract from Gymnema sylvestre in non-insulin-dependent diabetes mellitus patients*, Journal of Ethnopharmacology, 3, 1990, s. 295-305.
  65. Lamer-Zarawska E., Kowal-Gierczak B., Niedworok J., *Fitioterapia i leki roślinne*, PZWL, Warszawa 2012.
  66. Tiwari P., Mishra B.N., Sangwan N.S., *Phytochemical and pharmacological properties of Gymnema sylvestre: an important medicinal plant*, 2014, ID:830285, doi:10.1155/2014/830285.
  67. López-Romero P., Pichardo-Ontiveros E., Avila-Nava A., Vázquez-Manjarrez N., Tovar A. R., Pedraza-Chaverri J, Torres N., *The effect of nopal (Opuntia Ficus Indica) on postprandial blood glucose, incretins, and antioxidant activity in mexican patients with type 2 diabetes after consumption of two different composition breakfasts*, Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics, 11, 2014, s. 1811-1818.
  68. Zhao L.Y., Lanab Q.J., Huang Z.C., Ouyang L.J., Zenga F.H., *Antidiabetic effect of a newly identified component of Opuntia dillenii polysaccharides*, Phytomedicine, 8-9, 2011, s. 661-668.
  69. Obolskiy D., Pischel I., Feiste B., Glotov N., Heinrich M., *Artemisia dracuncululus L. (Tarragon): A critical review of its traditional use, chemical composition, pharmacology, and safety*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 21, 2011, s. 11367-11384.
  70. Méndez-Del Villar M., Puebla-Pérez A.M., Sánchez-Peña M. J., González-Ortiz L.J., Martínez-Abundis E, González-Ortiz M., *Effect of Artemisia dracuncululus administration on glycemic control, insulin Sensitivity, and insulin secretion in patients with impaired glucose tolerance*, Journal of Medicinal Food, 5, 2016, s. 481-485.
  71. Yin J., Zhang H., Ye J., *Traditional Chinese medicine in treatment of metabolic syndrome, Endocrine, metabolic and immunological disorders – drug targets*, 2, 2008, s. 99-111.
  72. Di Pierro F., Villanova N., Agostini F., Marzocchi R. , Soverini V., Marchesini G., *Pilot study on the additive effects of berberine and oral type 2 diabetes agents for patients with suboptimal glycemic control*, Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy, 5, 2012, s. 213-217.

## Roślinne substancje bioaktywne a profilaktyka i terapia cukrzycy typu 2

### Streszczenie

Cukrzyca jest chorobą powszechnie rozprzestrzeniającą się na całym świecie, która dotyka ludzi zarówno w krajach rozwiniętych, jak i rozwijających się. Cukrzyca typu 2 jest zaburzeniem metabolicznym, które charakteryzuje się hiperglikemią i nietolerancją glukozy z powodu insulinooporności. Choroba ta występuje zwykle u osób starszych i dotyka w większym stopniu osoby z nadwagą lub otyłe. Dieta oparta na wysoko przetworzonych produktach spożywczych jest jednym z czynników powodujących wysoki wzrost częstości występowania choroby. Dieta jest również głównym czynnikiem regulującym jej postęp. Udowodniono, że tradycyjnie stosowane rośliny lecznicze mają działanie antydiabetyczne. Przeprowadzone badania potwierdziły takie właściwości bioaktywnych związków roślinnych, ale nadal trwają prace nad wyjaśnieniem mechanizmów ich działania. Obecnie udowodniono, że niektóre z tych cząsteczek zwiększają produkcję insuliny przez trzustkę, pomagają obniżyć zapotrzebowanie organizmu na insulinę, wpływają na insulinooporność, czy też zmniejszają glukoneogenezę w wątrobie. Celem niniejszego artykułu przeglądowego jest podsumowanie aktualnego stanu wiedzy i wyjaśnienie możliwych mechanizmów działania bioaktywnych związków roślinnych oraz ich roli w profilaktyce i leczeniu cukrzycy.

Słowa kluczowe: cukrzyca, zioła, składniki bioaktywne, cukrzyca typu 2

## Plant bioactive compounds in the prevention and treatment of type 2 diabetes

### Abstract

Diabetes mellitus is a common and worldwide spreading disease that affects people in both, developed and developing countries. Type 2 diabetes is a metabolic disorder which is characterized by hyperglycemia and glucose intolerance due to insulin resistance. The disease usually occurs in older adults and affects more the overweight or obese people. The diet based on the high-processed food products is a one of the factors causing a high increase in the prevalence of the disease. The diet is also the main factor regulating its progress. Traditionally used medicinal plants have been proven to have antidiabetic effects. The researches carried confirmed the such properties of plant bioactive compounds but explaining their activity mechanisms are still in progress. Some of those molecules have now been proven to increase insulin production by the pancreas, help to lower the body's insulin requirements, improve insulin resistance, or reducing gluconeogenesis in the liver. The purpose of this review article, is to sum up the current state of knowledge and explain the possible mechanisms of action of plant bioactive compounds and their role in the prevention and the management of diabetes mellitus.

Keywords: diabetes, herbs, bioactive compounds, type 2 diabetes

Aleksandra Janusz<sup>1</sup>, Joanna Janusz, Zdzisława Kondera-Anasz, Aleksandra Mielczarek-Palacz, Aleksandra Englisz, Marta Smycz-Kubańska, Patrycja Królewska-Daszczyńska, Dominika Wendlocha

## **Analiza cech morfologicznych i hipoteza dziedziczenia DNA pozajądrowego u hybrydy *Passiflora L.* z rodziny męczennicowatych**

### **1. Wstęp**

#### **1.1. Charakterystyka rodziny męczennicowatych (*Passifloraceae* Juss. ex Kunth in Humb.)**

Rodzina męczennicowatych (*Passifloraceae* Juss. ex Kunth in Humb.) jest licznie reprezentowana przez co najmniej 580 gatunków, uprawianych głównie ze względu na właściwości lecznicze, ale także walory ozdobne kwiatów i liści. Do rodziny *Passifloraceae* należą 4 rodzaje:

1. *Astrophea*, obejmujące 60 gatunków,
2. *Deidamioides*, którą reprezentuje zaledwie 13 gatunków,
3. *Decaloba*, utworzony przez 230 gatunków,
4. *Passiflora* L., do którego należy 250 gatunków [1].

Rośliny należące do rodziny męczennicowatych to zimozielone, silnie rosnące pnącza z czepnymi wąsami. W warunkach naturalnych występują w deszczowych tropikalnych lasach. W poszukiwaniu światła, pnącza te wytwarzają bardzo długie pędy. Roślina ma liście proste lub 3-5 klapowe, które na pędzie ułożone są naprzemianlegle. Największą ozdobą rośliny są egzotycznie wyglądające kwiaty, które wyrastają w kątach górnych liści. Kwiaty są różnej wielkości w zależności od gatunku. Mogą być bardzo małe, o średnicy około 1-2 cm lub duże i okazałe od 10 do 12 cm, barwy: białej, czerwonej, kremowej, fioletowej, niebieskiej lub żółtej. Charakterystyczną cechą roślin z tej rodziny jest przykoronek okwiatu, o różnej długości i kolorystyce. Wszystkie gatunki tej rodziny zawiązują owoce, a niektóre z nich są jadalne. Najbardziej znane są owoce męczennicy jadalnej – *Passiflora edulis*, pochodzącej z Brazylii, wielkości śliwki z grubą skórką koloru fioletowego lub żółtego, stąd nazywane marakują. Owoc zawiera galaretowaty i aromatyczny miąższ o lekko kwaskowym smaku z dużą ilością nasion, który można spożywać na surowo lub dodawać do soków lub jogurtów [2].

Pierwsza publikacja dotycząca roślin należących do rodzaju *Passiflora* L. została napisana przez Linneusza w 1745 roku i zawierała opis 22 gatunków. Następnie w 1753 roku w pracy pt. „Species Plantarum” scharakteryzował 2 nowe gatunki z rodzaju *Passiflora* L. Jednak w 1872 roku Mastster opublikował największą monografię, gdzie opisał aż 202 gatunki tej rośliny [2].

Rośliny należące do rodzaju *Passiflora* L. znalazły szerokie zastosowanie w medycynie i przemyśle kosmetycznym. Wśród właściwości leczniczych warto

---

<sup>1</sup> ola.janusz@vp.pl, Katedra i Zakład Immunologii i Serologii, Wydział Nauk Farmaceutycznych, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec.

wymienić zdolności immunomodulujące owoców *Passiflory foetida*, związane z obecnością polisacharydów takich jak: PFP1, PFP2, PFP3 i PFP4. Polisacharydy mają zdolność do promowania produkcji tlenku azotu (NO), czynnika martwicy nowotworu  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) i interleukiny-6 (IL-6) w makrofagach [3]. Z kolei (neuroaktywne) flawonoidy obecne w liściach *P. edulis* oraz *P. incarnata* L. oddziałują na ośrodkowy układ nerwowy, przez działanie uspokajająco-nasenne, dlatego stosowane są jako środek antydepresyjny [4, 5]. Natomiast sok z owoców *P. setacea*, zawierający związki o działaniu przeciwzapalnym znalazł zastosowanie w zapobieganiu chorobom kardiometabolicznym [6]. Z kolei sproszkowana miazga owoców *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. jest bogatym źródłem związków probiotycznych i fenolowych, które korzystnie wpływają na przewód pokarmowy u ludzi [7]. Wykazano również, że ekstrakt płynny otrzymany z nasion *P. mollissima* posiada właściwości hamujące żywotność komórek raka okrężnicy [8].

W przemyśle kosmetycznym zastosowanie znalazły nasiona pozyskiwane z owoców *P. edulis* Sims var. *edulis*, które są bogate w związki o właściwościach przeciwutleniających i przeciwstarzeniowych (piceatannol i resweratrol) [9]. Z kolei Jusuf i wsp. [10] wykazali, iż ekstrakt z nasion *Passiflory edulis* Sims var. *edulis* wykazuje silne działanie przeciwbakteryjne wobec bakterii *Propionibacterium acnes*, która wywołuje trądzik pospolity (*acne vulgaris*), co można zastosować w przemyśle kosmetycznym.

Rodzinę *Passifloraceae* charakteryzuje duża różnorodność struktur kwiatowych i wegetatywnych oraz złożona taksonomia. Z tego powodu uważa się, że przedstawiciele rodziny *Passifloraceae* charakteryzują się największym zróżnicowaniem, jeśli chodzi o budowę liści i kwiatów, spośród wszystkich rodzajów roślin. Na tej samej roślinie może występować zarówno pojedyncza, jak i złożona blaszka liściowa [11, 12]. Natomiast kwiaty większości roślin należących do tej rodziny są obupłciowe, co ułatwia tworzenie różnych krzyżówek międzygatunkowych. Dlatego rośliny z rodziny męczennicowatych są ciekawym materiałem do badań genetycznych.

## 1.2. Dziedziczenie u roślin z rodziny *Passifloraceae*

U roślin z rodziny *Passifloraceae* dziedziczenie cech odbywa się zarówno zgodnie z prawami Mendla tzw. dziedziczenie jądrowe oraz z udziałem DNA chloroplastowego (cpDNA) i mitochondrialnego (mtDNA), nazywanego dziedziczeniem pozajądrowym [13]. Różnice pomiędzy dziedziczeniem jądrowym i pozajądrowym wynikają głównie z faktu, iż u roślin DNA mitochondrialne i chloroplastowe różni się od DNA, znajdującego się w jądrze komórkowym. Mitochondria mają wiele kopii DNA, natomiast komórki roślinne posiadają wiele mitochondriów, dlatego DNA mitochondrialne występuje w wielu kopiach w przeciwieństwie do DNA jądrowego. Dodatkowo, podczas dziedziczenia mitochondrialnego dochodzi do losowej segregacji genów do komórek potomnych, co skutkuje tym, że geny znajdują się w różnych komórkach potomnych. Najczęściej DNA pozajądrowe jest dziedziczone od jednego z rodziców, co oznacza, że potomstwo otrzymuje mitochondrialne DNA (mtDNA) tylko od rośliny żeńskiej lub męskiej, nie od obojga jak w przypadku dziedziczenia jądrowego zgodnego z prawami Mendla [14-16].

Natomiast w przypadku dziedziczenia DNA chloroplastowego, niektóre komórki pozostaną z jednolitym zestawem prawidłowych zielonych chloroplastów a inne będą miały jednorodny zestaw niefunkcjonalnych białych chloroplastów. Dodatkowo będą

obserwowane komórki zawierające jednocześnie: prawidłowe i нефункционалне chloroplasty. Rośliny takie mają pstrokaty wygląd, co jest związane z obecnością zarówno białych, jak i zielonych chloroplastów [15].

Wiadomo jest, że podczas rozwoju rośliny przekształcają komórki ze szczytu pędu w komórki wytwarzające gamety. Dlatego zielony pęd jest źródłem komórki jajowej z zielonymi chloroplastami, które dadzą początek zielonemu potomstwu. Natomiast pęd, który jest biały wytworzy komórki jajowe, które będą zawierać tylko białe chloroplasty i dadzą początek białemu potomstwu. Z kolei pstrokaty pęd ma komórki zawierające różnorodne chloroplasty funkcjonalne (zielone) lub нефункционалне (białe) oraz oba typy jednocześnie. Wszystkie trzy rodzaje komórek mogą dać początek komórkom jajowym, prowadząc do pojawienia się zielonego, białego lub pstrokatego potomstwa w nieprzewidywalnych proporcjach [16-18].

Pąki kwiatowe mogą rozwijać się na dowolnej gałęzi: pstrokatej, zielonej lub białej. W krzyżówkach między kwiatami na różnokolorowych pędach, kolor zygoty i powstałej rośliny jest określony przez dziedziczenie matczyne. Jeśli gałąź takiego pędu jest pstrokata (zróznicowana), to mogą powstać trzy rodzaje zygot, w zależności od tego, czy komórka jajowa zawierała tylko białe, tylko zielone czy zarówno zielone, jak i białe chloroplasty. W zróznicowanych zygotach proces segregacji cytoplazmatycznej podczas kolejnych podziałów komórkowych prowadzi do powstania mozaiki, czyli całkowicie zielonych i całkowicie białych komórek, co w efekcie prowadzi do uzyskania pstrokatą rośliny [14, 15, 19].

U roślin z rodziny męczennicowatych, dziedziczenie pozajądrowe zostało udowodnione tylko u rośliny z rodzaju *Decaloba* – *Passiflora bilora* Lam. [20]. Wszyscy przedstawiciele, należący do rodziny *Passifloraceae*, wykazują ogromną zmienność dziedziczonych cech, co czyni rośliny z tej rodziny idealnym materiałem do badań dynamicznej ewolucji plastomów okrytozależkowych, a także dziedziczenia pozajądrowego. Z tego powodu dziedziczenie pozajądrowe było analizowane u hybryd międzygatunkowych z rodzaju *Passiflora L.* Ocenie poddano regiony DNA: chloroplastowy (cp), mitochondrialny (mt) i rybosomalny (ITS), wyizolowane od hybryd: czterech sztucznych i jednej naturalnej. Wyniki analizy rybosomalnego DNA potwierdziły jego hybrydowe pochodzenie, czyli zarówno mateczne, jak i ojcowskie. Natomiast wszystkie mtDNA zostały odziedziczone po matce. Z kolei cpDNA u wszystkich czterech hybryd wykazały ojcowskie dziedziczenie, podczas gdy ta obejmująca taksony z podrodzaju *Decaloba* dawała dowody przeniesienia po roślinie matecznej. Wyniki te mogą mieć znaczenie dla trwających badań nad ewolucją molekularną tego rodzaju roślin, a także stanowić źródło ważnych informacji w analizie, mającej na celu wyjaśnienie czynników determinujących dziedziczenie pozajądrowego DNA [12].

Wśród roślin z rodziny męczennicowatych za zmienność obserwowanych cech mogą odpowiadać także mutacje. Dojrzewanie komórek jajowych wiąże się z szybką replikacją mtDNA, co może prowadzić do losowego pojawienia się mutacji mtDNA. W efekcie dochodzi może do pojawienia się zmiennej liczby kopii zmutowanego mtDNA u potomstwa pochodzącego od roślin matecznych, u których występują mutacje mtDNA [21].

## 2. Cel pracy

Za cel pracy przyjęto rozważenie udziału dziedziczenia pozajądrowego z udziałem mitochondrialnego DNA (mtDNA) u wyhodowanej hybrydy o cechach mozaiki z rodziny *Passifloraceae* i rodzaju *Passiflora* L., otrzymanej ze skrzyżowania Passiflory ‘Amethyst’ (*P. kermesina* x *P. caerulea*) z *Passiflorą* ‘Clear Sky’ ((*P. amethystina* x *P. caerulea*) x *P. caerulea* x *P. caerulea*).

Cel ten realizowano poprzez analizę następujących cech morfologicznych: kolor kwiatów, kształt okwiatu, kolor przykoronka oraz kształt pylników i znamion słupka. Ocenie poddano także zapach kwiatów oraz zdolność wyhodowanej hybrydy do rozmnażania generatywnego.

## 3. Materiał i metody

W sierpniu 2017 roku w hodowli wewnętrznej (szklarnia), kwiat Passiflory ‘Amethyst’ (*P. kermesina* x *P. caerulea*) został ręcznie zapyłony pyłkiem pochodzącym od Passiflory ‘Clear Sky’ ((*P. amethystina* x *P. caerulea*) x *P. caerulea* x *P. caerulea*). *Passiflora* ‘Amethyst’ charakteryzuje się kwiatami ciemno-różowej barwy, o smukłych płatkach, które układają się pionowo. Przykoronek kwiatów tej passiflory jest koloru bordowo-biało-fioletowego. Natomiast *P. ‘Clear Sky’* ma kwiaty koloru zielono-białego z bordowo-biało-niebieskim przykoronkiem. Płatki okwiatu są mniej smukłe w porównaniu do *P. ‘Amethyst’* i nie układają się pionowo. Po zapyleniu, do czasu zawiązania owocu, kwiat osłaniany był woreczkiem, w celu uniknięcia przypadkowego zapylenia przez owady pyłkiem pochodzącym od innej passiflory.

Po upływie około 4 miesięcy owoc dojrzał, z którego uzyskano 30 nasion, wśród nich 10 było pustych. Nasiona te odrzucono. Prawidłowe nasiona wysiano na początku stycznia 2018 roku do donic z ziemią torfową o odczynie kwaśnym. Donice z wysianymi nasionami ustawiono na parapecie usytuowanym na południową stronę i podlewano regularnie, nie dopuszczając do przesuszenia torfu. Po upływie około 8 tygodni, 10 nasion wykiełkowało. Następnie po 4 miesiącach małe rośliny rozsadzono do oddzielnych donic i oznaczono nazwami roślin rodzicielskich, czyli *P. ‘Amethyst’* x *P. ‘Clear Sky’*. Rośliny systematycznie podlewano wodą, zasilając je w okresie od marca do sierpnia odżywką do roślin kwitnących.

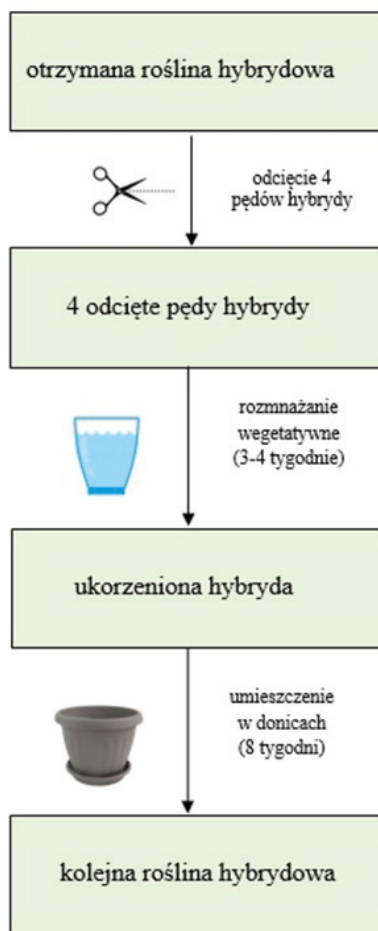
W lipcu 2019 roku zakwitły 4 z otrzymanych roślin. Ocenie poddano morfologię kwiatów otrzymanej hybrydy. Wyróżniała je odmienna kolorystyka. W tych samych warunkach hodowlanych, w jednym czasie otrzymano bowiem na jednym pędzie każdej z 4 hybryd, kwiaty o różnych kolorach. Część kwiatów miała płatki okwiatu śnieżno-białe, natomiast pozostała jasno-różowe. Wykluczono wpływ środków chemicznych (środków ochrony roślin) oraz odmiennych warunków pogodowych i hodowlanych.

W sierpniu 2019 roku z każdej rośliny hybrydowej odcięto 4 gałązki i umieszczono w pojemniku z wodą na okres 3-4 tygodni. Po tym czasie uzyskano ukorzenione sadzonki, które umieszczono w donicach z kwaśnym torfem. Po upływie 2 miesięcy otrzymano silne rośliny, które zakwitły. Wszystkie uzyskane przez rozmnażanie wegetatywne rośliny hybrydowe morfologicznie były identyczne – miały te same cechy co hybrydy wysiane z nasion, z których odcięto pędy przeznaczone do ukorzeniania. U roślin rozwinęły się kwiaty o zróżnicowanej kolorystyce, czyli śnieżno-białe i jasno-różowe.

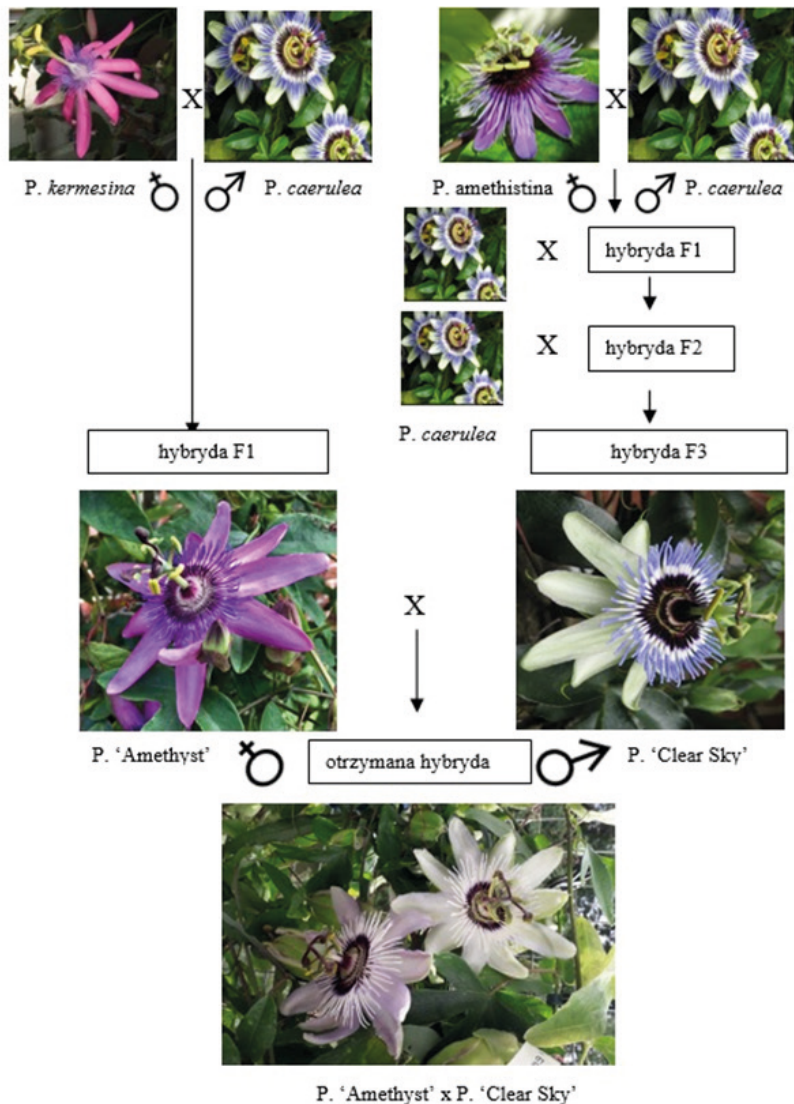


Od wyhodowanej hybrydy pobrano pyłek i przeniesiono na inny gatunek passiflory. Natomiast znamię słupka zapylono pyłkiem pochodzącym od innej passiflory. Obie rośliny zawiązały owoce, które prawidłowo się rozwijały. Po osiągnięciu pełnej dojrzałości stwierdzono, iż oba owoce zawierały prawidłowo wykształcone nasiona, które po wysianiu do donic z torfem, wykiełkowały dając kolejne pokolenie roślin hybrydowych.

Na rycinach 1, 3 i 4 przedstawiono schematy doświadczeń, na rycinie 2 kwiaty form rodzicielskich oraz otrzymanej hybrydy. Natomiast rycina 5 ilustruje miejsce hodowli własnej hybrydy.



Rycina 1. Schemat eksperymentu. Źródło: [opracowanie własne]



Rycina 2. Schemat eksperymentu. Źródło: [opracowanie własne]



Rycina 3. Schemat eksperymentu. Źródło: [opracowanie własne]



Rycina 4. Schemat eksperymentu. Źródło: [opracowanie własne]



Rycina 5. Miejsce hodowli otrzymanej krzyżówki passiflory.  
Źródło: [opracowanie własne]

#### 4. Rezultaty

Wyhodowana podczas eksperymentu hybryda miała charakterystyczne cechy morfologiczne, które wyróżniały ją spośród innych przedstawicieli tej rodziny. Mieszaniec międzygatunkowy charakteryzował się zróżnicowaną kolorystyką kwiatów na jednym pędzie, co przedstawiono na rycinie 2. Także pąki kwiatowe otrzymanej hybrydy miały różne kolory działki kielicha, co zilustrowano na rycinie 6. Stwierdzono także powtarzalność obserwowanych cech morfologicznych u roślin rozmnażanych wegetatywnie. U otrzymanej hybrydy kształt wszystkich kwiatów był mieszany pomiędzy formami rodzicielskimi, natomiast układanie płatków okwiatu typowe dla rośliny ojcowskiej. Nie stwierdzono charakterystycznego dla *P. 'Amethyst'* układania pionowego płatków okwiatu. Wszystkie kwiaty wyhodowanej hybrydy miały przykoronek dwukolorowy – bordowo-biały. Stwierdzono prawidłowo wykształcone pylniki i znamiona słupka. Pylniki wytwarzały pyłek. Otrzymana hybryda wykazywała zdolność do rozmnażania generatywnego i zawiązała owoce, które zawierały nasiona charakterystyczne dla rodzaju *Passiflora* L, co przedstawiono na rycinie 7.



Rycina 6. Pąki kwiatowe otrzymanej krzyżówki passiflory, z lewej o jasno-różowych kwiatach i z prawej o białych kwiatach. Źródło: [opracowanie własne]



Rycina 7. Owoc zawiązany przez wyhodowaną hybrydę passiflory. Źródło: [opracowanie własne]

Analizie poddano także zapach kwiatów otrzymanej własnej hybrydy i stwierdzono, że zarówno kwiaty koloru śnieżno-białego, jak i jasno-różowego, pachniały tak samo jak roślina ojcowska.

## 5. Dyskusja

Istnieje duże zainteresowanie hodowlą roślin hybrydowych z rodzaju *Passiflora* L. ze względu na piękno i egzotyczne cechy jej kwiatów. Uzyskanie własnych roślin hybrydowych z rodziny *Passifloraceae* jest możliwe ze względu na fakt, iż większość passiflor ma kwiaty obupłciowe, co umożliwia otrzymanie nowych gatunków [22]. Dodatkowo gatunki z rodzaju *Passiflora* L. mają zróżnicowane cechy morfologiczne, anatomiczne oraz wykazują zmienność filogenetyczną. Hodowla hybryd *Passiflora* L. do celów ozdobnych rozpoczęła się dawno temu, jednak do chwili obecnej charakterystyka genomowa i cytogenetyczna

uzyskanych hybryd nie jest dobrze zbadana. Co więcej, istniejące międzygatunkowe i wewnątrzgatunkowe różnice między gatunkami *Passiflora* L. utrudniają zrozumienie związku między zmiennością morfologiczną tych roślin, ich różnorodnością genotypową i specjacją. Dodatkowo rosnąca liczba hybryd międzygatunkowych przyczynia się ogromnej zmienności morfologicznej. Dlatego konieczne są badania weryfikujące kompatybilność fenotypową i genotypową otrzymanych hybryd. Interesujące wydają się także zbadanie czynników mogących wpływać na ich płodność. Identyfikację taką można przeprowadzić przy użyciu różnych technik, od prostych i niedrogich wykorzystujących analizę cech morfologicznych po badania markerów molekularnych [23]. W pracy weryfikację przeprowadzono analizując cechy morfologiczne wyhodowanej hybrydy. Jest to metoda, która nie generuje wysokich kosztów. W piśmiennictwie brak jest prac opisujących analizę hybryd z użyciem tej metody.

Otrzymana hybryda wykazywała cechy mozaiki, co widoczne było w wyglądzie morfologicznym. Co ciekawe, na 26 innych, otrzymanych przez autorów pracy, sztucznych krzyżówek międzygatunkowych oraz 400 innych posiadanych hodowlanych gatunków roślin z rodziny *Passifloraceae* (reprezentujących wszystkie cztery rodzaje tej rodziny) u żadnej rośliny (w tych samych warunkach hodowlanych) nie uzyskano kwiatów o różnych kolorach. Dlatego postawiono hipotezę o dziedziczeniu pozajądrowym lub pojawieniu się mutacji oraz czy dziedziczenie genów odpowiedzialnych za te cechy są zgodne z prawami Mendla i zasadami dziedziczenia jądrowego DNA, czy może jednak nie [12]? Komórki płciowe mają bowiem po 50% alleli pochodzących od każdego z rodziców [13]. W związku z tym, że formy rodzicielskie hybrydy będącej tematem pracy były roślinami di- i tetraploidalnymi, analiza cech morfologicznych otrzymanej krzyżówki powinna uwzględniać także przodków tych roślin. W tym przypadku zarówno pochodzące od *P. 'Amethyst'* (ciemno-różowy kolor okwiatu), jak i *P. 'Clear Sky'* (zielono-biały kolor okwiatu). Należy tutaj podkreślić, iż *P. 'Amethyst'* jest krzyżówką *P. kermesina* (różowy kolor okwiatu) z *P. caerulea* (zielono-biały kolor okwiatu). Natomiast pierwotnymi formami rodzicielskimi *P. 'Clear Sky'* były skrzyżowane gatunki: *P. amethystina* (różowy kolor okwiatu) i *P. caerulea* (zielono-biały kolor okwiatu). W wyniku tej krzyżówki otrzymano hybrydę pokolenia F1, którą znowu zapyłono pyłkiem *P. caerulea*. Następnie hybrydę pokolenia F2, po raz kolejny skrzyżowano z *P. caerulea*. W efekcie powstała *P. 'Clear Sky'* będąca pokoleniem F3. *Passiflora* ta była z kolei rośliną ojcowską otrzymanej własnej hybrydy. Na rycinie 1 przedstawiono kolory kwiatów form rodzicielskich i otrzymanej hybrydy.

Kolejną istotną rzeczą w analizie cech morfologicznych otrzymanej hybrydy jest fakt, iż allele danego genu determinujące odpowiednią cechę zewnętrzną mogą mieć charakter dominujący, recesywny lub mogą występować w postaci mieszanej [13]. Wiadomo, iż dominujący jest ten allel, którego jedna kopia w komórce wystarcza, by pojawiła się dana cecha organizmu. Natomiast recesywny allel, to taki który powoduje pojawienie się jakiejś cechy, tylko i wyłącznie wtedy, gdy w komórce nie ma innego allelu tego genu. Mogą zatem powstać rośliny o kolorach: zielono-białym lub jasno lub ciemno-różowym. Otrzymuje się wówczas rośliny o jednakowo ubarwionych kwiatach. Nie zawsze jednak dziedziczenie polega na

pełnej dominacji jednego allelu nad drugim. Powstają wówczas rośliny o pośrednich cechach morfologicznych. Oznacza to, że w przypadku form rodzicielskich o białych i ciemno-różowych kwiatach, powstaną także rośliny o jasno różowych kwiatach. W prowadzonej hodowli na jednej roślinie otrzymano kwiaty o różnych kolorach. Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, iż na 26 wcześniej otrzymanych hybryd międzygatunkowych, w 60% kolor okwiatu wykazywał cechy mieszane, czyli np. jeśli rośliny rodzicielskie miały kwiaty koloru: białego i ciemno-różowego, to potomstwo charakteryzowało się jasno-różowym kolorem wszystkich kwiaków. Natomiast w 23% kwiaty miały kolor charakterystyczny dla linii męskiej i tyle samo dla żeńskiej. Tak więc jeśli jedno z rodziców miało białe płatki okwiatu, a drugie ciemno-różowe, to potomstwo miało kolor biały lub ciemno-różowy. Można zatem postawić hipotezę, iż u roślin z rodziny *Passifloraceae* występują allele nie całkowicie dominujące i powstają kolory pośrednie między formami rodzicielskimi. W przypadku hybrydy będącej przedmiotem pracy otrzymano roślinę o powtarzalnych cechach morfologicznych, czyli o dwóch kolorach kwiaków na jednym pędzie: śnieżno-białym i jasno-różowym, co może sugerować dziedziczenie pozajądrowe lub wystąpienie mutacji.

Warto przypomnieć, iż w przypadku dziedziczenia pozajądrowego, zachodzącego z udziałem DNA mitochondrialnego, może powstać pokolenie potomne o zróżnicowanej kolorystyce okwiaków. Ponieważ mtDNA często dziedziczone jest tylko od jednego z rodziców, potomstwo może otrzymać mtDNA tylko od rośliny żeńskiej lub męskiej, nie od obojga [24-26]. Formy rodzicielskie otrzymanej hybrydy były di- i tetraploidami. Analiza koloru kwiaków pokolenia (F1) z linii żeńskiej otrzymanej hybrydy może świadczyć o tym, iż allel determinujący barwę różową dominuje całkowicie nad allelem determinującym zielono-białą barwę kwiaków. W efekcie, wszystkie osobniki pierwszego pokolenia charakteryzują się kwiakami o barwie różowej. Natomiast analiza linii męskiej otrzymanej hybrydy może wskazywać, iż allel odpowiedzialny za barwę różową nie dominuje całkowicie nad allelem zielono-białym. Należy tutaj podkreślić, iż pokolenie ojcowskie było trzykrotnie krzyżowane z tym samym gatunkiem passiflory (*P. caerulea*), co zilustrowano na rycinie 1. Czyli otrzymane rośliny potomne pokolenia F1 i F2 były ponownie krzyżowane z rośliną o zielono-białych kwiatach. W efekcie powstała hybryda o zielono-białym zabarwieniu okwiatu, trudno zatem wnioskować, czy allel genu determinującego zielono-biały kolor okwiatu był całkowicie lub częściowo dominujący nad allelem genu odpowiedzialnego za ujawnienie się koloru różowego kwiaku. Brak całkowitej dominacji któregoś z alleli skutkowało by powstaniem pokolenia o pośredniej kolorystyce, czyli jasno-różowych kwiakach.

Dane literaturowe wskazują, iż w przypadku rodzaju *Passiflora L.* dziedziczenie mtDNA następuje w linii żeńskiej [12]. Wiadomo także, że w krzyżówkach między roślinami o różnokolorowych pędach, kolor zygoty i powstałej rośliny jest określony przez matczyne mtDNA [15], czyli niezależnie od mtDNA ojcowskiego rośliny potomne miały by przekazane mitochondrialne DNA pochodzące od matki. Analiza koloru okwiaków form rodzicielskich otrzymanej hybrydy, a także znajomość zasad dziedziczenia pozajądrowego DNA może sugerować, iż kolejne pokolenie mogłoby charakteryzować się: śnieżno-białymi, różowymi i jasno-różowymi kwiakami. Powinny to być teoretycznie rośliny o jednakowym ubarwieniu wszystkich kwiaków

na jednym pędzie, czyli tylko: śnieżno-białych lub jasno-różowych.

W niniejszej pracy analizie poddano także kształt okwiatu, czyli długość płatków i zdolność układania się ich w pionie kwiatu. Santos i wsp. [27] wykazali u analizowanych hybryd z rodzaju *Passiflora* L. przewagę dziedziczenia męskich cech vegetatywnych. Natomiast z doświadczenia własnego wynika, że u 81% własnych innych hybryd, kształt był typowy dla roślin żeńskich, u 15% – dla męskich, a jedynie u niecałych 4% jest charakterystyczny dla dziedziczenia mieszanego od obu form rodzicielskich. U otrzymanej hybrydy o dwukolorowych kwiatach na jednym pędzie, stwierdzono układanie płatków okwiatu typowe dla rośliny ojcowskiej, natomiast kształt okwiatu mieszany: męsko-żeński. Nie stwierdzono charakterystycznego dla *P. 'Amethyst'* układania pionowego płatków okwiatu. Zatem obserwowane u otrzymanej hybrydy cechy mogłyby potwierdzać wnioski wysunięte z doświadczenia Santosa i wsp., ale także istnienie mozaikowości.

W analizie cech morfologicznych roślin z rodzaju *Passiflora* L., ciekawe wydaje się także dziedziczenie genów odpowiedzialnych za kolor przykoronka. Przykoronki form rodzicielskich były zróżnicowane: bordowo-biało-fioletowe i bordowo-biało-niebieskie. Natomiast otrzymana hybryda miała przykoronek dwukolorowy – bordowo-biały. Takiej kolorystyki nie wykazywał żaden z przodków, zarówno z linii żeńskiej, jak i męskiej. Dodatkowo, na pędzie o zróżnicowanej kolorystyce okwiatu, nie stwierdzono odmiennego koloru przykoronka, oba kwiaty miały taki sam. Mogłoby to wskazywać na istnienie jeszcze innego mechanizmu dziedziczenia genów odpowiedzialnych za kolor tej części rośliny. Z wcześniejszych doświadczeń wynika, że spośród 26 innych otrzymanych wcześniej własnych hybryd, aż 65% roślin wykazywało ubarwienie przykoronka o cechach mieszanych, czyli zarówno pochodzenia matecznego, jak i ojcowskiego. U żadnej nie pojawił się kolor odbiegający od ubarwienia przodków, tak jak w przypadku hybrydy będącej przedmiotem pracy. Natomiast 23% z 26 roślin miało przykoronek wskazujący na dziedziczenie po linii żeńskiej, a tylko 11% po męskiej. Badaniem tej części kwiatu zajmowali się Hemingway i wsp. [28], którzy analizowali ekspresję trzech genów przykoronka u *P. caerulea* (męczennica niebieska) i doszli do wniosku, że jest to struktura całkowicie odrębna od androgynoforu. Może to wskazywać na inny mechanizm dziedziczenia tej części kwiatu, co mogłoby być zgodne z obserwacjami poczynionymi przez autorów tej pracy.

Kwiaty *Passiflora* L. posiadają wiele unikalnych cech morfologicznych, takich jak: jaskrawe włókna przykoronka, różnorodna morfologię wieczka, androgynofor i wyszukane struktury nektarników. Uważa się, że ewolucja zmienności morfologii kwiatów jest wynikiem interakcji z szeroką gamą tzw. „zapyłaczy”, takich jak: trzmiele, osy, kolibry, a nawet nietoperze. Dlatego ten rodzaj może stanowić szczególnie interesujący materiał do badań nad ewolucją zapylania, zwłaszcza tych, których celem jest wyjaśnienie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw tych etapów adaptacyjnych [29]. Z tego powodu ocenie poddano również kształt pylników i znamion słupka, a także zdolność wytwarzania pyłku. Cechy te mogą wskazywać na płodność lub jej brak. Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono prawidłowo wykształcone pylniki i znamiona słupka. Pylniki wytwarzały pyłek w bardzo dużej ilości. Na podstawie wcześniej przeprowadzonych analiz wiadomo, że nie wszystkie hybrydy międzygatunkowe mają prawidłowo wykształcone pylniki i nie



wszystkie wytwarzają pyłek. Szczególnie dotyczy to tych, których rośliną mateczną była *P. 'Amethyst'*, tak jak w tym przypadku. Otrzymanie w pełni płodnej hybrydy, czyli wytwarzającej zarówno pyłek oraz prawidłowo wykształcone znamiona, daje możliwość tworzenia kolejnych krzyżówek międzygatunkowych, co umożliwia przeprowadzenie analizy molekularnej kolejnych pokoleń.

Analiza płodności otrzymanej hybrydy wykazała zdolność do rozmnażania generatywnego. Roślina zapylona pyłkiem innej passiflory zawiązała owoce, które prawidłowo się rozwijały. Także inna passiflora, której znamiona zapylono pyłkiem otrzymanej hybrydy, zawiązała prawidłowe owoce. Po osiągnięciu pełnej dojrzałości stwierdzono, iż oba owoce zawierały prawidłowo wykształcone nasiona, które po wysianiu do donic z torfem, wykiełkowały dając kolejne pokolenie roślin hybrydowych. Tymczasem wcześniejsze doświadczenia wykazały, iż niektóre krzyżówki międzygatunkowe w obrębie tego samego rodzaju z rodziny *Passifloraceae*, pomimo prawidłowo wykształconych znamion słupka, nie zawiązywały jednak owoców. Mogłoby to wskazywać na istnie barier prezygotycznych, uniemożliwiających zapłodnienie komórki jajowej plemnikami pyłku niektórych gatunków passiflor. Te z kolei, które zawiązywały owoce, nie zawsze jednak zawierały prawidłowo rozwinięte nasiona. Takie owoce były najczęściej odrzucane przez roślinę jeszcze przed osiągnięciem ich pełnej dojrzałości. Analiza takich odrzuconych owoców wykazywała obecność tylko białych lub zielonych nieprawidłowo wykształconych nasion, bez nasion prawidłowych. Sugerowało by to z kolei istnienie barier postzygotycznych (pozapłodnieniowych), uniemożliwiających powstanie dojrzałego zarodka. Wśród roślin z rodziny *Passifloraceae* bariery takie istnieją pomiędzy przedstawicielami rodzaju *Passiflora* L. i *Decaloba*, które jak wykazali Silva i wsp. [30] są odległe genetycznie pomimo przynależności do jednej rodziny. W przypadku otrzymanej rośliny hybrydowej, takich barier nie stwierdzono. Owoce zawierały nasiona charakterystyczne dla rodzaju *Passiflora* L. może to świadczyć o płodności wyhodowanej passiflory.

Z kolei ocena zapachu kwiatów otrzymanej hybrydy wykazała, iż kwiaty, zarówno koloru śnieżno-białego, jak i jasno-różowego, pachniały tak samo jak roślina ojcowska. Roślina macierzysta (*P. 'Amethyst'*) wytwarza kwiaty bezzapachowe, w przeciwieństwie do rośliny męskiej (*P. 'Clear Sky'*), której kwiaty pięknie pachną. Wyhodowanie passiflory o pachnących kwiatach dodaje dodatkowej wartości hodowlanej otrzymanej roślinie. Nie można odnieść się w tym przypadku do danych literaturowych, ponieważ nie ma prac, porównujących zapach hybryd z rodziny *Passifloraceae* z roślinami rodzicielskimi. Natomiast analizę chromatograficzną lotnych związków zapachu 5 gatunków roślin z rodzaju *Passiflora* L. przeprowadzili Montero i wsp. [31]. W pracy tej dokonano także oceny profilu zapachów kwiatowych każdego gatunku przez profesjonalnego perfumiarza. Stwierdzono duże zróżnicowanie międzygatunkowe między składami chemicznymi zapachu kwiatowego w obrębie rodzaju *Passiflora* L. Głównymi składnikami były: linalol (*P. alata*), geraniol (*P. quadrangularis*), 1,4-dimetoksybenzen (*P. edulis*), benzaldehyd (*P. cincinnata*) i 2-metylo-3-pentanon (*P. coccinea*). Natomiast z doświadczenia własnego wynika, iż zdecydowana większość (około 95%) uzyskanych krzyżówek międzygatunkowych dziedziczy geny odpowiedzialne za zapach kwiatów po roślinie

matecznej. Pozostałe 5% nie pachniały, pomimo, iż roślina mateczna pachniała. Żadna z hybryd nie odziedziczyła tej cechy po roślinie męskiej. Natomiast, jak wspomniano wcześniej, kwiaty otrzymanej hybrydy pachniały tak jak kwiaty P. 'Clear Sky', czyli rośliny ojcowskiej. Ta cecha wyróżnia także otrzymaną hybrydę spośród innych przedstawicieli rodziny *Passifloraceae*.

Analiza wykazanej zmienności u wyhodowanej hybrydy powinna także uwzględnić di- i tetraploidalność form rodzicielskich. Cytologicznie, gatunki *Passiflora* L. można podzielić na cztery grupy kariologiczne, reprezentowane przez  $x = 6$ ,  $x = 9$ ,  $x = 10$  i  $x = 12$ . Większość gatunków *Passiflora* jest diploidalna, przy czym  $2n = 12$ ,  $2n = 18$  lub  $2n = 20$ , chociaż odnotowano niektóre tetraploidy ( $2n = 24$ ), heksaploidy ( $2n = 36$ ) i ośmiornice ( $2n = 72$ ) [32]. Być może na zróżnicowane cechy morfologiczne wyhodowanej hybrydy miały wpływ: di- i tetraploidalność form rodzicielskich oraz skrzyżowanie rośliny ojcowskiej aż trzykrotnie z tą samą passiflorą (*P. caerulea*).

Oceniając cechy morfologiczne otrzymanej hybrydy nie można także wykluczyć, iż zróżnicowana kolorystyka kwiatów na jednym pędzie mogła być efektem mutacji i przypadkowej segregacji kopii mtDNA. W wyniku podziałów komórkowych, mogą bowiem powstać komórki z jednolitym zestawem prawidłowych genów, a inne z różną kombinacją prawidłowych i zmutowanych kopii mtDNA. Może więc powstać potomstwo o pstrokatej kolorystyce okwiatu [21]. Wydaje się jednak, iż w tym przypadku wszystkie rośliny posiadałyby jednakowo wybarwione kwiaty i nie obserwowanoby mozaiki. Można zatem wyciągnąć hipotezę, iż obserwowane cechy zróżnicowanej kolorystyki płatków kwiatów własnej hybrydy nie były raczej efektem mutacji.

Wyniki analizy cech morfologicznych kwiatów otrzymanej własnej hybrydy (*P. 'Amethyst' x P. 'Clear Sky'*) mogą stanowić ważne źródło informacji dla oceny, mającej na celu wyjaśnienie czynników determinujących dziedziczenie pozajądrowego DNA. Może to być pomocne w ocenie ewolucji molekularnej roślin należących do rodzaju *Passiflora* L. z rodziny *Passifloraceae*. Wydaje się, że liście, owoce oraz nasiona otrzymanych hybryd międzygatunkowych, szczególnie ze względu za zawarte w nich fitoskładniki, mogą stanowić cenny materiał do badań nad wartością odżywczą i działaniem farmakologicznym oraz wykorzystania w przemyśle kosmetycznym [33].

## 6. Wnioski

Z przeprowadzonego doświadczenia wypływają następujące wnioski:

1. Różne kolory okwiatów na tej samej roślinie mogą przemawiać za dziedziczeniem pozajądrowym z udziałem mitochondrialnego DNA (mtDNA).
2. Obserwowany u wyhodowanej hybrydy kolor przykoronka może być efektem pojawienia się mutacji.
3. Mozaikowatość hybrydy, stwierdzona na podstawie analizy cech morfologicznych, nie wpłynęła na płodność rośliny. Hybryda była zdolna do rozmnażania generatywnego.

## Podziękowania

Autorzy składają ogromne podziękowania za nieocenioną pomoc naukową w realizacji pracy Panu Prof. dr n. med. Adamowi Stebel, Kierownikowi Katedry i Zakładu Botaniki Farmaceutycznej i Zielerstwa, Wydziału Nauk Farmaceutycznych, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

## Literatura:

1. Richardo J., Silvério A., *New trends in Passiflora L. pollen grains: morphological/aperture aspects and wall layer considerations*, Protoplasma, 2019; 256(4), s. 923-939, doi: 10.1007/s00709-019-01350-w. Epub 2019 Feb 4. PMID: 30719577.
2. Goller K., *Collection of passion flowers in greenhouse in the Botanical Garden of the Polish Academy of Sciences*, Biuletyn Ogrodów Botanicznych, 2005, 14, s. 67-73.
3. Song Y., Wen P., Hao H., Zhu M., Sun Y., Zou Y., Requena T., Huang R., Wang H., *Structural Features of Three Hetero-Galacturonans from Passiflora foetida Fruits and Their in Vitro Immunomodulatory Effects*, Polymers (Basel), 2020, 12(3), pii: E615, doi: 10.3390/polym12030615.
4. Kim G.H., Yi S.S., *Chronic oral administration of Passiflora incarnata extract has no abnormal effects on metabolic and behavioral parameters in mice, except to induce sleep*, Lab Anim Res, 2019, 35, s. 31, doi: 10.1186/s42826-019-0034-9. eCollection 2019.
5. Alves J.S.F., Silva A.M.D.S., da Silva R.M., Tiago P.R.F., de Carvalho T.G., de Araújo Júnior R.F., de Azevedo E.P., Lopes N.P., Ferreira L.S., Gavioli E.C., da Silva-Júnior A.A., Zucolotto S.M., *In Vivo Antidepressant Effect of Passiflora edulis f. flavicarpa into Cationic Nanoparticles: Improving Bioactivity and Safety*, Pharmaceutics, 2020, 21, 12(4), pii: E383, doi: 10.3390/pharmaceutics12040383.
6. Duarte I.A.E., Milenkovic D., Borges T.K.D.S., Rosa A.J.M., Morand C., Oliveira L.L., Costa A.M., *Acute Effects of the Consumption of Passiflora setacea Juice on Metabolic Risk Factors and Gene Expression Profile in Humans*, Nutrients, 2020, 12(4), pii: E1104, doi: 10.3390/nu12041104.
7. Santos Monteiro S., Albertina Silva Beserra Y., Miguel Lisboa Oliveira H., Pasquali M.A.B., *Production of Probiotic Passion Fruit (Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Deg.) Drink Using Lactobacillus reuteri and Microencapsulation via Spray Drying*, Foods, 2020, 9(3), pii: E335, doi: 10.3390/foods9030335.
8. Ballesteros-Vivas D., Alvarez-Rivera G., León C., Morantes S.J., Ibáñez E., Parada-Alfonso F., Cifuentes A., Valdés A., *Foodomics evaluation of the anti-proliferative potential of Passiflora mollissima seeds*, Food Res Int, 2020, 130, s. 108938, doi: 10.1016/j.foodres.2019.108938. Epub 2019 Dec 24.
9. Krambeck K., Oliveira A., Santos D., Pintado M.M., Baptista Silva J., Sousa Lobo J.M., Amaral M.H., *Identification and Quantification of Stilbenes (Piceatannol and Resveratrol) in Passiflora edulis By-Products*, Pharmaceutics (Basel), 2020, 13(4), pii: E73.
10. Jusuf N.K., Putra I.B., Dewi N.K., *Antibacterial Activity of Passion Fruit Purple Variant (Passiflora edulis Sims var. edulis) Seeds Extract Against Propionibacterium acnes*, Clin Cosmet Investig Dermatol, 2020, 13, s. 99-104, doi: 10.2147/CCID.S229743. eCollection 2020.
11. Muschner V.C., Lorenz A.P., Cervi A.C., Bonatto S.L., Souza-Chies T.T., Salzano F.M., Freitas L.B., *A first molecular phylogenetic analysis of Passiflora (Passifloraceae)*, Am J Bot Journal, 2003, 90(8), s. 1229-38, doi: 10.3732/ajb.90.8.1229.
12. Muschner V.C., Lorenz-Lemke A.P., Vecchia M., Bonatto S.L., Salzano F.M., Freitas L.B., *Differential organellar inheritance in Passiflora's (Passifloraceae) subgenera*, Genetica, 2006, 128(1-3), s. 449-53.
13. Chorąży M., *Gen strukturalny – ewolucja pojęcia i dylematy*, Nauka, 2009, 3, s. 57-108.
14. Miko I., *Non-nuclear genes and their inheritance*, Nature Education, 2008, 1(1), s. 135.
15. Griffiths A.J.F., Gelbart W.M., Miller J.H., Lewontin R.C., *Inheritance of organelle genes*, W Modern Genetic Analysis, New York, 1999, NY: W. H. Freeman.
16. Birky C.W., *The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: Laws, mechanisms, and models*, Annu Rev Genet, 2001, s. 18-128.
17. Hagemann R., Baur E., Correns C., *Who really created the theory of plastid inheritance?*, Journal of Heredity, 2000, 91(6), s. 435-440.
18. Chiai H., Craig J., *mtDNA and mitochondrial diseases*, Nature Education, 2008, 1(1), s. 217.
19. NIH Talking Glossary of Genetic Terms, NHGRI. Mitochondrial DNA. Dostęp z dnia 2 maja.2020 roku.

20. Shrestha B., Weng M.L., Theriot E.C., Gilbert L.E., Ruhlman T.A., Krosnick S.E., Jansen R.K., *Highly accelerated rates of genomic rearrangements and nucleotide substitutions in plastid genomes of Passiflora subgenus Decaloba*, Mol Phylogenet Evol, 2019, 138, s. 53-64, doi: 10.1016/j.ymp.2019.05.030.
21. Taylor R.W., Turnbull D.M., *Mitochondrial DNA mutations in human disease*, Nature Reviews Genetics, 2005, 6(5), s. 389-402, <http://dx.doi.org/10.1038/nrg1606>.
22. Tomczyk P.P., *Passiflora – a utilitarian and symbolic plant*, Humanistyka i Przyrodoznawstwo, 2018, 24, s. 423-434.
23. Silva G.S., Souza M.M., de Melo C.A.F., Urdampilleta J.D., Forni-Martins E.R., *Identification and characterization of karyotype in Passiflora hybrids using FISH and GISH*, Genet Mol Res, 2018, 19(1), s. 26, doi: 10.1186/s12863-018-0612-0.
24. Khrapko K., *Two ways to make a mtDNA bottleneck*, Nature Genetics, 2008, 40(2), s. 134-135.
25. Schwartz M, Vissing J., *Paternal inheritance of mitochondrial DNA*, N Engl J Med, 2002, 347, s. 576-580, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa020350>.
26. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., *The genetic systems of mitochondria and plastids*, W Mol Biol Cell, 2002, (4th ed.), New York, NY: Garland Science.
27. Santos E.A., Viana A.P., Freitas J.C., Souza M.M., Paiva C.L., Rodrigues D.L., Tavares R.F., *Phenotyping of Passiflora edulis, P. setacea, and their hybrids by a multivariate approach*, Genet Mol Res, 2014, 13(4), s. 9828-45, doi: 10.4238/2014.
28. Hemingway C.A., Christensen A.R., Malcomber S.T., *B- and C-class gene expression during corona development of the blue passionflower (Passiflora caerulea, Passifloraceae)*, Am J Bot, 2011, 98(6), s. 923-934.
29. Cutri L., Dornelas M.C., *PASSIOMA: Exploring Expressed Sequence Tags podczas rozwoju kwiatu u Passiflora spp.* Comp Funct Genomics, 2012, 2012, s. 510549, Doi: 10.1155/2012/510549.
30. Silva G.S., Souza M.M., *Origin of the cultivated passion fruit Passiflora edulis f. flavicarpa and genomic relationships among species of the subgenera Decaloba and Passiflora*, Plant Biol (Stuttg), 2020, 22(3), s. 533-540, doi: 10.1111/plb.13100.
31. Montero D.A., Marques M.O., Meletti L.M., Kampen M.H., Polozzi S.C., *Floral scent of brazilian Passiflora: five species analysed by dynamic headspace*, An Acad Bras Cienc, 2016, 88(3), s. 1191-200, doi: 10.1590/0001-3765201620150285.
32. De Melo N.F., Guerra M., *Variability of the 5S and 45S rDNA Sites in Passiflora L. Species with Distinct Base Chromosome Numbers*, Ann Bot, 2003, 92(2), s. 309-316, doi: 10.1093/aob/mcg138.
33. Dhawan K., Dhawan S., Sharma A., *Passiflora: a review update*, J Ethnopharmacol, 2004, 94 (1), s. 1-23, doi: 10.1016 / j.jep.2004.02.023.

## **Analiza cech morfologicznych i hipoteza dziedziczenia DNA pozajądrowego u hybrydy *Passiflora L.* z rodziny męczennicowatych**

### Streszczenie

Wstęp. Rodzina męczennicowatych jest licznie reprezentowana przez co najmniej 550 gatunków. Wśród nich wyróżnia się 4 rodzaje: *Astrophea*, *Deidamioides*, *Decaloba* i *Passiflora L.* Pomimo, iż przedstawiciele poszczególnych gatunków roślin z tej rodziny byli przedmiotem badań dotyczących dziedziczenia pozajądrowego DNA, to jego mechanizmy nadal nie zostały do końca poznane.

Cel pracy. Za cel pracy przyjęto rozważenie udziału dziedziczenia pozajądrowego z udziałem mitochondrialnego DNA (mtDNA) u wyhodowanej hybrydy o cechach mozaiki z rodziny *Passifloraceae* i rodzaju *Passiflora L.*, otrzymanej ze skrzyżowania Passiflory ‘Amethyst’ (*P. kermesina* x *P. caerulea*) z Passiflorą ‘Clear Sky’ ((*P. amethystina* x *P. caerulea*) x *P. caerulea* x *P. caerulea*).

Cel ten realizowano poprzez analizę następujących cech morfologicznych: kolor kwiatów, kształt okwiatu, kolor przykoronka oraz kształt pylników i znamion słupka. Ocenie poddano także zapach kwiatów oraz zdolność wyhodowanej hybrydy do rozmnażania generatywnego.

Słowa kluczowe: passiflora, dziedziczenie pozajądrowego DNA, hybryda

## **An analysis of morphological features and a hypothesis of extranuclear DNA inheritance in the hybrid of *Passiflora L.* from the *Passifloraceae* family**

### Abstract

Introduction. The *Passifloraceae* are a family containing by at least 550 species; among them can be distinguished 4 subgenera: *Astrophea*, *Deidamioides*, *Decaloba* and *Passiflora L.* Although the representatives of the respective species of that plant have been subject to investigations aimed at the extranuclear DNA inheritance, its mechanisms have not been thoroughly investigated yet.

Purpose. The assumed scope of the paper was an analysis of the share of extranuclear inheritance with participation of mitochondrial DNA (mtDNA) in the bred hybrid – with mosaicism – belonging to the *Passifloraceae* family and the *Passiflora L.* genus, obtained from the crossing of ‘Amethyst’ Passiflora (*P. kermesina* x *P. caerulea*) with ‘Clear Sky’ Passiflora (*P. amethystina* x *P. caerulea*) x *P. caerulea* x *P. caerulea*).

This scope was pursued by analyzing the following morphologic features: flower color, perianth shape, color of corolla appendage, the shape of anthers and the stigma. Evaluated were as well the floral scent and the ability to generative reproduction of the hybrid obtained.

Conclusions. The following conclusions arise from the research done:

Different colors of perianths on the same plant might corroborate extranuclear inheritance with participation of mitochondrial DNA (mtDNA).

The shape of the corolla appendage observed in the hybrid obtained may be attributed to a mutation.

The hybrid mosaicism, found basing upon an analysis of morphologic features, did not influence the plant fertility. The hybrid was capable of generative reproduction.

Keywords: passiflora, extranuclear DNA inheritance, hybrid

## Geograficzne zróżnicowanie roślin z rodziny *Fabaceae* i ich wybranych mikrosymbiontów wiążących azot

### 1. Wstęp

Bobowate (*Fabaceae*, dawniej motylkowate – *Papilionaceae*) stanowią trzecią pod względem wielkości rodzinę roślin okrytonasiennych, wśród której wyodrębniono około 770 rodzajów i 19 500 gatunków [1-3]. Na Ziemi rośliny bobowate pojawiły się około 60 milionów lat temu, przystosowując się w toku ewolucji do życia we wszystkich znanych biomach na świecie, nawet tych cechujących się skrajnie ekstremalnymi warunkami środowiskowymi [2-4]. Występują one, m.in. w wilgotnych lasach tropikalnych Ameryki Południowej, Afryki i Azji, na sawannie i regionach pustynnych, a także na obszarach o klimacie śródziemnomorskim i umiarkowanym. Oprócz swojej kosmopolitycznej natury gatunki z rodziny *Fabaceae* charakteryzują się ogromnym zróżnicowaniem morfologicznym. Możemy tu znaleźć m.in. ogromne drzewa tropikalne, leśne drzewa liściaste, zdrewniałe liany, pustynne krzewy, efemeryczne rośliny zielne oraz rzadziej gatunki wodne [1-3].

Rośliny te stanowią cenne źródło białka, dlatego są one głównie wykorzystywane jako rośliny uprawne oraz pastewne [2, 5]. Przedstawicielami tych pierwszych jest m.in. soja zwyczajna (*Glycine max* (L.) Merr.), fasola (*Phaseolus* sp.) orzech ziemny (*Arachis hypogaea* L.), soczewica jadalna (*Lens culinaris*, Medik), ciecierzycza pospolita (*Cicer arietinum* L.) i groch zwyczajny (*Pisum sativum* L.). Natomiast lucerna (*Medicago sativa* L.) oraz koniczyna (*Trifolium* L.) są ważnym źródłem białka paszowego dla zwierząt hodowlanych [1, 2]. Ponadto, rośliny te odgrywają istotną rolę w płodozmianie, użyźnianiu gleby i renowacji terenów zniszczonych przez przemysł (np. łubin (*Lupinus* L.), robinia biała (*Robinia pseudoacacia*), karagana syberyjska (*Caragana arborescens*), amorfa krzewiasta (*Amorpha fruticosa* L.), wyka (*Vicia* sp.). Wiele gatunków roślin bobowatych, takich jak: lukrecja (*Glycyrrhiza gabra*), nostrzyk żółty (*Melilotus officinalis*), koniczyna biała (*Trifolium repens* L.) czy koniczyna czerwona (*Trifolium pratense* L.) są źródłem związków biologicznie czynnych wykorzystywanych w medycynie [5-8]. Z kolei erytryna (*Erythrina* L.), groszek (*Lathyrus* L.), złotokap (*Laburnum* Fabr.) czy wianowłostka (*Delonix* Raf.) znajdują zastosowanie w ogrodnictwie jako rośliny ozdobne [1].

Prawdopodobnie najbardziej znaną cechą roślin bobowatych jest ich zdolność wiązania azotu cząsteczkowego w symbiozie z powszechnie występującymi w glebie bakteriami brodawkowymi z rodziny *Rhizobiaceae* (powszechnie zwanymi też

<sup>1</sup> martakoziełbiot@gmail.com, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, <https://www.umcs.pl/pl/instytut-nauk-biologicznych,17571.htm>.

<sup>2</sup> j\_wojnicka@onet.eu, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, <https://www.umcs.pl/pl/instytut-nauk-biologicznych,17571.htm>.

<sup>3</sup> mon.jan@poczta.umcs.lublin.pl, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, <https://www.umcs.pl/pl/instytut-nauk-biologicznych,17571.htm>.

ryzobiami). Proces ten określany mianem biologicznego wiązania azotu (BNF, ang. *Biological Nitrogen Fixation*) umożliwia uzyskanie większej biomasy roślinnej, przy jednoczesnym ograniczeniu ilości stosowanych syntetycznych nawozów azotowych, co znacząco przyczynia się do zmniejszenia eutrofizacji wód i gleby oraz rozwoju zrównoważonego rolnictwa [1-8]. Dane te wskazują, że rodzina *Fabaceae* charakteryzująca się ogromnym zróżnicowaniem morfologicznym i gatunkowym, stanowi jeden z najbardziej spektakularnych przykładów ewolucji roślin. Tym samym skłoniło to naukowców do dalszych badań dotyczących ich fizjologii, różnorodności i biogeografii [2]. Fenotypowe i genetyczne analizy tych roślin przeprowadzone w ostatnich latach doprowadziły do znacznych zmian w tradycyjnym rozumieniu taksonomii rodziny *Fabaceae*. Jednocześnie rozwój licznych metod molekularnych umożliwił dokładne scharakteryzowanie pod względem różnorodności gatunkowej populacji bakterii glebowych zdolnych do nawiązywania symbiozy z omawianą grupą roślin. Na podstawie wielu przeprowadzonych badań przypuszcza się, że wpływ na genetyczne i fenotypowe zróżnicowanie ryzobiów wiążących azot ma właśnie ich gospodarz roślinny, który rozprzestrzeniając się na nowe tereny dokonuje ścisłej selekcji mikrosymbiontów, co umożliwia mu kolonizację różnych, czasem skrajnie odmiennych środowisk [9-11].

W niniejszej pracy omówiono geograficzne zróżnicowanie i aktualną systematykę roślin z rodziny *Fabaceae*, a także przedstawiono przykłady prezentujące wpływ ich rozprzestrzeniania się na różnorodność gatunkową populacji infekujących je mikrosymbiontów.

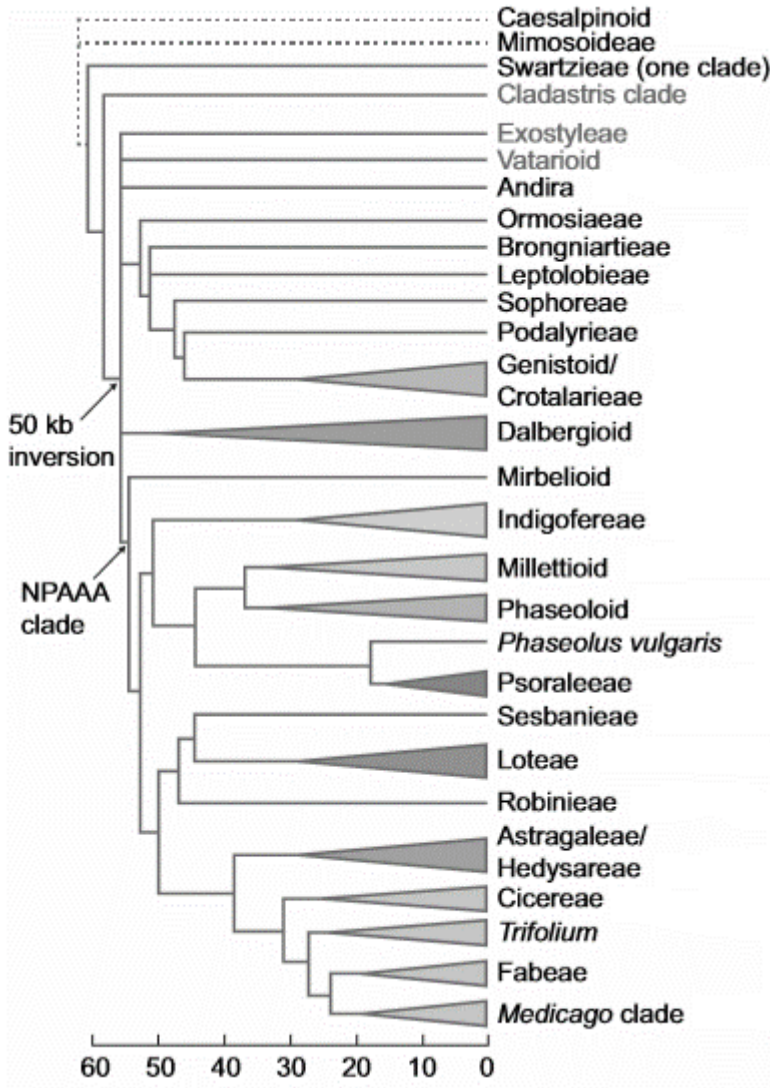
## 2. Taksonomia roślin z rodziny *Fabaceae*

Ekologiczne i gospodarcze znaczenie roślin z rodziny *Fabaceae* spowodowało, iż stały się one przedmiotem licznych badań, w których szczególny nacisk postawiono na poznanie ich taksonomii. Przełomowym momentem w rozwoju wiedzy dotyczącej systematyki roślin motylkowatych była publikacja książki „*Legumes of the World*” [3] podsumowującej informacje dotyczące biogeografii i taksonomii roślin z rodziny bobowatych, zebrane przez dwie ostatnie dekady badań. Kolejnym krokiem milowym w poznaniu związków filogenetycznych występujących pomiędzy omawianą grupą roślin, były prace badawcze grupy „*Legume Phylogene Working Group*” (LPWG), które zaowocowały wydaniem dwóch publikacji, tj. „*Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress, prospects and lessons*” [1] oraz „*A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny*” [2], traktujących nie tylko o filogenezie bobowatych, ale także o szeregu cech morfologicznych charakterystycznych dla poszczególnych kładów.

Zgodnie z najnowszymi doniesieniami naukowymi dotychczasowy podział rodziny *Fabaceae* na trzy podrodziny, tj. brezylkowate (*Caesalpinioideae*), mimozowate (*Mimosoideae*) oraz motylkowate (*Papilionoideae*) jest przestarzały i nie odzwierciedla naszej obecnej wiedzy na temat systematyki tych roślin [1, 2, 5, 9].

Kulminacją, ponad 30 lat badań nad filogenezą roślin bobowatych był ich podział na sześć podrodzin, tj. *Cercidoideae*, *Detarioideae*, *Duparquetioideae*, *Dialioideae*, *Caesalpinioideae*, *Papilionoideae* (rys. 1) [2, 9]. Do pierwszych czterech podrodzin zaliczamy gatunki roślinne, które nie są infekowane przez ryzobia, toteż w dalszej części pracy nie będą one omawiane. Natomiast rośliny należące do mimozowatych

wraz z gatunkami z podrodziny brezylikowatych, zdolnymi do nawiązywania interakcji symbiotycznych z bakteriami z rodziny *Rhizobiaceae* zaliczane są do wspólnego kladu *Mimosoideae-Caesalpinieae-Cassieae* (MCC) [2, 9].



Rysunek 1. Filogenetyczne zależności pomiędzy podrodzinaми *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* i *Papilionoideae*. Źródło: [9].

## 2.1. Podrodzina *Caesalpinioideae*

W parafiletycznej podrodzinie *Caesalpinioideae* wyodrębniono 148 rodzajów, które obejmują około 4 400 gatunków roślin występujących w tropikalnych i subtropikalnych regionach Ameryki Południowej, Afryki i południowo-wschodniej Azji [1-2]. W toku licznych badań wykazano, że symbiotyczne bakterie glebowe



nodulują jedynie rośliny z ośmiu rodzajów, należących do omawianej grupy, tj. *Campsiandra*, *Chidlowia*, *Dimorphandra*, *Erythrophleum*, *Jacqueshuberia*, *Melanoxylon*, *Moldenhauwera* i *Tachigal*, a powstające na ich korzeniach brodawki są zwykle typu niezdeterminowanego [2, 11, 12].

Zgodnie z przedstawioną niedawno nową taksonomią rodziny *Fabaceae*, do omawianej grupy należą również plemiona (*Mimosaeae*, *Ingeae*, *Parkieae*, *Acacieae*) klasyfikowane wcześniej do mimozowatych. Jednakże, rośliny te charakteryzują się tak bardzo odrębnymi cechami morfologicznymi od podrodziny *Caesalpinoideae*, że często są one określane jako nieformalny kład roślin mimozowatych bądź tradycyjnie jako rodzina *Mimosoideae* [2]. Kład ten obejmuje około 3 300 gatunków roślinnych rosnących przeważnie na pustyniach, sawannach oraz w wilgotnych lasach tropikalnych [1, 3]. Mimo że, większość roślin bobowatych należących do podrodziny mimozowatych jest infekowanych przez ryzobia i wykształca w pełni funkcjonalne brodawki typu niezdeterminowanego [12], to istnieją wśród nich liczne wyjątki. Znany jest szereg rodzajów roślin z podrodziny *Mimosoideae*, u których nie zaobserwowano powstawania brodawek, np. *Adenantha*, *Newtonia* występujących głównie w Afryce, Azji i na Madagaskarze. A z kolei inne, takie jak *Parkia* prawdopodobnie utraciły tą zdolność. Szczególnie ciekawym przykładem jest rodzaj *Pentaclethra*. Zawiera on zarówno rośliny brodawkujące, jak i te, które takiej zdolności nie posiadają. Przy czym te ostatnie, podobnie jak rodzaje *Adenantha* i *Newtonia*, są charakterystyczne głównie dla Afryki [1, 13].

## 2.2. Rodzina *Papilionoideae*

Kolejną szeroko rozpowszechnioną grupą są rośliny z podrodziny *Papilionoideae*. Zaliczamy do niej około 503 rodzaje oraz 14 000 gatunków roślin i drzew o istotnym znaczeniu ekologicznym i gospodarczym, występujących w lasach tropikalnych, sawannach, a także obszarach klimatu umiarkowanego [2, 3, 14, 15]. W przypadku tej grupy, wszystkie rośliny, z wyjątkiem plemion *Desmodieae*, *Phaseoleae*, *Psoraleae* i niektórych gatunków *Lotea*, posiadają brodawki niezdeterminowane [12]. Najnowsze badania filogenetyczne, oparte na analizie genu matK wskazują, że do najwcześniej rozgałęzionych linii rozwojowych w podrodzinie *Papilionoideae* należą przedstawiciele roślin trzech plemion, tj.: *Angylocalyceae*, *Dipterygeae* i *Amburaneae* określanych wspólnym mianem kładu ADA. Następną wyodrębnioną grupę stanowi plemię *Swartzieae*. Ponadto, w obrębie podrodziny *Papilionoideae* wyróżniamy kład obejmujący rodzaje należące do plemienia *Cladrastis*, a pozostałe rośliny strączkowe zaliczane są do grupy charakteryzującej się posiadaniem 50-kb inwersji w genomie chloroplastu w stosunku do kolejności genów najczęściej występującej wśród roślin lądowych (rys. 1) [9, 14, 16]. Przy czym, w obrębie tego kładu wyróżniono 9 składowych grup, spośród których największym zróżnicowaniem gatunkowym charakteryzują się odgałęzienia *Genistoid*, *Dalbergioid* oraz NPAAA (ang. *Non-Protein-Amino-Acid – Accumulating clade*) (rys. 1) [14].

Kład *Genistoid*, po raz pierwszy zidentyfikowany przez Wojciechowski i in. [17], obejmuje około 2 400 gatunków. Są to głównie występujące na półkuli południowej rośliny z plemion: *Brongniartieae*, *Crotalarieae*, *Genisteae*, *Podalyrieae*, *Sophoreae*, *Camoensieae* i *Leptolobieae* [1, 14, 17]. Odgałęzienie *Dalbergioid* to około 1367 gatunków roślinnych obecnych przeważnie na obszarach tropikalnych, zaliczanych

do około 46 rodzajów, wśród których dominują: *Adesmia* DC., *Aeschynomene* L., *Dalbergia* L.f. i *Machaerium* Pers. [14]. Największe zgrupowanie różnorodności gatunkowej całej rodziny *Papilionoideae* stanowi kład NPAAA, do którego należy 9464 gatunków zaklasyfikowanych do 305 rodzajów. Obecne w tej grupie rośliny są pogrupowane w następujące klady: *Baphioid*, *Mirbelioid*, *Indigoferoid/Millettioid* oraz *Hologalegina*. Przy czym ten ostatni jest podzielony na dwie mniejsze grupy, tj. odgałęzienie Robinoid oraz IRLC (ang. *Inverted Repeat-Lacking Clade*). Szacuje się, że rośliny należące do IRLC, będące przedstawicielami takich plemion, jak: *Cicereae*, *Fabeae* *Hedysareae*, *Trifolieae* i *Galegaea* pojawiły się na Ziemi stosunkowo niedawno (około 39 mln lat temu). Grupa ta liczy około 4 500 gatunków roślin, spośród których wiele ma istotne znaczenie gospodarcze, np. groszek zwyczajny (*Pisum sativum*), soczewica (*Lens culinaris*), ciecierzycyca (*Cicer arietinum*), wyka (*Vicia* spp.), koniczyna (*Trifolium* spp.) [1, 9, 12].

### 2.3. Biogeograficzne zróżnicowanie roślin z rodziny *Fabaceae*

Na podstawie teorii tektoniki płyt, opracowanej przez wiele lat badań można obecnie odtworzyć zmiany, jakim w ciągu 600 mln lat ulegała skorupa ziemska. Około 200 mln lat temu na Ziemi istniały dwa ogromne superkontynenty, tj. Laurazja (dzisiejsza Ameryka Północna, Europa, Grenlandia) oraz Gondwana (obecnie Ameryka Południowa, Afryka, Indie, Madagaskar, Antarktyda i Australia), rozdzielone przez rozległy paleocean Tetydę [9, 18]. Przypuszcza się, że to właśnie w północnych, słonych wodach Tetydy około 60 mln lat temu pojawiły się pierwsze rośliny bobowate [4, 9], skąd następnie rozprzestrzeniły się one na wszystkie pozostałe kontynenty. Liczne badania mające na celu poznanie kierunków przemieszczania się roślin z rodziny *Fabaceae* ukazały ich znaczne zróżnicowanie gatunkowe w zależności od długości i szerokości geograficznej [9].

Przykładem roślin występujących na ściśle określonych obszarach są gatunki bobowate z grupy IRLC, do których zaliczamy m.in. rodzaje *Oxytropis* i *Astragalus*. Gatunki należące do wspomnianych rodzajów (np. *O. maydelliana*, *O. arctobia*, *A. alpinus* L.) występują głównie w północnej Euroazji oraz na subarktycznych i arktycznych obszarach Koła Podbiegunowego (66°33'39"N) [9]. Ponadto, Ampomah i współpracownicy [19] zaobserwowali występowanie w tych szerokościach geograficznych kilku innych gatunków z rodzaju *Trifolium*, *Lathyrus* oraz *Vicia cracca* [9]. Natomiast powyżej 70° N jedynym jak dotąd poznanym przedstawicielem roślin bobowatych jest *Hedysarum arcticum*. Gatunki z tego rodzaju występują również w północnych Chinach, na górzystych wzniesieniach sięgających od 4 000 do 5 000 metrów wysokości [9].

Rośliny z grupy IRLC można spotkać także w regionie basenu morza Śródziemnego. Przykładem są rośliny należące do rodzajów *Astragalus*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Melilotus* i *Medicago* [20]. Ponadto, w obrębie terenów skupiających się wokół Morza Śródziemnego (głównie wysp wchodzących w skład Makaronezji) występuje grupa roślin bobowatych, będąca przedstawicielami plemienia *Genisteeae*. Najczęściej spotykanymi rodzajami zaliczanymi do wspomnianego kładu są: *Cytisus*, *Genista* oraz *Ulex*. W przeciwieństwie do grupy roślin IRLC, nie mają one żadnego znaczenia ekonomicznego [9]. Chociaż w Ameryce Północnej wśród roślin rolniczych z rodziny

*Fabaceae* dominuje głównie lucerna i soja, to występuje tam również szereg innych gatunków bobowatych, które potencjalnie mogłyby być istotne gospodarczo. Są to m.in.: rośliny z plemion *Amorpheae* i *Phaseoleae*, charakterystyczne dla obszarów położonych pomiędzy południową Kanadą a Meksykiem [9].

Duże zróżnicowanie gatunkowe roślin bobowatych obserwuje się również na niższych szerokościach geograficznych, tj. obszarach leżących w strefie zwrotnikowej. W Ameryce Południowej dominują gatunki drzewiaste zaliczane do rodzajów *Mimosa* i *Inga*, które wytwarzają brodawki typu niezdeterminowanego, a także rodzaj *Chamaecrista* należący do podrodziny *Caesalpinioideae*, którego centrum różnorodności biologicznej znajduje się w Brazylii [3, 9].

Z kolei roślinność Afryki cechuje się niezwykle różnorodnością, co w dużej mierze uwarunkowana jest strefowością klimatyczną. W międzyzwrotnikowych obszarach Afryki (a także na terenach Ameryki Południowej) występuje rodzaj *Acacia*, należący do podrodziny mimoszowatych. Stanowi on drugi największy pod względem liczby gatunków (ok. 1 000) rodzaj roślin bobowatych. Szczególnie powszechne są tutaj rośliny ulegające nodulacji, zaliczane dawniej do wspomnianego rodzaju, a dziś klasyfikowane do grup *Vachellia* i *Senegalia* [3, 9, 21]. Natomiast, wytwarzające brodawki rośliny z podrodziny *Papilionoideae* przeważają w cechującej się ogromnym zróżnicowaniem morfologicznym florze roślinnej Państwa Przylądkowego (ang. *Cape Floristic Region*, CFR), położonego na południowym końcu Afryki [9]. Charakterystyczną cechą tego obszaru jest brak roślin z rodziny mimoszowatych, w przeciwieństwie do południowo-zachodnich obszarów Państwa Australijskiego (ang. *South West Australian Floristic Region*, SWAFR), gdzie roślinność ta dominuje. Innymi przedstawicielami bobowatych spotykanymi na terenach Afryki są m.in. rośliny zielne z rodzaju *Chamaecrista*, czy gatunki z rodzaju *Cyclopia* (np. *Cyclopia intermedia*) oraz *Aspalathus linearis* (aspalat prosty) należący do plemienia *Crotalarieae*, którego liście i łodygi są wykorzystywane zwykle do przygotowywania naparu o cennych właściwościach leczniczych [22-24].

Przykładem rośliny z rodziny *Fabaceae* rosnącej na glebach kwaśnych i ubogich w składniki odżywcze, które występują w południowej i zachodniej części kontynentu afrykańskiego, jest *Lebeckia ambigua*. Z uwagi na to, iż obszary te cechują się bardzo podobnymi warunkami klimatycznymi do Australii Zachodniej, *Lebeckia ambigua* została wprowadzona do tamtejszych upraw i jest obecnie wykorzystywana jako roślina pastewna [25]. Mimo to, iż warunki glebowe niektórych regionów Australii i Afryki Południowej wykazują znaczne podobieństwo do siebie, to jednak flora roślinna obu tych kontynentów jest odmienna [9, 25].

We wspomnianym wcześniej regionie SWAFR zidentyfikowano głównie wykazujące zdolność brodawkowania gatunki z rodzaju *Acacia* Mill. (akacja) i *Davesia* oraz plemion: *Brongniartieae*, *Mirbelieae*, *Bossiaeeae* i *Phaseoleae*. Przedstawicielami ostatniej grupy jest m.in. *Glycine max*, a także rośliny z rodzajów *Kennedia* i *Hardenbergia*. Unikatową cechą plemienia *Brongniartieae* jest jego występowanie zarówno na terenie Australii, jak i w regionach Ameryki Południowej, Ameryki Środkowej oraz Karaibach [9,12]. Do grupy tej zaliczamy 16 rodzajów, w tym np. *Cyclolobium* Benth., *Poecilanthus* Benth. i *Lamprolobium* Benth., charakteryzujących się posiadaniem struktur podobnych do nici infekcyjnych, w których znajdują się bakteroidy wiążące azot atmosferyczny. Spośród wielu australijskich roślin, należących

do podrodziny *Caesalpinioideae*, które występują w północnych tropikalnych i subtropikalnych regionach Australii, jedynie dwa rodzaje wykazują zdolność do tworzenia brodawek korzeniowych, tj. jeden gatunek z rodzaju *Erythrophleum* (*Erythrophleum chlorostachys*) oraz 14 gatunków z rodzaju *Chamaecrista* [26, 27].

#### 2.4. Systematyka bakterii z rodziny *Rhizobiaceae*

Badania nad taksonomią i gatunkowym zróżnicowaniem symbiotycznych bakterii wiążących azot są prowadzone od ponad 130 lat, kiedy to po raz pierwszy użyto zaproponowanej przez Frank [28] nazwy *Rhizobium* do opisanego rodzaju obejmującego wszystkie znane ówczesnie mikrosymbionty roślin bobowatych. Jednakże, mimo licznie prowadzonych ówczesnie badań, informacji dotyczących taksonomii tych mikroorganizmów było niewiele. Przy czym, większość nowo poznawanych bakterii redukujących azot atmosferyczny była klasyfikowana do rodzaju *Rhizobium* [29]. Dopiero rozwój szeregu metod molekularnych, w tym przede wszystkim, sekwencjonowania genów, wielolokusowej analizy sekwencji genów (ang. *Multilocus Sequence Analysis*, MLSA) czy analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych międzygenowego regionu 16S-23S rRNA (ang. *Restriction Fragments Length Polymorphism*, RFLP) umożliwił dokładne poznanie filogenezy tych mikroorganizmów [30, 31].

Obecnie wiadomo, że wszystkie znane symbiotyczne bakterie wiążące azot, określane wspólną nazwą ryzobia, są zaklasyfikowane do ponad 180 gatunków, które należą do kilkudziesięciu rodzajów, należących do klasy  $\alpha$ - i  $\beta$ -proteobakterii [30,31].

Liczne prace badawcze prowadzone z wykorzystaniem wspomnianych wyżej metod molekularnych przyczyniły się do poznania i dokładnego scharakteryzowania 9 rodzin symbiotycznych bakterii, które obejmują takie rodzaje, jak: *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Ochrobactrum* i *Shinella* (zaliczane do klasy  $\alpha$ -proteobakterii) oraz *Burkholderia*, *Cupriavidus* i *Herbaspirillum* (należące do  $\beta$ -proteobakterii) (tab. 1). Przy czym, wydaje się, że  $\alpha$ -ryzobia są najbardziej rozpowszechnioną grupą mikroorganizmów, charakteryzującą się dużym zróżnicowaniem biogeograficznym i szerokim zakresem gospodarzy roślinnych [30, 31].

Tabela 1. Wykaz rodzin i rodzajów mikrosymbiontów roślin bobowatych

Klasa	Rodzina	Rodzaj	Literatura
α-proteobakteria	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Agrobacterium</i>	[32]
		<i>Allorhizobium</i>	[33]
		<i>Ensifer</i>	[34]
		<i>Neorhizobium</i>	[35]
		<i>Pararhizobium</i>	[36]
		<i>Rhizobium</i>	[37]
		<i>Shinella</i>	[38]
	<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Mesorhizobium</i>	[39]
		<i>Phyllobacterium</i>	[40]
	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	[41]
	<i>Methylobacteriaceae</i>	<i>Microvirga</i>	[42]
		<i>Methylobacterium</i>	[43]
	<i>Brucellaceae</i>	<i>Ochrobactrum</i>	[44]
<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Devosia</i>	[45]	
<i>Xanthobacteraceae</i>	<i>Azorhizobium</i>	[46]	
β-proteobakteria	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i>	[47]
		<i>Cupriavidus/ Ralstonia</i>	[48]
	<i>Oxalobacteriaceae</i>	<i>Herbaspirillum</i>	[49]

### 3. Geograficzne zróżnicowanie ryzobiów brodawkujących rośliny bobowate

Występowanie symbiotycznych bakterii brodawkujących korzenie roślin bobowatych potwierdzono w wielu odległych od siebie częściach Świata. Charakteryzując występujące na poszczególnych obszarach populacje ryzobiów zaobserwowano, że mikroorganizmy te wykazują znaczne zróżnicowanie, nie tylko pod względem gatunkowym, ale również organizacji genomów, obecności sekwencji niektórych genów czy cech fenotypowych. Przy czym, różnice te w dużej mierze kształtowane są przez ich gospodarza roślinnego, który jak się wydaje ma znaczący wpływ na biogeograficzne i genetyczne zróżnicowanie swoich mikrosymbiontów [29, 50]. Przykładem mogą być β-ryzobia z rodzaju *Burkholderia* wyizolowane z brodawek roślin bobowatych, należących do dwóch oddzielnych podrodzin, tj. *Mimosoideae* oraz *Papilionoideae*, które występują, odpowiednio, w Afryce i Ameryce Południowej. W toku licznych badań wykazano, że szczepy te, mimo że prawdopodobnie pochodzą od jednego wspólnego przodka, charakteryzują się znacznym zróżnicowaniem sekwencji genów nodulacji (*nod*) [9, 50, 51].

Do najczęściej izolowanych z brodawek korzeniowych α-proteobakterii zaliczamy szczepy z rodzaju *Bradyrhizobium*, które to charakteryzują się prawdopodobnie najszerszym zakresem infekowanych gatunków roślin bobowatych [11, 52, 53]. Mikroorganizmy te występują głównie w Australii, Afryce i centralnej części Ameryki Południowej [9, 53-56]. W przypadku Ameryki Południowej infekują one rośliny

z podrodziny *Caesalpinioideae* (np. zagrożoną wyginięciem *Dimorphandra wilsonii*) oraz gatunki należące do rodzaju *Chamaecrista* [3, 55, 57]. Z kolei makrosymbionty tych bakterii występujące w Afryce to głównie gatunki z podrodziny *Papilionoideae* o dużym znaczeniu gospodarczym, których przykładem są m.in. soja, wspięga wężowata (łac. *Vigna unguiculata*) czy orzech ziemny [54]. Natomiast przedstawicielami roślin rosnących w Australii i infekowanych przez omawianą grupę bakterii są gatunki z rodzaju *Lupinus*, należące do plemienia *Genisteae*. Na podstawie analizy sekwencji genów symbiotycznych (nod i nif) uważa się, że szczepy wyizolowane z brodawek tych roślin są potomkami ryzobiów pochodzących z nasion łubinu, sprowadzonych przypadkowo z terenów Europy [58]. Z kolei, Li i współpracownicy [59] zidentyfikowali ostatnio dwa szczepy z rodzaju *Bradyrhizobium*, tj. *B. guangdongense* CCBAU 51649 oraz *B. guangxiense* CCBAU 53363, infekujące korzenie orzechy podziemnej uprawianej w dwóch różnych prowincjach Chin (tj. Guangdong i Guangxi). Szczepy te posiadały identyczną sekwencję genów *nodA* jak szczepy *Bradyrhizobium* sp. PI237 oraz CH81 brodawkujące roślinę *Arachis hypogaea*, która występuje w Argentynie. Jednakże, geny *nodA* z tych szczepów wykazywały bardzo niski (poniżej 66%) stopień podobieństwa sekwencji do wszystkich innych sekwencji *nodA* dostępnych w bazach danych, co może wskazywać na niezależne pochodzenie tych genów w genomie badanych szczepów [59].

Kolejnymi szeroko rozpowszechnionymi mikroorganizmami infekującymi gatunki roślin bobowatych są bakterie z rodzaju *Rhizobium*. Zaliczamy do niego ponad 50 gatunków, z czego około 48 to szczepy symbiotyczne. Są to m.in.: *R. acidisoli*, *R. egyptiacum*, *R. aethiopicum*, *R. ecuadorensense*, *R. esperanzae*, *R. etli*, *R. gallicum*, *R. laguerreae*, *R. pisi*, *R. tropici*, *R. leguminosarum* [30]. Makrosymbiontem dla większości wymienionych powyżej szczepów jest *Phaseolus vulgaris* (fasola zwyczajna), występujący głównie na obszarach Mezoameryki oraz Chin i należący do plemienia *Phaseoleae* z podrodziny *Papilionaceae* [12, 60]. Fakt ten może wskazywać, że istotny wpływ na gatunkowe zróżnicowanie ryzobiów może mieć geograficzne rozmieszczenie gospodarza roślinnego. Wnioski te potwierdza publikacja Wang i współpracowników [60], którzy scharakteryzowali mikrosymbionty fasoli zwyczajnej, występującej w chińskiej prowincji Shaanxi. Naukowcy ci zidentyfikowali podczas swoich badań nieopisane do tej pory gatunki bakterii, które nawiązują symbiozę z *P. vulgaris* oraz wykazali obecność nie znanych wcześniej alleli genów *nodC*. Może to wskazywać, że omawiany makrosymbiont nawiązał symbiozę z lokalnie występującymi szczepami ryzobiów, które prawdopodobnie nabyły geny symbiotyczne na drodze horyzontalnego transferu genów [60]. Podobne wnioski wynikają z badań dotyczących populacji bakterii brodawkujących korzenie fasoli zwyczajnej rosnącej w północnej Hiszpanii. Na podstawie szeregu analiz genetycznych, Garcia-Fraile i inni [61] wykazali, że wszystkie otrzymane izolaty należały do gatunku *R. leguminosarum*. Jednakże, szczepy te w swoich genomach posiadały allele genu *nodC* charakterystyczne dla *R. etli*, będącego głównym gatunkiem infekującym *P. vulgaris* w Ameryce. Ponadto, obecność tych alleli potwierdzono także w zidentyfikowanych jako *R. etli*, mikrosymbiontach fasoli zwyczajnej, występującej w południowej Hiszpanii. Tym samym, sugeruje to, iż najprawdopodobniej szczep ten został sprowadzony z Ameryki do Hiszpanii, wraz z nasionami fasoli. Jednakże warunki klimatyczne panujące w północnej części tego

kraju nie sprzyjały jego bytowaniu w glebie, a jego symbiotyczne geny zostały na drodze horyzontalnego transferu genów nabyte przez występujące w tym środowisku autochtoniczne szczepy *R. leguminosarum* [61]. Bakterie należące do rodzaju *Rhizobium* występują także na obszarach charakteryzujących się niskimi temperaturami w porównaniu do innych regionów Świata. Fagerli i Swenning [62] wyizolowali te mikroorganizmy (*R. leguminosarum* bv. *trifolii*) z brodawek korzeniowych roślin koniczyny czerwonej (*T. pratense*), białej (*T. repens*) oraz białoróżowej (*T. hybridum*), występujących na obszarach w okolicach północnego koła podbiegunowego (a nawet położonych przy 78° N szerokości geograficznej) [62]. Wpływ gospodarza roślinnego na gatunkowe zróżnicowanie populacji brodawkujących go bakterii potwierdzono także na przykładzie koniczyny białej obecnej w północnych i wschodnich glebach Chin. Badając szczepy wyizolowane z brodawek *T. repens* zaobserwowano, że oprócz specyficznego dla tej rośliny mikrosymbionta (tj. *R. leguminosarum* bv. *trifolii*), w populacji tej obecne były jeszcze inne gatunki, takie jak: *R. anhuiense* bv. *trifolii* oraz nie zidentyfikowany do tej pory gatunek *Rhizobium* wykazujący największy stopień podobieństwa do *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Wskazuje to, że podobnie jak we wcześniej przytoczonych przykładach, geny nodulacji obecne w genomie *R. leguminosarum* bv. *trifolii* odpowiedzialne za infekowanie koniczyny białej zostały przekazane na drodze horyzontalnego transferu genów autochtonicznym szczepom lepiej zaadaptowanym do lokalnych warunków środowiskowych [10].

Uprawiana w Azji i na obszarach położonych wokół basenu Morza Śródziemnomorskiego ciecierzycy pospolita (*Cicer arietinum*) jest infekowana głównie przez bakterie z rodzaju *Mesorhizobium*, takie jak: *M. ciceri* [63], *M. mediterraneum* [64] oraz zidentyfikowany ostatnio w chińskiej prowincji Xinjiang gatunek *M. muleiense* [65]. Potwierdzono również nawiązywanie efektywnych interakcji symbiotycznych między tym gospodarzem roślinnym a szczepami *M. amorphae*, *M. loti*, *M. huakuii* i *M. tianshanense*, występującymi w Portugalii. Przyczym, wszystkie te mikrosymbionty wykazywały wysoki stopień podobieństwa sekwencji symbiotycznych genów *nodC* i *nifH* do homologicznych genów szczepów należących do *M. ciceri* i *M. mediterraneum*. Wskazuje to transfer tych genów w obrębie różnych gatunków ryzobiów, w celu utrzymania cechującej się wysoką specyficznością symbiozy pomiędzy występującą na odległych od siebie terenach ciecierzycą pospolitą i jej mikrosymbiontem [65, 66].

#### 4. Podsumowanie

Mimo intensywnie prowadzonych badań dotyczących geograficznego i gatunkowego zróżnicowania roślin z rodziny *Fabaceae* i ich mikrosymbiontów, a także molekularnych mechanizmów leżących u podstaw interakcji symbiotycznych zachodzących między tymi organizmami, nadal istnieje wiele niejasnych kwestii związanych z tym zagadnieniem. Do tej pory nie poznano przyczyn wykształcania przez poszczególne kłady roślin bobowatych brodawek o odmiennej strukturze i morfologii. Kolejnym pytaniem jest dlaczego niektóre oddziaływania roślina – mikrosymbiont cechują się większą specyficznością w porównaniu do innych? Jakie czynniki sprzyjają rozprzestrzenianiu się poszczególnych gatunków z rodziny bobowatych na odległe tereny i nawiązywaniu symbiozy z lokalnie występującymi szczepami ryzobiów? Aktualne dane wskazują, iż znaczącą rolę w tym procesie może odgrywać horyzontalny transfer symbiotycznych genów pomiędzy różnymi gatunkami bakterii

z rodziny *Rhizobiaceae*, co pozwala roślinom na rozprzestrzenianie się i nawiązywanie interakcji z autochtonicznymi szczepami danego ekosystemu. Biorąc pod uwagę istotne ekonomiczne i gospodarcze znaczenie tych roślin, nie ulega wątpliwości, że zostaną podjęte dalsze prace badawcze umożliwiające dokładne poznanie biologii całej rodziny *Fabaceae* i ich mikrosymbiontów [9, 11].

## Literatura:

1. LPWG, *Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress, prospects and lessons for other species-rich clades* Taxon, 62, 2013, s. 217-248.
2. LPWG, *A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny*, Taxon, 66, 2017, s. 44-77.
3. Lewis G., Schrire B, Mackinder B., Lock M., [w:] Lewis G. (red.) *Legumes of the World*, Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond 2005.
4. Schrire B, Lewis G., Lavin M., *Biogeography of the Leguminosae*, [w:] Lewis G., Schrire B., Mackinder B., Lock M. (red.), *Legumes of the World*, Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond 2005, s. 21-54.
5. Yahara T., Javadi F., Onoda Y. Queiroz L., Faith D., Prado D., Akasaka M., Kadoya T., Ishihama F., Davies S., Slik F., Yi T., Ma K., Bin C., Darnaedi D., Pennington R., Tuda M., Shimada M., Ito M., Nkonki T., *Global legume diversity assessment: Concepts, key indicators, and strategies*, Taxon, 62, 2013, s. 249-266.
6. Zhou J.X., Braun M.S., Wetterauer P., Wetterauer B., Wink M., *Antioxidant, cytotoxic, and antimicrobial activities of Glycyrrhiza glabra L., Paeonia lactiflora Pall., and Eriobotrya japonica (Thunb.) Lindl. Extracts*, Medicines, 6, 2019, s. 1-16.
7. Cornara L., Xiao J., Burlando B., *Therapeutic Potential of Temperate Forage Legumes: A Review*, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 56, 2016, s. 149-161.
8. Rani K., Sharma P., Kumar S., Wati L., Kumar R., Gurjar D.S., Kumar D., *Legumes and sustainable use of soils*, [w:] Meena R., Kumar S., Bohra J., Jat M., (red.), *Sustainable management of soil and environment*, Springer, Singapore 2019, s. 3-31.
9. Sprent J.I., Ardley J., James K.E., *Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts*, The New Phytologist, 215, 2017, s. 40-56.
10. Zhang J.J., Jing X.Y., de Lajudie P., Ma C., Singh R.P., Chen W.F., Wang E.T., *Association of white clover (Trifolium repens L.) with rhizobia of sv. trifolii belonging to three genomic species in alkaline soils in North and East China*, PLoS ONE, 407, 2016, s. 417-427.
11. Andrews M., Andrews M.E., *Specificity in Legume-Rhizobia symbioses*, International Journal of Molecular Sciences, 18, 2017, s. 1-39.
12. Sprent J.I., Ardley J.K., Jamek E.K., *From north to south: a latitudinal look at legume nodulation processes*, South African Journal of Botany, 89, 2013, s. 31-41.
13. Sprent J.I., *Nodulation in Legumes*, Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond 2001.
14. Cardoso D., Pennigton R.T., de Queiroz L.P., Boatwright J.S., Van Wyk B.E., Wojciechowski M.F., Lavin M., *Reconstructing the deep-branching relationships of the papilionoid legumes*, South African Journal of Botany, 89, 2013, s. 58-75.
15. Schrire B.D., Lavin M., Lewis G.P., *Global distribution patterns of the Leguminosae: Insights from recent phylogenies*, Biologiske Skrifter. K. Danske videnskabernes Selskab, 55, 2005, s. 375-442.
16. Wojciechowski M.F., *Towards a new classification of Leguminosae: naming clades using non-Linnaean phylogenetic nomenclature*, South African Journal of Botany, 89, 2013, s. 85-93.
17. Wojciechowski M.F., Lavin M., Sanderson M.J., *A phylogene of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family*, American Journal of Botany 9, 2004, s. 1846-1862.
18. Rogers J.J.W., Santosh M., *Supercontinents in Earth history*, Gondwana Research, 6, 2003, s. 357-368.
19. Ampomah O.Y., James E.K., Iannetta P.P.M., Kenicer G., Sprent J.I., Huss-Danell K.,



- Nodulation and ecological significance of indigenous legumes in Scotland and Sweden*, Symbiosis, 57, 2012, s. 133-148.
20. Small E., *Alfalfa and relatives: evolution and classification of Medicago* NRC Research Press, Wallingford, UK 2010.
  21. Kyalangalilwa, B., Boatwright J.S., Daru B.H., Maurin O., van der Bank M., *Phylogenetic position and revised classification of Acacia s.l. (Fabaceae: Mimosoideae) in Africa, including new combinations in Vachellia and Senegalia*, Botanical Journal of the Linnean Society, 172, 2013, s. 500-523.
  22. Sarnowska M., Gawron-Gzella A., *Rooibos (Aspalathus linearis (Burm. f.) R. Dahlgren) – substancje biologicznie aktywne i działanie farmakologiczne*, Postępy Fitoterapii, 3, 2016, s. 189-199.
  23. Hawkins M.J., Malgas R.R., Bienabe E., *Ecotypes of wild rooibos (Aspalathus linearis (Burm. F) Dahlg., Fabaceae) are ecologically distinct*, South African Journal of Botany, 77, 2011, s. 360-370.
  24. Joubert E., Joubert M.E., Bester C., de Beer D., De Lange J.H., *Honeybush (Cyclopia spp.): from local cottage industry to global markets – the catalytic and supporting role of research*, South African Journal of Botany, 77, 2011, s. 887-907.
  25. Howieson J.G., De Meyer S.E., Vivas-Marfisi A., Ratnayake S., Ardley J.K., Yates R.J., *Burkholderia bacteria isolated from Lebeckia ambigua – a perennial suffrutescent legume of the fynbos*, Soil Biology and Biochemistry, 60, 2013, s. 55-64.
  26. Brockwell J., Evans C.M., Bowman A.M., McInnes A., *Distribution, frequency of occurrence and symbiotic properties of the Australian native legume Trigonella suavissima Lindl. And its associated root-nodule bacteria*, The Rengeland Journal, 32, 2010, s. 395-406.
  27. Davis R.W., Hurter J.H., *Swainsona thompsoniana (Fabaceae: Galegeae), a new species endemic to the Pilbara bioregion of Western Australia*, Nuytsia, 23, 2013, s. 1-4.
  28. Wang E.T., Chen W.F., Fu Tian C., Young J.P.W., Chen W.X., *Symbiosis between Rhizobia and Legumes*, [w:] Wang E.T. (red.), Ecology and Evolution of Rhizobia, Springer, Singapore 2019, s. 3-19.
  29. Gyaneshwar P., Hirsch A.M., Moulin L., Chen W., Elliott G.N., Bontemps C., de los Santos P.E., Gross E., dos Reis Jr F.B., Sprent J.I., Young J.P.W., James E.K., *Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects*, Molecular Plant-Microbe Interactions, 24, 2011, s. 1276-1288.
  30. Wang E.T., Chen W.F., Fu Tian C., Young J.P.W., Chen W.X., *Current Systematics of Rhizobia*, [w:] Wang E.T. (red.), Ecology and Evolution of Rhizobia, Springer, Singapore 2019, s. 41-102.
  31. Peix A., Ramirez-Bahana M.H., Velázquez E., Bedmar E.J., *Bacterial associations with Legumes*, Critical Reviews in Plant Sciences, 34, 2015, s. 17-42.
  32. Holmes B., Roberts P., *The classification, identification and nomenclature of agrobacteria*. Journal of Applied Bacteriology, 50, 1981, s. 443-467.
  33. de Lajudie P., Laurent-Fulele E., Willems A., Torck U., Coopman R., Collins M.D., Kersters K., Dreyfus B., Gillis M., *Allorhizobium undicola gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate Neptunia natans in Senegal*, International Journal of Systematic Bacteriology, 48, 1998, s. 1277-1290.
  34. Chen W.H., Yang S.H., Li Z.H., Zhang X.X., Sui X.H., Wang E.T., Chen W.X., Chen W.F., *Ensifer shofinae sp. nov., a novel rhizobial species isolated from root nodules of soybean (Glycine max)*. Systematic and Applied Microbiology, 40, 2017, s. 144-149.
  35. Mousavi S.A., Österman J., Wahlberg N., Nesme X., Lavire C., Vial L., Paulin L., de Lajudie P., Lindström K., *Phylogeny of the Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium clade supports the delineation of Neorhizobium gen. nov.* Systematic and Applied Microbiology, 37, 2014, s. 208-215.
  36. Mousavi S.A., Willems A., Nesme X., de Lajudie P., Lindström K., *Revised phylogeny of Rhizobiaceae: proposal of the delineation of Pararhizobium gen. nov., and 13 new species combinations*. Systematic and Applied Microbiology, 38, 2015, s. 84-90.

37. Kuzmanović N., Smalla K., Gronow S., Puławska J., *Rhizobium tumorigenes* sp. nov., a novel plant tumorigenic bacterium isolated from cane gall tumors on thornless blackberry, *Scientific Reports*, 8, 2018, s. 1-8.
38. An D.S., Im W.T., Yang H.C., Lee S.T., *Shinella granuli* gen. nov., sp. nov., and proposal of the reclassification of *Zoogloea ramigera* ATCC 19623 as *Shinella zoogloeoides* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 2006, s. 443-448.
39. Chen W.X., Wang E.T., Wang S.Y., Li Y.B., Li Y., *Characteristics of Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China., *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45, 1995, s. 153-159.
40. Mantelin S., Saux M.F., Zakhia F., Béna G., Bonneau S., Jeder H., de Lajudie P., Cleyet-Marel J.C., *Emended description of the genus Phyllobacterium and description of four novel species associated with plant roots: Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. And *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 2006, s. 827-839.
41. Jordan D.C., *Transfer of Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 32, 1982, s. 136-139.
42. Safronova V.I., Kuznetsova I.G., Sazanova A.L., Belimov A.A., Andronov E.E., Chirak E.R., Osledkin Y.S., Onishchuk O.P., Kurchak O.N., Shaposhnikov A.I., Willems A., Tikhonovich I.A., *Microvirga ossetica* sp. nov., a species of rhizobia isolated from root nodules of the legume species *Vicia alpestris* Steven, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67, 2017, s. 94-100.
43. Sy A., Giraud E., Jourand P., Garcia N., Willems A., de Lajudie P., Prin Y., Neyra M., Gillis M., Boivin – Masson C., Dreyfus B., *Methylotrophic Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes, *Journal of Bacteriology*, 183, 2001, s. 214-220.
44. Zurdo-Piñeiro J.L., Rivas R., Trujillo M.E., Vizcaino N., Carrasco J.A., Chamber M., Palomares A., Mateos P.F., Martínez-Molina E., Velázquez E., *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2007, s. 784-788.
45. Rivas R., Willems A., Subba-Rao N.S., Mateos P.F., Dazzo F.B., Kroppenstedt R.M., Martínez-Molina E., Gillis M., Velázquez E., *Description of Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India, *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 2003, s. 47-53.
46. Dreyfus B., Garcia L., Gillis M., *Characterization of Azorhizobium caulinodans* gen. nov. sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38, 1988, s. 89-98.
47. Estrada-de los Santos P., Palmer M., Chávez-Ramírez B., Beukes C., Steenkamp E.T., Briscoe L., Khan N., Maluk M., Lafos M., Humm E., Arrabit M., Crook M., Gross E., Simon M.F., Dos Reis Junior F.B., Whitman W.B., Shapiro N., Poole P.S., Hirsch A.M., Venter S.N., James E.K., *Whole genome analyses suggests that Burkholderia sensu lato contains two additional novel genera (Mycetohabitans gen. nov., and Trinickia gen. nov.): implications for the evolution of diazotrophy and nodulation in the Burkholderiaceae*, *Genes*, 9, 2018, s. 1-23.
48. Chen W.M., Moulin L., Bontemps C., Vandamme P., Béna G., Boivin-Masson C., *Legume symbiotic nitrogen fixation by  $\beta$  – Proteobacteria is widespread in nature*, *Journal of Bacteriology*, 185, 2003, s. 7266-7272.
49. Chen W.M., Laevens S., Lee T.M., Coenye T., De Vos P., Mergeay M., Vandamme P., *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient, *International Journal of Systematic and Evolutionary*

- Microbiology, 51, 2001, s. 1729-1735.
50. Lemaire B., Chimphango S.B.M., Stirton C., Rafudeen S., Honnay O., Smets E., Chen W., Sprent J., James E.K., Muasya Muthama A., *Biogeographical patterns of Legume-nodulating Burkholderia spp.: from African Fynbos to continental scales*, American Society for Microbiology Journals, 82, 2016, s. 5099-5115.
  51. Bournaud C., de Faria S.M., Ferreira dos Santos J.M., Tisseyre P., Silva M., Chaintreuil C., Gross E., James E.K., Prin Y., Moulin L., *Burkholderia species are the most common and preferred nodulating symbionts of the Piptadenia Group (Tribe Mimoseae)*, PLoS ONE, 15, 2013, s. 1-13.
  52. Parker M.A., *The spread of Bradyrhizobium lineages across host legume clades: from Abarema to Zygia*, Microbiol Ecology, 69, 2015, s. 630-640.
  53. Ormeño-Orrillo E., Martínez-Romero E., *A genomotaxonomy view of the Bradyrhizobium genus*, Frontiers in Microbiology, 10, 2019, s. 1-13.
  54. Jaiswal S.K., Dakora F.D., *Widespread distribution of highly adapted Bradyrhizobium species nodulating diverse Legumes in Africa*, Frontiers in Microbiology, 10, 2019, s. 1-16.
  55. Fonseca M.B., Peix A., de Faria S.M., Mateos P.F., Rivera L.P., Simões-Araujo J.L., Costa Franca M.G., dos Santos Isaias R.M., Cruz C., Velázquez E., Scotti M.R., Sprent J.I., James E.K., *Nodulation in Dimorphandra wilsonii Rizz. (Caesalpinioideae), a threatened species native to the Brazilian Cerrado*, PLoS ONE, 7, 2012, s. 1-16.
  56. Stępkowski T., Hughes C.E., Law I.J., Markiewicz Ł., Gurda D., Chlebicka A., Moulin L., *Diversification of Lupine Bradyrhizobium strains: evidence from nodulation gene trees*, Applied and Environmental Microbiology, 73, 2007, s. 3254-3264.
  57. Santos J.M., Casaes Alves P.A., Silva V.C., Kruschewsky Rhem M.F., James E.K., Gross E., *Diverse genotypes of Bradyrhizobium nodulate herbaceous Chamaecrista (Moench) (Fabaceae, Caesalpinioideae) species in Brazil*, Systematic and Applied Microbiology, 40, 2017, s. 69-79.
  58. Stępkowski T., Moulin L., Krzyżńska A., McInnes A., Law I.J., Howieson J., *European origin of Bradyrhizobium populations infecting Lupins and Serradella in soils of Western Australia and South America*, Applied and Environmental Microbiology, 71, 2005, s. 7041-7052.
  59. Li Y.H., Wang R., Zhang X.X., Young J.P., Wang E.T., Sui H.X., Chen W.X., *Bradyrhizobium guangdongense sp. nov. and Bradyrhizobium guangxiense sp. nov., isolated from effective nodules of peanut*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 65, 2015, s. 4655-4662.
  60. Wang L., Cao Y., Tao Wang E., Juan Qiao Y., Jiao S., Shan Liu Z., Zhao J., Hong Wei G., *Biodiversity and biogeography of rhizobia associated with common bean (Phaseolus vulgaris L.) in Shaanxi Province*, Systematic and Applied Microbiology, 56, 2016, s. 211-219.
  61. Garcia-Fraile P., Mulas-Garcia D., Peix A., Rivas R., Gonzalez-Andres F., Vela 'zquez E., *Phaseolus vulgaris is nodulated in northern Spain by Rhizobium leguminosarum strains harboring two nodC alleles present in American Rhizobium etli strains: biogeographical and evolutionary implications*, Canadian Journal of Microbiology, 56, 2010, s. 657-666.
  62. Fagerli I.L., Svenning M.M., *Arctic and subarctic soil populations of Rhizobium leguminosarum biovar trifolii nodulating three different clover species: Characterisation by diversity at chromosomal and symbiosis loci*, Plant and Soil, 275, 2005, s. 371-381.
  63. Nour S.M., Fernandez M.P., Normand P., Cleyet-Marel J.C., *Rhizobium ciceri sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (Cicer arietinum L.)*, International Journal of Systematic Bacteriology, 44, 1994, s. 511-522.
  64. Nour S.M., Cleyet-Marel J.C., Normand P., Fernandez M.P., *Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (Cicer arietinum L.) and description of Rhizobium mediterraneum sp. Nov*, International Journal of Systematic Bacteriology, 45, 1995, s. 640-648.
  65. Zhang J., Lou K., Jin X., Mao P., Wang E., Tian C., Sui X., Feng Chen W., Chen Xin W.,

*Distinctive Mesorhizobium populations associated with Cicer arietinum L. in alkaline soils of Xinjiang, China.* Plant and Soil, 353, 2011, s. 123-134.

66. Wang E.T., Chen W.F., Fu Tian C., Young J.P.W., Chen W.X., *Diversity of interactions between Rhizobia and Legumes* [w:] Wang E.T. (red.), Ecology and Evolution of Rhizobia, Springer, Singapore 2019, s. 41-102.

## **Geograficzne zróżnicowanie roślin z rodziny *Fabaceae* i ich wybranych mikrosymbiontów wiążących azot**

Streszczenie

Rodzina *Fabaceae* stanowi trzecią pod względem liczby gatunków rodzinę roślin okrytonasiennych, której członkowie występują we wszystkich znanych ekosystemach. Unikatową cechą tych roślin jest zdolność nawiązywania symbiozy z wiążącymi azot atmosferyczny bakteriami glebowymi, powszechnie zwanymi ryzobiami. W ostatnich latach, dzięki przeprowadzeniu wielu analiz molekularnych i fenotypowych, zmianie uległo nasze rozumienie taksonomii roślin z rodziny bobowatych. Okazało się, że tradycyjny podział rodziny *Fabaceae* na trzy podrodziny, tj. *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae*, *Papilionoideae* jest przestarzały i nie odzwierciedla obecnej wiedzy na temat systematyki tych roślin. Jednocześnie nastąpił intensywny rozwój metod molekularnych, umożliwiających zidentyfikowanie coraz większej liczby ich mikrosymbiontów. W niniejszej pracy omówiono geograficzne zróżnicowanie i aktualną systematykę roślin z rodziny *Fabaceae*, a także przedstawiono przykłady prezentujące ich wpływ na różnorodność gatunkową populacji infekujących je mikrosymbiontów.

Słowa kluczowe: biogeografia, *rhizobium*, symbioza, bioróżnorodność

## **Geographical diversity of plants from the *Fabaceae* family and their chosen nitrogen-fixing microsymbionts**

Abstract

*Leguminosae* is the third largest angiosperm family in terms of species numbers, whose members are found in all environments. A unique feature of the plants from *Fabaceae* family is their ability to form a symbiotic interaction with N<sub>2</sub>-fixing soil bacteria, commonly known as rhizobia. Our understanding of the taxonomy of legumes has changed significantly over the last decades, due to performance of many molecular and phenotypic analyses. The traditional classification of the family into the three well-known subfamilies, such as *Papilionoideae*, *Caesalpinioideae* and *Mimosoideae* is outdated. Simultaneously many genera and species of rhizobia have been noted that are known to nodulate legumes. Here, the literature on legumes global occurrence and their taxonomy, as well as an impact of these plants on biodiversity of their microsymbionts was reviewed.

Keywords: biogeography, *rhizobium*, symbiosis, biodiversity

## Indeks autorów:

Antonik M.....	56	Mańkowska G.....	116
Becker R.....	167, 189	Mielczarek-Palacz A.....	285
Buczowska- Chmielewska K.....	99	Mierzejewska E.....	128
Burdziej A.....	66	Okoń S.....	37
Cieplak M.....	37	Osińska E.....	47
Ciereszko I.....	21	Ożarowski M.....	116, 152
Długosz-Grochowska O.....	81	Rogowska A.....	7, 66, 179
Dreger M.....	116, 152	Sagan M.....	268
Drutowska A.....	47	Smycz-Kubańska M.....	285
Dziedzic E.....	56	Sroka-Bartnicka A.....	92
Englisz A.....	285	Stefanik N.....	81
Grygoruk N.....	21	Styczyński M.....	259
Gryszczyńska A.....	152	Suśniak K.....	92
Guzowska M.....	99	Sutor K.....	56
Janczarek M.....	302	Szakiel A.....	66
Janusz A.....	285	Szalata M.....	116, 152
Janusz J.....	285	Urbaniak M.....	128
Kamecka-Krupa J.....	202	Wasiak W.....	99
Kasabuła M.....	21	Wawrzyniak R.....	99
Kondera-Anasz Z.....	285	Wendlocha D.....	285
Kowalczuk-Vasilev E.....	268	Wielgus K.....	116, 152
Kozieł M.....	302	Wojnicka J.....	302
Królewska-Daszczynska P.....	285	Wybraniec S.....	56
Krysa M.....	92	Wytyczak K.....	237
Kumorkiewicz-Jamro A.....	56	Yamada K.....	81
Łyszcz Z.....	47		