

## Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku polskim

Związki fenolowe stanowią jedną z najliczniejszych grup roślinnych metabolitów wtórnych, które syntetyzowane są przez rośliny w warunkach stresu środowiskowego. Ze względu na swoją budowę chemiczną niektóre związki fenolowe cechuje szerokie spektrum właściwości biologicznie czynnych, wśród których jedną z najważniejszych w kontekście problemów współczesnej medycyny jest aktywność przeciwdrobnoustrojowa. Ze względu na rosnącą lekooporność bakterii poszukuje się nowych źródeł związków chemicznych, w tym również metabolitów wtórnych zawartych w tkankach roślinnych, które posiadają potencjał przeciwbakteryjny i nie indukują oporności wśród zwalczanych mikroorganizmów.

Muchołówka amerykańska (*Dionaea muscipula* J. Ellis) jest rośliną mięsożerną, która jest monotypowym rodzajem w obrębie rodziny rosiczkowatych (Droseraceae). Z uwagi na swoje specyficzne przystosowanie do środowiska muchołówka amerykańska ma zdolność do syntezy i akumulacji bardzo dużych ilości różnych pochodnych fenolowych: fenylopropanoidów, flawonoidów, antocyjanów czy 1,4-naftochinonów. Z tego względu stanowi ona użyteczny model do badań nad syntezą związków fenolowych w warunkach stresu oraz ich właściwościami biologicznie czynnymi.

Prezentowana praca doktorska składa się z cyklu trzech powiązanych tematycznie, oryginalnych publikacji naukowych. Tematem przewodnim opublikowanych prac była synteza związków fenolowych w kulturach tkankowych roślin muchołówki amerykańskiej, które poddano elicytacji i transformacji genetycznej. Równocześnie przedmiotem badań było zbadanie odpowiedzi fizjologicznej roślin *D. muscipula* na transformację genetyczną oraz określenie właściwości biologicznie czynnych metabolitów wtórnych zawartych w ekstraktach uzyskanych z roślin w procesie elicytacji i transformacji.

Głównymi celami pracy doktorskiej było: (1) opracowanie efektywnej metody elicytacji związków fenolowych w kulturach tkankowych muchołówki amerykańskiej, w celu podwyższenia aktywności przeciwutleniających i antybakteryjnych ekstraktów uzyskanych z badanych roślin, (2) uzyskanie transformowanych roślin *D. muscipula* dzięki wykorzystaniu transformacji wektorowej – *Rhizobium rhizogenes*, (3) ocena transformowanych klonów muchołówki amerykańskiej pod kątem akumulacji związków fenolowych i ich właściwości

antybakteryjnych, (4) zbadanie wybranych parametrów fizjologicznych odpowiedzi roślin muchołówki amerykańskiej na transformację genetyczną.

Aby zrealizować postawione cele badawcze, zastosowano elicytor biotyczny w postaci lizatu z bakterii *Cronobacter sakzarii*, o stężeniu: 1,5, 2,5 i 5% w hodowli płynnej *D. muscipula*. Transformację genetyczną wykonano przy użyciu trzech szczepów bakterii *R. rhizogenes* LBA 9402, ATCC 15834 i A4, które posiadają naturalną zdolność inkorporacji fragmentu DNA plazmidowego (T-DNA) do genomu roślinnego. Rośliny muchołówki amerykańskiej poddane elicytacji i transformacji badano w kontekście akumulacji biomasy, związków fenolowych (metodami spektrofotometrycznymi i wysokosprawnej chromatografii cieczowej) oraz ich właściwości antyoksydacyjnych i antybakteryjnych w stosunku do antybiotykoopornych patogenów bakteryjnych: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*. Transformację genetyczną *D. muscipula* potwierdzono na poziomie molekularnym dzięki zastosowaniu reakcji PCR. Wykazano obecność genu *rolB* w DNA uzyskanych teratomów (transformowanych pędów) muchołówki amerykańskiej. Dodatkowo z użyciem hybrydyzacji typu Southern wykazano, że bakteryjny gen *rolB* został wbudowany do DNA klonów *D. muscipula* w jednej kopii. Transformowane klony muchołówki amerykańskiej zbadano pod kątem ich zmian w akumulacji aldehydu dimalonowego (markera stresu oksydacyjnego), proliny, karotenoidów, kwasów fenolowych, glutationu i aktywności enzymów antyoksydacyjnych w porównaniu do roślin nietransformowanych. Ponadto w teratomach oznaczono zawartość lipidów i cukrów, będących składową metabolizmu pierwotnego.

Uzyskane wyniki wykazały, że: (1) efektywność elicytacji związków fenolowych w kulturach tkankowych muchołówki amerykańskiej z użyciem lizatu z bakterii *C. sakzarii* jest zależna od stężenia i czasu działania elicytora, (2) zastosowana strategia elicytacyjna skutecznie podnosi właściwości przeciwutleniające i przeciwbakteryjne roślin muchołówki amerykańskiej, (3) bakteryjny gen *rolB* w DNA genomowym roślin muchołówki może działać jak endogenny elicytor związków fenolowych i tym samym prowadzić do zwiększenia właściwości przeciwbakteryjnych ekstraktów uzyskanych z roślin transformowanych, (4) transformacja roślin *D. muscipula* wywołuje efekt plejotropowy, prowadząc do zmian w gospodarce reaktywnych form tlenu, metabolizmie pierwotnym i wtórnym roślin, (5) stabilne genetycznie organizmy transformowane mogą stanowić dobry model do badań nad syntezą i akumulacją związków fenolowych w roślinach leczniczych.