

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Πτυχιακή Διατριβή

Ιστοκαλλιέργεια και δευτεροταγείς μεταβολίτες σε κάλους της *Ruta graveolens*

Ζουρνατζής Ηλίας

Επιβλέπων καθηγητής

Γούναρης Ιωάννης

Βόλος 2018

Ιστοκαλλιέργεια και δευτεροταγείς μεταβολίτες σε κάλους της *Ruta graveolens*

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ι. ΓΟΥΝΑΡΗΣ	Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Ε. ΒΕΛΛΙΟΣ	Επίκουρος Καθηγητής Φυτοπαθολογίας Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
Σ. ΠΕΤΡΟΠΟΥΛΟΣ	Επίκουρος Καθηγητής Λαχανοκομίας Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε ορισμένους ανθρώπους, η συμβολή και η συμπαράσταση των οποίων ήταν πολύτιμη και καθοριστική στην εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω, καταρχάς, στον καθηγητή μου και επιβλέποντα της πτυχιακής μου διατριβής, κύριο Ιωάννη Γούναρη, Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας, ο οποίος με τίμησε με την εμπιστοσύνη του αναθέτοντάς μου την εκπόνηση αυτής της εργασίας. Τον ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγηση και για τις πολύτιμες συμβουλές του, για το χρόνο που διέθεσε απλόχερα και για την αδιάλειπτη και πάντα με προθυμία παροχή της βοήθειάς του σε οποιοδήποτε πρόβλημα αντιμετώπιζα καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης την πτυχιακής μου διατριβής.

Κρίνω απαραίτητο να εκφράσω την εκ των προτέρων εκτίμησή μου προς τα υπόλοιπα μέλη της επιτροπής για την προσεκτική ανάγνωση της εργασίας μου και για τις πολύτιμες υποδείξεις τους στο σύνολο της.

Ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να απευθύνω στον Επίκουρο Καθηγητή Φυτοπαθολογίας- Σύγχρονες Μέθοδοι Διαγνωστικής κ. Ευάγγελο Βέλλιο, για την παραχώρηση εργαστηριακού χώρου και εξοπλισμού για την πραγματοποίηση εργαστηριακού μέρους αυτής της εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Λαχανοκομίας κ. Σπυρίδωνα Πετρόπουλο, για την άμεση ανταπόκρισή του και το πολύτιμο υλικό που μου παρείχε για τους σκοπούς της εργασίας.

Θα ήθελα ακόμη να στείλω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Οργανικής Χημείας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, κ. Κωνσταντίνο Λίτινα, για την πολύτιμη βοήθειά του και για το χρόνο που διέθεσε για την διεκπεραίωση του εργαστηριακού μέρους της υγρής χρωματογραφίας και φασματοσκοπίας μαζών.

Επίσης αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους του καθηγητές του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, για τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσαν όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου.

Ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να απευθύνω στον φίλο και συνάδελφό μου, προπτυχιακό φοιτητή Μιλτιάδη Λαδάκη για τη συμμετοχή του και βοήθειά του στη διεκπεραίωση του εργαστηριακού μέρους και για την άριστη συνεργασία μας καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας.

Πάνω απ' όλα, είμαι ευγνώμων στους γονείς μου οι οποίοι υπήρξαν ανεκτίμητο στήριγμα για μένα σε κάθε στάδιο της ζωής μου και τους ευχαριστώ για την ολόψυχη

αγάπη και υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και την υπόλοιπη οικογένειά μου που είναι πάντα δίπλα μου, καθώς επίσης και τους φίλους μου για τη στήριξη και την παρουσία τους στη ζωή μου.

Συντομογραφίες

2,4-D: 2,4-dichlorophenoxy acetic acid

Ag: άργυρος

AgNO₃: νιτρικός άργυρος

APX: ascorbate peroxidase

BA: benzyl adenine

BAP: benzyl amino purine

CAT: catalase

GPX: glutathione peroxidase

IAA: Indole-3-acetic acid

IBA: indole-3-butyric acid

MDA: malondialdehyde

MS: Murashige and Skoog

NAA: naphthalene acetic acid

PAL: phenylalanine ammonia-lyase

POD: peroxidase

PPO: polyphenol oxidase

ROS: reactive oxygen species

SA: σαλικυλικό οξύ

SOD: superoxide dismutase

TAT: tyrosine aminotransferase

Πίνακες

Πίνακας 1	Απορρόφηση στα 271 nm, εκχύλιση με νερό, 1 ^η ομάδα ουσιών	Σελ. 23
Πίνακας 2	Απορρόφηση στα 310 nm, εκχύλιση με νερό, 1 ^η ομάδα ουσιών	Σελ. 24
Πίνακας 3	Απορρόφηση στα 271 nm, εκχύλιση με αιθυλοξικό οξύ, 1 ^η ομάδα ουσιών	Σελ. 25
Πίνακας 4	Απορρόφηση στα 310 nm, εκχύλιση με αιθυλοξικό οξύ, 1 ^η ομάδα ουσιών	Σελ. 26
Πίνακας 5	Απορρόφηση στα 295 nm, εκχύλιση με αιθυλοξικό οξύ, 2 ^η ομάδα ουσιών	Σελ. 27
Πίνακας 6	Απορρόφηση στα 310, 290 και 273 nm ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 100 μM AgNO ₃	Σελ. 29
Πίνακας 7	Απορρόφηση στα 310, 290 και 273 nm ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 500 μM AgNO ₃	Σελ. 30
Πίνακας 8	Απορρόφηση στα 310, 290 και 273 nm ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 0,02 mM SA	Σελ. 34
Πίνακας 9	Απορρόφηση στα 310, 290 και 273 nm ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 0,1 mM SA	Σελ. 35

Διαγράμματα

Διάγραμμα 1	Απορρόφηση στα 271 nm, εκχύλιση με νερό, 1 _η ομάδα ουσιών	Σελ. 23
Διάγραμμα 2	Απορρόφηση στα 310 nm, εκχύλιση με νερό, 1 _η ομάδα ουσιών	Σελ. 24
Διάγραμμα 3	Απορρόφηση στα 271 nm, εκχύλιση με αιθυλοξικό οξύ, 1 _η ομάδα ουσιών	Σελ. 25
Διάγραμμα 4	Απορρόφηση στα 310 nm, εκχύλιση με αιθυλοξικό οξύ, 1 _η ομάδα ουσιών	Σελ. 26
Διάγραμμα 5	Απορρόφηση στα 295 nm, εκχύλιση με αιθυλοξικό οξύ, 2 _η ομάδα ουσιών	Σελ. 28
Διάγραμμα 6	Απορρόφηση στα 310, 290 και 273 nm ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 100 μM AgNO ₃	Σελ. 30
Διάγραμμα 7	Απορρόφηση στα 310, 290 και 273 nm ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 500 μM AgNO ₃	Σελ. 31
Διάγραμμα 8	Απορρόφηση στα 310 nm ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 100 και 500 μM AgNO ₃	Σελ. 31
Διάγραμμα 9	Απορρόφηση στα 290 nm ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 100 και 500 μM AgNO ₃	Σελ. 32
Διάγραμμα 10	Απορρόφηση στα 273 nm ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 100 και 500 μM AgNO ₃	Σελ. 32
Διάγραμμα 11	Απορρόφηση στα 310, 290 και 273 nm ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 0,02 mM SA	Σελ. 34
Διάγραμμα 12	Απορρόφηση στα 310, 290 και 273 nm ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 0,1 mM SA	Σελ. 35
Διάγραμμα 13	Απορρόφηση στα 310 nm ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 0,02 και 0,1 mM SA	Σελ. 36
Διάγραμμα 14	Απορρόφηση στα 290 nm ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 0,02 και 0,1 mM SA	Σελ. 36
Διάγραμμα 15	Απορρόφηση στα 273 nm ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 0,02 και 0,1 mM SA	Σελ. 37

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	2
2 Υλικά και μέθοδοι.....	9
2.1 Ιστοκαλλιέργεια.....	9
2.2 Εκχύλιση ουσιών από τους φυτικούς ιστούς και προκαταρκτικός καθαρισμός με χρωματογραφία χάρτου.....	12
2.3 Φασματοσκοπία υπεριώδους.....	13
2.4 Ανάλυση των εκχυλισμάτων με φασματοσκοπία υπεριώδους, υγρή χρωματογραφία και φασματομετρία μαζών.....	14
3 Αποτελέσματα.....	15
3.1 Ιστοκαλλιέργεια.....	15
3.2 Απομόνωση δευτεροταγών μεταβολιτών.....	17
3.3 Επίδραση διαφόρων ουσιών στα ποσοστά ουσιών με αρωματικό δακτύλιο.....	22
3.4 Επίδραση του νιτρικού αργύρου.....	28
3.5 Επίδραση του σαλικυλικού οξέος.....	33
4. Συζήτηση.....	38
4.1 Ιστοκαλλιέργεια.....	38
4.2 Επίδραση διαφόρων ουσιών στο ποσό των δευτεροταγών μεταβολιτών.....	39
4.3 Επίδραση διαφόρων ουσιών στην παραγωγή δευτεροταγών μεταβολιτών.....	43
4.4 Επίδραση νιτρικού αργύρου στην παραγωγή δευτεροταγών μεταβολιτών.....	44
4.5 Επίδραση σαλικυλικού οξέος στην παραγωγή δευτεροταγών μεταβολιτών.....	46
5. Συμπέρασμα.....	47
6. Βιβλιογραφία.....	48

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία εξετάζουμε την επίδραση του νιτρικού αργύρου, σαλικυλικού οξέος, πυρουβικού νατρίου, ακετυλο-σαλικυλικού οξέος, λακτικού οξέος, εμοδίνης, οξαλοξικού νατρίου, γοσσυπολόνης, PDC, ακεταμίνης, μεθυλγλυοξάλης, ακετυλοκουστεΐνης, κυανού του μεθυλενίου, NADPH, γλουταθειόνης, 3-φωσφογλυκεραλδεΐδης, διθειοθρεϊτόλης και υδροκουϊνόνης στα επίπεδα των κύριων δευτερογενών μεταβολιτών σε κάλλους του φυτού *Ruta graveolens*. Συγκεκριμένα, στο πείραμα πραγματοποιήθηκε ιστοκαλλιέργεια του *Ruta graveolens* (απήγανος), που περιλαμβάνει καλλογένεση, αναγέννηση και ριζοβολία του φυτού καθώς και καλλιέργεια παρουσία διαφόρων ουσιών. Οι πρώτοι κάλλοι εμφανίστηκαν σε περίπου 3 εβδομάδες, στην αναγέννηση από κάλλους παρατηρήθηκαν βλαστοί την 2^η εβδομάδα υπό φυσικό φωτισμό, ενώ οι πρώτες ρίζες από τους βλαστούς εμφανίστηκαν την 5^η εβδομάδα σε καλλιεργητικό μέσον ριζοβολίας. Για την ιστοκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε καλλιεργητικό μέσο Murashige και Skoog (MS), που περιείχε 4.5 μM 2,4-D και 2.3 μM κινητίνη για την καλλογένεση, 1 μM NAA και 7.5 μM BA για την αναγέννηση βλαστών από κάλλους, ενώ για τη ριζοβολία βλαστών δεν χρειάστηκαν ορμόνες. Για την καλλιέργεια παρουσία διαφόρων χημικών ουσιών εφαρμόστηκε συγκέντρωση 100 και 500 μM για τον νιτρικό άργυρο και 0,02 και 0,1 mM για το σαλικυλικό οξύ. Παρατηρήθηκε η επίδραση του νιτρικού αργύρου και σαλικυλικού οξέος στις σχετικές συγκεντρώσεις των δευτεροταγών μεταβολιτών για χρονικό διάστημα 5 εβδομάδων. Ταυτοποίηση της ρουτακριδόνης, ως μίας από τις ουσίες του φυτού, έγινε με φασματοσκοπία υπεριώδους και φασματομετρία μαζών. Γενικά παρατηρήθηκε ότι ο νιτρικός άργυρος σε όλες τις συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκαν αρχικά κατέστειλε την παραγωγή των μεταβολιτών, πιθανότατα λόγω παρεμπόδισης της δράσης του αιθυλενίου, αλλά αργότερα την ενίσχυσε. Αντίθετα, το σαλικυλικό οξύ αρχικά αύξησε το ποσό των μεταβολιτών, ίσως λόγω της ενεργοποίησης ενζύμων του μονοπατιού του σικιμικού οξέως, οι οποίοι σταδιακά επανερχόταν σε χαμηλότερα επίπεδα.

1. Εισαγωγή

Ιστοκαλλιέργεια *Ruta graveolens*

Η ιστοκαλλιέργεια του φυτού *Ruta graveolens* έχει μελετηθεί στο παρελθόν και υπάρχει ποικιλία καλλιεργητικών μέσων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Π.χ. για την καλλογένεση αναφέρεται ότι σε καλλιεργητικό μέσο Murashige and Skoog (MS) με 10 μM 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid η συχνότητα εμφάνισης κάλλων ήταν 70,6% (Ahmad et al. 2010). Επίσης για την έναρξη καλλογένεσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί MS με 4.0 mg/L NAA, ενώ για την διατήρηση και ανανέωση κάλλων χρησιμοποιήθηκε MS με 1 mg/L 2,4-D (Al-Ajlouni et al. 2015) αλλά και MS με 0,5 mg/L IAA και 1 mg/L 2,4-D (Gurudeeban et al. 2012), με τους κάλλους να εμφανίζονται μέσα σε 4 εβδομάδες. Για την αναγέννηση βλαστών από κάλλους χρησιμοποιείται MS με 1 mg/L BAP και 0,25 mg/L IAA (Bohidar et al. 2013), όπου η συχνότητα εμφάνισης βλαστών ανέρχεται στο 96,6%. Παρόμοια υψηλό ποσοστό αναγέννησης (92,3%) παρατηρήθηκε σε MS με 7,5 μM BA και 1 μM NAA (Ahmad et al. 2010) αλλά και σε MS με 10 μM BA και 2,5 μM NAA (Faisal et al. 2005) με ποσοστό αναγέννησης 98,5%. Για την ριζοβολία των βλαστών χρησιμοποιείται MS με 0,5 μM IBA (Ahmad et al. 2010) ή MS μισής συγκέντρωσης (half-strength) με 0,5 μM IBA (Faisal et al. 2005) ή half-strength MS με 2 mg/L IBA (Bohidar et al. 2013), όπου οι ρίζες εμφανίστηκαν σε 10-12 ημέρες.

Επίδραση νιτρικού αργύρου (AgNO_3) στην καλλογένεση

Η χρήση AgNO_3 αναφέρεται από πολλούς ερευνητές ότι επιδρά θετικά στην καλλογένεση. Π.χ. η ανάπτυξη κάλλων από φύλλα του φυτού *Primula vulgaris* βελτιώθηκε με εφαρμογή 1,7 mg/L AgNO_3 , ενώ μειώθηκε ταυτόχρονα το καφέτιασμα (Hayta et al. 2016). Στο φυτό *Brassica oleracea* (λάχανο) η εφαρμογή 1-10 mg/L AgNO_3 βελτίωσε την καλλογένεση και την μακροπρόθεσμη καλλιέργεια κάλλων (Williams et al. 1990). Στην τομάτα (*Solanum lycopersicum*) δοκιμάστηκαν διάφορες ποσότητες AgNO_3 , με την υψηλότερη καλλογένεση (91,33%) να παρατηρείται στην ποικιλία Rio Grande με 10-15 mg/L AgNO_3 (Shah et al. 2014). Σε κάλλους

ζαχαροκάλαμου οι συγκεντρώσεις 29, 59 και 118 μM AgNO_3 αυξήσαν το φρέσκο βάρος των κάλλων κατά ποσοστά 25%, 43% και 75% αντίστοιχα (Taylor et al. 1994). Σε καλλιέργεια *in vitro* του φυτού *Coffea canephora* εφαρμόστηκαν 0, 20 και 40 μM AgNO_3 σε καλλιεργητικό μέσο MS, με αποτέλεσμα τα έκφυτα να δείξουν εμβρυογένεση σε ποσοστά 5%, 35% και 48% αντίστοιχα και σε δευτερογενή εμβρυογένεση αντέδρασαν σε ποσοστά 3%, 68% και 90% αντίστοιχα (Kumar et al. 2007). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται και για το φυτό *Phoenix dactylifera*, όπου η εφαρμογή 3 mg/L AgNO_3 στο καλλιεργητικό μέσο διπλασίασε τον αριθμό των εμβρύων (Roshanfekrrad et al. 2017). Το ίδιο παρατηρήθηκε και σε κύτταρα καρότου, όπου 10-20 μM AgNO_3 διπλασίασαν τον αριθμό των εμβρύων (Roustan et al. 1990).

Ο AgNO_3 δεν φαίνεται να είχε καμία επίδραση στην καλλογένεση του *Zea mays* (Songstad et al. 1988) σε συγκέντρωση 100 μM , ούτε στο *Pennisetum americanum* (Plus et al. 1993) όπου οι συγκεντρώσεις 58,9, 117,7 και 294,3 μM AgNO_3 δεν επηρέασαν το φρέσκο ή ξηρό βάρος των κάλλων, όμως η αναγέννηση αυξήθηκε 12 φορές περισσότερο στο *Zea mays* ενώ με συγκέντρωση AgNO_3 58,9 μM τριπλασιάστηκε στο *Pennisetum americanum*. Παρομοίως σε κάλλους του φυτού *Primula vulgaris* η αναγέννηση αυξήθηκε με εφαρμογή 0,85, 1,7 και 3,4 mg/L AgNO_3 με τη μέγιστη να φτάνει στο 72% με 3,4 mg/L AgNO_3 (Hayta et al. 2016). Αντίστοιχα, στο είδος *Brassica campestris* η εφαρμογή 30 και 60 μM AgNO_3 στο καλλιεργητικό μέσο αύξησε την αναγέννηση, με το σχηματισμό βλαστών να αυξάνεται σε ποσοστά 77,4% και 83,6% αντίστοιχα σε σύγκριση με το 6,1% του μάρτυρα (Palmer 1992). Επιπλέον, στο *Brassica oleracea* (Williams et al. 1990) αναφέρεται ότι 1-10 mg/L AgNO_3 αύξησαν την αναγέννηση σε καλλιεργητικά μέσα με λίγες ορμόνες, ενώ στο *Solanum lycopersicum* το υψηλότερο ποσοστό αναγέννησης (96,66%) παρατηρήθηκε στην ποικιλία Rio Grande σε συγκεντρώσεις 8-10 mg/L AgNO_3 (Shah et al. 2014). Στην ελαιοκράμβη (*Brassica napus*) επίσης αναφέρεται ότι η συγκέντρωση 5 mg/L AgNO_3 βελτίωσε την αναγέννηση σε ορισμένους μόνο γενοτύπους του φυτού, δηλαδή η αναγέννηση τριπλασιάστηκε στους Orient και SLM ενώ στους PF, Cobra και Okri δεν υπήρχε μεγάλη διαφορά σε σχέση με το μάρτυρα (Ulaiie et al. 2008).

Επομένως η επίδραση του AgNO_3 στην καλλογένεση και αναγέννηση εξαρτάται από την συγκέντρωση της ουσίας στο καλλιεργητικό μέσο, το είδος του φυτού και την ποικιλία.

Επίδραση νιτρικού αργύρου (AgNO₃) σε δευτερογενείς μεταβολίτες

Ο AgNO₃ φαίνεται ότι αυξάνει τα αλκαλοειδή και συγκεκριμένα την καμαλεξίνη. Φυτά *Aradiopsis thaliana* (Zandalinas et al. 2012) ψεκάστηκαν με 5 mM AgNO₃ και παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης του διϋδροκαμαλεξικού οξέος κατά 2000 φορές σε σχέση με το μάρτυρα, καθώς και αύξηση της καμαλεξίνης που σχετίζεται με την προηγούμενη ουσία. Σε κάλλους σιταριού (Barbasz et al. 2016) εφαρμόστηκαν 20, 40 και 60 ppm AgNO₃, όπου τα 60 ppm διπλασίασαν τα ποσοστά MDA (methylene-diphenyl diamine) ενώ κάποια άλλα νανοσωματίδια και ιόντα AgNPs τριπλασίασαν την προλίνη.

Επίδραση νιτρικού αργύρου (AgNO₃) σε ένζυμα και έκφραση γονιδίων

Ο AgNO₃ φαίνεται ότι επιδρά στη δραστηριότητα των ενζύμων σύνθεσης του αιθυλενίου. Σε κολεόπτια καλαμποκιού (Knee et al. 1992) η δραστηριότητα του αιθυλενίου παρεμποδίστηκε από τη δράση ιόντων Ag έξω από την πλασματική μεμβράνη, ενώ συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10 μM AgNO₃ περιόρισαν την δραστηριότητα της ATPάσης. Παρομοίως σε καλλιέργεια κυττάρων καρότου (Roustan et al. 1990) αναφέρεται ότι τα ιόντα Ag περιορίζουν τη δραστηριότητα αιθυλενίου, ενώ συγκεντρώσεις 10 και 20 μM AgNO₃ αύξησαν τη δραστηριότητα του ενζύμου αποκαρβοξυλάση αργινίνης, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι της πολυαμίνης και στη σύνθεση της ελεύθερης ρίζας του νιτρικού οξειδίου (NO), σε ποσοστά 45% και 54% αντίστοιχα.

Σε καλλιέργεια κυττάρων ζαχαροκάλαμου (Taylor et al. 1994) αναφέρεται ότι ο AgNO₃ είναι τοξικός για την ανάπτυξη κυττάρων και βλαστών σε συγκεντρώσεις από 29 ως 118 μM και αυξάνει την παραγωγή αιθυλενίου λόγω stress. Επιπλέον, σε κάλλους ποικιλιών σιταριού (Barbasz et al. 2016) η εφαρμογή 20, 40 και 60 ppm (120, 240 και 360 μM αντίστοιχα ή 20 mg/L, 40 mg/L και 60 mg/L) AgNO₃ ενεργοποίησε το μη ενζυματικό αντιοξειδωτικό σύστημα στην ποικιλία Parabola, ενώ στην ποικιλία Raweta ενεργοποιήθηκε και το ενζυματικό σύστημα για την άμυνα ενάντια στα ενεργά είδη οξυγόνου, ROS (reactive oxygen species). Επίσης σε τομάτες, η εφαρμογή συγκέντρωσης 10⁻⁴ M (100 μM) AgNO₃ εμποδίζει τα ένζυμα β-φρουκτοφουρανοοσιδάση E και L (Nakagawa et al. 1972).

Επομένως η επίδραση του AgNO₃ στο αιθυλένιο και σε διάφορα ένζυμα εξαρτάται από την συγκέντρωση AgNO₃ και διαφέρει ανάλογα με το είδος του φυτού. Γενικώς όμως, σε μικρότερες συγκεντρώσεις (<20 μM) φαίνεται ότι ελαττώνει το αιθυλένιο και αυξάνει τις πολυαμίνες και το NO, τα οποία ελαττώνουν τις ελεύθερες ρίζες, ενώ σε μεγαλύτερες αυξάνει το οξειδωτικό stress.

Επίδραση σαλικυλικού οξέος (salicylic acid, SA) στην καλλογένεση

Η επίδραση του SA στην ταχύτητα σχηματισμού κάλλων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του SA και το είδος του φυτού. Π.χ. στο *Phyllanthus pulcher* (Danaee et al. 2015) και στο *Vitis vinifera* (Mihai et al. 2009) χαμηλότερες συγκεντρώσεις SA, (≤ 5 mg/L (35 μM) και ≤ 10 mM αντίστοιχα) αύξησαν την φρέσκη μάζα των κάλλων αλλά όχι την ξηρή μάζα. Επιπλέον, στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δεν είχαν αποτέλεσμα ή είχαν αρνητικό αποτέλεσμα.

Αντίθετα στο *Hypericum perforatum* (Walker et al. 2002) ελαττώνει την βιομάζα των κάλλων και μάλιστα περισσότερο υπό συνθήκες σκότους. Η παρόμοια ένωση ακετυλο-SA δεν είχε επίδραση στη βιομάζα κάλλων του *Pennicetum americanum* (Plus et al. 1993) αλλά αύξησε την ξηρή μάζα. Επιπλέον το SA αυξάνει την πιθανότητα δημιουργίας εμβρύων (Luo et al. 2001) και πιθανότατα δρα δια μέσου της αύξησης του H₂O₂ με καταστολή των ενζύμων περοξειδάση του ασκορβικού οξέος και καταλάση.

Επομένως φαίνεται ότι το SA σε υψηλές συγκεντρώσεις ευνοεί το οξειδωτικό στρες, ενώ σε χαμηλότερες παρεμποδίζει την δημιουργία ελεύθερων ριζών.

Επίδραση σαλικυλικού οξέος σε δευτερογενείς μεταβολίτες

Όσον αφορά τα φαινολικά, η σύνθεση ρουτίνης διεγείρεται στο φυτό *Phyllanthus pulcher* (Danaee et al. 2015) από συγκεντρώσεις SA μέχρι 20 mg/L (120 μM) αλλά καταστέλλεται από μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Το ίδιο συμβαίνει με το ολικό ποσό φαινολικών ουσιών. Παρόμοια αύξηση φαινολικών ουσιών από SA παρατηρείται στο είδος *Artemisia aucheri* (Abbaspour et al. 2016), *Digitalis trojana Ivanina* με συγκέντρωση SA 150 mM (Cincoz et al. 2016), στο είδος *Salvia miltiorrhiza* (Li et al. 2016) με εφαρμογή 0,16 mM, σε βλαστούς *Phaseolus vulgaris* cv. *Dalia* (Mendoza-Sanchez et al. 2016) με 1-2 mM SA και στο είδος *Brassica rapa* (Thiruvengadam et al. 2016) με εφαρμογή 100 μM SA. Μάλιστα στο είδος *Salvia miltiorrhiza* (Li et al. 2016)

με εφαρμογή 0,16 mM αυξήθηκαν τα φαινολικά οξέα: καφεϊκό, ροσμαρινικό και σαλβιανολικό οξύ B και σε βλαστούς *Phaseolus vulgaris* cv *Dalia* (Mendoza-Sanchez et al. 2016) η εφαρμογή 1-2 mM SA αύξησε την ποσότητα φαινολικών 1,8 φορές παραπάνω και συγκεκριμένα το κουμαρικό, σαλικυλικό, γαλλικό και καφεϊκό οξύ αυξήθηκαν 8,5, 115, 25 και 1,7 φορές παραπάνω αντίστοιχα. Παρόμοια αύξηση παρατηρήθηκε και στην ρουτίνη η οποία αυξήθηκε 41 φορές παραπάνω. Το SA αναφέρεται επίσης ότι αυξάνει τα φλαβονοειδή στα είδη *Artemisia aucheri* (Abbaspour et al. 2016), *Digitalis trojana Ivanina* με συγκέντρωση SA 150 mM (Cincoz et al. 2016), σε βλαστούς *Phaseolus vulgaris* cv. *Dalia* (Mendoza-Sanchez et al. 2016) και στο είδος *Brassica rapa* (Thiruvengadam et al. 2016). Στο *Digitalis trojana Ivanina* (Cincoz et al. 2016) αναφέρεται ότι η εφαρμογή 150 mM SA έχει καλύτερα αποτελέσματα όταν οι κάλλοι διατηρηθούν στους 45 °C για 2 ώρες, ενώ στο *Phaseolus vulgaris* (Mendoza-Sanchez et al. 2016) 1-2 mM SA τριπλασίασαν την ποσότητα φλαβονοειδών. Παρομοίως η σύνθεση ανθοκυανών υπερδιπλασιάζεται στο αμπέλι (Mihai et al. 2009). Αύξηση ανθοκυανών λόγω της εφαρμογής SA αναφέρεται και στο *Brassica rapa* (Thiruvengadam et al. 2016) με 100 μM SA που προκαλούν ταυτόχρονη αύξηση καροτενοειδών και χλωροφύλλης II που είναι παρόμοια και στο *Catharanthus roseus* (Idrees et al. 2011). Αντιθέτως, στο *Hypericum perforatum* (Walker et al. 2002) η σύνθεση υπερικίνης σε καλλιέργειες κυττάρων ελαττώνεται από το SA σε συγκέντρωση 7 mg/L. Σε έμβρυα *Sauropus androgynus* (Wee et al. 2015) συγκεντρώσεις SA ≤ 200 μM προκάλεσαν αύξηση της ναριγκίνης, του TBHQ και της κεμφορόλης 92,8, 16,3 και 10,7 φορές παραπάνω αντίστοιχα, ενώ μείωσαν την ποσότητα της παπαβερίνης και της κουερσετίνης. Γενικώς τα φαινολικά αυξάνονται από το SA όλων των συγκεντρώσεων, αν και εξαρτάται αυτό από το φυτό.

Επιπλέον το SA φαίνεται ότι αυξάνει τα αλκαλοειδή σε διάφορα είδη φυτών. Σε καλλιεργητικό μέσο ριζοβολίας του *Datura metel* (Ajungla et al. 2009) εφαρμόστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις SA και παρατηρήθηκε αύξηση των αλκαλοειδών τροπανίου και συγκεκριμένα στις ουσίες υοσκυαμίνη και σκοπολαμίνη με μέγιστη αύξηση 3,5 φορές περισσότερο με εφαρμογή 500 μM SA. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε καλλιέργεια ριζικού συστήματος του *Scopolia parviflora* (Kang et al. 2004) όπου η ποσότητα σκοπολαμίνης έφτασε στο μέγιστο στις 24 ώρες μετά την έκθεσή του σε SA αλλά μετά άρχισε να μειώνεται, ενώ η παραγωγή της σκοπολαμίνης ήταν 40% περισσότερη από το control με εφαρμογή 0,01 mM (10 μM) SA. Σε καλλιέργεια ριζικού συστήματος του φυτού *Valerianella locusta* (Kittipongpatana et

al. 2002) 100 μM SA αυξήσαν την ποσότητα ιριδοειδών αλκαλοειδών και συγκεκριμένα το ισοβαλταρικό και διβαλταρικό οξύ, ενώ σε κάλλους φυτών *Leucosium aestivum* L. και *L. aestivum* Gravity Giant (Ptak et al. 2017) 5 μM SA για 10 ώρες προκάλεσαν αύξηση βιοσύνθεσης γαλακταμίνης 8 φορές παραπάνω για το Gravity Giant αλλά ίδια συγκέντρωση και στα δύο *L. aestivum* αύξησε την συγκέντρωση λυκορίνης 5 φορές περισσότερο από το control.

Άρα η επίδραση του SA στη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών εξαρτάται από το είδος του φυτού και πιθανόν από το μεταβολικό μονοπάτι.

Επίδραση σαλικυλικού οξέος σε ένζυμα και έκφραση γονιδίων

Η επίδραση του σαλικυλικού οξέος σε ένζυμα και έκφραση γονιδίων φαίνεται ότι εξαρτάται από την συγκέντρωση του SA και το είδος του φυτού. Σε φυτά σιταριού 2 εβδομάδων (Chen et al. 2016) εφαρμογή 0,25 mM (250 μM) SA αύξησε τα αντιοξειδωτικά ένζυμα POD, SOD, CAT, APX, GPX αλλά η εφαρμογή 2,5 mM SA μείωσε την δραστηριότητα των SOD, CAT, and APX. Παρομοίως σε φυτά πατάτας (Faried et al. 2017) εφαρμογή 0,5 mM (500 μM) υπό συνθήκες στρες αλατότητας βελτίωσε την δραστηριότητα των ενζύμων SOD, CAT και POD κατά 43,81%, 24,37% και 37,34% αντίστοιχα. Σε καρπούς του φυτού *Luffa cylindrica* (Han et al. 2017) παρατηρήθηκε παρόμοια δράση όπου με εφαρμογή 1,5 mM SA κατά την αποθήκευση βελτιώθηκε η δραστηριότητα των SOD, CAT, APX αλλά αναστάλθηκε η δραστηριότητα των PAL και polyphenol oxidase (PPO, πλαστιδιακό ένζυμο) και των ενζύμων που σχετίζονται με το καφέτιασμα. Η εφαρμογή 1 mM SA σε φύλλα φυτών τομάτας (Poór et al. 2017) σε φως προκάλεσε την ενεργοποίηση της NADPH oxidase κατά τις πρώτες ώρες με συνέπεια την αύξηση παραγωγής υπεροξειδάσης και μείωση της δραστηριότητας των ενζύμων CAT και APX (ένζυμα που διασπούν το H_2O_2) με αποτέλεσμα την αύξηση του H_2O_2 . Παρόμοια μείωση του ενζύμου CAT αναφέρεται σε κάλλους φυτού *Cuscuta reflexa* (Srivastava et al. 2001) όπου 50 και 100 μM SA μείωσαν το ποσοστό CAT κατά 16% και 30% και της περοξειδάσης κατά 16% και 25% αντίστοιχα. Σε φυτά *Artemisia aucheri* (Abbaspour et al. 2016) η δραστηριότητα των ενζύμων PAL και TAL αυξήθηκε με εφαρμογή SA και σε καλλιέργεια κυττάρων φυτού *Salvia miltiorrhiza* (Li et al. 2016) η συγκέντρωση 0,16 mM SA βελτίωσε την έκφραση γονιδίων των ενζύμων PAL, TAT και RAS πιθανότατα λόγω μείωσης του κυτοπλασμικού pH που προκλήθηκε από τον περιορισμό της δράσης της H^+ -ATPase

στην πλασματική μεμβράνη. Επιπλέον το SA φαίνεται ότι επιδρά θετικά στην παραγωγή της β-1,3-γλουκανάσης (glucanase). Σε κάλλους βαμβακιού (Li et al. 2003) η εφαρμογή 1 mM SA προκάλεσε αύξηση της δραστηριότητας της β-1,3-glucanase και nitinase 4,5 και 2 φορές παραπάνω αντίστοιχα, ενώ σε κάλλους του *Zingiber officinale* (Prachi et al. 2002) τα ένζυμα περοξειδάση και β-1,3-glucanase πήραν τη μέγιστη τιμή με συγκέντρωση 10^4 μM (10 mM) SA. Επιπλέον, εφαρμογή 300 μM SA σε καλλιέργειες κυττάρων *Vitis amurensis* (Kiselev et al. 2014) μείωσε την μεθυλίωση της κυτοσίνης των γονιδίων της συνθετάσης του στιλβενίου και αυξήθηκε η παραγωγή της Τ-ρεσβερατρόλης (T-resveratrol) σε ποσοστά 2,8-3,1 φορές σε σχέση με το control.

Πιθανοί κοινοί παράγοντες στη δράση του αιθυλενίου και του ακετυλο-σαλικυλικού οξέος

Το αιθυλένιο και το ακετυλο-σαλικυλικό οξύ αναφέρονται ότι αλληλοεπιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και συγκεκριμένα επάγουν την δημιουργία τους (Cervantes και Tocino 2009). Επίσης οι ελεύθερες ρίζες βρίσκονται σε μικρότερες ποσότητες στους κάλλους από ότι στα φυτά (Hossain et al. 2015).

Βασικός σκοπός της εργασίας είναι να εξετάσει τη δράση των ουσιών που επιδρούν στις ελεύθερες ρίζες, ώστε να επιβεβαιωθεί η συμβολή τους στη σύνθεση δευτεροταγών μεταβολιτών.

2 Υλικά και μέθοδοι

2.1 Ιστοκαλλιέργεια

Κατασκευή των καλλιεργητικών μέσων

Το θρεπτικό υλικό και όλα τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν απολυμάνθηκαν σε αποστειρωτή (autoclave) στους 121 °C για 30-40 λεπτά. Όλα τα καλλιεργητικά μέσα τοποθετήθηκαν σε γυάλινα δοχεία όγκου 500 ml ή 1 L και το pH ρυθμίστηκε στο 5.8 με προσθήκη διαλύματος NaOH ή HCl. Μετά από αποστείρωση το θρεπτικό υλικό διαμοιράστηκε σε καλλιεργητικά δοχεία. Όλες οι διαδικασίες που ακολουθούν καθώς και η διανομή του καλλιεργητικού μέσου έγινε σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar hood flow), η επιφάνεια του οποίου αποστειρώθηκε με αιθανόλη. Για ομοιόμορφη κατανομή του θρεπτικού υλικού εφαρμόστηκε συνεχής ανακίνηση του δοχείου και μοιράστηκε σε μικρότερα κλειστά δοχεία όπου το καθένα περιείχε τελικά 50 ml περίπου καλλιεργητικό μέσο. Στη συνέχεια αφήθηκαν ακίνητα σε θερμοκρασία δωματίου για σταδιακή ψύξη και στερεοποίηση του μέσου.

Απολύμανση του φυτικού ιστού και ιστοκαλλιέργεια

Ο φυτικός ιστός που χρησιμοποιήθηκε ήταν μίσχοι φύλλων μήκους 5 cm περίπου μετά από απομάκρυνση των φύλλων, προερχόμενοι από το φυτό *Ruta graveolens*. Οι μίσχοι αρχικά τοποθετήθηκαν σε διάλυμα υγρού σαπουνιού 1% TritonX-100 για 5 λεπτά με παροδική ανακίνηση. Μετά τη διαβροχή του υγρού σαπουνιού τα έκφυτα τοποθετήθηκαν σε 2 επιπλέον απολυμαντικά μέσα για 5 λεπτά με παροδική ανακίνηση, τα μισά σε 70% αιθανόλη και τα υπόλοιπα σε χλωριούχο υδράργυρο. Με σκοπό την απομάκρυνση των απολυμαντικών ουσιών από τον φυτικό ιστό, οι μίσχοι μεταφέρθηκαν κατόπιν σε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό όπου παρέμειναν για 5 λεπτά.

Οι μίσχοι, κάλλοι και οι βλαστοί που χρησιμοποιήθηκαν κόβονταν μέσα σε αποστειρωμένα τρυβλία petri με νυστέρια τα οποία αποστειρώνονταν με φλόγα μετά από εμβάπτισή τους σε αιθανόλη. Από τους κάλλους αφαιρούνταν τα καφέ νεκρά κομμάτια για να διατηρούνται νέοι. Η μεταφορά των μίσχων, κάλλων ή βλαστών έγινε

με λαβίδα αποστειρωμένη με φλόγα μετά από εμβάπτιση σε αιθανόλη. Για την αποφυγή τραυματισμού του φυτικού ιστού η λαβίδα και το νυστέρι μετά την αποστείρωση βυθίζονται στο καλλιεργητικό μέσο για μείωση της θερμοκρασίας. Οι μίσχοι για τον σχηματισμό κάλλων τοποθετούνται οριζόντια στο καλλιεργητικό μέσο ενώ οι βλαστοί για το σχηματισμό ριζών τοποθετούνται κάθετα. Στη συνέχεια ο καλλιεργητικός ιστός ανάλογα με τη σύσταση του καλλιεργητικού μέσου τοποθετείται σε κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξή του οι οποίες θα αναφερθούν παρακάτω για κάθε περίπτωση.

Όλη η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar hood flow), η επιφάνεια του οποίου είχε προηγουμένως αποστειρωθεί με αιθανόλη.

Καλλογένεση

Τα καλλιεργητικά μέσα αποτελούνταν από άλατα Murashige και Skoog (MS) με βιταμίνες του μέσου B6, 100 mg/L μυο-ινοσιτόλη, 2 mg/L γλυκίνη, 1 mg/L 2,4-D (4.5 μM), 0.5 mg/L κινετίνη (2.3 μM), 3% w/v σουκρόζη, 1% w/v άγαρ, pH 5.8. Για τη ρύθμιση του pH χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικό πεχάμετρο και διαλύματα 0.1 M NaOH και 0.1 M HCl. Για τον σχηματισμό κάλλων χρησιμοποιήθηκαν απολυμασμένοι μίσχοι μήκους 5 cm, οι οποίοι κόπηκαν σε τεμάχια μήκους 1-2 εκατοστά και τοποθετήθηκαν οριζόντια επί των στερεοποιημένων καλλιεργητικών μέσων. Κόβονταν μέσα σε αποστειρωμένα τρυβλία petri με νυστέρια, τα οποία αποστειρώνονταν με φλόγα μετά από εμβάπτισή τους σε αιθανόλη. Όλη η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής, η επιφάνεια του οποίου είχε προηγουμένως αποστειρωθεί με αιθανόλη. Τα κλειστά καλλιεργητικά δοχεία με τους μίσχους τοποθετήθηκαν στο σκοτάδι σε θάλαμο (incubator) σε θερμοκρασία 25 °C. Οι πρώτοι κάλλοι εμφανίστηκαν από τα άκρα των εκφύτων την 3^η περίπου εβδομάδα καλλιέργειας.

Αναγέννηση

Η σύσταση των καλλιεργητικών μέσων για την αναγέννηση ήταν ίδια με αυτή της καλλογένεσης αλλά αντί για 2,4-D και κινετίνη χρησιμοποιήθηκαν 1 μM NAA και 7.5 μM BA. Από τους κάλλους αφαιρούνταν τα καφέ νεκρά κομμάτια για να διατηρούνται νέοι. Η μεταφορά των κάλλων στα καλλιεργητικά μέσα αναγέννησης έγινε με λαβίδα

αποστειρωμένη με φλόγα μετά από εμβάπτιση σε αιθανόλη. Για την αποφυγή τραυματισμού του φυτικού ιστού η λαβίδα και το νυστέρι μετά την αποστείρωση βυθίζονται στο καλλιεργητικό μέσο για μείωση της θερμοκρασίας. Για την αναγέννηση χρησιμοποιήθηκαν πλήρως αναπτυγμένοι κάλλοι οι οποίοι τοποθετήθηκαν πάνω στα καλλιεργητικά μέσα εντός των δοχείων ιστοκαλλιέργειας για ένα μήνα σε θάλαμο (incubator), στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία 25 °C και στη συνέχεια αφέθηκαν σε έμμεσο (ανακλώμενο) φυσικό φωτισμό σε θερμοκρασία δωματίου. Βλαστοί εμφανίστηκαν την 2^η εβδομάδα μετά την έκθεση σε φυσικό φωτισμό.

Ριζοβολία

Αναγεννηθέντες πράσινοι βλαστοί μήκους 0.5-1 cm μεταφέρθηκαν σε ημιστερεά μέσα ριζοβολίας ίδιας σύστασης με αυτά της καλλογένεσης με τη διαφορά ότι από ορμόνες χρησιμοποιήθηκε μόνο NAA αντί για 2,4-D και κινετίνη. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικές συστάσεις με 1 mg/L NAA (5.4 μM), 0,5 mg/L NAA (2.7 μM), 0,25 mg/L NAA (1.35 μM) και 0 mg/L NAA, αντίστοιχα. Αποτελέσματα έδωσαν μόνο τα καλλιεργητικά μέσα της τέταρτης σύστασης, τα οποία δεν περιείχαν ορμόνες, με τις πρώτες ρίζες να εμφανίζονται στην 5^η περίπου εβδομάδα. Οι βλαστοί καλλιεργήθηκαν σε έμμεσο (ανακλώμενο) φυσικό φωτισμό σε θερμοκρασία δωματίου.

Καλλιέργεια παρουσία διαφόρων ουσιών

Καλλιέργεια παρουσία ενώσεων αναγωγικών ή με καρβονυλικές ομάδες

Τα καλλιεργητικά μέσα ήταν ίδιας σύστασης με αυτά της καλλογένεσης, αλλά προστέθηκε επιπλέον ποσότητα συγκέντρωσης 100 μM από διαφορετικές ουσίες σε κάθε καλλιεργητικό μέσο. Οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα χρησιμοποιήθηκαν ουσίες με καρβονυλικές ομάδες και συγκεκριμένα οι sodium pyruvate (πυρουβικό νάτριο), acetyl-salicylic acid (ακετυλοσαλικυλικό οξύ), lactic acid (λακτικό οξύ), emodin (εμοδίνη), Na oxalacetic acid (οξαλοξικό νάτριο), gossypolone (γοσσυπολόνη), PDC (διφαινυλκυκλοπροπενόνη), acetamine (ακεταμίνη) και methyl-glyoxal (μεθυλγλυοξάλη). Στη δεύτερη ομάδα χρησιμοποιήθηκαν αναγωγικές ουσίες, οι acetylcysteine

(ακετυλοκυστεΐνη), methylene blue (κυανούν του μεθυλενίου), NADPH, glutathione (γλουταθειόνη), 3-PGAD (3-φωσφογλυκεραλδεΐδη), DTT (διθειοθρεϊτόλη) και hydroquinone (υδροκουϊνόνη). Οι κάλλοι αναπτύχθηκαν στο σκοτάδι σε θάλαμο (incubator) σε θερμοκρασία 25 °C.

Καλλιέργεια παρουσία αργύρου

Χρησιμοποιήθηκαν καλλιεργητικά μέσα καλλογένεσης με προσθήκη ποσότητας νιτρικού αργύρου (AgNO₃) σε συγκεντρώσεις 100 μM και 500 μM. Οι κάλλοι αναπτύχθηκαν στο σκοτάδι σε θάλαμο (incubator) σε θερμοκρασία 25 °C.

Καλλιέργεια παρουσία σαλικυλικού οξέος

Χρησιμοποιήθηκαν καλλιεργητικά μέσα καλλογένεσης με προσθήκη ποσότητας σαλικυλικού οξέος σε συγκεντρώσεις 0,02 mM (20 μM) και 0,1 mM (100 μM). Οι κάλλοι αναπτύχθηκαν στο σκοτάδι σε θάλαμο (incubator) σε θερμοκρασία 25 °C.

2.2 Εκχύλιση ουσιών από τους φυτικούς ιστούς και προκαταρκτικός καθαρισμός με χρωματογραφία χάρτου

Εκχύλιση

Μέθοδος με νερό

Για την εκχύλιση ουσιών από τον φυτικό ιστό χρησιμοποιήσαμε δύο μεθόδους. Η πρώτη μέθοδος ήταν η μέθοδος του νερού. Αρχικά ο φυτικός ιστός ομογενοποιήθηκε σε 500 μl νερό μέσα σε σωλήνες μικροφυγοκέντρου και ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 12000 x g για 3 λεπτά. Στη συνέχεια προσθέσαμε 500 μl χλωροφόρμιο (CHCl₃) και μεταφέραμε την ανώτερη υδατική φάση σε νέο σωλήνα με χρήση πιπέτας ενώ η κατώτερη φάση απορρίφθηκε. Στο νέο σωλήνα προστέθηκαν 100 μl 30% υδροξειδίου του αμμωνίου (NH₄OH) και 500 μl χλωροφόρμιο. Η ανώτερη (υδατική) φάση μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα ενώ το υπόλοιπο απορρίφθηκε. Για όλες τις εκχυλίσεις χρησιμοποιήθηκαν κάλλοι 4 εβδομάδων περίπου, ζυγισμένοι σε ζυγαριά ακριβείας. Για

τις καλλιέργειες παρουσία σαλικυλικού οξέος και αργύρου χρησιμοποιήθηκαν κάλλοι από την αρχή της καλλιέργειας ως και την 5^η εβδομάδα ανάπτυξής τους με τις εκχυλίσεις να γίνονται στο τέλος της κάθε εβδομάδας. Οι σωλήνες με τις εκχυλισμένες ουσίες συντηρήθηκαν στην κατάψυξη μέχρι την ανάλυσή τους.

Εκχύλιση με αιθυλ-οξικό οξύ

Ο ιστός ομογενοποιήθηκε σε αιθυλοξικό οξύ / 5% HCl, 1/1. Μετά από φυγοκέντρηση παραλήφθηκε η άνω φάση στην οποία προστίθενται 1/8 του όγκου 2.5 M NaOH για αλκαλοποίηση και ένας όγκος νερού ακόμη. Τα τεταρτοταγή αλκαλοειδή παραλήφθηκαν με εκχύλιση με έναν όγκο χλωροφορμίου, φυγοκέντρηση για διαχωρισμό των φάσεων και παραλαβή της υδατικής (ανώτερης) φάσης.

Χρωματογραφία χάρτου

Για τη χρωματογραφία χρησιμοποιήθηκαν 20-30 μl από τα δείγματα της εκχύλισης με τα οποία διαβρέξαμε το χαρτί χρωματογραφίας Whatman 3mm Chr σε συγκεκριμένες θέσεις χωρίς να έρχονται σε επαφή μεταξύ τους οι κηλίδες που σχηματίστηκαν. Το χαρτί τοποθετήθηκε σχεδόν κάθετα μέσα σε δοχείο χρωματογραφίας μέσα στο οποίο είχε προηγουμένως προστεθεί η άνω φάση μίγματος βουτανόλης\οξικού οξέος\νερού σε αναλογία 4\1\5. Το χαρτί αφέθηκε στο δοχείο για 30 λεπτά και στη συνέχεια αφού στέγνωσε μεταφέρθηκε σε υπεριώδες φως 300 nm όπου είναι ορατές οι φθορίζουσες ουσίες. Για περαιτέρω χαρακτηρισμό των ουσιών, αυτές εκχυλίσθηκαν από το χαρτί με 50% v/v αιθανόλη και κατόπιν με νερό και αφέθηκαν σε ανοικτούς μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες για ξήρανση.

2.3 Φασματοσκοπία υπεριώδους

Στην φασματοσκοπία υπεριώδους χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο τύπου jasco v-630 biospectrophotometer. Μέσα στο θάλαμο που λειτουργούν οι λάμπες του φασματοφωτόμετρου συμπληρώθηκε το πρώτο δοχείο με αιθανόλη μέχρι την κορυφή και το δεύτερο μέχρι τελικού όγκου 500 μl. Από τις ρυθμίσεις μετρήθηκε η baseline και στη συνέχεια προστέθηκαν 10 μl από δείγμα εκχύλισης στο δεύτερο δοχείο. Το

φάσμα υπεριώδους της ουσίας μετρήθηκε με εντολή που δόθηκε από τις ρυθμίσεις. Μετά τη μέτρηση του φάσματος το διάλυμα του δεύτερου δοχείου απορρίφθηκε και το δοχείο καθαρίστηκε με αιθανόλη. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε δείγμα εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε

2.4 Ανάλυση των εκχυλισμάτων με φασματοσκοπία υπεριώδους, υγρή χρωματογραφία και φασματομετρία μαζών

Στη φασματοσκοπία υπεριώδους χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο τύπου Jasco v-630 Biospectrophotometer. Μέσα στο θάλαμο που λειτουργούν οι λάμπες του φασματοφωτόμετρου συμπληρώθηκε το πρώτο δοχείο με αιθανόλη μέχρι την κορυφή και το δεύτερο μέχρι τελικού όγκου 500 μl. Από τις ρυθμίσεις μετρήθηκε η baseline και στη συνέχεια προστέθηκαν 10 μl από δείγμα εκχύλισης στο δεύτερο δοχείο. Το φάσμα υπεριώδους της ουσίας μετρήθηκε με εντολή που δόθηκε από τις ρυθμίσεις. Μετά τη μέτρηση του φάσματος το διάλυμα του δεύτερου δοχείου απορρίφθηκε και το δοχείο καθαρίστηκε με αιθανόλη. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε δείγμα εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε.

Η χρωματογραφία υγρής φάσεως, συνδυασμένη με φασματοσκοπία μαζών (LC-MS) έγινε με χρήση οργάνου τύπου LCMS 2010EV Shimadzu στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ), υπό την εποπτεία του καθηγητή κ. Κ. Λίτινα. Η χρωματογραφική στήλη ήταν η Pathfinder silica 100, 3.5 μm αντιστρόφου φάσεως, διαστάσεων 4.6 x 150 mm. Η ρέουσα υγρή φάση ήταν 50% v/v μεθανόλη, 0,05% φορμικό οξύ σε νερό, κινούμενη με ταχύτητα 0,4 ml ανά λεπτό. Οι εξερχόμενες ουσίες ανιχνεύθηκαν από τις απορροφήσεις τους στο φάσμα των 190-800 nm, με χρήση ανιχνευτή SPD-M20A σειράς διόδων (diode array). Επίσης, υποβλήθηκαν σε φασματοσκοπία μαζών, των θετικών και αρνητικών ιόντων που προκύπτουν από ιονισμό με ηλεκτρονιο-ψεκασμό με δέσμη ηλεκτρονίων 1.4 kV, σε ατμόσφαιρα αζώτου ροής 1,5 λίτρων ανά λεπτό. Υπό τις συνθήκες αυτές διατηρούνται τα μοριακά ιόντα $(N+H)^+$ $(N+1)$, $(N+Na)^+$ $(N+23)$, καθώς και τα αρνητικά $(N-H)^-$ $(N-1)$.

3 Αποτελέσματα

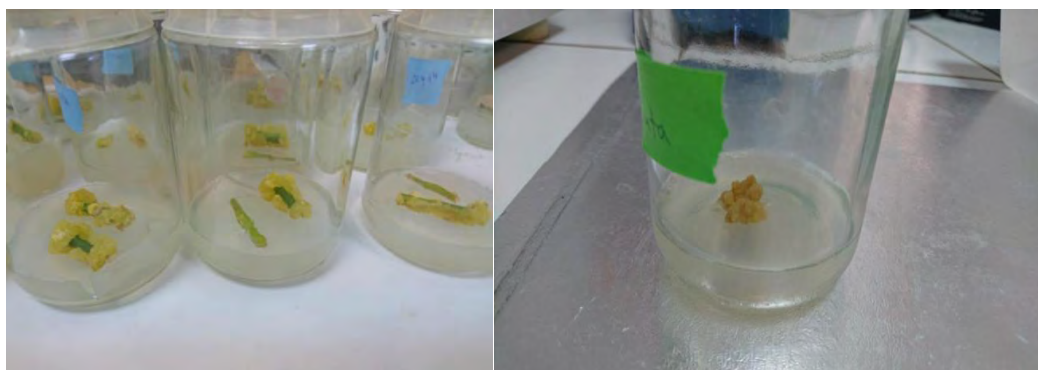
3.1 Ιστοκαλλιέργεια

Ο απήγανος (Εικόνα 1) είναι αειθαλές ποώδες φυτό, διαθέσιμο όλον τον χρόνο για έρευνα. Μίσχοι των φύλλων του χρησιμοποιήθηκαν σαν έκφυτα για την παραγωγή κάλλων.



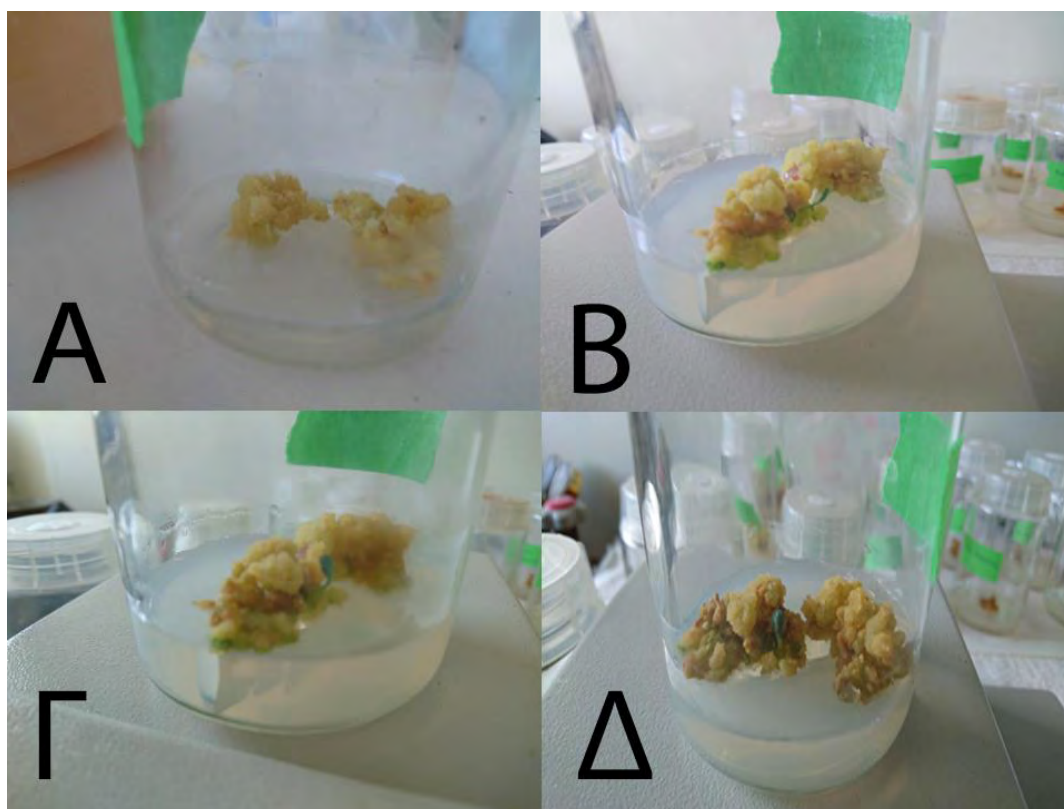
Εικόνα 1. Φωτογραφίες του φυτού *Ruta graveolens* (απήγανος), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην εργασία αυτή.

Για την καλλογένεση χρησιμοποιήθηκε καλλιεργητικό μέσο με συνδυασμό 4.5 μM 2,4-D και 2.3 μM κινητίνη. Σε παρόμοια πειράματα σε φυτό *Ruta graveolens* έχει αναφερθεί ότι μεγαλύτερα ποσοστά καλλογένεσης επιτυγχάνονται με τη χρήση αυξινών (Ahmad et al. 2010, Gurudeeban et al. 2012). Ωστόσο ο συνδυασμός αυξίνης και κυτοκινίνης που εφαρμόσαμε παρουσίασε θετικά αποτελέσματα με τους πρώτους κάλλους κιτρινωπού χρώματος να εμφανίζονται περίπου την 3^η εβδομάδα καλλιέργειας (Εικόνα 2). Περίπου το ίδιο χρονικό διάστημα (4 εβδομάδες) χρειάστηκε για την εμφάνιση κάλλων κατά την καλλογένεση σε προηγούμενο πείραμα σε *Ruta graveolens* (Gurudeeban et al. 2012).



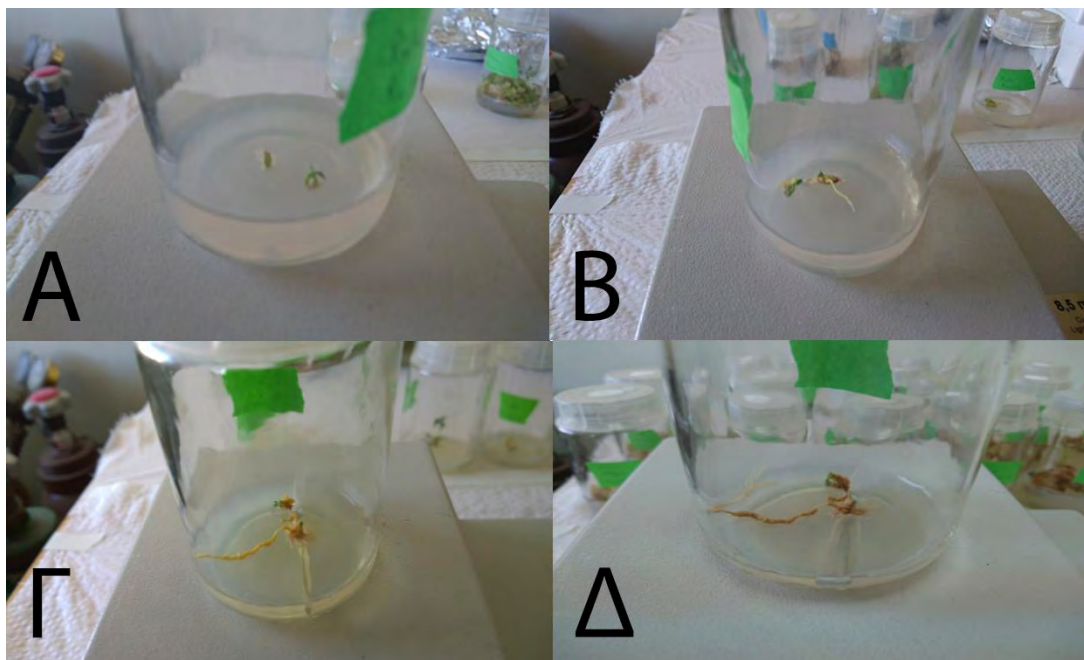
Εικόνα 2. Αριστερά: Κάλλοι του φυτού αναπτυχθέντες από μίσχους φύλλων μετά από τρεις εβδομάδες ιστοκαλλιέργειας. **Δεξιά:** Κάλλος μετά από μακροχρόνια ιστοκαλλιέργεια.

Η χρήση 1 μM NAA και 7,5 μM BA στο καλλιεργητικό μέσο αναγέννησης είχε θετική επίδραση στη δημιουργία βλαστών, οι οποίοι εμφανίστηκαν την πρώτη εβδομάδα που οι κάλλοι αφέθηκαν σε φυσικό φωτισμό (Εικόνα 3). Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με προηγούμενα πειράματα όπου οι ίδιες ποσότητες ορμονών παρουσίασαν τα μεγαλύτερα ποσοστά αναγέννησης (Ahmad et al. 2010).



Εικόνα 3. Αναγέννηση πράσινων βλαστών από κάλλους μετά από **A:** 1 εβδομάδα, **B:** 2 εβδομάδες, **Γ:** 3 εβδομάδες και **Δ:** 4 εβδομάδες ιστοκαλλιέργειας

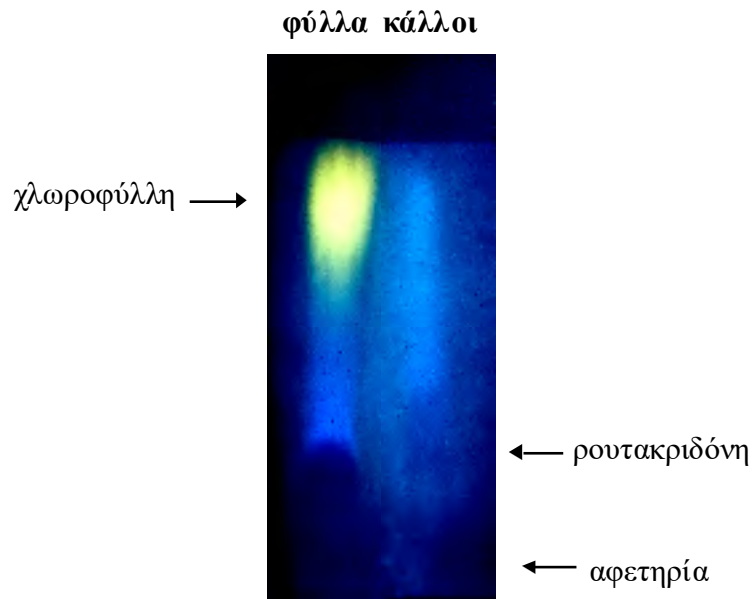
Στη ριζοβολία η χρήση ορμονών φάνηκε να παρεμποδίζει τον σχηματισμό ριζών. Συγκεκριμένα η χρήση διαφόρων ποσοτήτων της αυξίνης NAA δε διέγειρε την ανάπτυξη ριζών. Ρίζες σχηματίστηκαν την 5^η εβδομάδα σε καλλιεργητικό μέσο χωρίς ορμόνες (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Ανάπτυξη ριζών από βλαστούς *Ruta graveolens*, μετά από **A**: 1 εβδομάδα, **B**: 5 εβδομάδες, **Γ**: 10 εβδομάδες και **Δ**: 15 εβδομάδες ιστοκαλλιέργειας σε μέσα ριζοβολίας. Οι βλαστοί προήλθαν με αναγέννηση από κάλλους

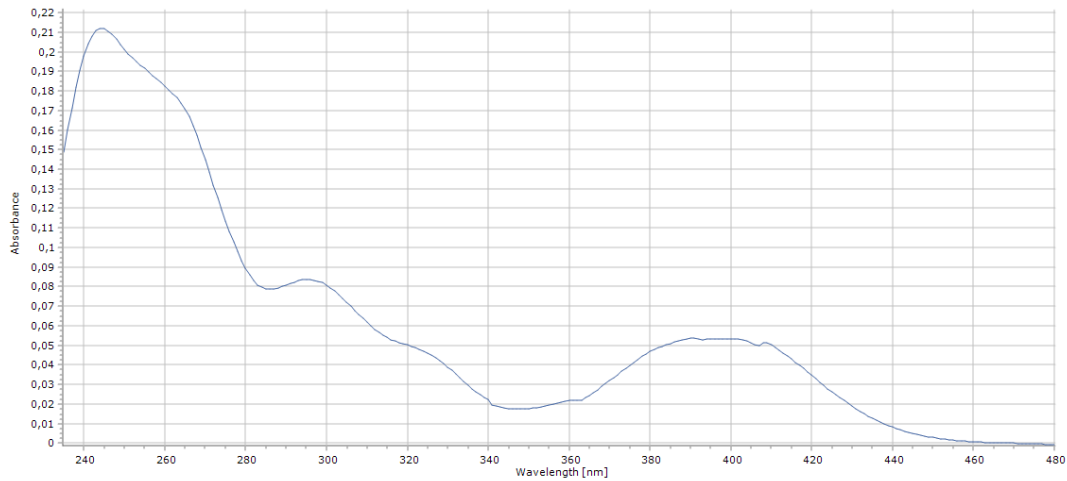
3.2 Απομόνωση δευτεροταγών μεταβολιτών

Τα εκχυλίσματα με νερό υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία χάρτου (Εικόνα 5). Ανιχνεύθηκαν διάφοροι φαινολικοί δευτεροταγείς μεταβολίτες από τον μπλέ φθορισμό τους ή σαν σκοτεινές κηλίδες στα 300 nm.



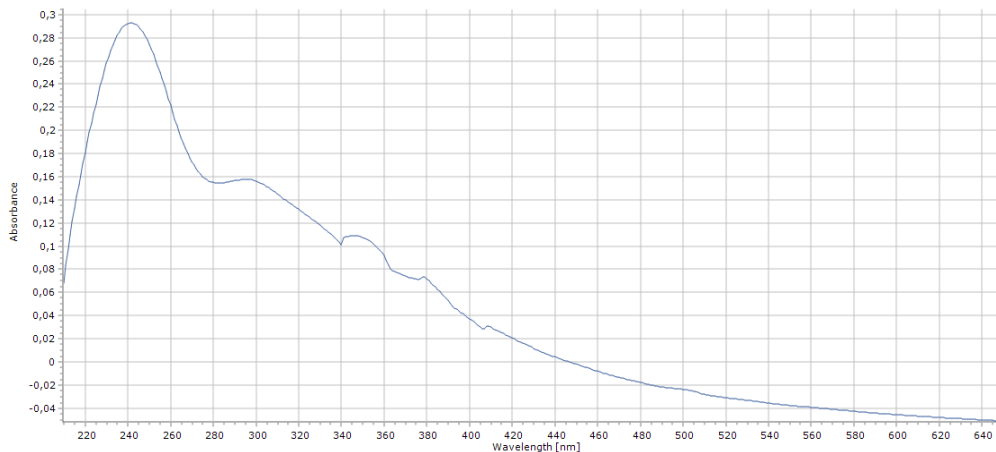
Εικόνα 5. Χρωματογραφία χάρτου εκχυλισμάτων από φύλλα (αριστερά) και κάλλους (δεξιά) προερχόμενοι από το φυτό *Ruta graveolens*. Το διάλυμα χρωματογραφίας ήταν βουτανόλη/οξικό οξύ/ νερό, 4/1/5. Μία φθορίζουσα έντονα μπλέ ουσία εμφανίζεται στο χαρτί, με $R_f = 0.3$ και στους δύο ιστούς. Άλλες ασθενέστερα φθορίζουσες ουσίες επίσης εμφανίζονται, οι οποίες όμως δεν αποτελούν την κύρια ουσία στα φύλλα.

Το φάσμα απορροφήσεων των ουσιών των εκχυλισμάτων από τους κάλλους και τα φύλλα του φυτού δίνονται στις εικόνες 6 και 7 αντίστοιχα. Παρατηρείται μία έντονη απορρόφηση στα 265 nm και στα 400 nm στο δείγμα από τους κάλλους που δεν απαντάται στα φύλλα. Με βάση αυτά, το σχετικό ποσό των δευτεροταγών μεταβολιτών με αρωματικό δακτύλιο θα μπορούσε να μετρηθεί από την απορρόφησή τους στα 260-275 nm και στα 280-300 nm.



Εικόνα 6. Φάσμα απορροφήσεων υπεριώδους του εκχυλίσματος από κάλλους *Ruta graveolens*. Παρατηρούνται μέγιστα απορρόφησης στα 245, 265, 290 και 390 nm.

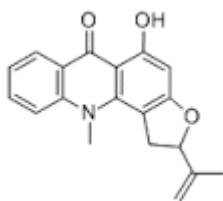
Φάσμα απορρόφησης υπεριώδους (UV) του εκχυλίσματος φύλλων *Ruta*



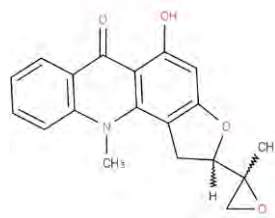
Εικόνα 7. Φάσμα απορροφήσεων υπεριώδους του εκχυλίσματος από φύλλα *Ruta graveolens*. Παρατηρούνται μέγιστα απορρόφησης στα 243 και 290 nm.

Χρήσιμοι δευτεροταγείς μεταβολίτες του φυτού είναι η ρουτακρινόνη και το εποξειδίο αυτής (Εικόνα 8). Το φάσμα απορρόφησης υπεριώδους της ρουτακρινόνης (Εικόνα 9) έχει ένα χαρακτηριστικό μέγιστο στα 275 nm.

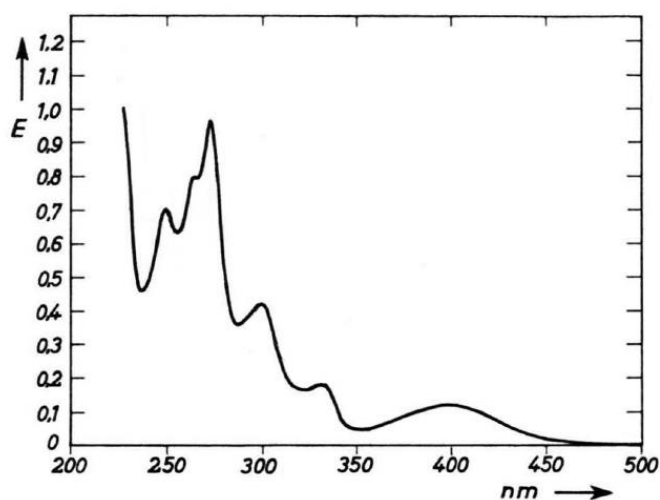
Rutacridone MW=307



Εποξειδίου ρουτακριδόνης MW=323

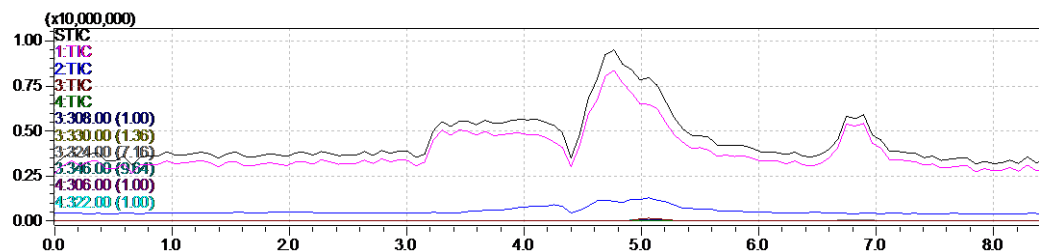


Εικόνα 8. Οι μοριακές δομές της ρουτακριδόνης και του εποξειδίου αυτής, οι οποίες είναι από τις σημαντικές ουσίες του *Ruta graveolens*.



Εικόνα 9. Φάσμα UV της ρουτακριδόνης. Παρατηρούνται μέγιστα απορρόφησης στα 400, 300, 275, 255 nm (Scharlemann 1972).

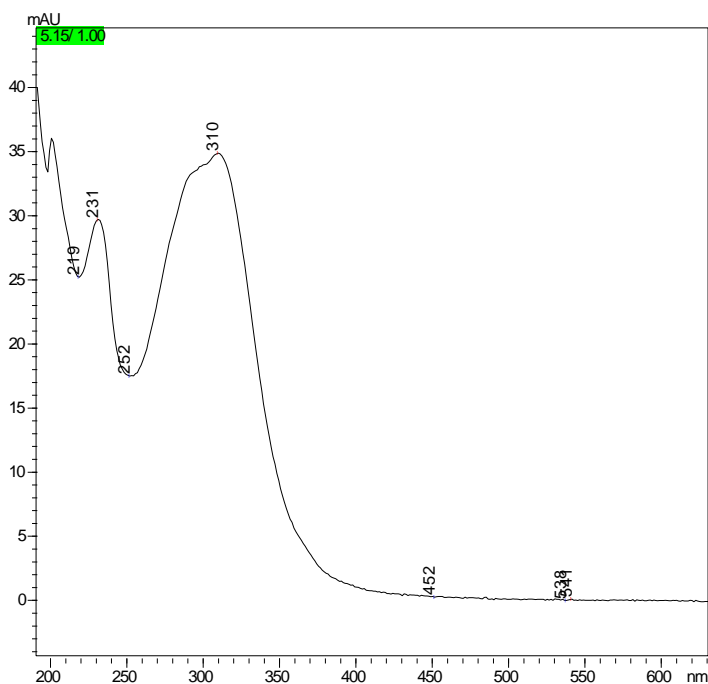
Υγρή χρωματογραφία του δείγματος δευτεροταγών μεταβολιτών του από κάλλους, πού απορροφούν υπεριώδες φως δίνεται στην εικόνα 10. Υπάρχουν τρεις ομάδες ουσιών πού εκλύονται από την στήλη χρωματογραφίας στα 3-4,4 min, 4,4-5,5 min και 6,6-7,2 min.



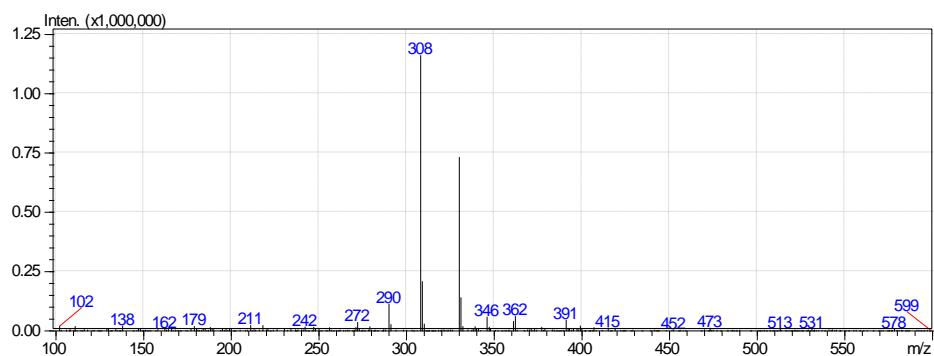
Εικόνα 10. Χρωματογράφημα (ολική ιονική ροή) υγρής χρωματογραφίας (LC) των δευτεροταγών φθοριζόντων μεταβολιτών του *Ruta graveolens*. Ανιχνεύονται ομάδες

ιόντων εκλύομενες της στήλης στις χρονικές περιόδους 3-4,4 min, 4,4-5,5 min και 6,6-7,2 min.

Το φάσμα υπεριώδους (Εικόνα 11) και το φάσμα μαζών (Εικόνα 12) των ουσιών που εκλύονται στα 5.1 min συμφωνούν με την μοριακή δομή της ρουτακριδόνης. Με βάση αυτά, η ρουτακριδόνη μπορεί να μετρηθεί από την απορρόφηση του δείγματος κοντά στα 300 nm.



Εικόνα 11. Φάσμα UV της κορυφής με χρόνο έκλυσης 5.1 min. Το μέγιστο της απορρόφησης στα 300-310 nm είναι παρόμοιο με αυτό της ρουτακριδόνης.



$[M+H]=308$

$[M+Na]=330$

Εικόνα 12. Φάσμα μαζών (MS) θετικών ιόντων της κορυφής στα 5.1 min. Ανιχνεύεται το ιόν της ρουτακριδόνης στα $307+H^+=308$ m/z και στα $307+Na^+=330$ m/z.

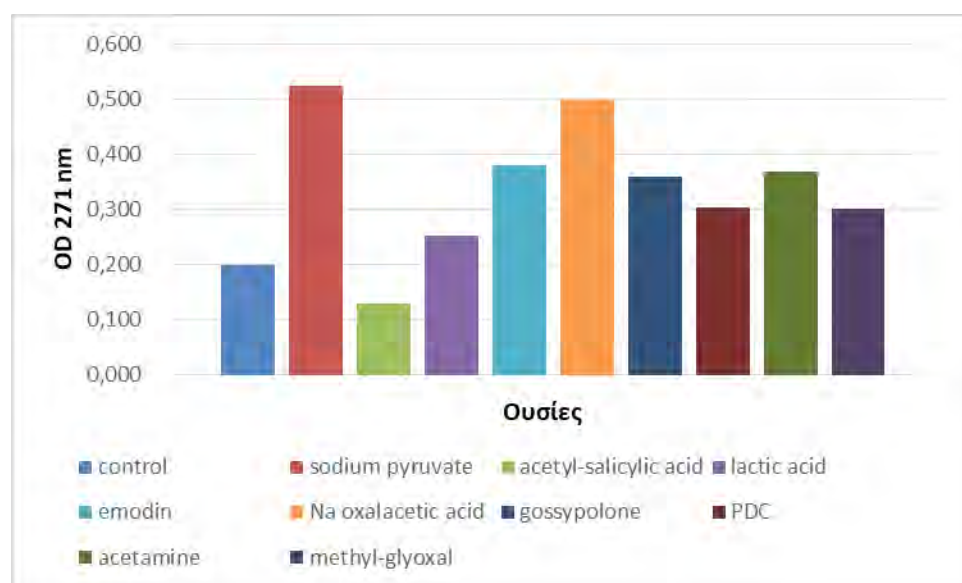
3.3 Επίδραση διαφόρων ουσιών στα ποσοστά ουσιών με αρωματικό δακτύλιο

Η απορρόφηση στα 271, 295 και 310 nm χρησιμοποιήθηκαν για σχετική σύγκριση των ποσών των δευτεροταγών μεταβολιτών μετά από την επίδραση διαφόρων αναγωγικών ή καρβονυλικών ενώσεων. Τα 245 nm, στα οποία υπάρχει επίσης μέγιστο απορρόφησης δεν χρησιμοποιήθηκαν διότι στην περιοχή αυτή απορροφούνται και άλλες ουσίες, όχι του δευτεροταγούς μεταβολισμού, πού δεν έχουν αρωματικό δακτύλιο. Οι μετρήσεις αφορούσαν το ποσό που εκχυλίστηκε με νερό ή με αιθυλοξικό οξύ από 0,1 γραμμάρια φρέσκου κάλλου. Στα εκχυλίσματα με νερό η απορρόφηση μετρήθηκε στα 271 και 310 nm, ενώ για τα εκχυλίσματα με αιθυλοξικό οξύ χρησιμοποιήθηκαν επίσης και τα 295 nm. Οι μετρήσεις καταχωρήθηκαν σε πίνακες (Πίνακες 1 έως 5) και χρησιμοποιήθηκαν για κατασκευή ραβδογράμματος (Διαγράμματα 1 έως 5).

Η πρώτη ομάδα των ουσιών που δοκιμάστηκαν για την επίδρασή τους στους δευτεροταγείς μεταβολίτες αποτελούνταν από τις παρακάτω ουσίες: πυρουβικό νάτριο (sodium pyruvate), ακετυλο-σαλικυλικό οξύ (acetyl-salicylic acid), λακτικό οξύ (lactic acid), εμοδίνη (emodin), οξαλοξικό νάτριο (Na oxalacetic acid), γοσσυπολόνη (gossypolone), PDC, ακεταμίνη (acetamine) και μεθυλγλυοξάλη (methyl-glyoxal). Στα εκχυλίσματα με νερό, εκτός του ακετυλο-σαλικυλικού οξέως, όλες οι άλλες εξωτερικές ουσίες αύξησαν το ποσό των φαινολικών πού απορροφούν στα 271, αλλά και στα 310 nm. Ιδιαίτερα έντονη ήταν η επίδραση των πυρουβικού και του οξαλοξικού νατρίου, τα οποία αύξησαν το ποσό των φαινολικών κατά 2-3 φορές. Όσον αφορά τα εκχυλίσματα με αιθυλοξικό οξύ, η απορρόφηση στα 271 nm ευνοείται από την γοσσυπολόνη και μερικώς από το πυρουβικό νάτριο, όχι όμως από το οξαλοξικό νάτριο. Ενδιαφέρουσα ήταν η μείωση πού παρατηρήθηκε στα 310 nm από την μεθυλγλυοξάλη.

Πίνακας 1. Απορρόφηση στα 271 nm εκχυλισμάτων με νερό από 0,1 g κάλλων *Ruta graveolens*, μετά την επίδραση διαφόρων ουσιών στους κάλλους. Οι συγκεντρώσεις των ουσιών στα καλλιεργητικά μέσα ήταν 100 μ M.

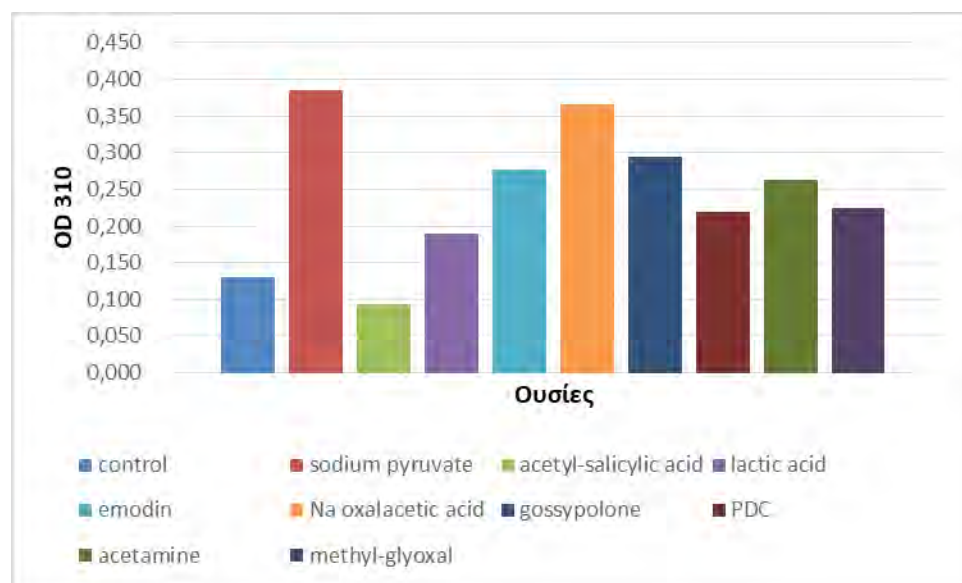
Ουσίες	OD 271 nm
Μάρτυρας (control)	0,200
Πυρουβικό νάτριο, Sodium pyruvate	0,526
Ακετυλο-σαλικυλικό οξύ, acetyl-salicylic acid	0,129
Λακτικό οξύ, Lactic acid	0,253
Εμοδίνη, emodin	0,382
Οξαλοξικό νάτριο, Na oxalacetic acid	0,500
Γοσσυπολόνη, gossypolone	0,361
Διφαινυλ-κυκλοπροπενόνη, PDC	0,305
Ακεταμίνη, acetamine	0,368
Μεθυλ-γλυοξάλη, methyl-glyoxal	0,303



Διάγραμμα 1. Σύγκριση της επίδρασης 100 μ M διαφόρων ουσιών στο σχετικό ποσό δευτεροταγών μεταβολιτών του *Ruta graveolens*. Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 271 nm, διαλύματος της ουσίας από 0.1 g κάλλων σε 25 ml αιθανόλης. Το πυρουβικό και το οξαλοξικό νάτριο είχαν την μεγαλύτερη επίδραση. Το ακετυλο-σαλικυλικό οξύ ελάττωσε το ποσό των ουσιών.

Πίνακας 2. Απορρόφηση στα 310 nm εκχυλισμάτων με νερό, από 0,1 g κάλλων *Ruta graveolens*. Οι συγκεντρώσεις των ουσιών στα καλλιεργητικά μέσα ήταν 100 μ M.

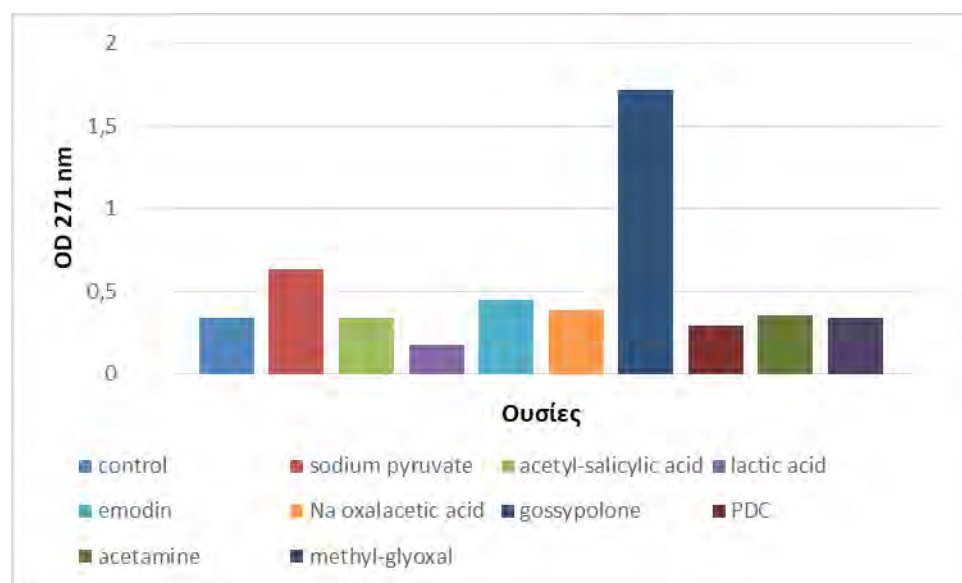
Ουσίες	OD 310 nm
control	0,130
Sodium pyruvate	0,386
acetyl-salicylic acid	0,094
Lactic acid	0,189
emodin	0,276
Na oxalacetic acid	0,367
gossypolone	0,295
PDC	0,220
acetamine	0,263
methyl-glyoxal	0,224



Διάγραμμα 2. Σύγκριση επίδρασης 100 μ M διαφόρων ουσιών στο σχετικό ποσό δευτεροταγών μεταβολιτών του φυτού *Ruta graveolens*. Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 310 nm, διαλύματος της ουσιών από 0.1 g κάλλων σε 25 ml αιθανόλης. Όπως και στην απορρόφηση στα 271 nm, το πυρουβικό και το οξαλοξικό νάτριο αύξησαν το ποσό των ουσιών, ενώ το ακετυλο-σαλικυλικό οξύ το μείωσε.

Πίνακας 3. Απορρόφηση στα 271 nm εκχυλισμάτων με αιθυλοξικό οξύ των ουσιών από 0.1 g κάλλων *Ruta graveolens*. Οι συγκεντρώσεις των ουσιών στα καλλιεργητικά μέσα ήταν 100 μΜ.

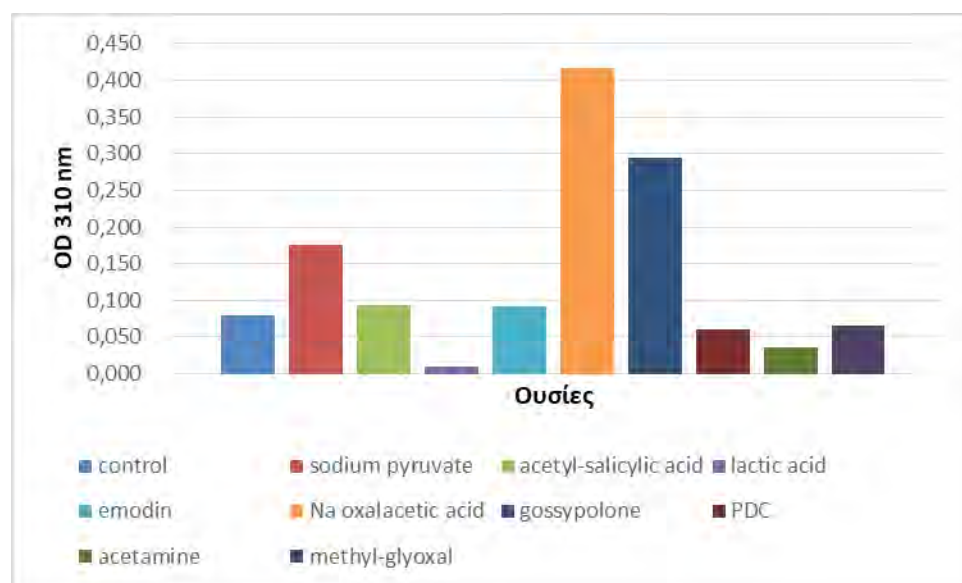
Ουσίες	OD 271 nm
control	0,337
Sodium pyruvate	0,632
acetyl-salicylic acid	0,341
Lactic acid	0,179
emodin	0,447
Na oxalacetic acid	0,383
gossypolone	1,721
PDC	0,293
acetamine	0,351
methyl-glyoxal	0,342



Διάγραμμα 3. Σύγκριση επίδρασης 100 μΜ διαφόρων ουσιών στο σχετικό ποσό δευτεροταγών μεταβολιτών του *Ruta graveolens*, με βάση την απορρόφηση στα 271 nm, διαλύματος ουσιών από 0.1 g κάλλων σε 25 ml αιθανόλης. Δεν παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης από την επίδραση του οξαλοξικού νατρίου, όπως με τα εκχυλίσματα με νερό. Αυτό δείχνει ότι το αιθυλοξικό οξύ εκχυλίζει άλλες ουσίες που επηρεάζονται μερικώς από το πυρουβικό νάτριο αλλά όχι και από το οξαλοξικό νάτριο.

Πίνακας 4. Απορρόφηση στα 310 nm εκχυλισμάτων με αιθυλοξικό οξύ φαινολικών από 0,1 g κάλλων *Ruta graveolens*. Οι συγκεντρώσεις των ουσιών στα καλλιεργητικά μέσα ήταν 100 μΜ.

Ουσίες	OD 310nm
control	0,080
Sodium pyruvate	0,175
acetyl-salicylic acid	0,094
Lactic acid	0,011
emodin	0,092
Na oxalacetic acid	0,417
gossypolone	0,295
PDC	0,061
acetamine	0,035
methyl-glyoxal	0,066

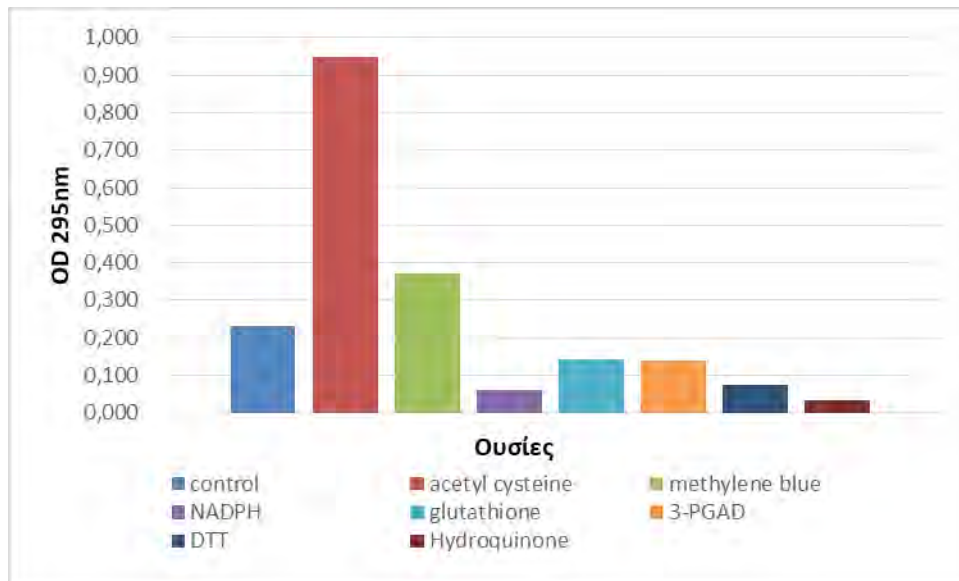


Διάγραμμα 4. Σύγκριση επίδρασης 100 μΜ διαφόρων ουσιών στο σχετικό ποσό δευτεροταγών μεταβολιτώντου *Ruta graveolens*, με βάση την απορρόφηση στα 310 nm, διαλύματος της ουσίας από 0.1 g κάλλων σε 25 ml αιθανόλης. Σε σύγκριση με το διάγραμμα 4, συμπεραίνεται ότι το αιθυλοξικό οξύ εξάγει από τον ιστό και μία ουσία που απορροφά περισσότερο στα 310 nm και της οποίας η σύνθεση ευνοείται από το οξαλοξικό νάτριο.

Η δεύτερη ομάδα των ουσιών που δοκιμάστηκαν αποτελούνταν από τις ουσίες ακετυλοκυστεΐνη (acetylcysteine), κυανούν του μεθυλενίου (methylene blue), NADPH, γλουταθειόνη (glutathione), 3-φωσφογλυκεραλδεΐδη (3-PGAD), διθειοθρεϊτόλη (DTT) και υδροκουϊνόνη (hydroquinone) και η εκχύλιση έγινε με αιθυλ-οξικό οξύ. Η απορρόφηση στα 295 nm είναι εντονότερη μετά την επίδραση της ακετυλο-κυστεΐνης και μερικώς από το κυανούν του μεθυλενίου (πίνακας 5 και διάγραμμα 5). Στα 310 nm αύξηση παρατηρήθηκε από το οξαλοξικό νάτριο, την γοσσυπολόνη και το πυρουβικό νάτριο. Ενδιαφέρουσα ήταν η μείωση που παρατηρήθηκε από τις αναγωγικές ουσίες NADPH, διθειοθρεϊτόλη και υδροκουϊνόνη.

Πίνακας 5. Απορρόφηση στα 295 nm εκχυλισμάτων με αιθυλοξικό οξύ δευτεροταγών μεταβολιτών από 0,1 g κάλλων *Ruta graveolens*. Οι συγκεντρώσεις των ουσιών στα καλλιεργητικά μέσα ήταν 100 μΜ.

Ουσίες	OD 295 nm
control	0,232
Ακετυλοκυστεΐνη acetylcysteine	0,947
Κυανούν του μεθυλενίου Methylene blue	0,371
NADPH	0,059
Γλουταθειόνη glutathione	0,141
3-φωσφογλυκεραλδεΐδη 3-PGAD	0,140
Διθειοθρεϊτόλη DTT	0,073
Υδροκουϊνόνη Hydroquinone	0,034



Διάγραμμα 5. Σύγκριση επίδρασης 100 μM διαφόρων ουσιών στο σχετικό ποσό δευτεροταγών μεταβολιτών του *Ruta graveolens*, με βάση την απορρόφηση στα 295 nm, διαλύματος της ουσίας από 0.1 g κάλλων σε 25 ml αιθανόλης. Η ακετυλοκυστεΐνη και το κυανούν του μεθυλενίου αύξησαν το ποσό των δευτεροταγών μεταβολιτών, ενώ όλα τα άλλα αντιδραστήρια το μείωσαν.

3.4 Επίδραση του νιτρικού αργύρου.

Τα σχετικά ποσά δευτεροταγών μεταβολιτών σε εκχυλίσματα κάλλων με νερό μετρήθηκαν από την απορρόφησή τους στα 273, 290 και 310 nm, τα οποία διαπιστώθηκε από το προηγούμενο πείραμα ότι ανταποκρίνονται με βέλτιστη ακρίβεια στις επιδράσεις εξωτερικών ουσιών.

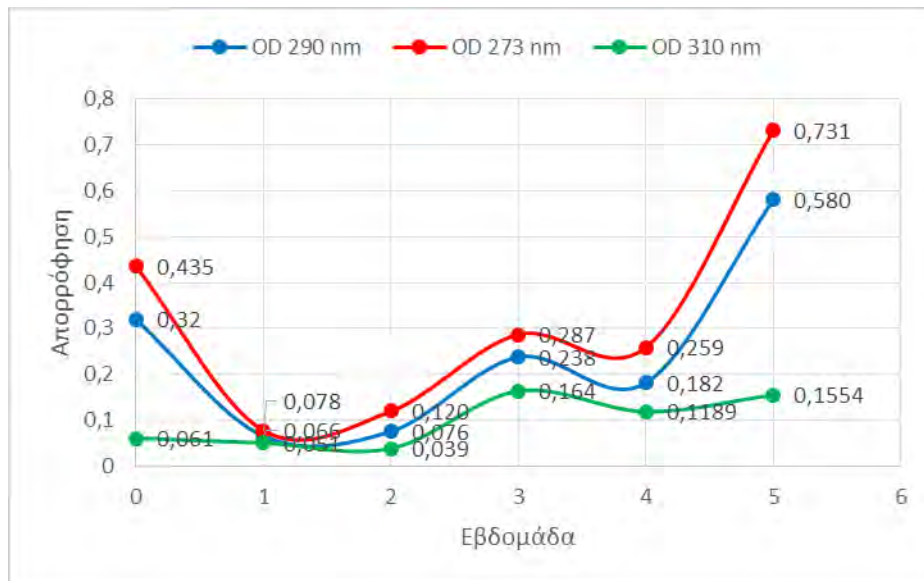
Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 6 και 7 καθώς και στα διαγράμματα 6 έως και 10. Και οι δύο συγκεντρώσεις νιτρικού αργύρου προκαλούν αρχικά σημαντική μείωση στο ποσό των δευτεροταγών μεταβολιτών που απορροφούν στα 271 και 290 nm για τις πρώτες 4 εβδομάδες της καλλιέργειας των κάλλων, ενώ κατόπιν σημειώνεται σημαντική αύξηση αυτών. Οι δευτεροταγείς μεταβολίτες όμως που απορροφούν στα 310 nm, πιθανότατα η ρουτακριδόνη, δείχνουν ελάχιστη μείωση για τις πρώτες δύο εβδομάδες και κατόπιν υπερδιπλασιασμό του ποσού τους.

Πιο συγκεκριμένα, ο AgNO_3 εφαρμόστηκε σε συγκεντρώσεις 100 και 500 μM (πίνακες 6 και 7). Οι παραπάνω συγκεντρώσεις γενικά δεν φάνηκε να επηρέασαν με κάποιο τρόπο την παραγωγή της ρουτακριδόνης, με βάση την απορρόφηση στα 273 και 290 nm, παρά μόνο μετά την 5^η εβδομάδα. Τις πρώτες 4 εβδομάδες παρατηρήθηκε

μείωση της απορρόφησης της ρουτακριδόνης σε σύγκριση με το control. Και στις δύο συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκαν παρατηρήθηκε μείωση στην απορρόφηση με τις χαμηλότερες τιμές να είναι αυτές της 1^{ης} και 2^{ης} εβδομάδας, ακολουθούμενες από μια σταδιακή αύξηση ως την 4^η εβδομάδα χωρίς όμως οι τιμές να ξεπερνούν την αρχική τιμή του control. Στην 5^η εβδομάδα ωστόσο υπάρχει μια ραγδαία αύξηση στις τιμές της απορρόφησης οι οποίες είναι περίπου διπλάσιες από τις αρχικές (διαγράμματα 6 και 7). Η συγκέντρωση των 100 μΜ στα 310 nm φαίνεται να μείωσε αρχικά την απορρόφηση τις 2 πρώτες εβδομάδες αλλά στην 3^η εβδομάδα πήραν τριπλάσια τιμή σε σύγκριση με την αρχική. Ακολουθεί μια ελαφριά μείωση στην 4^η εβδομάδα αλλά αυξάνεται πάλι την 5^η εβδομάδα στις υψηλές τιμές της 3^{ης}. Με την συγκέντρωση των 500 μΜ στα 310 nm παρατηρείται μια ελαφριά αύξηση τις 2 πρώτες εβδομάδες που γίνεται μεγαλύτερη την 3^η και 4^η εβδομάδα με την απορρόφηση να είναι 2,5 φορές υψηλότερη από την αρχική. Την 5^η εβδομάδα παρατηρείται μείωση της απορρόφησης, ωστόσο η τιμή της παραμένει υψηλότερη της αρχικής (διάγραμμα 8).

Πίνακας 6. Σχετικά ποσά δευτεροταγών μεταβολιτών σε 0,1 g κάλων *Ruta graveolens*, παρουσία 100 μΜ AgNO₃, μετρηθέντα με βάση την απορρόφηση στα 310, 290 και 273 nm διαλύματος της ουσίας σε 25 ml αιθανόλης.

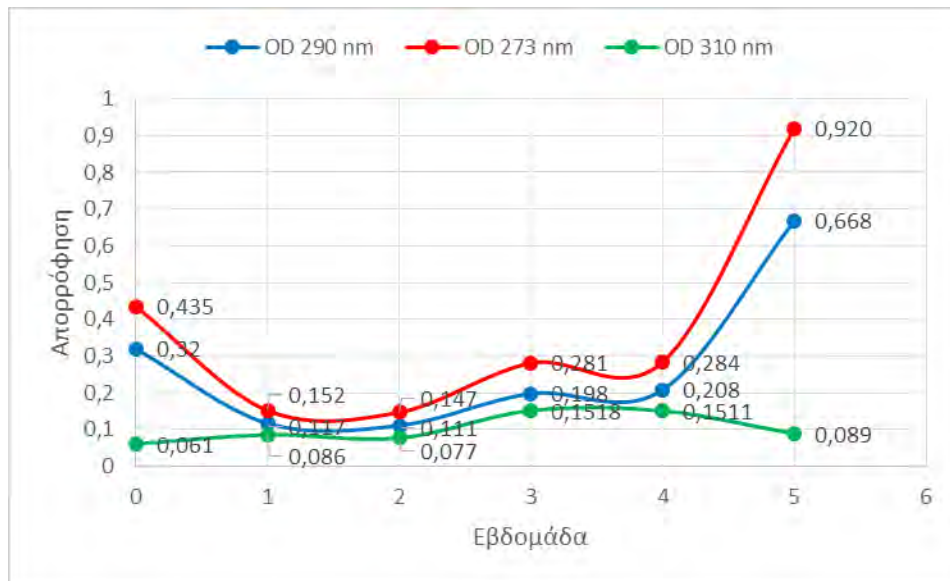
Εβδομάδες καλλιέργειας	OD 273 nm	OD 290 nm	OD 310 nm
0	0,435	0,32	0,061
1	0,078	0,066	0,051
2	0,120	0,076	0,039
3	0,287	0,238	0,164
4	0,259	0,182	0,1189
5	0,731	0,580	0,1554



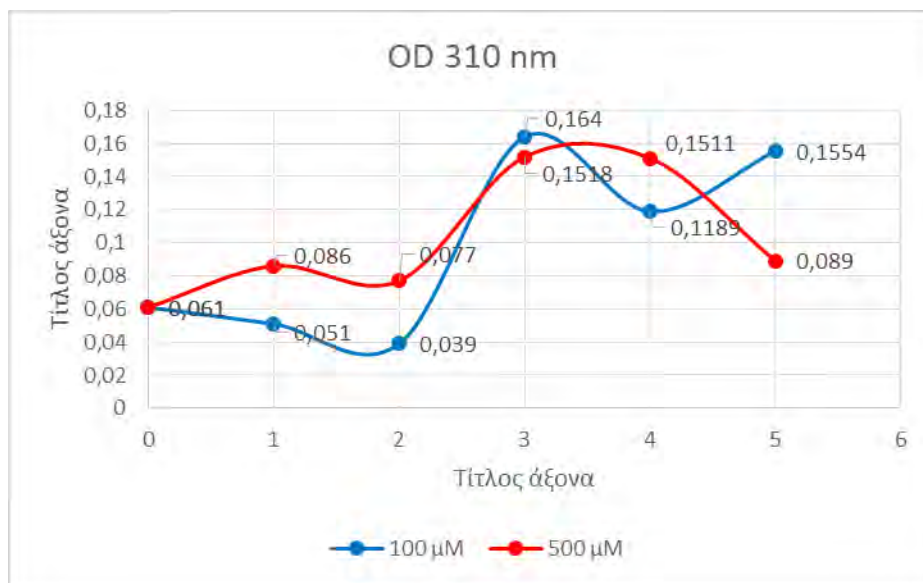
Διάγραμμα 6. Επίδραση 100 μM AgNO_3 στο σχετικό ποσό δευτεροταγών μεταβολιτών του *Ruta graveolens*, με βάση την απορρόφηση διαλύματος της ουσίας από 0.1 g κάλλων σε 25 ml αιθανόλης. Το ποσόν της ουσίας ελαττώνεται αρχικά για μία περίοδο τεσσάρων εβδομάδων και κατόπιν αυξάνει. Η απορρόφηση στα 310 nm δεν ακολουθεί το πρότυπο των καμπυλών στα 273 και 290 nm.

Πίνακας 7. Σχετικά ποσά δευτεροταγών μεταβολιτών σε 0,1 g κάλων *Ruta graveolens*, παρουσία 500 μM AgNO_3 , μετρηθέντα με βάση την απορρόφηση στα 310, 290 και 273 nm διαλύματος της ουσίας σε 25 ml αιθανόλης.

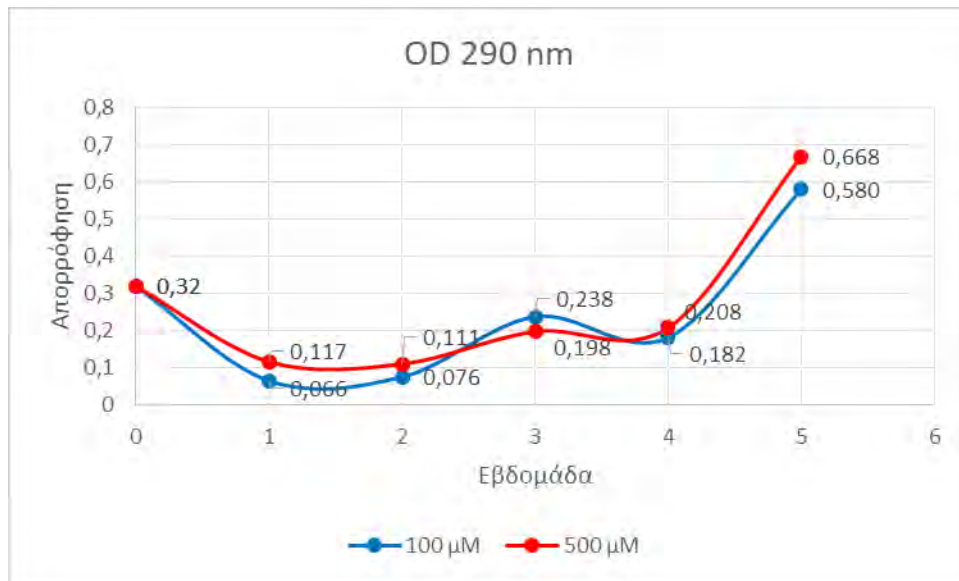
Εβδομάδες καλλιέργειας	OD 273 nm	OD 290 nm	OD 310 nm
0	0,435	0,32	0,061
1	0,152	0,117	0,086
2	0,147	0,111	0,077
3	0,281	0,198	0,1518
4	0,284	0,208	0,1511
5	0,920	0,668	0,089



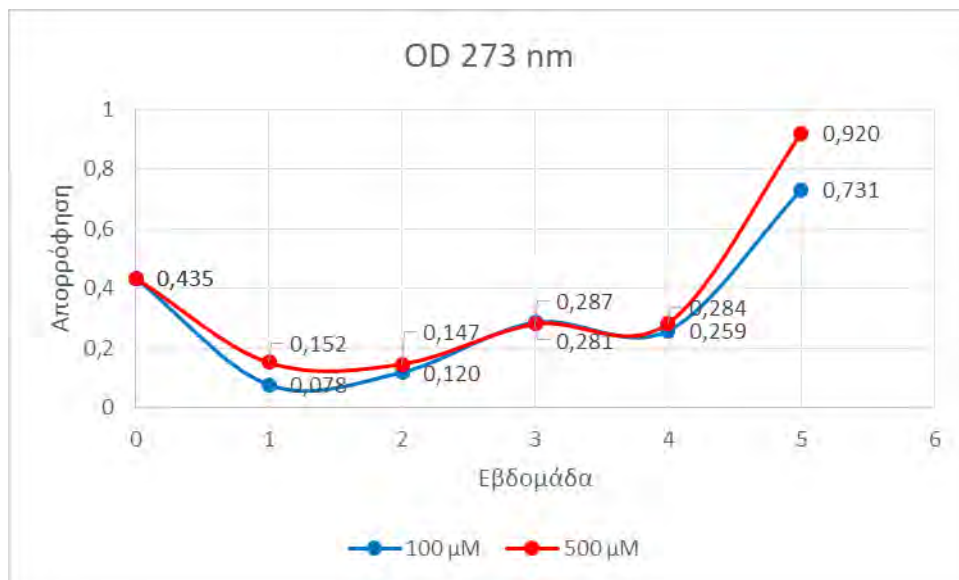
Διάγραμμα 7. Επίδραση 500 μM AgNO_3 στο σχετικό ποσό δευτεροταγών μεταβολιτών του *Ruta graveolens*, με βάση την απορρόφηση διαλύματος της ουσίας από 0,1 g κάλλων σε 25 ml αιθανόλης.



Διάγραμμα 8. Σύγκριση επίδρασης 100 και 500 μM AgNO_3 στο σχετικό ποσό δευτεροταγών μεταβολιτών του *Ruta graveolens*, με βάση την απορρόφηση στα 310 nm, διαλύματος του εκχυλίσματος από 0,1 g κάλλων σε 25 ml αιθανόλης. Το ποσό της ουσίας αυτής αυξάνεται με την επίδραση του νιτρικού αργύρου.



Διάγραμμα 9. Σύγκριση επίδρασης 100 και 500 μM AgNO_3 στο σχετικό ποσό δευτεροταγών μεταβολιτών του *Ruta graveolens*, με βάση την απορρόφηση στα 290 nm, διαλύματος του εκχυλίσματος από 0,1 g κάλλων σε 25 ml αιθανόλης. Η μικρότερη συγκέντρωση νιτρικού αργύρου είναι ελαφρώς πιο κατασταλτική.



Διάγραμμα 10. Σύγκριση επίδρασης 100 και 500 μM AgNO_3 στο σχετικό ποσό δευτεροταγών μεταβολιτών του φυτού *Ruta graveolens*, με βάση την απορρόφηση στα 273nm διαλύματος του εκχυλίσματος από 0,1 g κάλλων σε 25 ml αιθανόλης. Η μικρότερη συγκέντρωση νιτρικού αργύρου είναι ελαφρώς πιο κατασταλτική.

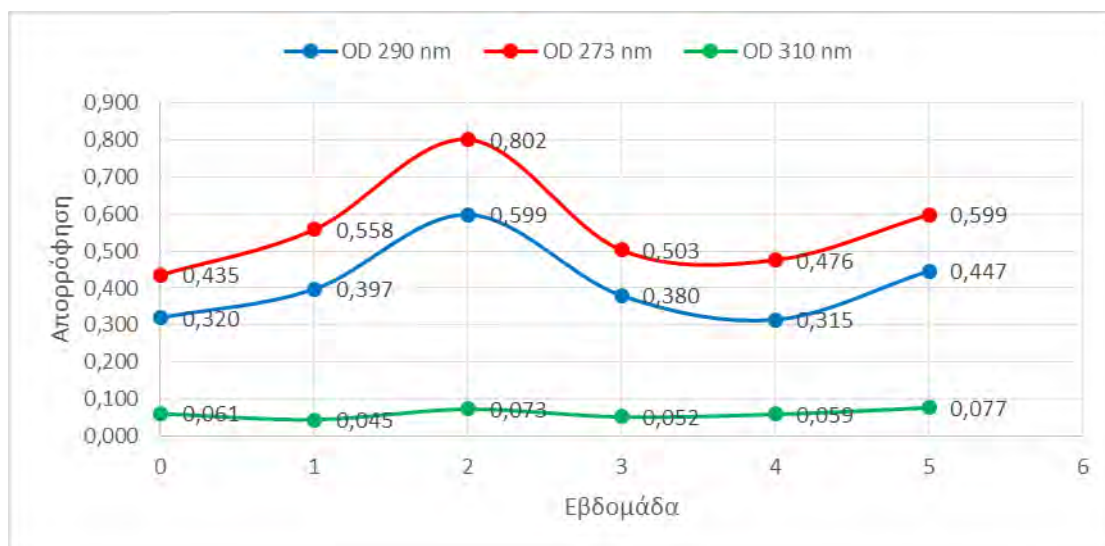
3.5 Επίδραση του σαλικυλικού οξέος

Η επίδραση του σαλικυλικού οξέος παρουσιάζεται στους πίνακες 8 και 9 καθώς και στα διαγράμματα 11 έως και 15. Για τις ουσίες που απορροφούν στα 271 και 290 nm τα αποτελέσματα είναι παρόμοια. Στη χαμηλότερη συγκέντρωση σαλικυλικού οξέος (20 μM) υπάρχει μία παροδική αύξηση των δευτεροταγών μεταβολιτών κατά την δεύτερη εβδομάδα της καλλιέργειας και ακολούθως η επίδραση αυτή σταδιακά εξασθενεί. Για την υψηλότερη συγκέντρωση των 100 μM σαλικυλικού οξέος (διαγράμματα 14 και 15) παρατηρείται αρχικά μία μικρή μείωση των δευτεροταγών μεταβολιτών μέχρι και την δεύτερη εβδομάδα της καλλιέργειας, που την ακολουθεί υπερδιπλασιασμός αυτών. Η ίδια τάση παρουσιάζεται και για τις ουσίες που απορροφούν στα 310 nm, μόνο που οι διακυμάνσεις είναι κατά πολύ ασθενέστερες (διάγραμμα 13).

Πιο συγκεκριμένα, το σαλικυλικό οξύ εφαρμόστηκε σε συγκεντρώσεις 0,02 και 0,1 mM (πίνακας 8). Η συγκέντρωση 0,02 mM σε όλα τα μήκη κύματος παρουσιάζει μια μικρή μείωση της απορρόφησης την 1^η εβδομάδα, που ακολουθείται από μια αύξηση την 2^η εβδομάδα με τις τιμές της να φτάνουν σε περίπου διπλάσια ποσά από αυτά της αρχικής. Την 3^η και 4^η εβδομάδα παρατηρείται μια μείωση στην απορρόφηση και οι τιμές της φτάνουν αυτές της αρχικής, ακολουθούμενες την 5^η εβδομάδα από μια ελαφριά αύξηση (διάγραμμα 11). Στα 310 nm, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα μήκη κύματος, οι τιμές της απορρόφησης ήταν πιο σταθερές και δεν παρουσίασαν τόσο μεγάλες αλλαγές σε σύγκριση με το control, ωστόσο ακολούθησαν το ίδιο μοτίβο (διάγραμμα 13). Η συγκέντρωση 0,1 mM σε όλα τα μήκη κύματος παρουσίασε μια μικρή μείωση στις τιμές της απορρόφησης τις 2 πρώτες εβδομάδες ωστόσο την 3^η εβδομάδα παρουσιάστηκε μια ραγδαία αύξηση με τις τιμές της να παίρνουν περίπου διπλάσιες τιμές σε σχέση με την αρχική και να παραμένουν στα ίδια υψηλά επίπεδα μέχρι και την 5^η εβδομάδα (διάγραμμα 12).

Πίνακας 8. Σχετικά ποσά δευτεροταγών μεταβολιτών σε 0,1 g κάλων *Ruta graveolens*, παρουσία 0,02 mM σαλικυλικού οξέος, με βάση την απορρόφηση στα 310, 290 και 273 nm της ουσίας σε 25 ml αιθανόλης.

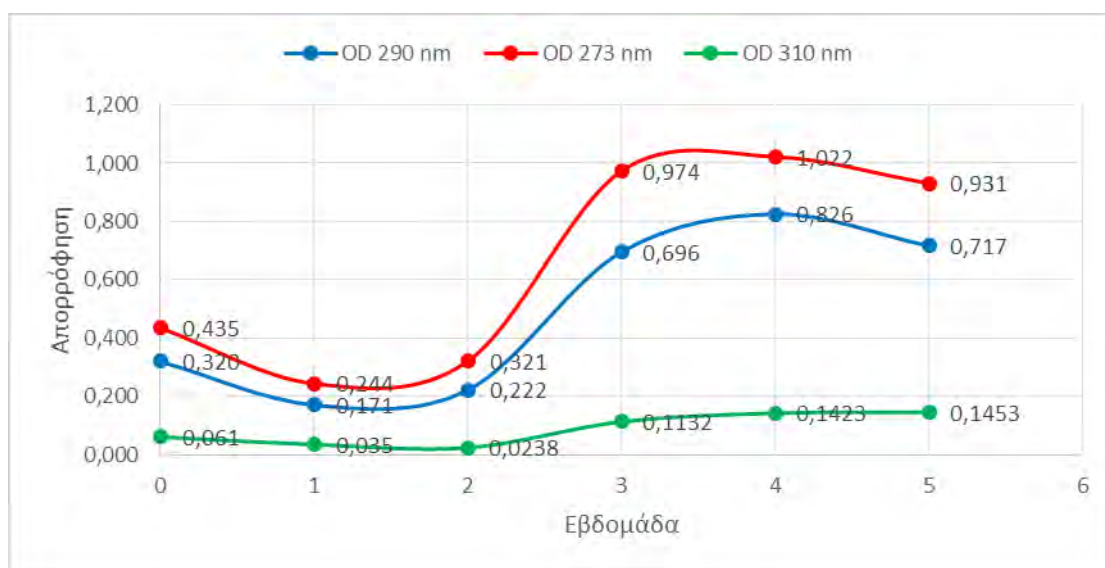
Εβδομάδες καλλιέργειας	OD 273 nm	OD 290 nm	OD 310 nm
0	0,435	0,320	0,061
1	0,558	0,397	0,045
2	0,802	0,599	0,073
3	0,503	0,380	0,052
4	0,476	0,315	0,059
5	0,599	0,447	0,077



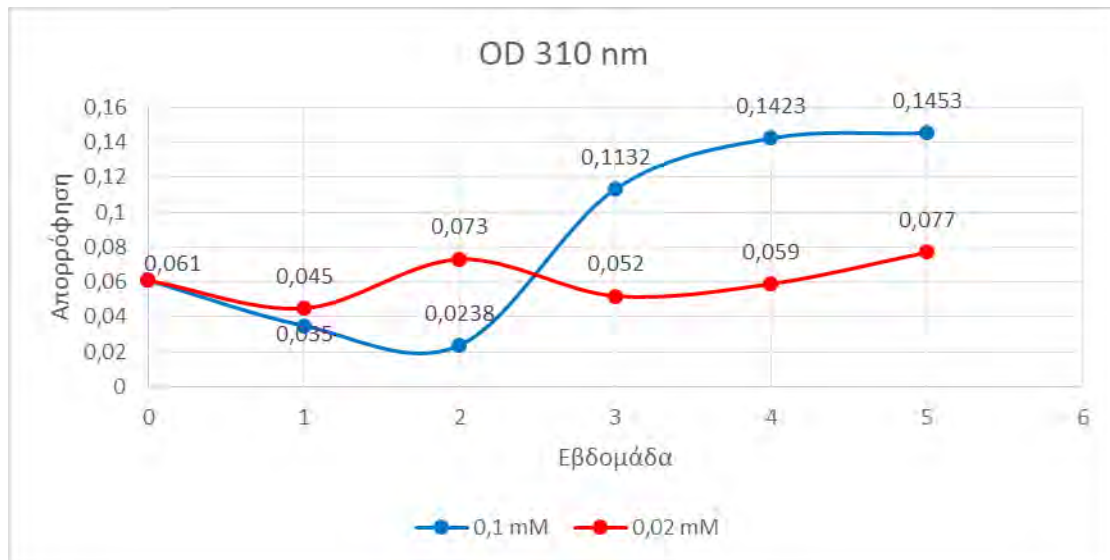
Διάγραμμα 11. Επίδραση 0,02 mM (20 μM) σαλικυλικού οξέος στο σχετικό ποσό δευτεροταγών μεταβολιτών του *Ruta graveolens*, με βάση την απορρόφηση διαλύματος της ουσίας από 0,1 g κάλων σε 25 ml αιθανόλης. Παρατηρείται σχετική άνοδος, κορυφούμενη κατά την δεύτερη εβδομάδα της καλλιέργειας των κάλων.

Πίνακας 9. Σχετικά ποσά δευτεροταγών μεταβολιτών σε 0,1 g κάλων *Ruta graveolens*, παρουσία 0,1 mM σαλικυλικού οξέος, με βάση την απορρόφηση στα 310, 290 και 273 nm της ουσίας σε 25 ml αιθανόλης.

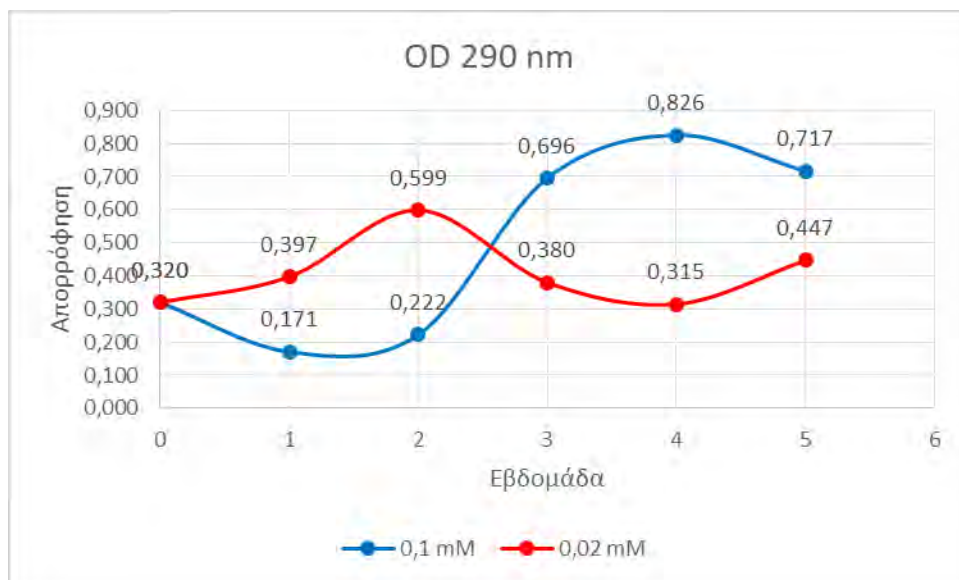
Εβδομάδες καλλιέργειας	OD 273 nm	OD 290 nm	OD 310 nm
0	0,435	0,320	0,061
1	0,244	0,171	0,035
2	0,321	0,222	0,0238
3	0,974	0,696	0,1132
4	1,022	0,826	0,1423
5	0,931	0,717	0,1453



Διάγραμμα 12. Επίδραση 0,1 mM (100 μM) σαλικυλικού οξέος στο σχετικό ποσό δευτεροταγών μεταβολιτών του *Ruta graveolens*, με βάση την απορρόφηση διαλύματος της ουσίας από 0,1 g κάλων σε 25 ml αιθανόλης. Στην υψηλότερη αυτή συγκέντρωση σαλικυλικού οξέος παρατηρείται μία αρχική μείωση στο ποσό της ρουτακριδόνης μέχρι την δεύτερη εβδομάδα της καλλιέργειας, ακολουθούμενη από μετέπειτα υπερδιπλασιασμό του ποσού.

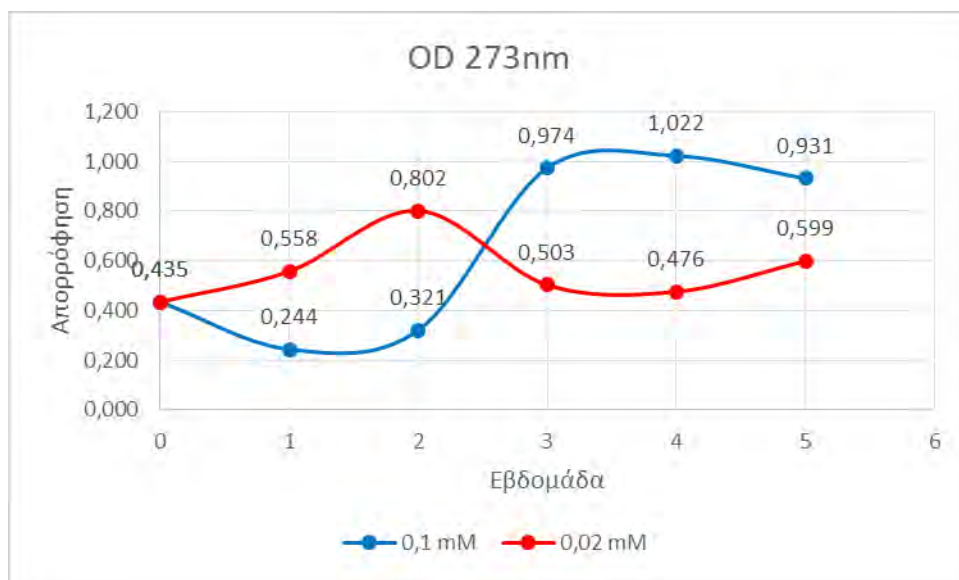


Διάγραμμα 13. Σύγκριση της επίδρασης 0,1 mM (100 μ M) και 0,02 mM (20 μ M) σαλικυλικού οξέος στο σχετικό ποσό δευτεροταγών μεταβολιτών του *Ruta graveolens*. Η σύγκριση έγινε με βάση την απορρόφηση στα 310 nm διαλύματος της ουσίας από 0,1 g κάλλων σε 25 ml αιθανόλης. Και στις δύο συγκεντρώσεις, η γενική μορφή της καμπύλης είναι ίδια με αυτή των απορροφήσεων στα 290 και 273 nm, αλλά με πολύ ασθενέστερες μεταβολές απορροφήσεων.



Διάγραμμα 14. Σύγκριση επίδρασης 0,1 και 0,02 mM σαλικυλικού οξέος στο σχετικό ποσό δευτεροταγών μεταβολιτών του *Ruta graveolens*. Η σύγκριση έγινε με βάση την απορρόφηση στα 290 nm διαλύματος της ουσίας από 0,1 g κάλλων σε 25 ml αιθανόλης. Είναι φανερό ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση παράγει μία αρχική φάση ελάττωσης του ποσού. Η μεγαλύτερη αύξηση στο ποσό δευτεροταγών μεταβολιτών παρατηρείται

κατά την δεύτερη εβδομάδα της καλλιέργειας όταν χρησιμοποιείται SA 20 μM . Η αύξηση είναι μεγαλύτερη όταν χρησιμοποιείται συγκέντρωση 100 μM και συμβαίνει κατά την τέταρτη εβδομάδα της καλλιέργειας.



Διάγραμμα 15. Σύγκριση επίδρασης 0,1 και 0,02 mM σαλικυλικού οξέος στο σχετικό ποσό δευτεροταγών μεταβολιτών του *Ruta graveolens*, με βάση την απορρόφηση στα 273 nm διαλύματος της ουσίας από 0,1 g κάλλων σε 25 ml αιθανόλης. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση SA παράγει μία αρχική μείωση του ποσού.

4. Συζήτηση

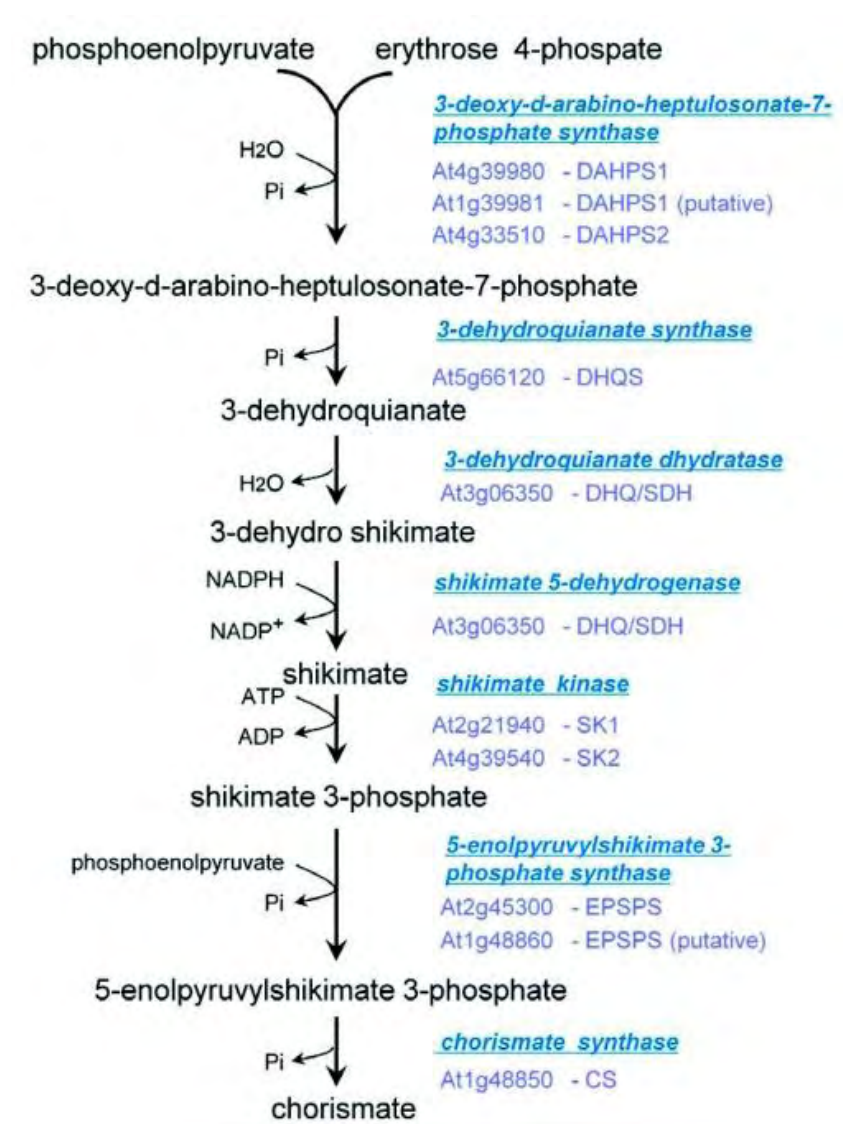
4.1 Ιστοκαλλιέργεια

Για την καλλογένεση χρησιμοποιήθηκε καλλιεργητικό μέσο με συνδυασμό 4.5 μM 2,4-D και 2.3 μM κινετίνη. Σε παρόμοια πειράματα στο φυτό *Ruta graveolens* έχει αναφερθεί ότι μεγαλύτερα ποσοστά καλλογένεσης επιτυγχάνονται με τη χρήση αυξινών (Ahmad et al. 2010, Gurudeeban et al. 2012). Ωστόσο ο συνδυασμός αυξίνης και κυτοκινίνης που εφαρμόσαμε παρουσίασε θετικά αποτελέσματα με τους πρώτους κάλλους κιτρινωπού χρώματος να εμφανίζονται περίπου την 3^η εβδομάδα καλλιέργειας. Περίπου το ίδιο χρονικό διάστημα (4 εβδομάδες) χρειάστηκε για την εμφάνιση κάλλων κατά την καλλογένεση σε προηγούμενο πείραμα σε φυτά *Ruta graveolens* (Gurudeeban et al. 2012). Η χρήση 1 μM NAA και 7,5 μM BA στο καλλιεργητικό μέσο αναγέννησης είχε θετική επίδραση στη δημιουργία βλαστών, οι οποίοι εμφανίστηκαν τη δεύτερη εβδομάδα που οι κάλλοι αφέθηκαν σε φυσικό φωτισμό. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με προηγούμενα πειράματα όπου οι ίδιες ποσότητες ορμονών παρουσίασαν τα μεγαλύτερα ποσοστά αναγέννησης (Ahmad et al. 2010).

Στη ριζοβολία, η χρήση διαφόρων ποσοτήτων της αυξίνης NAA δεν διέγειρε την ανάπτυξη ριζών, αντίθετα με τα αποτελέσματα άλλων πειραμάτων σε φυτά *Ruta graveolens* (Ahmad et al. 2010, Bohidar et al. 2013, Faisal et al. 2005). Οι ρίζες σχηματίστηκαν την 5^η εβδομάδα, σε καλλιεργητικό μέσο χωρίς ορμόνες και αυτή είναι η κύρια διαφορά μεταξύ των πειραμάτων μας και αυτών που έχουν δημοσιευθεί από άλλους ερευνητές. Σε προηγούμενα πειράματα παρατηρείται ότι όσο μειώνεται η συγκέντρωση NAA τόσο αυξάνεται το ποσοστό ριζοβολίας (Ahmad et al. 2010, Faisal et al. 2005), αλλά ποτέ κανείς δεν παρατήρησε ριζοβολία σε πλήρη απουσία ορμονών. Γενικώς, ο απήγανος ήταν ένα εύκολο υλικό για ανάπτυξη κάλλων και αναγέννηση φυτών από αυτούς.

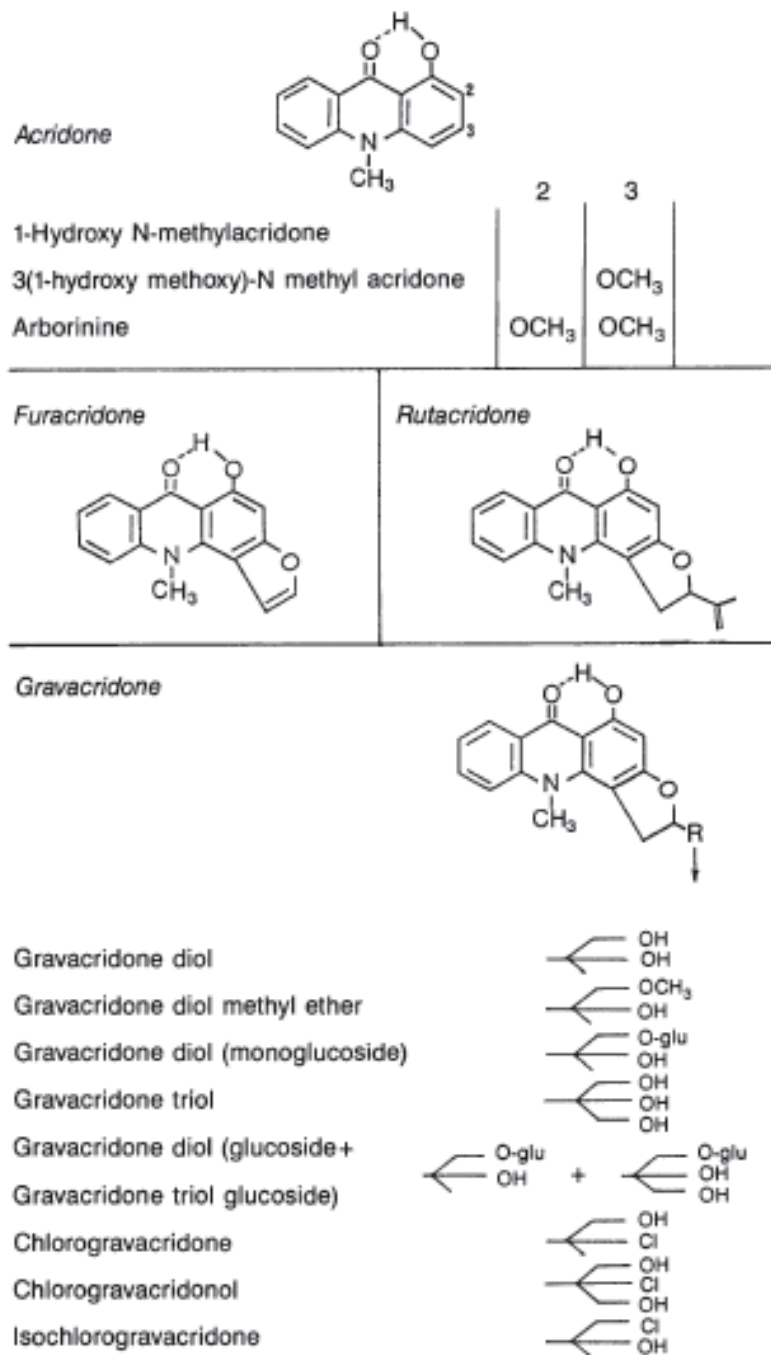
4.2 Επίδραση διαφόρων ουσιών στο ποσό των δευτεροταγών μεταβολιτών

Οι δευτεροταγείς μεταβολίτες περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τρεις κύριες ομάδες, τα φαινολικά, τα τερπενοειδή και τα αλκαλοειδή. Δευτεροταγείς μεταβολίτες που απορροφούν υπεριώδες φως πάνω από τα 260 nm είναι αυτοί που περιέχουν στην μοριακή δομή τους αρωματικό δακτύλιο. Αυτοί είναι κατά την μεγάλη των πλειονότητα φαινολικές ουσίες, και λιγότεροι είναι αλκαλοειδή, ενώ πολύ λίγοι είναι τερπενοειδή. Τα φαινολικά και τα αλκαλοειδή που απορροφούν υπεριώδες φως προέρχονται στην μεγάλη τους πλειονότητα από την βιοχημική οδό του σικιμικού οξέος (Εικόνα 18).

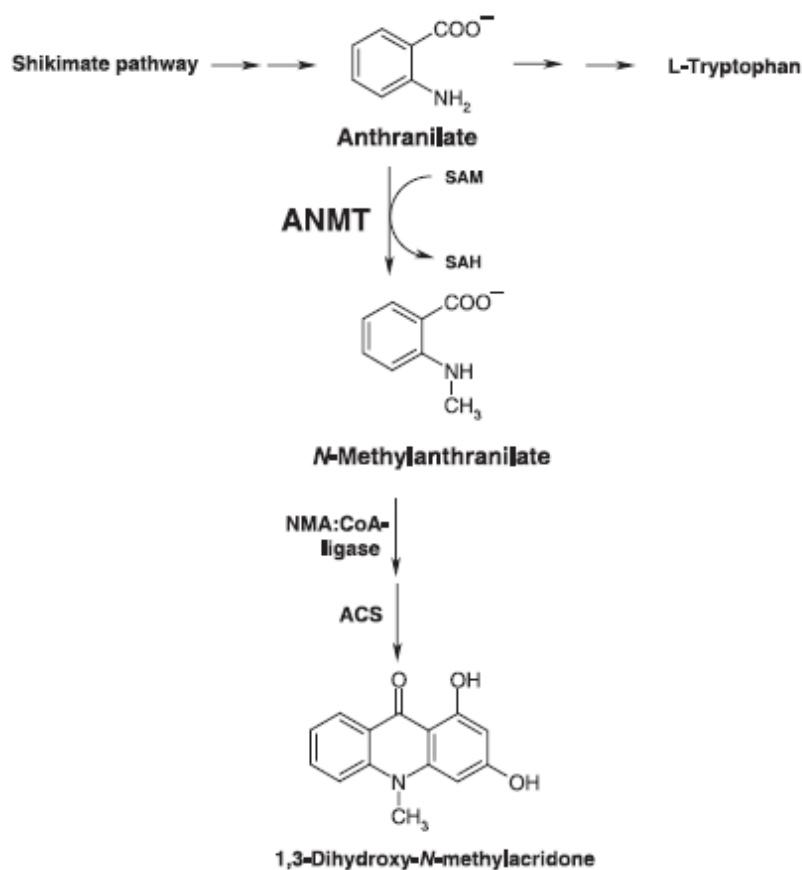


Εικόνα 18. Το βιοχημικό μονοπάτι του σικιμικού οξέος (Tzin et al. 2010). Με μπλε γράμματα εμφανίζονται τα ονόματα των ενζύμων που καταλύουν το αντίστοιχο βιοχημικό στάδιο. Το μονοπάτι καταναλώνει NADPH και ATP.

Στον απήγανο, κύριοι αρωματικοί δευτεροταγείς μεταβολίτες είναι οι φουρανοκουμαρίνες και οι φουρανοκουϊνολίνες (Ekiert and Kisiel 1997), οι οποίοι παράγονται μέσα από το μεταβολικό μονοπάτι του σικιμικού οξέως. Το φυτό περιέχει επίσης τα αλκαλοειδή ρουτακριδόνες, επίσης προερχόμενα από το μεταβολικό μονοπάτι του σικιμικού οξέως (Εικόνες 17 και 19). Η επίδραση επομένως του νιτρικού αργύρου και του σαλικυλικού οξέος, καθώς και άλλων χημικών παραγόντων στην περιεκτικότητα των αρωματικών ουσιών στους κάλλους του απήγανου θα πρέπει να εξηγηθεί από την επίδραση των αντιδραστηρίων αυτών συγκεκριμένο μεταβολικό μονοπάτι.



Εικόνα 17. Ακριδόνες που παράγονται από το φυτό *Ruta graveolens* (Βαζαϊ 1989).



Εικόνα 19. Μετατροπή του ανθρανιλικού οξέος σε διϋδροξυ-μεθυλ-ακριδόνη, η οποία μετατρέπεται κατόπιν σε διάφορες ακριδόνες (Rohde et al. 2007).

Ένας σχετικά γρήγορος τρόπος συγκριτικής μέτρησης των αρωματικών δευτεροταγών μεταβολιτών στον απήγανο είναι η καταγραφή του φάσματος απορροφήσεων στο υπεριώδες φως των εκχυλισμάτων από τον φυτικό ιστό και η εύρεση μερικών μηκών κύματος, όπου συμβαίνει μέγιστη απορρόφηση ή κοντά στην μέγιστη. Από το φάσμα μαζών (MS) θετικών ιόντων στα 5,1 min παρατηρούνται δύο κορυφές στα 308 και 330 m/z (εικόνα 12). Η ρουτακριδόνη έχει μοριακό βάρος 307 οπότε οι κορυφές εξηγούνται ως $307 + H^+ = 308$ m/z και $307 + Na^+ = 330$ m/z. Επιβεβαιώνεται έτσι πως μία από τις ουσίες του εκχυλίσματος φυτού *Ruta graveolens* είναι η ρουτακριδόνη. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με παρόμοιο πείραμα σε φυτά *Ruta graveolens* όπου επίσης αναφέρθηκε η ρουτακριδόνη ως κύρια ουσία του φυτού (Baumert et al. 1982). Όμως υπάρχουν και πολλές άλλες ουσίες που απορροφούν στο υπεριώδες φως.

4.3 Επίδραση διαφόρων ουσιών στην παραγωγή δευτεροταγών μεταβολιτών

Είναι αναμενόμενο ότι το πυρουβικό νάτριο θα επιτάχυνε την σύνθεση δευτεροταγών αρωματικών ουσιών διότι το πυρουβικό οξύ αποτελεί, μαζί με την 4-φωσφορική ερυθρόζη πρόδρομη ένωση με την οποία ξεκινά το μονοπάτι αυτό. Ο μηχανισμός όμως της δράσης του οξαλοξικού οξέως είναι λιγότερο σαφής. Το οξύ αυτό δεν συμμετέχει άμεσα στην σύνθεση δευτεροταγών μεταβολιτών, αλλά εύκολα μετατρέπεται εντός του κυτοπλάσματος σε πυρουβικό οξύ. Πιθανόν λοιπόν το ενισχυτικό αποτέλεσμα του οξαλοξικού νατρίου στην σύνθεση δευτεροταγών μεταβολιτών να είναι έμμεσο και να οφείλεται στην αυξημένη σύνθεση πυρουβικού οξέως.

Η κατασταλτική δράση του ακετυλοσαλικυλικού οξέως θα μπορούσε να εξηγηθεί από την μετατροπή του σε σαλικυλικό οξύ. Το σαλικυλικό οξύ συντίθεται επίσης από την οδό του σικιμικού οξέως και συγκεκριμένα από το ισοχορισμικό οξύ εντός των πλαστιδίων, αλλά η υπερβολική συγκέντρωσή του σταματά την λειτουργία της οδού αυτής (Serrano et al. 2013) και αναμενόμενα και την σύνθεση και των άλλων δευτεροταγών μεταβολιτών. Εκτός αυτού, το ακετυλοσαλικυλικό οξύ είναι αντιοξειδωτική ουσία (Saini et al. 1998) και είναι γνωστό ότι η οδός του σικιμικού οξέως επάγεται από το οξειδωτικό στρες (Tzin and Gallili 2010).

Η ρουτακριδόνη απορροφά μέγιστα στα 300-310 nm. Από το διάγραμμα φάσματος UV της ουσίας στα 5,1 min (εικόνα 11), που αποδείχτηκε ότι είναι η ρουτακριδόνη, παρατηρείται μέγιστο απορρόφησης στα 310 nm. Στην εκχύλιση με αιθυλοξικό οξύ παρατηρείται ότι στα 310 nm οι ουσίες γοσσυπολόνη και οξαλοξικό νάτριο προκάλεσαν υψηλότερη απορρόφηση σε σύγκριση με το control. Στα 271 nm το οξαλοξικό νάτριο αυξάνει ελάχιστα την απορρόφηση ενώ η ουσία γοσσυπολόνη προκαλεί την μεγαλύτερη αύξηση. Συμπεραίνεται ότι στα 271 nm υπάρχει κάποια επιπλέον ουσία, της οποίας η σύνθεση δεν επηρεάζεται από το οξαλοξικό νάτριο.

Η δεύτερη ομάδα των ουσιών που δοκιμάστηκαν αποτελούνταν από τις αναγωγικές ουσίες ακετυλοκουστεΐνη, κυανού του μεθυλενίου, NADPH, γλουταθειόνη, 3-φωσφογλυκεραλδεΐδη, διθειοθρεϊτόλη και υδροκουϊνόνη και η εκχύλιση έγινε με αιθυλοξικό οξύ. Η ακετυλοκουστεΐνη είχε επαγωγική δράση στην σύνθεση δευτεροταγών μεταβολιτών. Είναι ουσία η οποία απομακρύνει (ανάγει) τις ελεύθερες ρίζες. Την ίδια δράση έχει και η γλουταθειόνη, η οποία ελάττωσε μάλλον το ποσό των

δευτεροταγών μεταβολιτών, αν και μέσα στο κύτταρο παράγεται από την δράση της ακετυλοκουστεΐνης. Αυτό εξηγείται από το ότι η ακετυλοκουστεΐνη εισέρχεται εύκολα στα κύτταρα, ενώ η γλουταθειόνη δύσκολα (Witschi et al. 1992).

Όμως, οι ουσίες κυανούν του μεθυλενίου και ακετυλοκουστεΐνη αναφέρονται ως αντιοξειδωτικές και περιορίζουν το οξειδωτικό stress που προκαλείται λόγω των ενεργών ειδών οξυγόνου ή του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Aloni et al. 2010, Ishibashi et al. 2013, Pauw et al. 2004). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου ενεργοποιεί τους παράγοντες μεταγραφής ενζύμων που συμμετέχουν στο βιοχημικό μονοπάτι του σικιμικού οξέος (Moon et al. 2016). Το συγκεκριμένο μονοπάτι συνεισφέρει στην παραγωγή δευτεροταγών μεταβολιτών, οπότε η παρεμπόδιση του υπεροξειδίου του υδρογόνου λόγω των ουσιών αυτών θα έπρεπε τουλάχιστον να διατηρήσει τα ποσοστά δευτεροταγών μεταβολιτών σε επίπεδα περίπου ίσα με το control, σε αντίθεση με την αύξηση που παρατηρείται στα αποτελέσματά μας. Το κυανούν του μεθυλενίου μάλιστα αναφέρεται ότι σε συνθήκες φωτός παράγει μονήρες οξυγόνο (Halliwell και Gutteridge 1989), το οποίο μπορεί να δημιουργήσει συνθήκες οξειδωσης. Επομένως πρέπει να συμπεράνουμε ότι η δράση των αναγωγικών ουσιών δεν οφείλεται απλώς στην απομάκρυνση ελευθέρων ριζών και οξειδωτικού στρες, αλλά σε κάποια άλλη δράση που χρήζει διερεύνησης.

Εξετάζοντας τις μοριακές δομές των υπόλοιπων αναγωγικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν διαπιστώνουμε ότι δεν έχουν υδροθειομάδα (-SH) ή άλλες θειούχες ομάδες. Συμπεραίνεται ότι οι αναγωγή από θειούχες ομάδες επιτείνει την σύνθεση δευτεροταγών μεταβολιτών. Ένας τρόπος με τον οποίο θα μπορούσε να γίνει αυτό είναι με το να κρατούν σε ανηγμένη μορφή, και επομένως λειτουργικά, τα ένζυμα που εμπλέκονται στη οδό του σικιμικού οξέως.

4.4 Επίδραση νιτρικού αργύρου στην παραγωγή δευτεροταγών μεταβολιτών

Από προηγούμενα πειράματα σε ιστοκαλλιέργειες διαφόρων φυτών αναφέρεται ότι ο νιτρικός άργυρος βελτιώνει την αναγέννηση (Hayta et al. 2016, Palmer et al. 1992, Plus et al. 1993, Shah et al. 2014, Songstad et al. 1988, Uliiaie et al. 2008, Williams et al. 1990) καθώς και ότι παρεμποδίζει την δράση του αιθυλενίου (Knee et al. 1992, Kumar et al. 2007, Roustan et al. 1990). Αναφέρεται επίσης ότι ο νιτρικός άργυρος εκτός από

την μείωση της δράσης του εξωγενούς αιθυλενίου περιορίζει και τη βιοσύνθεσή του (Ruey-Song 1988). Το αιθυλένιο αυξάνει το ποσό του mRNA των ενζύμων φαινυλαλανίνη-αμμωνία λυάση, λιγάση 4-κουμαροϋλ-συνένζυμο α και συνθάση χαλκόνης που είναι μέρος του μονοπατιού σύνθεσης φαινολικών ουσιών (Ecker and Davis 1987).

Το αιθυλένιο αυξάνεται με τραυματισμούς στους ιστούς μαρουλιού και αυξάνει το ποσοστό του ενζύμου φαινυλαλανίνη-αμμωνία λυάση και των φαινολικών (Tomás-Barberán et al. 1997). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με τραυματισμό σε καρότα όπου εκτός από την αύξηση έκφρασης γονιδίων για σύνθεση φαινολικών ουσιών και λιγνίνης παρατηρήθηκε και αύξηση των ενζύμων συνθάση του 3-δεοξυ-D-αραβινο-επτουλοζανικού οξέος (3-deoxy-D-arabino-heptulosanate synthase) και συνθάση του 5-ενολπυρουβυλ-3-φωσφο-σικιμικού οξέος (5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase (Becerra-Moreno et al. 2015). Επιπλέον, τραυματισμοί σε πατάτα προκάλεσαν αύξηση του ενζύμου συνθάση 3-δεοξυ-D-5-φωσφο-αραβινοεπτουλοσονικού οξέος (3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase) (Dyer et al. 1989, Muday et al. 1992) ενώ σε *Arabidopsis* αυξήθηκε η έκφραση των γονιδίων των ενζύμων κινάση σικιμικού οξέως (shikimate kinase), 5-ενολπυρουβυλ-3-φωσφοσικιμικού οξέος (5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase) και συνθάσης χορισμικού οξέος (chorismate synthase) (Chen et al. 2006). Όλα τα παραπάνω ένζυμα συμμετέχουν στο βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης σικιμικού οξέος από το οποίο προέρχεται η πλειονότητα των ουσιών με αρωματικούς δακτυλίους.

Οι συγκεντρώσεις νιτρικού αργύρου που εφαρμόσαμε (100 και 500 μM) φαίνεται γενικά να καταστέλλουν την παραγωγή των δευτεροταγών μεταβολιτών τις 4 πρώτες εβδομάδες. Αυτή η καταστολή ίσως οφείλεται στην ικανότητα του αργύρου να παρεμποδίζει τη δράση του αιθυλενίου. Η θεωρία αυτή και τα αποτελέσματά μας φαίνεται να συμφωνούν με αυτά από προηγούμενο πείραμα σε κάλλους *Pennisetum glaucum* όπου μετρήθηκε η παραγωγή αιθυλενίου για 40 ημέρες υπό την επίδραση νιτρικού αργύρου σε διάφορες συγκεντρώσεις και παρατηρήθηκε ότι οι συγκεντρώσεις 117,7 και 294,3 μM παρουσίασαν λιγότερη έκλυση αιθυλενίου σε σύγκριση με το control τις πρώτες 30 ημέρες αλλά στις 40 φαίνεται να είναι η ίδια τόσο στο control όσο και στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (Plus et al. 1993). Στο πείραμά μας μέχρι και την 4^η εβδομάδα (28) ημέρες παρατηρείται χαμηλότερο ποσό δευτεροταγών μεταβολιτών, που οφείλεται στην καταστολή του αιθυλενίου και επομένως υπάρχει ίσως καταστολή και κάποιων γονιδίων που εκφράζουν ένζυμα τα οποία συμμετέχουν

στη βιοχημική οδό του σικιμικού οξέος. Την 5^η εβδομάδα η αύξηση της απορρόφησης ίσως οφείλεται στη λήξη της επίδρασης του νιτρικού αργύρου και στην έκφραση των παραπάνω γονιδίων.

4.5 Επίδραση σαλικυλικού οξέος στην παραγωγή δευτεροταγών μεταβολιτών

Το σαλικυλικό οξύ έχει χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενα πειράματα σε συγκεντρώσεις παρόμοιες με αυτές που χρησιμοποιήσαμε. Σε καλλιέργεια ριζικού συστήματος του *Scopolia parviflora* αναφέρεται ότι συγκεντρώσεις 0,01 και 1 mM αύξησαν τα ποσοστά σκοπολαμίνης η οποία είναι αλκαλοειδές (Kang et al. 2004), ενώ σε καλλιέργεια ριζικού συστήματος του *Datura metel* η συγκέντρωση 0,5 mM αύξησε την σκοπολαμίνη σε ποσοστά 4 φορές περισσότερο από το control (Ajungla et al. 2009). Το σαλικυλικό οξύ φαίνεται να αυξάνει τα ποσοστά φαινολικών (Cincosz et al. 2016, Faried et al. 2017) αλλά αναφέρεται επίσης ότι αυξάνει και τη δραστηριότητα των ενζύμων λυάση φαινυλαλανίνης-αμμωνίας (PAL, phenylalanine ammonia-lyase), λυάση τυροσίνης-αμμωνίας (tyrosine ammonia-lyase) (Abbaspour et al. 2016) αλλά και της αμινοτρανσφεράσης της τυροσίνης (tyrosine aminotransferase) (Li et al., 2016), τα οποία σχετίζονται με την βιοχημική οδό του σικιμικού οξέος. Το σαλικυλικό οξύ αυξάνει τα ποσοστά υπεροξειδίου του υδρογόνου (Hao et al. 2014), το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί τους παράγοντες μεταγραφής των ενζύμων αφυδρογονάση του σικιμικού οξέως (shikimate dehydrogenase) και κινάση του σικιμικού οξέως (shikimate kinase), τα οποία συμμετέχουν στο βιοχημικό μονοπάτι του σικιμικού οξέος (Moon et al. 2016).

Με τον ίδιο τρόπο φαίνεται να δρα στο πείραμά μας το σαλικυλικό οξύ προκαλώντας παροδική αύξηση των δευτεροταγών μεταβολιτών σε ποσοστά διπλάσια περίπου από αυτά του control περί την 2^η εβδομάδα με τη χαμηλότερη συγκέντρωση των 0,02 mM σαλικυλικού οξέος. Η παροδική αυτή αύξηση των δευτεροταγών μεταβολιτών συμβαίνει αργότερα, την 4^η εβδομάδα και μετά από μία παροδική μείωση των μεταβολιτών, όταν χρησιμοποιήθηκε υψηλότερη συγκέντρωση σαλικυλικού οξέος (0,1 mM). Θα μπορούσε αυτό ίσως να οφείλεται σε κάποια αρχική τοξική ενέργεια της υψηλότερης συγκέντρωσης, η οποία παρέρχεται καθώς το σαλικυλικό οξύ μεταβολίζεται.

5. Συμπέρασμα

Ο νιτρικός άργυρος και το σαλικυλικό οξύ έχουν αντίθετο αποτέλεσμα στην σύνθεση δευτεροταγών μεταβολιτών με αρωματικό δακτύλιο του φυτού απήγανος. Ο νιτρικός άργυρος αρχικά καταστέλλει την σύνθεση δευτεροταγών μεταβολιτών, ενώ το σαλικυλικό οξύ αρχικά την αυξάνει, σύμφωνα με την κατασταλτική δράση του πρώτου και την επαγωγική δράση του δευτέρου στη δημιουργία ελευθέρων ριζών και ενεργών ειδών οξυγόνου. Αύξηση σημαντική όμως παρατηρείται και από την παρουσία θειούχων αναγωγικών ουσιών, οι οποίες αναμένονταν να ελαττώσουν το ποσό των ελευθέρων ριζών, πού υποδηλώνει ότι η ενεργητικότητα της βιοχημικής οδού σύνθεσης των δευτεροταγών μεταβολιτών δεν εξαρτάται μόνο από την παρουσία οξειδωτικής καταπόνησης και ελευθέρων ριζών. Θα ήταν ενδιαφέρον να εξετασθεί η επίδραση των ουσιών αυτών στην *in vitro* ισορροπία αντιδράσεων ελευθέρων ριζών. Είναι γνωστό ότι και το αιθυλένιο και το ακετυλο-σαλικυλικό οξύ επάγουν τη δημιουργία ελεύθερων ριζών. Οι κάλλοι έχουν γενικώς λιγότερες ελεύθερες ρίζες από ότι τα άθικτα φυτά και αυτό θα εξηγούσε ίσως και το μικρότερο ποσό δευτεροταγών μεταβολιτών στους κάλλους. Θα ήταν επομένως ενδιαφέρον, για να επιβεβαιώσουμε τον κεντρικό ρόλο των ελεύθερων ριζών στη σύνθεση δευτεροταγών μεταβολιτών να εξεταστεί η δράση ουσιών που δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες σε άθικτα φυτά.

6. Βιβλιογραφία

- Abbaspour J, Ehsanpour A. 2016. The impact of salicylic acid on some physiological responses of *Artemisia aucheri* Boiss. under in vitro drought stress. *Acta Agriculturae Slovenica* 107(2):287-298.
- Ahmad N, Faisal M, Anis M, Aref IM. 2010. In vitro callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Ruta graveolens* L. *South African Journal of Botany* 76(3):597-600.
- Ajungla L, Patil PP, Barmukh RB, Nikam TD. 2009. Influence of biotic and abiotic elicitors on accumulation of hyoscyamine and scopolamine in root cultures of *Datura metel* L. *Indian Journal of Biotechnology* 8(3):317-322.
- Al-Ajlouni ZI, Abbas S, Shatnawi M, Al-Makhadmeh I. 2015. In vitro propagation, callus induction, and evaluation of active compounds on *Ruta graveolens*. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 13(2):101-106.
- Aloni B, Karni L, Aktas H. 2010. Methylene blue increases the tolerance of tomato plants to abiotic stresses. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 85(5):387-393
- Bajaj YPS. 1989. Medicinal and Aromatic Plants II. In: Bajaj Y.P.S. (ed). *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 7. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin
- Barbasz A, Kreczmer B, Ocwieja M. 2016. Effects of exposure of callus cells of two wheat varieties to silver nanoparticles and silver salt (AgNO₃). *Acta Physiologiae Plantarum* 38(3):1-11.
- Becerra-Moreno A, Redondo-Gil M, Benavides J, Nair V, Cisneros-Zevallos L, et al. 2015. Combined effect of water loss and wounding stress on gene activation of metabolic pathways associated with phenolic biosynthesis in carrot. In: Araújo S. (ed). *Frontiers in Plant Science* 15; 6: 837.
- Bohidar S, Pattanaik S, Thiruvanoukkarasu M. 2013. Improved furanocoumarin production in *Ruta graveolens* L. regenerated via in vitro stem internode cultures. *Plant Biotechnology Reports* 7(3):399-405.

- Cervantes E, Tocino A. 2009. Ethylene, free radicals and the transition between stable states in plant morphology. *Plant Signaling & Behavior* 4(5):367–371.
- Chen Y, Zhang X, Wu W, Zhangliang C, Gu H, Qu L-J. 2006. Overexpression of the wounding-responsive gene *AtMYB15* activates the shikimate pathway in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology* 48:1084-1095.
- Chen YE, Cui JM, Li GX, Yuan M, Zhang ZW, Yuan S, Zhang HY. 2016. Effect of salicylic acid on the antioxidant system and photosystem II in wheat seedlings. *Biologia Plantarum* 60:139-147.
- Cingoz GS, Gurel E. 2016. Effects of salicylic acid on thermotolerance and cardenolide accumulation under high temperature stress in *Digitalis trojana* Ivanina. *Plant Physiology and Biochemistry* 105:145-149.
- Danaee M, Farzinebrahimi R, Kadir MA., Sinniah UR., Mohamad R, Mat Taha R. 2015. Effects of MeJA and SA elicitation on secondary metabolic activity, antioxidant content and callogenesis in *Phyllanthus pulcher*. *Revista Brasileira de Botanica* 38(2):265-272.
- Dyer W, Henstrand J, Handa A, Herrmann K. 1989. Wounding Induces the First Enzyme of the Shikimate Pathway in Solanaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(19):7370-7373.
- Ecker J, Davis R. 1987. Plant Defense Genes are Regulated by Ethylene, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(15):5202-5206.
- Ekiert H, Kisiel W. 1997. Coumarin and alkaloids in shoot culture of *Ruta graveolens*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 66(3-4): 329-332.
- Faisal M, Ahmad N, Anis M. 2005. In vitro regeneration and mass propagation of *Ruta graveolens* L. - A multipurpose shrub. *HortScience* 40(5):1478-1480.
- Fariad HN, Ayyub CM, Amjad M, Ahmed R, Wattoo FM, Butt M, Bashir M, Shaheen MR, Waqas MA. 2017. Salicylic acid confers salt tolerance in potato plants by improving water relations, gaseous exchange, antioxidant activities and osmoregulation. *Journal of the science of food and agriculture* 97(6):1868-1875.

- Gurudeeban S, Satyavani K, Ramanathan T, Balasubramanian T. 2012. Effect of antioxidant and anti-aggregating properties of micro-propagated plantlets of *Ruta graveolens*. *African Journal of Biotechnology* 11(6):1497-1504.
- Halliwell B, Gutteridge J M C. 2015. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, New York
- Han C, Zuo J, Wang Q, Dong H, Gao L. 2017. Salicylic acid alleviates postharvest chilling injury of sponge gourd (*Luffa cylindrica*). *Journal of Integrative Agriculture* 16(3):735-741.
- Hao W, Guo H, Zhang J, Hu G, Yao Y, Dong J. 2014. Hydrogen Peroxide Is Involved in Salicylic Acid-Elicited Rosmarinic Acid Production in *Salvia miltiorrhiza* Cell Cultures. *The Scientific World Journal* Article ID 843764, 7 pages.
- Hayta S, Smedley M, Li J, Harwood W, M Gilmartin P. 2016. Plant Regeneration from Leaf-derived Callus Cultures of Primrose (*Primula vulgaris*). *HortScience* 51(5):558-562.
- Hossain ABM, Haq I, Ibrahim NA, Aleissa MS. 2016. Callus cell proliferation from broccoli leaf slice using IBA and BAP in vitro culture: Its biochemical and antioxidant properties. *Data in Brief* 6:214-220
- Idrees M, Naeem M, Aftab T, Khan MMA, Moinuddin. 2011. Salicylic acid mitigates salinity stress by improving antioxidant defence system and enhances vincristine and vinblastine alkaloids production in periwinkle [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don]. *Acta Physiologiae Plantarum* 33(3):987-999.
- Ishibashi Y, Koda Y, Zheng SH, Yuasa T, Iwaya-Inoue M. 2013. Regulation of soybean seed germination through ethylene production in response to reactive oxygen species. *Annals of Botany* 111(1):95–102.
- Kang S, Jung H, Kang Y, Yun D, Bahk J, Yang J, Choi M. 2004. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. *Plant Science* 166(3):745-751.
- Kiselev KV, Tyunin AP, Karetin YA. 2014. Salicylic acid induces alterations in the methylation pattern of the VaSTS1, VaSTS2, and VaSTS10 genes in *Vitis amurensis* Rupr. cell cultures. *Plant Cell Reports* 34(2):311-320.

- Kittipongpatana N, Davis DL, Porter JR. 2002. Methyl jasmonate increases the production of valepotriates by transformed root cultures of *Valerianella locusta*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71:65-75.
- Knee M. 1992. Sensitivity of ATPases to silver ions suggests that silver acts outside the plasma membrane to block ethylene action. *Phytochemistry* 31(4):1093-1096.
- Kumar V, Ramakrishna A, Ravishankar GA. 2007. Influence of different ethylene inhibitors on somatic embryogenesis and secondary embryogenesis from *Coffea canephora* P ex Fr. in *Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 43(6):602-607.
- Li X, Guo H, Qi Y, Liu H, Zhang X, Ma P, Liang Z, Dong J. 2016. Salicylic acid-induced cytosolic acidification increases the accumulation of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 126(2):333-341.
- Li Y, Zheng X, Tang H, Zhu J, Yang J. 2003. Increase of β -1, 3-glucanase and chitinase activities in cotton callus cells treated by salicylic acid and toxin of *Verticillium dahlia*. *Acta Botanica Sinica* 45(7):802-808.
- Lin RS. 1988. Physiological effects of silver thiosulfate, (aminooxy)acetic acid, and malonate pulse treatments on the inhibition of ethylene biosynthesis and mode of action in carnations, Retrospective Theses and Dissertations, University of Iowa.
- Luo J, Jiang S, Pan L. 2001. Enhanced somatic embryogenesis by salicylic acid of *Astragalus adsurgens* Pall.: Relationship with H₂O₂ production and H₂O₂-metabolizing enzyme activities. *Plant Science* 161:125-132.
- Mendoza-Sánchez M, Guevara-González RG, Castaño-Tostado, Mercado-Silva EM, Acosta-Gallegos JA, Rocha-Guzmán NE, Reynoso-Camacho R. 2016. Effect of chemical stress on germination of cv Dalia bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as an alternative to increase antioxidant and nutraceutical compounds in sprouts. *Food Chemistry* 212:128-137.
- Mihai R, Brezeanu A, Cogalniceanu G. 2009. Aspects of some elicitors influence on non-morphogenic callus of *Vitis vinifera* var. Isabelle. *Romanian Biotechnological Letters* 14(4):4511-4518.

- Moon UR, Mitra A. 2016. A mechanistic insight into hydrogen peroxide-mediated elicitation of bioactive xanthenes in *Hoppea fastigiata* shoot cultures. *Planta* 244: 259–274.
- Muday GK, Herrmann KM. 1992. Wounding Induces One of Two Isoenzymes of 3-Deoxy-d-arabino-Heptulosonate 7-Phosphate Synthase in *Solanum tuberosum* L. *Plant Physiology* 98(2):496–500.
- Nakagawa H, Kawasaki Y, Ogura N, Takehana H. 1972. Purification and some properties of two types of β -fructofuranosidase from tomato fruit. *Agricultural and Biological Chemistry* 36:18-26.
- Palmer CE. 1992. Enhanced shoot regeneration from *Brassica campestris* by silver nitrate. *Plant Cell Reports* 11(11):541-545.
- Pauw B, van Duijn B, Kijne JW, Memelink J. 2004. Activation of the oxidative burst by yeast elicitor in *Catharanthus roseus* cells occurs independently of the activation of genes involved in alkaloid biosynthesis. *Plant Molecular Biology* 55(6):797-805.
- Plus J, George L, Eapen S, Rao PS. 1993. Enhanced plant regeneration in pearl millet (*Pennisetum americanum*) by ethylene inhibitors and cefotaxime. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32:91-96.
- Poor P, Takacs Z, Bela, Czekus Z, Szalai G. Tari I. 2017. Prolonged dark period modulates the oxidative burst and enzymatic antioxidant systems in the leaves of salicylic acid-treated tomato. *Journal of Plant Physiology* 213:216-226.
- Prachi, Sharma TR, Singh BM. 2002. Salicylic acid induced insensitivity to culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f.sp. *zingiberi* in the calli of *Zingiber officinale* Roscoe. *European Journal of Plant Pathology* 108:31-39.
- Ptak A, Moranska E, Saliba S, Zielinski A, Simlat M, Laurain-Mattar D. 2017. Elicitation of galanthamine and lycorine biosynthesis by *Leucojum aestivum* L. and *L. aestivum* ‘Gravety Giant’ plants cultured in bioreactor RITA®. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 128(2):335-345.
- Roshanfekrrad M, Zarghami R, Hassani H, Zakizadeh H, Salari A. 2017. Effect of AgNO₃ and BAP on root as a novel explant in date palm (*Phoenix dactylifera* cv. medjool) somatic embryogenesis. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 20(1):20-27.

- Roustan J, Latche A, Fallot J. 1990. Control of carrot somatic embryogenesis by AgNO₃, an inhibitor of ethylene action: Effect on arginine decarboxylase activity. *Plant Science* 67:89-95.
- Saini T, Bagchi M, Bagchi D, Jaeger S, Hosoyama S, Stohs SJ. 1998. Protective ability of acetylsalicylic acid (aspirin) to scavenge radiation induced free radicals in J774A.1 macrophage cells. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*. 101(3):259-68.
- Scharlemann W. 1972. Acridin-Alkaloide aus Kalluskulturen von *Ruta graveolens* L. / Acridine-Alkaloids from Callus Cultures of *Ruta graveolens* L. *Zeitschrift für Naturforschung B* 27(7):806-808.
- Serrano M, Wang B, Aryal B, Garcion C, Abou-Mansour E, Heck S, Geisler M, Mauch F, Nawrath C, Métraux J-P. 2013. Export of salicylic acid from the chloroplast requires the multidrug and toxin extrusion-like transporter. *Plant Physiology* 162:1815–1821.
- Shah SH, Ali S, Jan SA, Jalal-Ud-Din, Ali GM. 2014. Assessment of silver nitrate on callus induction and in vitro shoot regeneration in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.). *Pakistan Journal of Botany* 46(6):2163-2172.
- Songstad DD, Duncan DR, Widholm JM. 1988. Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, silver nitrate, and norbornadiene on plant regeneration from maize callus cultures. *Plant Cell Reports* 7(4):262-265.
- Srivastava S, Dwivedi UN. 2001. Plant regeneration from callus of *Cuscuta reflexa* - An angiospermic parasite - And modulation of catalase and peroxidase activity by salicylic acid and naphthalene acetic acid. *Plant Physiology and Biochemistry* 39(6):529-538.
- Taylor PWJ, Ko HL, Fraser TA, Masel N, Adkins SW. 1994. Effect of silver nitrate on sugarcane cell suspension growth, protoplast isolation, ethylene production and shoot regeneration from cell suspension cultures. *Journal of Experimental Botany* 45(8):1163-1168.
- Thiruvengadam M, Baskar V, Kim S, Chung I. 2016. Effects of abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid on the content of phytochemicals and their gene expression

- profiles and biological activity in turnip (*Brassica rapa* ssp. *rapa*). *Plant Growth Regulation* 80(3):377-390.
- Tomás-Barberán F, Loaiza-Velarde J, Bonfanti A, Saltveit M. 1997. Early Wound- and Ethylene-induced Changes in Phenylpropanoid Metabolism in Harvested Lettuce. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122(3):399-404.
- Tzin V, Galili G. 2010. The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book*. Doi e0132.10.1199.
- Uliaie ED, Farsi M, Ghreyazie B, Imani J. 2008. Effects of Genotype and AgNO₃ on Shoot Regeneration in Winter Cultivars of Rapeseed (*Brassica napus*). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11: 2040-2043.
- Walker TS, Pal Bais H, Vivanco JM. 2002. Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort) *Phytochemistry* 60(3):289-293.
- Wee SL, Yap WSP, Alderson PG, Khoo TJ. 2015. Effects of elicitors on in vitro cultures of *Sauropus androgynus* (Sweet shoot) for sustainable metabolite production and antioxidant capacity improvement. *Acta Horticulturae* 1083:145-155.
- Williams J, Pink DAC, Biddington NL. 1990. Effect of silver nitrate on long-term culture and regeneration of callus from *Brassica oleracea* var. *gemmifera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 21:61-66.
- Witschi A, Reddy S, Stofer B, Lauterburg BH. 1992. The systemic availability of oral glutathione. *European Journal of Clinical Pharmacology* 43(6):667-669.
- Zandalinas SI, Vives-Peris V, Gomez-Cadenas A, Arbona V. 2012. A fast and precise method to identify indolic glucosinolates and camalexin in plants by combining mass spectrometric and biological information. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(35):8648-8658.