

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

Πτυχιακή Διατριβή  
**Επίδραση χημικών παραγόντων σε ιστοκαλλιέργεια του *Cichorium spinosum***  
Μιλτιάδης Λαδάκης

---

Επιβλέπων καθηγητής  
Γούναρης Ιωάννης

Βόλος 2018

### ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

I. ΓΟΥΝΑΡΗΣ	Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
E. 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

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άτομα, των οποίων η συμβολή υπήρξε καθοριστική και ιδιαίτερα χρήσιμη για την εκπόνηση της συγκεκριμένης πτυχιακής διατριβής.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου και επιβλέποντα της πτυχιακής διατριβής, κύριο Ιωάννη Γούναρη, Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας, ο οποίος από την πρώτη στιγμή με εμπιστεύτηκε και δέχτηκε να μου αναθέσει την εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Ειδικότερα, τον ευχαριστώ ιδιαίτερα που ήταν διαθέσιμος και πρόθυμος να συνδράμει ανά πάσα στιγμή στην εκπόνηση της εργασίας παρέχοντας τις πολύτιμες γνώσεις του και την υποστήριξη του.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Φυτοπαθολογίας- Σύγχρονες Μέθοδοι Διαγνωστικής κ. Βέλλιο Ευάγγελο για την παροχή του κατάλληλου εργαστηριακού χώρου και εξοπλισμού προκειμένου να περατωθεί το εργαστηριακό μέρος της εν λόγω εργασίας.

Παράλληλα, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Επίκουρο Καθηγητή Λαχανοκομίας κ. Σπυρίδωνα Πετρόπουλο που ανταποκρίθηκε στις ανάγκες και τους σκοπούς της παρούσας εργασίας παρέχοντας πολύτιμο υλικό.

Εξίσου ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απονείμω στον Καθηγητή Οργανικής Χημείας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, κ. Κωνσταντίνο Λίτινα, του οποίου η συνδρομή ήταν ουσιαστική και χρήσιμη για την πραγμάτωση του εργαστηριακού μέρους της υγρής χρωματογραφίας και φασματοσκοπίας μαζών.

Ολοκληρώνοντας τις σπουδές μου στο Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικών Περιβάλλοντος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το σύνολο των καθηγητών του Πανεπιστημίου για τις αξιόλογες και εποικοδομητικές γνώσεις που μου πρόσφεραν όλα αυτά τα χρόνια.

Επιπλέον, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τον συμφοιτητή και φίλο μου Ζουρνατζή Ηλία για την πολύτιμη συνδρομή του και για την άψογη συνεργασία μας στο εργαστηριακό μέρος της εργασίας.

Εν κατακλείδι, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την υποστήριξη και την συμπαράσταση καθόλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## Πίνακες

Πίνακας 1	Απορρόφηση στα 329, 294 και 272 nm ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 0,02 mM SA	Σελ. 24
Πίνακας 2	Απορρόφηση στα 329, 294 και 272 nm ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 0,1 mM SA	Σελ. 25
Πίνακας 3	Απορρόφηση στα 329, 294 και 272 nm ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 1 mM SA	Σελ. 26
Πίνακας 4	Απορρόφηση στα 329 nm ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 100&500 $\mu$ M AgNO <sub>3</sub>	Σελ. 29
Πίνακας 5	Απορρόφηση στα 272 nm, ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 100&500 $\mu$ M AgNO <sub>3</sub>	Σελ. 30
Πίνακας 6	Απορρόφηση στα 294 nm ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 100&500 $\mu$ M AgNO <sub>3</sub>	Σελ. 31
Πίνακας 7	Αναγεννητική ικανότητα κάλλων <i>Cichorium spinosum</i> παρουσία 0,02,0,1 και 1 mM SA	Σελ. 32

## Διαγράμματα

Διάγραμμα 1	Απορρόφηση στα 329, 294 και 272 nm ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 0,02 mM SA	Σελ. 24
Διάγραμμα 2	Απορρόφηση στα 329, 294 και 272 nm ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 0,1 mM SA	Σελ. 25
Διάγραμμα 3	Απορρόφηση στα 329, 294 και 272 nm ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 1 mM SA	Σελ. 26
Διάγραμμα 4	Σύγκριση απορρόφησης στα 329 nm, ανά εβδομάδα καλλιέργειας, για 0,02, 0,1 και 1 mM SA	Σελ. 27
Διάγραμμα 5	Σύγκριση απορρόφησης στα 294 nm, ανά εβδομάδα καλλιέργειας, για 0,02, 0,1 και 1 mM SA	Σελ. 27
Διάγραμμα 6	Σύγκριση απορρόφησης στα 272 nm, ανά εβδομάδα καλλιέργειας, για 0,02, 0,1 και 1 mM SA	Σελ. 28
Διάγραμμα 7	Απορρόφηση στα 329 nm ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 100&500 $\mu$ M AgNO <sub>3</sub>	Σελ. 29
Διάγραμμα 8	Απορρόφηση στα 272 nm ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 100&500 $\mu$ M AgNO <sub>3</sub>	Σελ. 30
Διάγραμμα 9	Απορρόφηση στα 294 nm ανά εβδομάδα καλλιέργειας, 100&500 $\mu$ M AgNO <sub>3</sub>	Σελ. 31

## Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή .....	2
2. Υλικά και Μέθοδοι .....	9
2.1 Ιστοκαλλιέργεια .....	9
2.2 Καλλιέργεια παρουσία αργύρου ή σαλικυλικού οξέως. ....	11
2.3 Εξαγωγή ουσιών από ιστούς, χρωματογραφία χάρτου, ποσοτικοποίηση.....	12
2.4 Διαχωρισμός ουσιών με υγρή χρωματογραφία και ταυτοποίηση με φασματομετρία μαζών .....	13
3. Αποτελέσματα.....	14
4. Συζήτηση.....	33
4.1 Επίδραση του νιτρικού αργύρου ( $\text{AgNO}_3$ ) στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών στο <i>Cichorium spinosum</i> .....	37
4.2 Επίδραση του σαλικυλικού οξέος στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών στο <i>Cichorium spinosum</i> .....	39
5. Συμπέρασμα.....	43
6. Βιβλιογραφία .....	44

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία εξετάζεται η δράση του σαλικυλικού οξέος και νιτρικού αργύρου, στα επίπεδα των κύριων δευτερογενών μεταβολιτών σε κάλλους που δημιουργήθηκαν από το φυτό *Cichorium spinosum*. Ειδικότερα, στο πείραμα υλοποιήθηκε ιστοκαλλιέργεια του *Cichorium spinosum*, που περιλαμβάνει τις διαδικασίες της καλλογένεσης, της αναγέννησης και της ριζοβολίας του, καθώς και την καλλιέργεια του σε γλάστρα μετά από σκληραγώγηση. Η εμφάνιση των πρώτων κάλλων πραγματοποιήθηκε σε περίπου 5 εβδομάδες από την καλλιέργεια των εκφύτων, ενώ όταν τοποθετήσαμε ανεπτυγμένους κάλλους για αναγέννηση παρατηρήθηκαν βλαστοί από την 1<sup>η</sup> κιόλας εβδομάδα σε συνθήκες φυσικού φωτισμού. Με την διαδικασία της ριζοβολίας που ακολουθήσαμε στους αναγεννημένους βλαστούς, εμφανίστηκαν ρίζες μετά από 8 με 10 μέρες υπό φυσικό φώς. Για την ιστοκαλλιέργεια ειδικότερα, το μέσο καλλιέργειας Murashige και Skoog (MS) που χρησιμοποιήθηκε, περιείχε BA 0,25 mg/L και NAA 1,5 mg/L για την καλλογένεση, BA 1,5 mg για την αναγέννηση βλαστών από κάλλους, και 1 mg NAA προστέθηκε για τη ριζοβολία βλαστών. Για την καλλιέργεια των κάλλων παρουσία των χημικών ενώσεων που επιλέχθηκαν, εφαρμόστηκε συγκέντρωση 0,02, 0,1 και 1 mM για το SA (σαλικυλικό οξύ) και αντίστοιχα για τον AgNO<sub>3</sub> (νιτρικό άργυρο) 100 και 500 μM. Η επίδραση των χημικών παραγόντων που προσθέσαμε (σαλικυλικό οξύ και νιτρικός άργυρος) παρατηρήθηκε στις συγκεντρώσεις δευτεροταγών μεταβολιτών για 5 εβδομάδες. Στη συνέχεια, ταυτοποιήθηκαν οι ουσίες καφταρικό και κινχορικό οξύ με την διαδικασία της φασματοσκοπίας υπεριώδους και φασματομετρίας μαζών. Γενικά με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν, ο νιτρικός άργυρος στις συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκε, κατέστειλε την παραγωγή δευτεροταγών μεταβολιτών με το πέρας της πρώτης εβδομάδας, λόγω παρεμπόδισης της δράσης και της βιοσύνθεσης του αιθυλενίου. Ωστόσο, την 4<sup>η</sup> και 5<sup>η</sup> εβδομάδα παρατηρήθηκε αύξηση της παραγωγής των δευτερογενών μεταβολιτών. Με το σαλικυλικό οξύ προκλήθηκε αύξηση στη ποσότητα των μεταβολιτών, εξαιτίας της αύξησης των ελεύθερων ριζών οξυγόνου αναγκάζοντας το φυτό να συνθέσει περισσότερα φαινολικά και αντιοξειδωτικά ένζυμα προς απενεργοποίηση τους. Παρόλα αυτά, οι διαφορετικές συγκεντρώσεις είχαν ποικίλα αποτελέσματα όπως παρατηρείται στους πίνακες με το σχετικό ποσό φθοριζουσών ουσιών.

## 1. Εισαγωγή

Το σαλικυλικό οξύ (SA) και ο νιτρικός άργυρος ( $\text{AgNO}_3$ ) είναι δύο από τις ουσίες, οι οποίες επιδρούν στην βιοσύνθεση δευτεροταγών μεταβολιτών στα φυτά, αλλά και σε άλλες κυτταρικές διεργασίες.

Φαίνεται ότι, η επίδραση του  $\text{AgNO}_3$  έχει θετικά αποτελέσματα στις συγκέντρωση δευτερογενών αλλά και πρωτοταγών μεταβολιτών, καθώς σε πολλές περιπτώσεις τις αυξάνει. Π.χ. σε κάλλους σιταριού εφαρμόστηκαν (20, 40 και 60) ppm  $\text{AgNO}_3$  και παρατηρήθηκε ότι στα 60 ppm διπλασιάστηκαν τα ποσοστά μαλονοδιαλδεΐδης (MDA), ενώ κάποια άλλα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) τριπλασίασαν την προλίνη (Barbasz et al., 2016). Επίσης ο ψεκασμός των φυτώ *Aradiopsis thaliana* με 5 mM  $\text{AgNO}_3$ , αύξησε της συγκέντρωσης του διϋδροκαμαλεξικού οξέως (dihydrocamalexic acid) κατά 2000 φορές παραπάνω σε σχέση με το control και στην συνέχεια αυξήθηκε και η καμαλεξίνη (camalexin) (Zandalinas et al., 2012).

Ο μηχανισμός δράσης του νιτρικού αργύρου φαίνεται να εμπλέκει και επίδραση σε ένζυμα και γονίδια. Φαίνεται ότι από βιοχημικής απόψεως ο μηχανισμός της δράσης του εμπλέκει ελεύθερες ρίζες, οξειδωτικό στρες και αιθυλένιο. Η χρήση  $\text{AgNO}_3$  σε *in vitro* καλλιέργεια αυξάνει ή παρεμποδίζει την παραγωγή αιθυλενίου καθώς και την έκφραση γονιδίων, ανάλογα με την συγκέντρωσή του στο θρεπτικό υπόστρωμα αλλά και το είδος του φυτού. Σε εργαστηριακή καλλιέργεια κυττάρων καρότου αποδείχθηκε πως ο  $\text{AgNO}_3$  περιορίσε την δραστηριότητα του αιθυλενίου, ενώ η εφαρμογή του σε συγκεντρώσεις (10 και 20)  $\mu\text{M}$  αύξησαν την συγκέντρωση του ενζύμου αποκαρβοξυλάση της αργινίνης (ADC), στις πρώτες 4 ημέρες, κατά 45% και 54% αντίστοιχα, το οποίο είναι απαραίτητο για το βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης πολυαμινών (Roustan et al., 1990). Επίσης η εφαρμογή  $\text{AgNO}_3$  σε κολεόπτια καλαμποκιού, περιορίσε την δραστηριότητα του αιθυλενίου και τα ιόντα Ag δρουν εξωτερικά της πλασματικής μεμβράνης και σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10 $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  μείωσαν την ενεργητικότητα της ATPάσης (Knee et al., 1992). Εν αντιθέσει με ότι είδαμε πιο πάνω, παρατηρήθηκε η τοξική δράση του νιτρικού αργύρου σε καλλιέργεια κυττάρων ζαχαροκάλαμου κατά τη διαδικασία της αναγέννησης του, σε



συγκεντρώσεις (29, 59 και 118)  $\mu\text{M}$  , λόγω της αυξημένης σύνθεσης αιθυλενίου εξαιτίας του stress που προκαλείται (Taylor et al., 1994). Επιπλέον σε καλλιέργεια τομάτας η εφαρμογή  $\text{AgNO}_3$  συγκέντρωσης  $10^{-4}$  M, εμποδίζει τα ένζυμα β-φρουκτοφουρανοσιδάση L και E (Nakagawa et al., 1972). Επίσης σε κάλλους ποικιλιών σιταριού, η χρήση  $\text{AgNO}_3$  σε συγκεντρώσεις (20, 40 και 60) ppm, ενεργοποιούν το ενζυματικό σύστημα άμυνας για την αντιμετώπιση των ROS (reactive oxygen species) στην ποικιλία Raweta. Αντίθετα στην ποικιλία Parabola ενεργοποιήθηκε το μη ενζυματικό αντιοξειδωτικό σύστημα, (Barbasz et al., 2016).

Η εφαρμογή  $\text{AgNO}_3$  σε μέσα καλλιέργειας με σκοπό την αύξηση του ποσοστού της αναγέννησης/καλλογέννησης φυτών, φαίνεται πως έχει θετικά αποτελέσματα στις περισσότερες περιπτώσεις καθώς συσχετίζεται με το είδος του φυτού αλλά και την ποσότητα της ουσίας στο υπόστρωμα. Έτσι σε φυτά *Pennisetum americanum* η χρήση  $\text{AgNO}_3$  σε συγκεντρώσεις 58,9, 117,7 και 294,3  $\mu\text{M}$  δεν είχαν κάποιο θετικό αποτέλεσμα στην καλλογέννηση, όμως η συγκέντρωση 58,9  $\mu\text{M}$  τριπλασίασε την αναγέννηση του φυτού (Plus et al., 1993). Ίδια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στο φυτό *Zea mays* όπου σε συγκέντρωση 100  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  η αναγέννηση ήταν 12 φορές μεγαλύτερη ενώ η καλλογέννηση δεν επηρεάστηκε (Songstad et al., 1988). Αντίθετα αποτελέσματα διαπιστώθηκαν σε κύτταρα ζαχαροκάλαμου, όπου οι συγκεντρώσεις 29, 59 και 118  $\mu\text{M}$  του  $\text{AgNO}_3$  αύξησαν σε ποσοστά 25%, 43% και 75% αντίστοιχα το φρέσκο βάρος των κάλλων, ενώ σε αυτές τις συγκεντρώσεις η αναγέννηση μειώθηκε (Taylor et al., 1994). Η εφαρμογή 1,7 mg/L  $\text{AgNO}_3$  σε κάλλους από μέρη φύλλων του φυτού *Primula vulgaris* προκάλεσε μείωση του καφετιάσματος των κάλλων, ενώ σε συγκεντρώσεις 0,85, 1,7 και 3,4 mg/L αυξήθηκε η αναγέννησή τους με το μέγιστο (72%) να παρατηρείται για συγκέντρωση 3,4 mg/L (Hayta et al., 2016). Η εφαρμογή  $\text{AgNO}_3$  σε ποσότητες 2,5 με 20 mg/L σε καλλιέργεια διαφόρων ποικιλιών του φυτού *Solanum lycopersicum*, παρουσίασε ποσοστό καλλογέννησης 91,33% για 10-15 mg/L  $\text{AgNO}_3$  και 96,66% για την αναγέννηση, με εφαρμογή 8-10 mg/L  $\text{AgNO}_3$ , για την ποικιλία Rio Grande (Shah et al., 2014). Συμπεραίνεται επομένως κάποια κατασταλτική της αναγέννησης επίδραση στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις νιτρικού αργύρου. Η διαδικασία της καλλογέννησης/αναγέννησης καθώς και της συνεχόμενης καλλιέργειας κάλλων στο φυτό *Brassica oleracea*, βελτιστοποιήθηκε με  $\text{AgNO}_3$  ποσότητας 1-10 mg/L (Williams et al., 1990). Επιπλέον, ο αριθμός των εμβρύων σε φυτά *Phoenix dactylifera* διπλασιάστηκε καθώς στο

καλλιεργητικό μέσο εφαρμόστηκε η ποσότητα 3 mg/L AgNO<sub>3</sub> (Roshanfekrrad et al., 2017), αλλά και για την *in vitro* καλλιέργεια του φυτού ελαιοκράμβη (*Brassica napus*) όπου η συγκέντρωση 5 mg/L AgNO<sub>3</sub> αναφέρεται πως αύξησε την αναγέννηση σε συγκεκριμένους γενοτύπους του φυτού φτάνοντας να την τριπλασιάσει στους Orient και SLM, ενώ στους Okri, Cobra και PF, δεν παρατηρήθηκε αλλαγή (Ulaiye et al., 2008). Επιπλέον σε καλλιέργεια του φυτού *Brassica campestris*, η χρήση 30 και 60 μM AgNO<sub>3</sub>, αύξησε την αναγέννηση σε ποσοστό σχηματισμού των βλαστών 77,4% και 83,6% αντίστοιχα σε συγκριτικά με το μόλις 6,1% του control (Palmer, 1992). Επιπλέον, το φυτό *Coffea canephora* όταν καλλιεργήθηκε σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα με συγκεντρώσεις AgNO<sub>3</sub> 0, 20 και 40 μM, τα έκφυτα έδειξαν εμβρυογένεση σε ποσοστό 5%, 35% και 48% ενώ η δευτερογενής εμβρυογένεση παρουσίασε ποσοστά 3%, 68% και 90% (Kumar et al., 2007). Εκ των ανωτέρω συμπεραίνεται ότι ο AgNO<sub>3</sub> επιτείνει την διαφοροποίηση των κυττάρων σε ιστούς, δηλαδή υποβοηθάει την αναγέννηση φυτών και εμβρύων από κάλους αυτών, ενώ υπάρχουν και εξαιρέσεις περιπτώσεων, όπως του σακχαροκαλάμου, όπου παρατηρείται το αντίθετο αποτέλεσμα. Η ελάττωση του καφετιάσματος των κάλλων σημαίνει ελάττωση είτε της παραγωγής ή του πολυμερισμού των φαινολικών ουσιών και άρα ο νιτρικός άργυρος έχει ιδιότητες κατασταλτικές του οξειδωτικού στρες και της παραγωγής ελευθέρων ριζών, είτε με δική του απευθείας επίδραση στο ποσό των ελευθέρων ριζών ή έμμεσα με επίταση της παραγωγής αντιοξειδωτικών φαινολικών.

Φαίνεται πως η χρήση του σαλικυλικού οξέος (SA) αυξάνει την ποσότητα των δευτερογενών μεταβολιτών σε *in vitro* καλλιέργειες φυτών. Βέβαια υπάρχουν και εξαιρέσεις που είναι σχετικές με την ποσότητα εφαρμογής του SA αλλά και το είδος του φυτού. Επίσης φαίνεται ότι η ποσότητα τους επηρεάζεται από την διέγερση/μεταβολή που μπορεί να προκαλέσει το SA στα διάφορα μεταβολικά μονοπάτια. Πιο συγκεκριμένα, σε φυτά *Phyllanthus pulcher* (Danaee et al., 2015) και *Artemisia aucheri* (Abbaspour et al., 2016), το SA με συγκέντρωση έως 20 mg/L αυξάνει τη ποσότητα της ρουτίνης, ενώ στο δεύτερο παρατηρείται αύξηση φλαβονοειδών, ανθοκυανίνων και φαινολικών. Επίσης σε βλαστούς ποικιλίας *Dalia* του φυτού *Phaseolus vulgaris* η ποσότητα φαινολικών αυξήθηκε 1,8 φορές περισσότερο με τη χρήση 1-2 mM SA. Πιο συγκεκριμένα, το καφεϊκό οξύ, κουμαρικό, γαλλικό και σαλικυλικό αυξήθηκαν 1,7, 8,5, 25 και 115 φορές παραπάνω, ενώ η συγκέντρωση της ρουτίνης αυξήθηκε κατά 41 φορές (Mendoza-Sanchez et al.,

2016). Στο φυτό *Digitalis trojana* Ivanina, η εφαρμογή 150  $\mu\text{M}$  SA κάτω από συνθήκες θέρμανσης στους 45 °C για 2 ώρες, αύξησαν τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά (Cincos et al., 2016). Επίσης στο φυτό *Brassica rapa* ο εμπλουτισμός του θρεπτικού υλικού με 100  $\mu\text{M}$  SA προκάλεσε ταυτόχρονη αύξηση καροτενοειδών, χλωροφύλλης II, ανθοκυανίνων και φαινολικών (Thiruvengadam et al., 2016). Κάτι παρόμοιο φαίνεται να συμβαίνει και στο *Catharanthus roseus*, όπου με την προσθήκη  $10^{-5}$  M SA παρουσία NaCl, σε διάφορους συνδυασμούς, προκάλεσε την διέγερση των ίδιων δευτερογενών μεταβολιτών (Idrees et al., 2011). Επιπλέον στο *Salvia miltiorrhiza*, η εφαρμογή 0,16 mM αύξησε τα φαινολικά οξέα καφεϊκό, ροζμαρινικό και σαλβιανολικό B (Li et al., 2016). Σε έμβρυα προερχόμενα από το φυτό *Sauropus androgynus* και σε συγκεντρώσεις SA 200  $\mu\text{M}$ , προκλήθηκε αύξηση της κεμπερόλης, TBHQ και ναριγκινίνης 10,7, 16,3 και 92,8, φορές αντίστοιχα, ενώ μείωση καταγράφηκε στις τιμές της κουερσετίνης και παπαβερίνης (Wee et al., 2015). Αντίθετα, η συγκέντρωση 7 mg/L SA ελάττωσε τη σύνθεση του φαινολικού υπερικίνης στο *Hypericum perforatum* (Walker et al., 2002). Όμως η υπερικίνη προέρχεται από την οδό των πολυκετιδίων και όχι του σικιμικού οξέως από όπου συντίθενται τα άλλα ανωτέρω αναφερόμενα φαινολικά.

Το SA, εκτός από τα φαινολικά, αυξάνει και τα αλκαλοειδή σε μεγάλη ποικιλία φυτών. Οι συγκεντρώσεις 0, 25, 250 και 500  $\mu\text{M}$  SA σε μέσο καλλιέργειας για ριζοβολία του φυτού *Datura metel* προκάλεσε αύξηση των αλκαλοειδών τροπίνης και πιο συγκεκριμένα της υοσκυαμίνης και σκοπολαμίνης, όπου στην συγκέντρωση 500  $\mu\text{M}$  SA εμφανίστηκαν τα μέγιστα τα οποία ήταν 3,5 φορές περισσότερο από το control (Ajungla et al., 2009). Παρομοίως, σε ιστοκαλλιέργεια ριζικού συστήματος του φυτού *Scopolia parviflora* η ποσότητα της σκοπολαμίνης μεγιστοποιήθηκε μετά από 24 ώρες με την εισχώρηση 1 mM SA αλλά ακολούθησε ραγδαία μείωση, ενώ η συγκέντρωση 0,01 mM SA επέφερε 40% αύξηση της σκοπολαμίνης σε σύγκριση με το control (Kang et al., 2004). Σε κάλλους από έμβρυα των φυτών *L. aestivum* Gravity Giant και *Leucojum aestivum* L., η χρήση (Ptak et al., 2017) 5 $\mu\text{M}$  SA στις πρώτες 10 ώρες προκάλεσε την αύξηση της βιοσύνθεσης γαλανταμίνης 8 φορές παραπάνω στην ποικιλία Gravity Giant και η ίδια ποσότητα σαλικυλικού οξέος προκάλεσε αύξηση της συγκέντρωσης λυκορίνης 5 φορές παραπάνω από το control και στα δύο *L. aestivum*. Σε άλλη καλλιέργεια ριζικού συστήματος και συγκεκριμένα στο φυτό *Valerianella locusta*, ο εμπλουτισμός του θρεπτικού υποστρώματος με 100

$\mu\text{M SA}$ , αύξησε την ποσότητα των ιριδοειδών αλκαλοειδών ισοβαλτρατικού και διβαλτρατικού οξέως (Kittipongratana et al., 2002).

Η επίδραση SA στα ένζυμα των φυτών καθώς και στην έκφραση των γονιδίων τους, φαίνεται πως έχει άμεση σχέση με την συγκέντρωση του στο θρεπτικό υπόστρωμα αλλά και το είδος του. Σε φυτά πατάτας που εφαρμόστηκαν  $0,5 \text{ mM SA}$  υπό συνθήκες στρες λόγω αλατότητας, αυξήθηκε η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων καταλάση (CAT), περοξειδάση (POD) και δισμουτάση υπεροξειδίου (SOD) κατά 24,37%, 37,34% και 43,81% αντίστοιχα (Faried et al., 2017). Στους καρπούς του φυτού *Luffa cylindrica* παρατηρήθηκε παρόμοια δράση με εφαρμογή  $1,5 \text{ mmol/L SA}$ , όπου αυξήθηκε η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD, CAT, και περοξειδάση ασκορβικού οξέως (APX), ενώ κατεστάλη η δραστηριότητα της λυάσης της φαινυλαλανίνης (PAL) και οξειδάσης πολυφαινολών (PPO), μειώθηκε η διαρροή ηλεκτρολυτών και η δράση των ενζύμων που έχουν σχέση με το καφέτιασμα (Han et al., 2017). Επομένως φαίνεται το σαλικυλικό οξύ, πιθανότατα μέσω των αντιοξειδωτικών ενζύμων ελαττώνει το οξειδωτικό στρες. Αντίστοιχα φαινόμενα είχαμε και σε έκφυτα σιταριού 2 εβδομάδων στα οποία η εφαρμογή  $0,2 \text{ mM SA}$ , επηρέασε θετικά την παραγωγή των αντιοξειδωτικών ενζύμων APX, CAT, POD, SOD και περοξειδάση γλουταθειόνης (GPX), όμως η εφαρμογή μεγαλύτερων συγκεντρώσεων ( $2,5 \text{ mM}$ ) σαλικυλικού οξέος ελάττωσε την δραστηριότητα των CAT, APX και SOD (Chen et al., 2016). Επίσης σε φυτά *Artemisia aucheri*, η δράση SA είχε ως επακόλουθο την μείωση του οσμωτικού στρες που προκλήθηκε από πολυαιθυλενική γλυκόλη (PEG), με αύξηση της δραστηριότητας των PAL και λυάση τυροσίνης (TAL) (Abbaspour et al., 2016). Σε υγρή καλλιέργεια κυττάρων προερχόμενοι από το φυτό *Salvia miltiorrhiza*, η εφαρμογή  $0,16 \text{ mM SA}$  περιορίσε την δράση της  $\text{H}^+$ -ATPάσης στην πλασματική μεμβράνη και ως απόρροια αυτού μειώθηκε το pH του κυττάρου με αποτέλεσμα να βελτιστοποιηθεί η κωδικοποίηση των γονιδίων για PAL, αμινοτρανσφεράση τυροσίνης (TAT) και γονιδίων RAS, τα οποία παράγουν πρωτεΐνες μεταφοράς μηνυμάτων (Li et al., 2016). Άλλο ένα ένζυμο που φαίνεται ότι αυξήθηκε η παραγωγή του είναι η  $\beta$ -1,3-γλουκανάση για κινητοποίηση του μεταβολισμού σακχάρων και αυτό παρατηρήθηκε σε καλλιέργεια κάλλων βαμβακιού όπου, η εφαρμογή  $1 \text{ mmol/L SA}$  επέφερε αύξηση της 4,5 και της χιτινάσης 2 φορές (Li et al., 2003). Σε κάλλους του φυτού *Zingiber officinale* τα ένζυμα  $\beta$ -1,3-glucanase και

περοξειδάση παρουσίασαν το μέγιστο της τιμής τους με τη συγκέντρωση  $10^4$   $\mu\text{M}$  SA και μειώθηκε το καφέτιασμα (Prachi et al., 2002). Επιπροσθέτως σε εφαρμογή της συγκέντρωσης 300  $\mu\text{M}$  SA στην καλλιέργεια κυττάρων *Vitis amurensis* μειώθηκε η μεθυλίωση της κυτοσίνης των γονιδίων συνθετάσης στιλβενίου (STS) και σημειώθηκε αύξηση της παραγωγής T-ρεσβερατρόλης σε ποσά 2,8 έως 3,1 φορές σε σχέση με το control (Kiselev et al., 2014). Σε φύλλα τοματιάς εκτεθειμένα σε φως με ταυτόχρονη εφαρμογή 1 mM SA προκάλεσαν, κατά τη διάρκεια των πρώτων ωρών έκθεσής τους, την λειτουργία της NADPH oxidase επιφέροντας αύξηση στη παραγωγή υπεροξειδάσης με ταυτόχρονη ελάττωση της δραστηριότητας των ενζύμων APX και CAT, που σκοπό έχουν την διάσπαση του  $\text{H}_2\text{O}_2$ , με συνέπια την αύξηση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Posr et al., 2017). Παραπλήσια είναι η λειτουργία του SA και στην εφαρμογή του σε καλλιέργεια κάλλων του φυτού *Cuscuta reflexa* όπου η εφαρμογή 50 και 100  $\mu\text{M}$  SA προκάλεσαν μείωση στο ποσοστό της περοξειδάσης κατά 16% και 25% καθώς και του CAT κατά 16% και 30% αντίστοιχα (Srivastava et al., 2001). Η γενική τάση είναι το σαλικυλικό οξύ να αυξάνει τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, αλλά και να αυξάνει το ποσό αντιοξειδωτικών φαινολικών του κυττάρου.

Το σαλικυλικό οξύ έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει ή μειώνει την ταχύτητα πολλαπλασιασμού των κάλλων σε *in vitro* καλλιέργεια, ανάλογα με το είδος του φυτού αλλά και τις συγκέντρωσής του στο θεραπευτικό μέσο. Σε πείραμα το οποίο έγινε με κάλλους του φυτού *Vitis vinifera*, έδειξε ότι η προσθήκη SA με συγκεντρώσεις έως τα 10 mM αύξησε τον πολλαπλασιασμό των κάλλων (Mihai et al., 2009). Παρόμοια αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και για κάλλους του φυτού *Phyllanthus pulcher* όπου, η χρήση SA συγκέντρωσης 5 mg/L βελτίωσε την ανάπτυξη της υγρής μάζας τους ενώ δεν επηρέασε την ξηρή μάζα (Danaee et al., 2015). Επιπροσθέτως, στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ή δεν είχε κάποιο αποτέλεσμα ή είχε μικρότερο αποτέλεσμα. Επίσης, η παρόμοια ένωση ακετυλο SA δεν είχε κάποιο αποτέλεσμα στη ταχύτητα αύξησης των κάλλων του φυτού *Pennisetum americanum* αλλά επέδρασε θετικά στην ποσότητα της ξηρή μάζα (Plus et al., 1993). Αντίθετα με τα παραπάνω, στο φυτό *Hypericum perforatum* η εφαρμογή 50-200  $\mu\text{M}$  SA, ελαττώνει την βιομάζα των κάλλων με το φαινόμενο αυτό είναι πιο έντονο υπό συνθήκες σκότους (Walker et al., 2002). Επιπλέον, 150  $\mu\text{mol/L}$  SA φαίνεται πως αυξάνει την συχνότητα δημιουργίας εμβρύων και είναι πολύ πιθανόν να δρα μέσω της αύξησης του  $\text{H}_2\text{O}_2$  και

καταστολής των ενζύμων καταλάση και περοξειδάση του ασκορβικού οξέος (Luo et al., 2001).

### **Συντομογραφίες**

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

Ag: άργυρος

AgNO<sub>3</sub>: 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

PEG: polyethelene glycol

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Ιστοκαλλιέργεια

#### *Αποστείρωση των εκφύτων*

Ξεκινώντας την πειραματική διαδικασία χρειάστηκε να δημιουργήσουμε κάλλους από ένα μητρικό φυτό *Cichorium spinosum*. Για να πραγματοποιηθεί αυτή η διεργασία έπρεπε να κόψουμε έκφυτα από τον κεντρικό αγωγό ιστών φύλλων του φυτού και να τα απολυμάνουμε. Για την απολύμανση χρησιμοποιήσαμε 4 διαδοχικά δοχεία τα οποία περιείχαν κατά σειρά 1% w/v HgCl<sub>2</sub>, 70% v/v αιθανόλη και δύο δοχεία με αποστειρωμένο νερό. Αρχικά βάλουμε τα κομμένα έκφυτα μέσα στην αιθανόλη για 1 λεπτό, στην συνέχεια μεταφέρθηκαν στο HgCl<sub>2</sub> για 5 λεπτά και τέλος για 2 λεπτά σε κάθε δοχείο με αποστειρωμένο νερό, ώστε να απομακρυνθεί ο υδράργυρος.

#### *Καλλογένεση*

Τα απολυμασμένα έκφυτα για να δημιουργήσουν κάλλους πρέπει να εισαχθούν σε καλλιεργητικό υπόστρωμα το οποίο φτιάξαμε με την εξής διαδικασία: για 1 L υποστρώματος βάλουμε μέσα σε μια φιάλη με την βοήθεια ζυγού ακριβείας 4,4 g stock άλατα Murashige και Skoog (MS) περιέχοντα και βιταμίνες B6, 10 g agar, 30 g sucrose, ινοσιτόλη 100 mg/L, γλυκίνη 2 mg/L, BA (κυτοκίνη) 0,25 mg/L και NAA (αυξίνη) 1,5 mg/L. Στην συνέχεια γεμίσαμε την φιάλη με νερό μέχρι ένα σημείο και ρυθμίσαμε το pH στο 5,8 με την βοήθεια ενός ηλεκτρονικού πεχαμέτρου και αραιού διαλύματος 1 M NaOH. Όταν το pH έφτασε στα επιθυμητά όρια, γεμίσαμε την φιάλη με νερό μέχρι 1 λίτρο και την εισάγαμε μέσα σε έναν αποστειρωτή (autoclave), μαζί με 20 άδεια δοχεία και τρυβλία πετρί, και τα αφήσαμε για 30-40 λεπτά στους 121°C για αποστείρωση. Με το πέρας αυτής της διαδικασίας βγάλαμε από τον αποστειρωτή τα υλικά και τα τοποθετήσαμε στον θάλαμο νηματικής ροής (laminar hood flow), το υγρό ακόμη καλλιεργητικό μέσον διανεμήθηκε στα αποστειρωμένα δοχεία (50 ml/δοχείο) και αφέθηκαν να στερεοποιηθεί το μέσον με σταδιακή ψύξη του σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια τοποθετήσαμε τα απολυμασμένα έκφυτα

πλαγιαστά μέσα στα δοχεία, στην επιφάνεια των ημιστερεών καλλιεργητικών μέσων και τα μεταφέραμε για καλλιέργεια σε σκοτεινούς επωαστήρες-θαλάμους θερμοκρασίας 25 °C. Κάλλοι εμφανίσθηκαν μετά από πέντε εβδομάδες καλλιέργειας.

### ***Αναγέννηση βλαστών***

Στην συνέχεια του πειράματος έπρεπε να αναγεννήσουμε βλαστούς από κάλλους που είχαμε δημιουργήσει από το αρχικό φυτό με την διαδικασία της καλλογένεσης. Για να συντελεστεί η παραπάνω ενέργεια χρειάστηκε να πάρουμε κάλλους τουλάχιστον 6 εβδομάδων και να τους εισάγουμε εκ νέου σε νέο καλλιεργητικό μέσον, του οποίου η σύσταση διαφέρει από αυτό της καλλογένεσης στο ότι δεν έχει καθόλου NAA και διαθέτει BA 1,5 mg σε ένα λίτρο καλλιεργητικού μέσου, με ποσότητες που να φτάνουν για 10 δοχεία (50 ml ανά δοχείο) και να αφεθούν σε θερμοκρασίες δωματίου καθώς και σε συνθήκες διάχυτου φωτός. Με την παραπάνω διαδικασία δημιουργήθηκαν βλαστοί από την πρώτη εβδομάδα καλλιέργειας.

### ***Ριζοβολία βλαστών***

Με την διαδικασία της ριζοβολίας καταφέραμε να παράξουμε ρίζες στα αναγεννημένα φυτά *Cichorium spinosum* τα οποία είχαμε δημιουργήσει με την τεχνική της αναγέννησης βλαστών, που αναλύθηκε παραπάνω. Αρχικά και σε αυτήν την διαδικασία φτιάξαμε καλλιεργητικό μέσο για 10 δοχεία, σύστασης παρόμοιας με αυτή της καλλογένεσης, όπου αλλάζει μόνο η συγκέντρωση NAA, από το οποίο βάλουμε 1 mg σε ένα λίτρο καλλιεργητικού μέσου, καθώς και στο ότι δεν βάλουμε καθόλου BA. Στην συνέχεια διαλέξαμε αναγεννημένα φυτά με βλαστούς μήκους 1 έως 4 cm και τους μεταφέραμε στο ημιστερέο μέσο καλλιέργειας, κάθετα ως προς αυτό ώστε να δημιουργηθούν οι ρίζες. Επίσης σε κάθε δοχείο βάλουμε παραπάνω από έναν βλαστούς ώστε να έχουμε περισσότερα φυτά για φύτευση. Οι περιβαλλοντικές συνθήκες καλλιέργειας είναι ίδιες με αυτές της αναγέννησης και ο χρόνος έναρξης ριζοβολίας ήταν 8 έως 10 μέρες από την εισαγωγή των βλαστημένων φυτών στο νέο μέσο.



### ***Μεταφορά φυταρίων σε φυσικές συνθήκες καλλιέργειας σε έδαφος.***

Με την διαδικασία της ριζοβολίας δημιουργήσαμε φυτά τα οποία έπρεπε να τα βάλουμε σε γλάστρες με τύρφη ώστε να διαπιστώσουμε πόσα από αυτά θα μπορέσουν να επιβιώσουν. Για να επιτευχθεί αυτό έπρεπε πρώτα τα φυτά να περάσουν μια περίοδο σκληραγώγησης, διότι μέσα στα δοχεία στα οποία ριζοβόλησαν επικρατούσαν ασηπτικές συνθήκες. Τα φυτά που υπέστησαν σκληραγώγηση ήταν μόνο από 5 δοχεία, όπου βρίσκονταν τα ζωηρότερα, στα οποία για 11 μέρες συνεχόμενα ανοίγαμε τα καπάκια με την εξής χρονική συχνότητα : τις πρώτες 2 μέρες ανοίξαμε τα καπάκια για 15 λεπτά, για τις επόμενες 2 για 30 λεπτά, μετέπειτα για 3 μέρες τα αφήναμε 1 ώρα, για άλλες 2 μέρες τα κρατήσαμε 2 ώρες ανοικτά και τις τελευταίες 2 μέρες έπρεπε να μείνουν 4 ώρες. Μετά από αυτήν την περίοδο προσαρμογής, τα φυτά τα απομακρύναμε προσεκτικά από τα 3 δοχεία που απόμειναν με την παραπάνω ενέργεια, και τα βάλουμε για μερικά λεπτά σε ένα δίσκο πετρί ο οποίος περιείχε νερό, ώστε να διαλυθεί το καλλιεργητικό μέσο που βρισκόταν πάνω στις ρίζες. Τέλος έγινε η φύτευση σε 5 γλάστρες, με τα φυτά που ευδοκίμησαν τελικώς να είναι 4.

### **2.2 Καλλιέργεια παρουσία αργύρου ή σαλικυλικού οξέως.**

Εξετάσθηκε η ποσότητα δευτερογενών μεταβολιτών, παρουσία ή μη νιτρικού αργύρου και σαλικυλικού οξέως σε διάφορες συγκεντρώσεις. Οι εξεταζόμενες ουσίες εισήχθησαν στο υπόστρωμα, το οποίο έχει ίδια σύσταση με αυτό της καλλογένεσης, αλλά είχε και σαλικυλικό οξύ σε συγκεντρώσεις 138 mg (1 mM), 13,8 mg (0,1 mM) και 2,76 mg (0,02 mM) ανά λίτρο, ή είχε νιτρικό άργυρο με συγκεντρώσεις 17 g (100 mM) και 85 g (500 mM) ανά λίτρο καλλιεργητικού μέσου. Για κάθε μία από τις παραπάνω συγκεντρώσεις το υπόστρωμα που παρασκευάστηκε έφτανε για 10 καλλιεργητικά δοχεία, τα οποία αφού τα γεμίσαμε με 50 ml μέσου και αποστειρώθηκαν, τοποθετήσαμε μέσα τους νεαρά κομμάτια κάλλων του φυτού. Στην συνέχεια βάλουμε τα δοχεία στον σκοτεινό θάλαμο-επωαστήρα στους 25°C και τα αφήσαμε 1 εβδομάδα πριν πάρουμε μετρήσεις. Επίσης μία ποσότητα κάλλων, που είχαν εκτεθεί στις 3 συγκεντρώσεις σαλικυλικού οξέως, εισήχθη σε υπόστρωμα αναγέννησης εμπλουτισμένο με σαλικυλικό ίδιας συγκέντρωσης με αυτό που

καλλιεργήθηκαν οι κάλλοι. Η ποσότητα καλλιεργητικού μέσου έφτανε για 3 δοχεία για κάθε μία από τις συγκεντρώσεις και αφέθηκαν να βλαστήσουν σε συνθήκες διάχυτου φωτός σε θερμοκρασίες δωματίου.

### **2.3 Εξαγωγή ουσιών από ιστούς, χρωματογραφία χάρτου, ποσοτικοποίηση.**

#### ***Εκχύλιση ιστών***

Για να μπορέσουμε να μετρήσουμε τους δευτερογενής μεταβολίτες και το πόσο επηρεάστηκαν από τις ουσίες χρειάστηκε να απομονωθούν με εκχύλιση. Αρχικά, εισάγαμε 0,1 g από τους κάλλους του φυτού που δημιουργήθηκαν από την διαδικασία της καλλογένεσης και τους τοποθετήσαμε σε έναν φυγοκεντρικό σωλήνα μαζί με διάλυμα 1ml αιθανόλης 70% . Αφού πρώτα ομογενοποιήσαμε το μείγμα το βάλουμε για φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 10000xg. Τέλος με την βοήθεια μιας πιπέτας το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό σωλήνα και αποθηκεύτηκε στους -20°C. Η ίδια διαδικασία χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή ουσιών από τους κάλλους που εκτέθηκαν σε σαλικυλικό οξύ ή νιτρικό άργυρο, όμως εδώ γίνανε 5 εκχυλίσεις, δηλαδή μία ανά εβδομάδα, ξεκινώντας από την πρώτη εβδομάδα καλλιέργειας.

#### ***Χρωματογραφία χάρτου***

Από κάθε δείγμα πήραμε 20-30  $\mu\text{L}$  από το καθένα και με μία πιπέτα ακριβείας τοποθετήθηκαν σε ένα διηθητικό χαρτί Whatman 3MM. Στην συνέχεια το χαρτί με τα δείγματα τοποθετήθηκε όρθιο σε ένα συσκευή χρωματογραφίας χάρτου και τα δείγματα αναπτύχθηκαν με την άνω φάση μίγματος βουτανόλης/οξικού/νερού σε αναλογία 4\1\5 για περίπου 30 λεπτά, ώστε να διαχωριστούν τα συστατικά του μίγματος. Κατόπιν το χαρτί αφέθηκε να στεγνώσει και τα διαχωρισθέντα συστατικά έγιναν ορατά από τον φθορισμό τους υπό υπεριώδες φως 300 nm. Εκεί διακρίναμε τουλάχιστον δύο φωσφορίζουσες ουσίες.

## **Φασματοσκοπία υπεριώδους**

Εφόσον η χρωματογραφία χάρτου μας έδειξε την ύπαρξη φθοριζουσών φαινολικών ουσιών, έπρεπε να μετρήσουμε και την ποσότητά τους στους κάλλους. Αυτό επετεύχθη με την βοήθεια φασματοφωτόμετρου jasco v-630 bio. Μέσα στον θάλαμο όπου λειτουργούν οι λάμπες του φασματοφωτόμετρου, υπάρχουν 2 κυψελίδες χαλαζία, τις οποίες γεμίσαμε με καθαρή αιθανόλη καταγράφηκε η γραμμή βάσης του φάσματος απορρόφησης (base line) στην περιοχή από 200 έως 600 nm. Στην συνέχεια, 10 μικρόλιτρα δείγματος πού εκχυλίστηκε από τους κάλλους τοποθετήθηκε σε 500 μl αιθανόλης εντός της μίας κυψελίδας χαλαζία και καταγράφηκε το φάσμα απορρόφησης στην ίδια περιοχή, Η άλλη κυψελίδα ήταν το κοντρόλ προς το οποίο συγκρίνεται η απορρόφηση των συστατικών του δείγματος. Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε για όλα τα δείγματα. Το μόνο που άλλαζε ήταν η ποσότητα δείγματος η οποία χρησιμοποιείται για την καταγραφή του φάσματος. Ήταν 10 μL για τα δείγματα από κάλλους πού υποβλήθηκαν σε έκθεση σε νιτρικό άργυρο και 2 μL για τα δείγματα του σαλικυλικού οξέος. Η συγκριτική ποσοτικοποίηση των φαινολικών ουσιών έγινε με μέτρηση της απορρόφησης στα μέγιστα απορρόφησης του φάσματος.

### **2.4 Διαχωρισμός ουσιών με υγρή χρωματογραφία και ταυτοποίηση με φασματομετρία μαζών.**

Η χρωματογραφία υγρής φάσεως, σε συνδιασμό με φασματοσκοπία μαζών (LC-MS) επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας όργανο τύπου LCMS 2010EV Shimadzu στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ), με επόπτη τον καθηγητή κ. Κ. Λίτινα. Η στήλη χρωματογραφίας ήταν Pathfinder silica 100, 3.5 UM αντίστροφης φάσης, με διαστάσεις 4.6 x 150 mm. Το διάλυμα της ρέουσας υγρής φάσης ήταν 50% v/v μεθανόλη και 0.05% φορμικού οξέος σε νερό, και κινούνταν με ταχύτητα 0.4 ml/min. Οι ουσίες που εξέρχονταν ανιχνεύθηκαν από την απορρόφησή τους στο εύρος φάσματος 190-800 nm, με χρήση ανιχνευτή SPD-M20A σειράς διόδων (diode array). Επιπλέον εκτέθηκαν σε φασματοσκοπία μαζών, των αρνητικών και θετικών ιόντων πού προκύπτουν από ιονισμό με ηλεκτρονιο-ψεκασμό με δέσμη ηλεκτρονίων 1.4 kV, σε ατμόσφαιρα

αζώτου ροής 1.5 λίτρων ανά λεπτό. Κάτω από αυτές τις συνθήκες διατηρήθηκαν τα μοριακά ιόντα  $(N+H)^+$  (N+1),  $(N+Na)^+$  (N+23), καθώς και τα αρνητικά  $(N-H)^-$  (N-1).

### 3. Αποτελέσματα

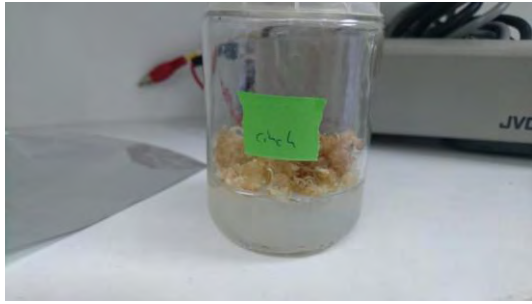
Το φυτό *Cichorium spinosum* (Εικ. 1) είναι σχετικά εύκολο να υποβληθεί σε ιστοκαλλιέργεια. Χρησιμοποιήθηκαν τα κεντρικά στελέχη των φύλλων του. Κάλλοι εμφανίσθηκαν μετά από μία εβδομάδα περίπου, ήταν καλής ποιότητας, χωρίς σημαντικό καφέτιασμα και αναπτυσσόταν γρήγορα (Εικ 2 και 3). Οι κάλλοι καλλιεργήθηκαν και σε μέσα περιέχοντα σαλικυλικό οξύ ή νιτρικό άργυρο.



**Εικόνα 1.** Φωτογραφία φυτού *Cichorium spinosum*, το οποίο χρησιμοποιήσαμε στην εργασία αυτή



**Εικόνα 2.** Κάλλοι του φυτού *Cichorium spinosum*, οι οποίοι προέρχονται από έκφυτα κεντρικού αγωγού ιστού φύλλων του φυτού, μετά από πέντε εβδομάδες καλλιέργειας. Διακρίνονται τα αρχικά πράσινα έκφυτα από τις άκρες των οποίων προήλθαν οι κάλλοι.



**Εικόνα 3.** Κάλλοι του φυτού *Cichorium spinosum*, μετά από μακροχρόνια καλλιέργεια .

Σε καλλιεργητικά μέσα αναγέννησης, υπό διάχυτο φως ημέρας, αναπτύχθηκαν πράσινοι βλαστοί (Εικ. 4). Μεταφορά των βλαστών σε μέσα ριζοβολίας έδωσε εύκολα ρίζες καθώς ο βλαστός συνέχιζε να αυξάνεται (Εικ. 5). Μετά από σταδιακή σκληραγώγηση σε συνθήκες εκτός δοχείου καλλιέργειας, τα φυτά μεταφέρθηκαν σε γλάστρες με χώμα και αναπτύχθηκαν κανονικά υπό φυσιολογικές συνθήκες (Εικ. 6).



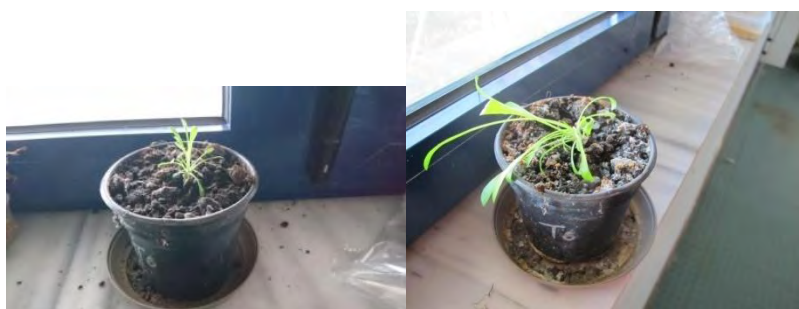
**Εικόνα 4.** Αναγέννηση βλαστών *Cichorium spinosum* από κάλλους, μετά από 8 εβδομάδες σε καλλιεργητικά μέσα αναγέννησης.



**Εικόνα 5.** Ριζοβολία βλαστών *Cichorium spinosum* μετά από 5 εβδομάδες σε καλλιεργητικά μέσα ριζοβολίας.

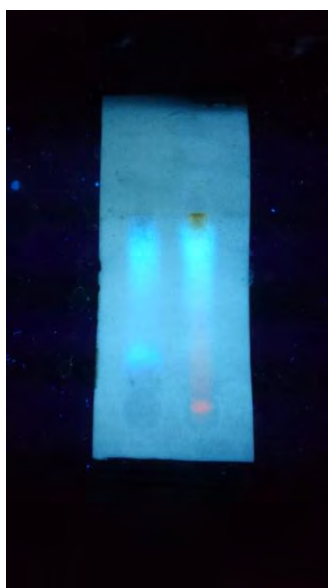
Εβδομάδα 1

Εβδομάδα 9



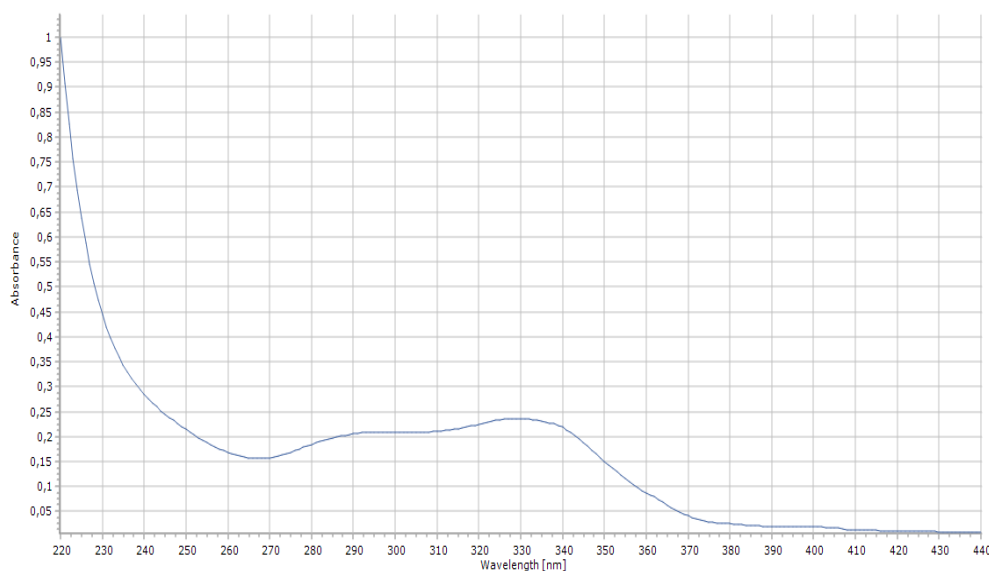
**Εικόνα 6.** Πλήρως αναγεννημένο φυτό *Cichorium spinosum*, προερχόμενο από κάλλους, μία και 9 εβδομάδες μετά την μεταφορά του σε χώμα από τα μέσα ριζοβολίας.

Η ανάλυση των συστατικών των κάλλων με χρωματογραφία χάρτου έδειξε την παρουσία φθορίζουσών υπό υπεριώδες φως ουσιών (Εικ. 7). Ο μπλε φθορισμός υποδηλώνει την παρουσία υποκατεστημένων φαινολικών δακτυλίων. Μία τουλάχιστον εξ' αυτών, με Rf 0.27 υπάρχει μόνον στους κάλλους.

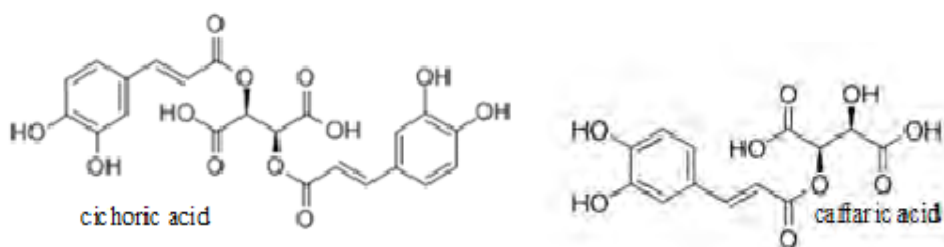


**Εικόνα 7.** Χρωματογραφία χάρτου (PC) εκχυλισμάτων από φυτό (δεξιά) και από κάλλους (αριστερά) *Cichorium spinosum*. Το διάλυμα χρωματογραφίας ήταν βουτανόλη/οξικό οξύ/ νερό, 4/1/5. Μία φθορίζουσα ουσία εμφανίζεται σε αμφότερα τα εκχυλίσματα, με Rf = 0.82. Μία δεύτερη φθορίζουσα ουσία εμφανίζεται μόνο σε εκχυλίσματα από κάλλους, με Rf = 0.27. Η ουσίες που φθορίζουν με κόκκινο χρώμα είναι διάφορες χλωροφύλλες.

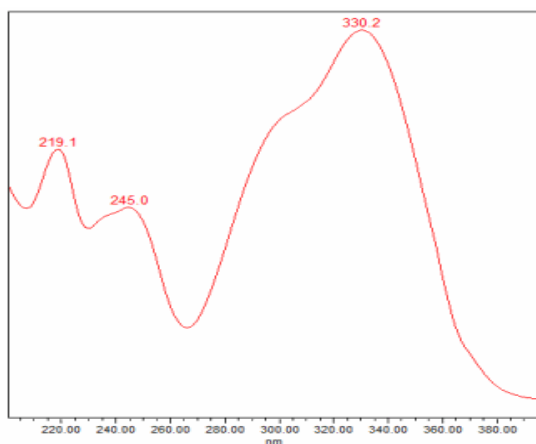
Η καταγραφή του φάσματος απορρόφησης των εκχυλισμάτων από τους κάλους (Εικ. 8) έδειξε την παρουσία μεγίστων απορρόφησης στα 330 και 290 nm. Η κορυφή στα 330 nm δείχνει την παρουσία, μεταξύ και άλλων φαινολικών, του κινχορικού και καφταρικού οξέως (Εικ. 9, 10, 11), που υπάρχουν στο φυτό αυτό. Οι ουσίες αυτές αποτελούν εστέρες του καφεϊκού οξέως με ταρταρικό οξύ.



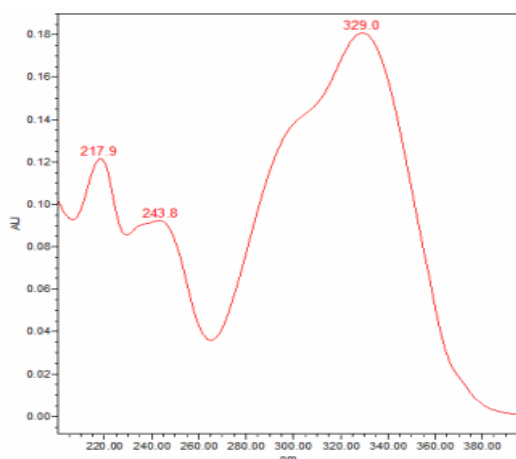
**Εικόνα 8.** Φάσμα απορρόφησης υπεριώδους (UV) του εκχυλίσματος κάλλων σε 70% αιθανόλη. Μέγιστα απορρόφησης παρατηρούνται στα 330 και 290 nm.



**Εικόνα 9.** Μοριακές δομές του κινχορικού (cichoric acid, MW = 474) και καφταρικού οξέως (caftaric acid, MW = 312), βασικών συστατικών των φυτών *Cichorium*.



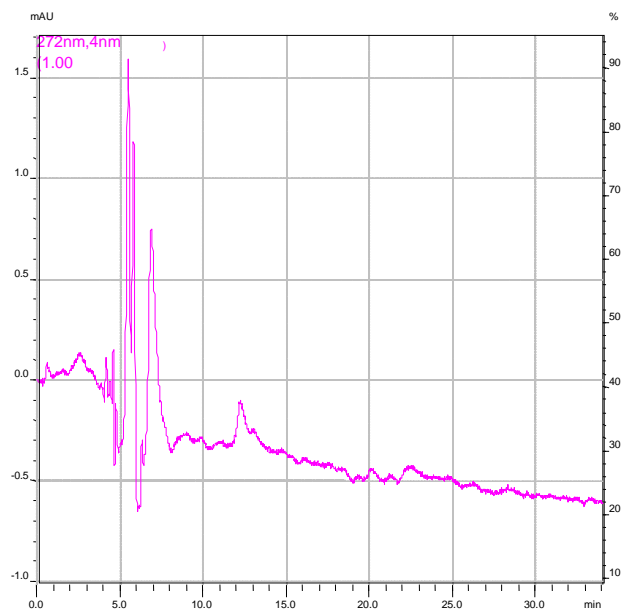
**Εικόνα 10.** Φάσμα απορροφήσεων υπεριώδους του καθαρού κιχορικού οξέως. Μέγιστα απορρόφησης στα 330, 294, 245 και 219 nm.



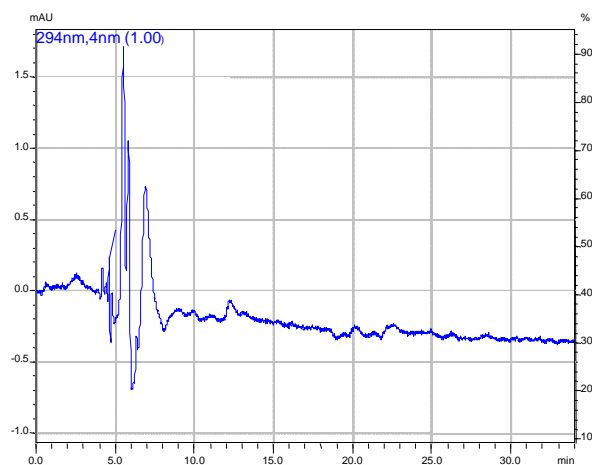
**Εικόνα 11.** Φάσμα απορροφήσεων υπεριώδους του καθαρού καφταρικού οξέως. Μέγιστα απορρόφησης στα 329, 294, 244 και 218 nm.

Η ανάλυση των εκχυλισμάτων με υγρή χρωματογραφία δείχνει τουλάχιστον δύο συστατικά, εκλυόμενα από την στήλη μετά από 5.54 και 7.2 min, είτε η ανίχνευση έγινε από την απορρόφηση των εκλουομένων ουσιών στα 272 nm (Εικ. 12), είτε στα 294 (Εικ. 13) ή στα 329 nm (Εικ. 14). Η ομοιότητα στην σχετική αναλογία των κορυφών απορρόφησης και στα 3 μήκη κύματος δείχνει ότι πρόκειται για ουσίες που απορροφούν και στα 3 αυτά μήκη κύματος. Τα ίδια χρωματογραφήματα παράχθηκαν και όταν αναλύθηκαν χωριστά οι δύο φθορίζουσες ουσίες, με Rf 0.82 και Rf 0.27.

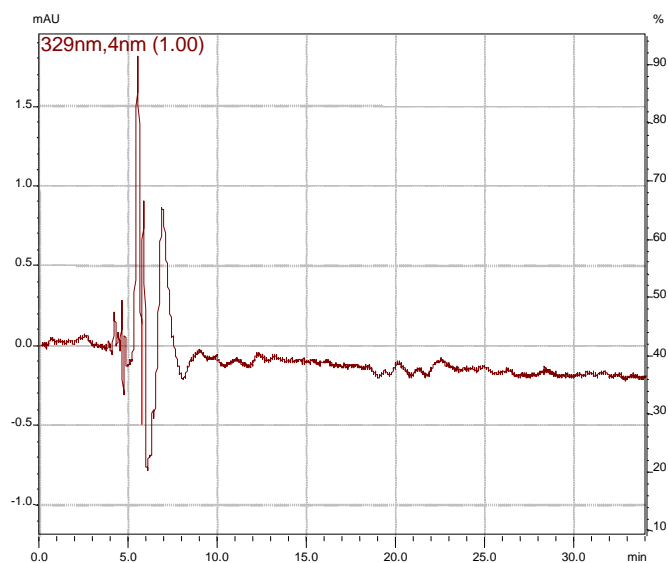




**Εικόνα 12.** Χρωματογράφημα υγρής χρωματογραφίας (LC) του εκχυλίσματος με 70% αιθανόλη από κάλλους *Cichorium spinosum*. Οι ουσίες που διαχωρίστηκαν ανιχνεύονται από την απορρόφησή των στα 272 nm. Κύριες κορυφές εκλύονται από την στήλη χρωματογραφίας στα 5.54 και 7.2 min.

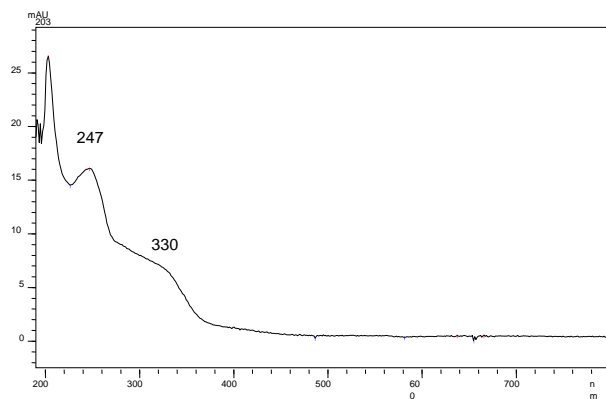


**Εικόνα 13.** Χρωματογράφημα υγρής χρωματογραφίας (LC) του εκχυλίσματος με 70% αιθανόλη από κάλλους *Cichorium spinosum*. Οι ουσίες που διαχωρίστηκαν ανιχνεύονται από την απορρόφησή των στα 294 nm. Η κύρια κορυφή εκλύεται από την στήλη χρωματογραφίας στα 5.54 min και μία δεύτερη σημαντική στα 7.2 min.

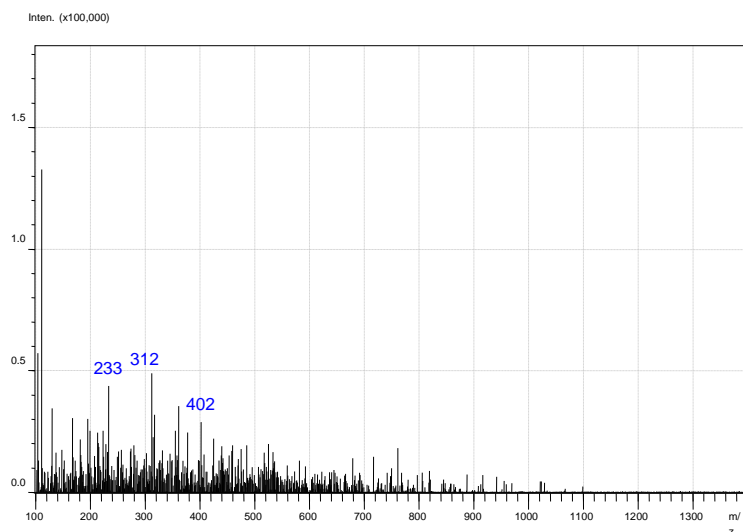


**Εικόνα 14.** Χρωματογράφημα υγρής χρωματογραφίας (LC) του εκχυλίσματος με 70% αιθανόλη από κάλλους *Cichorium spinosum*. Οι ουσίες που διαχωρίστηκαν ανιχνεύονται από την απορρόφησή τους στα 329 nm. Κύριες κορυφές εκκλύονται από την στήλη χρωματογραφίας στα 5.54 και 7.2 min.

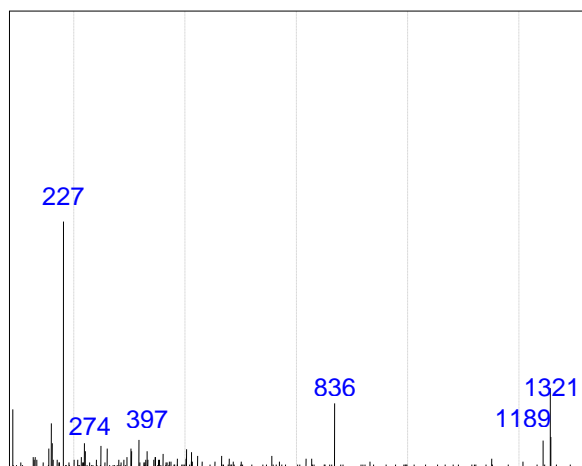
Η φθορίζουσα ουσία με Rf 0,87 στα χρωματογραφήματα χάρτου εκχυλίστηκε από το χαρτί με 70% αιθανόλη και υποβλήθηκε σε LC-MS. Το χρωματογράφημα LC ήταν ίδιο με αυτό του μίγματος των δύο ουσιών. Το φάσμα απορρόφησης της κορυφής στα 5.54 min καταγράφηκε (Εικ. 17). Υπάρχουν τα μέγιστα απορρόφησης στα 330 και 247 nm που φανερώνουν την παρουσία κιχορικού και καφταρικού οξέως, αλλά οι αναλογίες της έντασης απορρόφησης των κορυφών είναι διαφορετική από αυτήν των καθαρών οξέων και επομένως συνυπάρχουν και άλλα φαινολικά. Αυτό φαίνεται και στην ανάλυση των θετικών και αρνητικών ιόντων της φασματοσκοπίας μαζών του δείγματος αυτού (Εικ. 18, 20), στην οποία ανιχνεύονται ιόντα διαφόρων μαζών. Καμία από τις κύριες κορυφές ιόντων δεν είχε την μάζα του θετικού ιόντος ( $M+H^+ = 474+1$ ) ή του αρνητικού ιόντος ( $M^- = 474-1$ ) του κιχορικού οξέως. Ούτε το θετικό ( $312+1$ ) ή το αρνητικό ( $312-1$ ) ιόν του καφταρικού οξέως ήταν το κύριο συστατικό της κορυφής αυτής. Η κύρια απορρόφηση στα 247 nm υποδηλώνει την παρουσία κάποιου υδροξυλιωμένου βενζοϊκού οξέως, πιθανώς υποκατεστημένου σαλικυλικού οξέως.



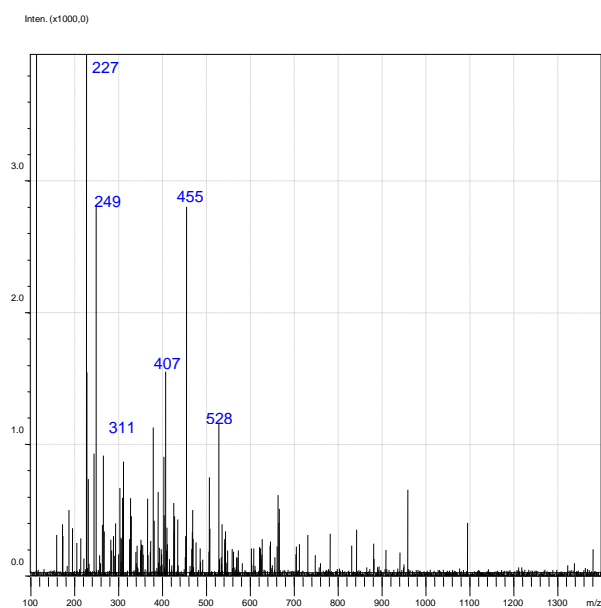
**Εικόνα 15.** Φάσμα UV της κύριας ουσίας (με χρόνο έκλυσης 5.54 min) του χρωματογραφήματος της ουσίας με  $R_f = 0.87$ . Μέγιστα απορρόφησης παρατηρούνται στα 330 και 247 nm σε συμφωνία με αυτά καθαρών κιχορικού και καφταρικού οξέως, αλλά με διαφορετική ένταση απορρόφησης.



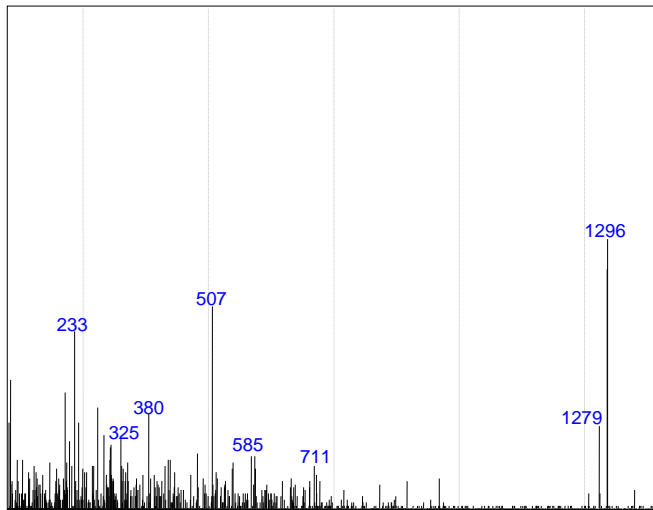
**Εικόνα 16.** Φάσμα μαζών (MS) αρνητικών ιόντων της κορυφής LC στα 5.54 min του χρωματογραφήματος της ουσίας με  $R_f=0.87$ .



**Εικόνα 17.** Φάσμα μαζών (MS) θετικών ιόντων της κορυφής LC στα 5.54 min του χρωματογραφήματος της ουσίας με  $R_f=0.82$ .



**Εικόνα 18.** Φάσμα μαζών (MS) αρνητικών ιόντων της κορυφής LC στα 5.54 min του χρωματογραφήματος της ουσίας με  $R_f=0.27$ .

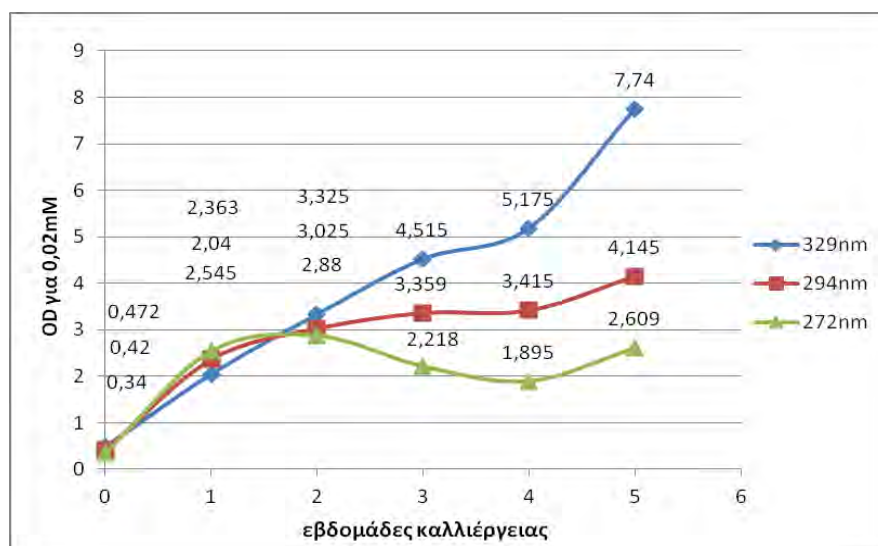


**Εικόνα 19.** Φάσμα μαζών (MS) θετικών ιόντων της κορυφής LC στα 5.54 min του χρωματογραφήματος της ουσίας με  $R_f=0.27$ .

Τα σχετικά ποσά των φαινολικών ουσιών στους κάλλους, κατά τις διάφορες φάσεις της καλλιέργειάς των και μετά από έκθεση σε σαλικυλικό οξύ ή νιτρικό άργυρο, μετρήθηκαν έμμεσα από την απορρόφηση του εκχυλίσματος σε τρία μήκη κύματος, στα οποία οι φαινολικές ουσίες του εκχυλίσματος απορροφούν τα μέγιστα. Στους πίνακες 1, 2 και 3 καταγράφονται οι απορροφήσεις μετά από έκθεση σε 0.02, 0.1 και 1 mM αντίστοιχα σαλικυλικού οξέως. Με βάση τους πίνακες αυτούς διαμορφώθηκαν τα διαγράμματα 1, 2 και 3 αντίστοιχα. Οι απορροφήσεις των εκχυλισμάτων από κάλλους που δεν είχαν υποστεί έκθεση σε σαλικυλικό οξύ ή σε νιτρικό άργυρο ήταν σταθερές και ίσες με τις τιμές που δίνονται στους πίνακες ή στα διαγράμματα για δείγματα με χρόνο μηδέν. Γενικώς υπήρξε αύξηση στο ποσό των φαινολικών, αλλά τα αποτελέσματα επηρεάστηκαν από την συγκέντρωση του σαλικυλικού οξέως. Παρατηρήθηκε μία κυκλική χρονική διακύμανση στο ποσό των φαινολικών. Υπήρξαν φάσεις αύξηση και φάσεις παροδικής μερικής μείωσης αυτών, περισσότερο εμφανείς για την συγκέντρωση 0.1 mM σαλικυλικού οξέως. Οι μεγαλύτερες αυξήσεις φαινολικών παρατηρήθηκαν κατά την 5<sup>η</sup> εβδομάδα της καλλιέργειας, αλλά για την συγκέντρωση του 1 mM σαλικυλικού οξέως αυτή συνέβη πολύ ενωρίτερα, κατά την 2<sup>η</sup> εβδομάδα της καλλιέργειας. Αυτό γίνεται πιο εμφανές όταν συγκρίνονται οι απορροφήσεις στο μέγιστο της απορρόφησης του κιχορικού οξέως, στα 329 περίπου nm (διάγραμμα 4).

**Πίνακας 1.** Σχετικά ποσά της φθορίζουσας ουσίας σε 0.1 g κάλων *Cichorium spinosum*, παρουσία 0,02 mM σαλικυλικού οξέος, μετρηθέντα με βάση την απορρόφηση στα 329, 294 και 272 nm, διαλύματος της ουσίας σε 50 ml αιθανόλης

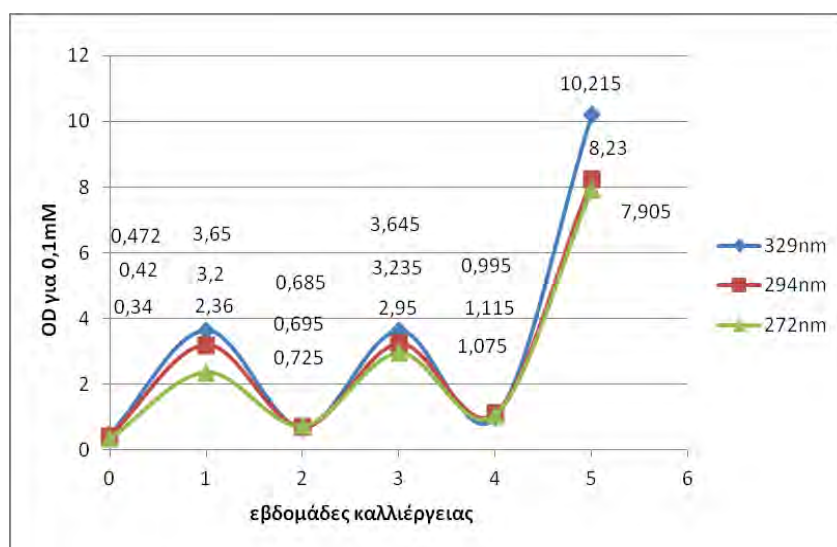
Εβδομάδες καλλιέργειας	OD 329 nm	OD 294 nm	OD 272 nm
0 (κοντρόλ)	0,472	0,42	0,34
1	2,04	2,363	2,545
2	3,325	3,025	2,88
3	4,515	3,359	2,218
4	5,175	3,415	1,895
5	7,74	4,145	2,609



**Διάγραμμα 1.** Σχετικά ποσά φθορίζουσών ουσιών σε κάλλους *Cichorium*, οι οποίοι καλλιεργήθηκαν παρουσία 0.02 mM σαλικυλικού οξέως. Τα ποσά συγκρίθηκαν μέσω των απορροφήσεων των εκχυλισμάτων σε τρία διαφορετικά μήκη κύματος.

**Πίνακας 2.** Σχετικά ποσά της φθορίζουσας ουσίας σε 0.1 g κάλων *Cichorium spinosum*, παρουσία 0,1 mM σαλικυλικού οξέος, μετρηθέντα με βάση την απορρόφηση στα 329, 294 και 272 nm, διαλύματος της ουσίας σε 50 ml αιθανόλης.

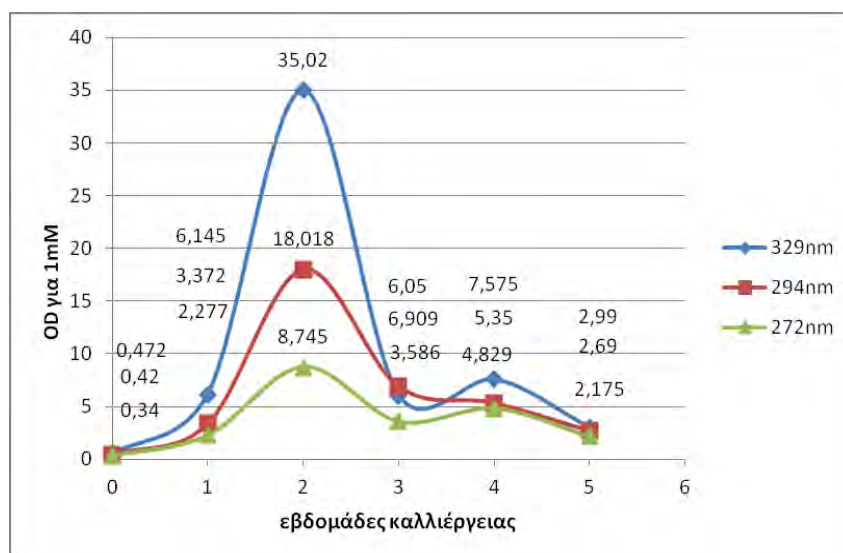
Εβδομάδες καλλιέργειας	OD 329 nm	OD 294 nm	OD 272 nm
0 (κοντρόλ)	0,472	0,42	0,34
1	3,65	3,2	2,36
2	0,685	0,695	0,725
3	3,645	3,235	2,95
4	0,995	1,115	1,075
5	10,215	8,23	7,905



**Διάγραμμα 2.** Σχετικά ποσά φθορίζουσών ουσιών σε κάλλους *Cichorium*, οι οποίοι καλλιεργήθηκαν παρουσία 0.1 mM σαλικυλικού οξέως. Τα ποσά συγκρίθηκαν μέσω των απορροφήσεων των εκχυλισμάτων σε τρία διαφορετικά μήκη κύματος.

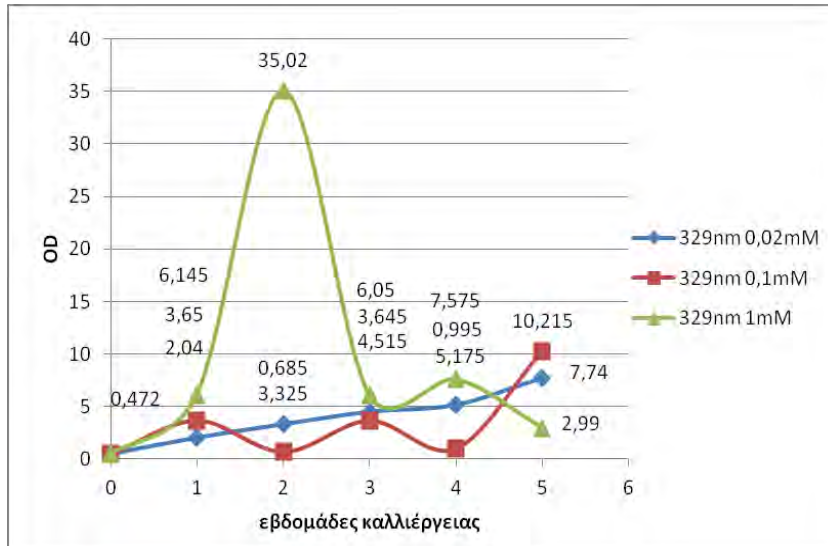
**Πίνακας 3.** Σχετικά ποσά της φθορίζουσας ουσίας σε 0.1 g κάλων *Cichorium spinosum*, παρουσία 1 mM σαλικυλικού οξέως, μετρηθέντα με βάση την απορρόφηση στα 329, 294 και 272 nm, διαλύματος της ουσίας σε 50 ml αιθανόλης

Εβδομάδες καλλιέργειας	OD 329 nm	OD 294 nm	OD 272 nm
0	0,472	0,42	0,34
1	2,04	2,363	2,545
2	3,325	3,025	2,88
3	4,515	3,359	2,218
4	5,175	3,415	1,895
5	7,74	4,145	2,609

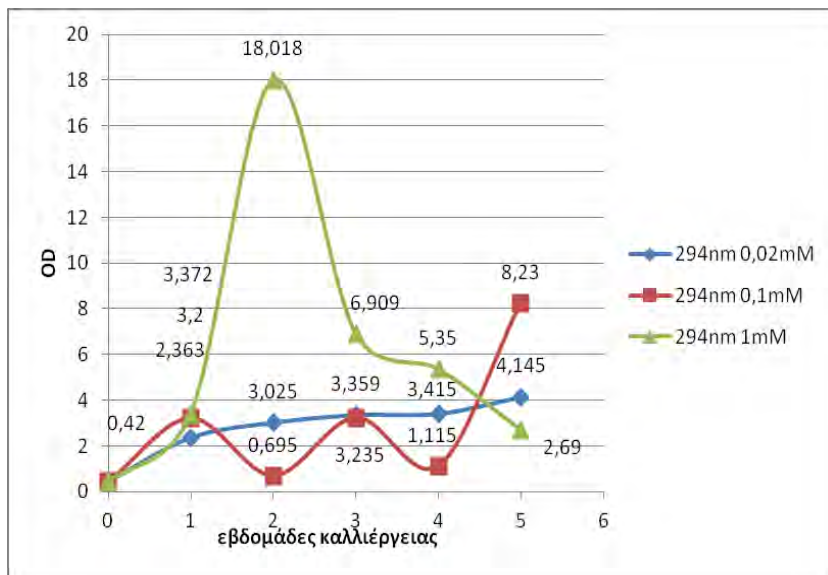


**Διάγραμμα 3.** Σχετικά ποσά φθορίζουσών ουσιών σε κάλλους *Cichorium spinosum*, οι οποίοι καλλιεργήθηκαν παρουσία 1 mM σαλικυλικού οξέως. Τα ποσά συγκρίθηκαν μέσω των απορροφήσεων των εκχυλισμάτων σε τρία διαφορετικά μήκη κύματος.

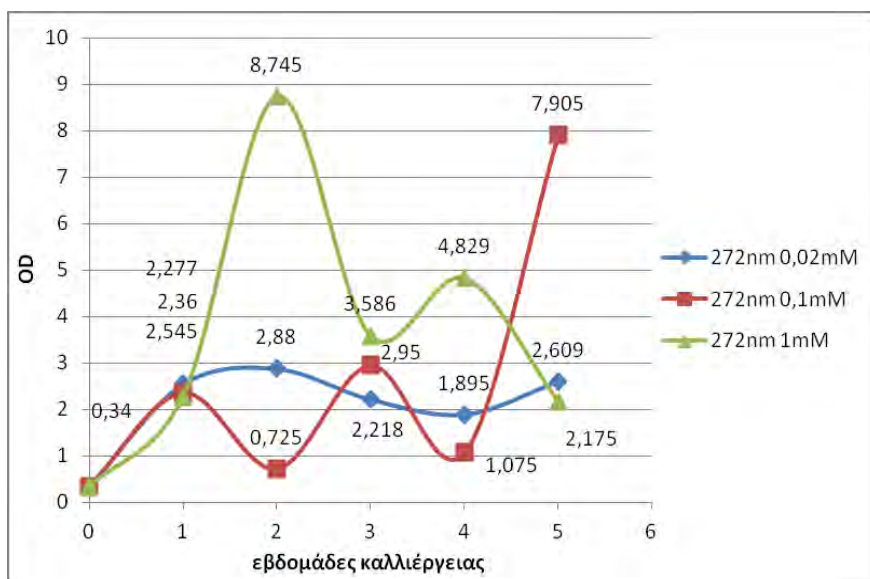




**Διάγραμμα 4.** Σύγκριση της επίδρασης του σαλικυλικού οξέος σε συγκεντρώσεις 0,1, 0,02, και 1 mM στο σχετικό ποσό της φθορίζουσας ουσίας του *Cichorium spinosum*. Τα σχετικά ποσά της ουσίας συγκρίθηκαν με χρήση της απορρόφησης στα 329 nm διαλυμάτων της ουσίας από 0.1 g κάλλων σε 50 ml αιθανόλης.



**Διάγραμμα 5.** Σύγκριση της επίδρασης του σαλικυλικού οξέος σε συγκεντρώσεις 0,1, 0,02, και 1 mM στο σχετικό ποσό της φθορίζουσας ουσίας του *Cichorium spinosum*. Τα σχετικά ποσά της ουσίας συγκρίθηκαν με χρήση της απορρόφησης στα 294 nm διαλυμάτων της ουσίας από 0.1 g κάλλων σε 50 ml αιθανόλης

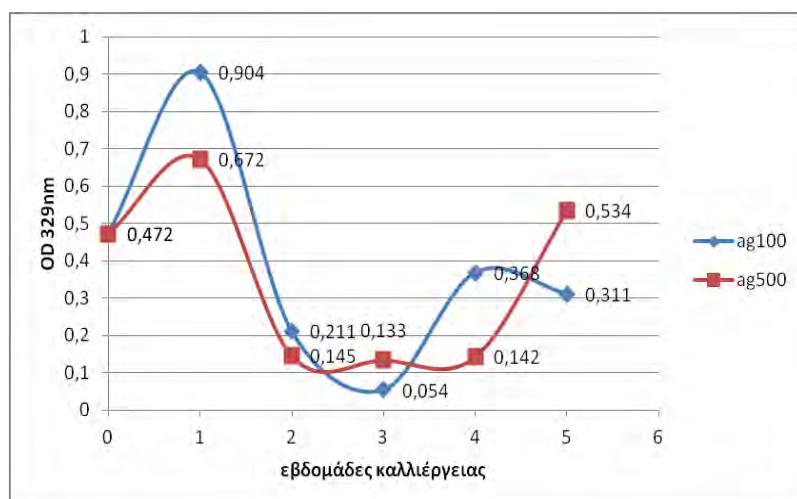


**Διάγραμμα 6.** Σύγκριση της επίδρασης του σαλικυλικού οξέος σε συγκεντρώσεις 0,1, 0,02, και 1 mM στο σχετικό ποσό της φθορίζουσας ουσίας του *Cichorium spinosum*. Τα σχετικά ποσά της ουσίας συγκρίθηκαν με χρήση της απορρόφησης στα 272 nm διαλυμάτων της ουσίας από 0.1 g κάλλων σε 50 ml αιθανόλης.

Τα αποτελέσματα της έκθεσης σε νιτρικό άργυρο δίνονται στους πίνακες 4-6 και στα σχετικά διαγράμματα 7-9. Είτε μετρήθηκαν τα φαινορικά που απορροφούν μέγιστα στα 329 nm (πίνακας 4 και διάγραμμα 7), είτε όσα απορροφούν στα 272 nm (πίνακας 5 και διάγραμμα 8), είτε στα 294 nm (πίνακας 6 και διάγραμμα 9), το σχετικό ποσό των φαινολικών αυξήθηκε κυρίως κατά την πρώτη εβδομάδα της έκθεσης σε νιτρικό άργυρο. Κατόπιν μειώθηκε σε επίπεδα μικρότερα του κοντρόλ και επανήλθε σε κάπως αυξημένα επίπεδα κατά την 5<sup>η</sup> εβδομάδα της καλλιέργειας. Παραδόξως, η αύξηση των φαινολικών κατά την πρώτη εβδομάδα της καλλιέργειας ήταν μεγαλύτερη για την μικρότερη συγκέντρωση νιτρικού αργύρου (100 μM), ενώ αυτή της 5<sup>ης</sup> εβδομάδος παρατηρήθηκε μόνο για την υψηλότερη συγκέντρωση νιτρικού αργύρου (500 μM). Συμπεραίνεται ότι η συγκέντρωση των 500 μM ίσως είναι βλαπτική σε κάποιο βαθμό και το επαγωγικό αποτέλεσμα παρατηρείται αργότερα, όταν ο μεταβολισμός του κάλλου μειώνει την συγκέντρωση του νιτρικού αργύρου ή προσαρμόζεται σε αυτή.

**Πίνακας 4.** Σχετικά ποσά της φθορίζουσας ουσίας σε 0.1 g κάλων *Cichorium spinosum*, παρουσία 100 & 500  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , μετρημένα με βάση την απορρόφηση στα 329 nm διαλύματος της ουσίας σε 50 mL αιθανόλης.

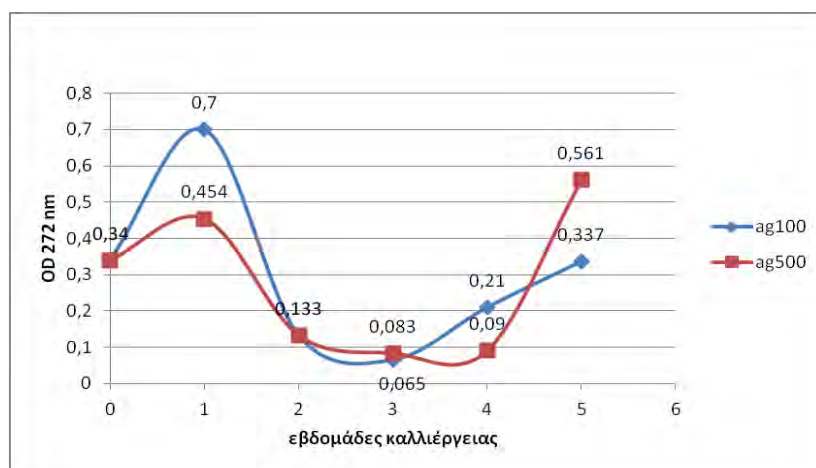
	<b>Ag 100 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>Ag 500 <math>\mu\text{M}</math></b>
<b>Εβδομάδες καλλιέργειας</b>	<b>OD 329 nm</b>	<b>OD 329 nm</b>
0	0,472	0,472
1	0,904	0,672
2	0,211	0,145
3	0,054	0,133
4	0,368	0,142
5	0,311	0,534



**Διάγραμμα 7.** Επίδραση 100 & 500  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  στο σχετικό ποσό φθορίζουσας ουσίας του *Cichorium spinosum*, μετρημένη από την απορρόφηση διαλύματος της ουσίας από 0.1 g κάλων σε 50 ml αιθανόλης.

**Πίνακας 5.** Σχετικά ποσά της φθορίζουσας ουσίας σε 0.1 g κάλων *Cichorium spinosum*, παρουσία 100 & 500  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , μετρημένα με βάση την απορρόφηση στα 272 nm διαλύματος της ουσίας σε 50 mL αιθανόλης.

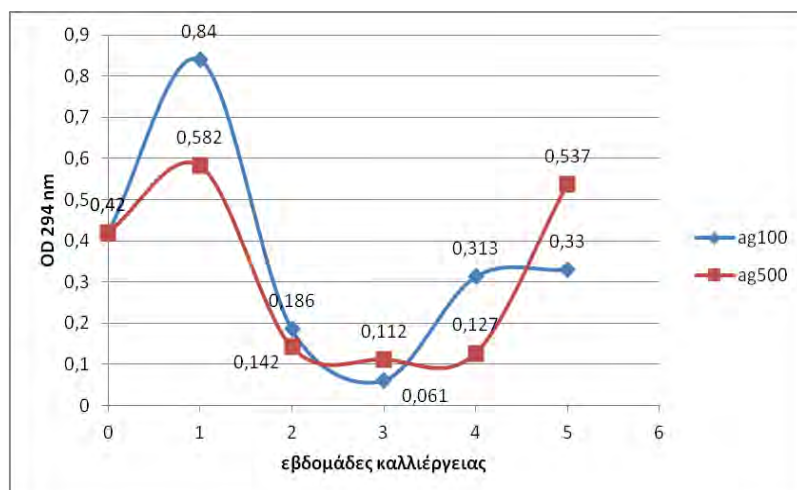
	<b>Ag100</b>	<b>Ag500</b>
<b>Εβδομάδες καλλιέργειας</b>	<b>OD 272 nm</b>	<b>OD 272 nm</b>
0	0,34	0,34
1	0,7	0,454
2	0,133	0,133
3	0,065	0,083
4	0,21	0,09
5	0,337	0,561



**Διάγραμμα 8.** Επίδραση 100 & 500  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  στο σχετικό ποσό φθορίζουσας ουσίας του *Cichorium spinosum*, μετρημένη από την απορρόφηση στα 272 nm διαλύματος της ουσίας από 0.1 g κάλων σε 50 ml αιθανόλης.

**Πίνακας 6.** Σχετικά ποσά της φθορίζουσας ουσίας σε 0.1 g κάλων *Cichorium spinosum*, παρουσία 100 & 500  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , μετρημένα με βάση την απορρόφηση στα 329 nm διαλύματος της ουσίας σε 50 mL αιθανόλης.

	Ag 100 $\mu\text{M}$	Ag 500 $\mu\text{M}$
εβδομάδες	OD 294 nm	OD 294 nm
0	0,42	0,42
1	0,84	0,582
2	0,186	0,142
3	0,061	0,112
4	0,313	0,127
5	0,33	0,537



**Διάγραμμα 9.** Επίδραση 100 & 500  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  στο σχετικό ποσό φθορίζουσας ουσίας του *Cichorium spinosum*, μετρημένη από την απορρόφηση στα 294 nm διαλύματος της ουσίας από 0.1 g κάλων σε 50 ml αιθανόλης.

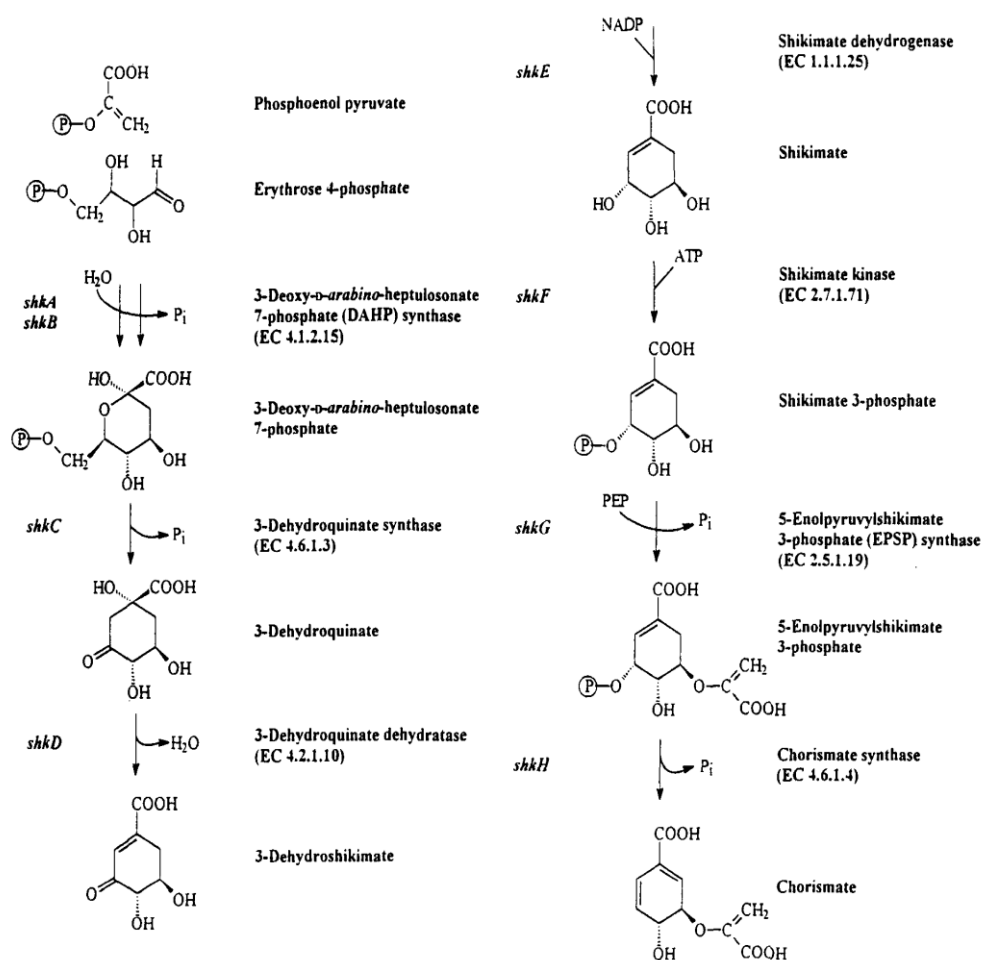
Εφόσον στα προηγούμενα πειράματα διαπιστώθηκε ότι το σαλικυλικό οξύ αυξάνει δραστικά τις συγκεντρώσεις των φθορίζουσών φαινολικών, επιχειρήσαμε να διαπιστώσουμε εάν αυτό επηρεάζει και την αναγεννητική ικανότητα των κάλων. Στον πίνακα 7 διαπιστώνεται ότι αναλόγως της συγκεντρώσεως του σαλικυλικού οξέως, ο παράγοντας αυτός μπορεί και να υπερ-τετραπλασιάσει τον αριθμό των βλαστών που αναγεννώνται από κάλλους του φυτού που εξετάσαμε.

**Πίνακας 7.** Αναγεννητική ικανότητα κάλλων *Cichorium spinosum* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων σαλικυλικού οξέως (SA). Εμφανίζεται ο αριθμός των αναγεννημένων βλαστών ανά gr κάλλου. Τα αποτελέσματα προέρχονται από πείραμα πού επαναλήφθηκε 3 φορές.

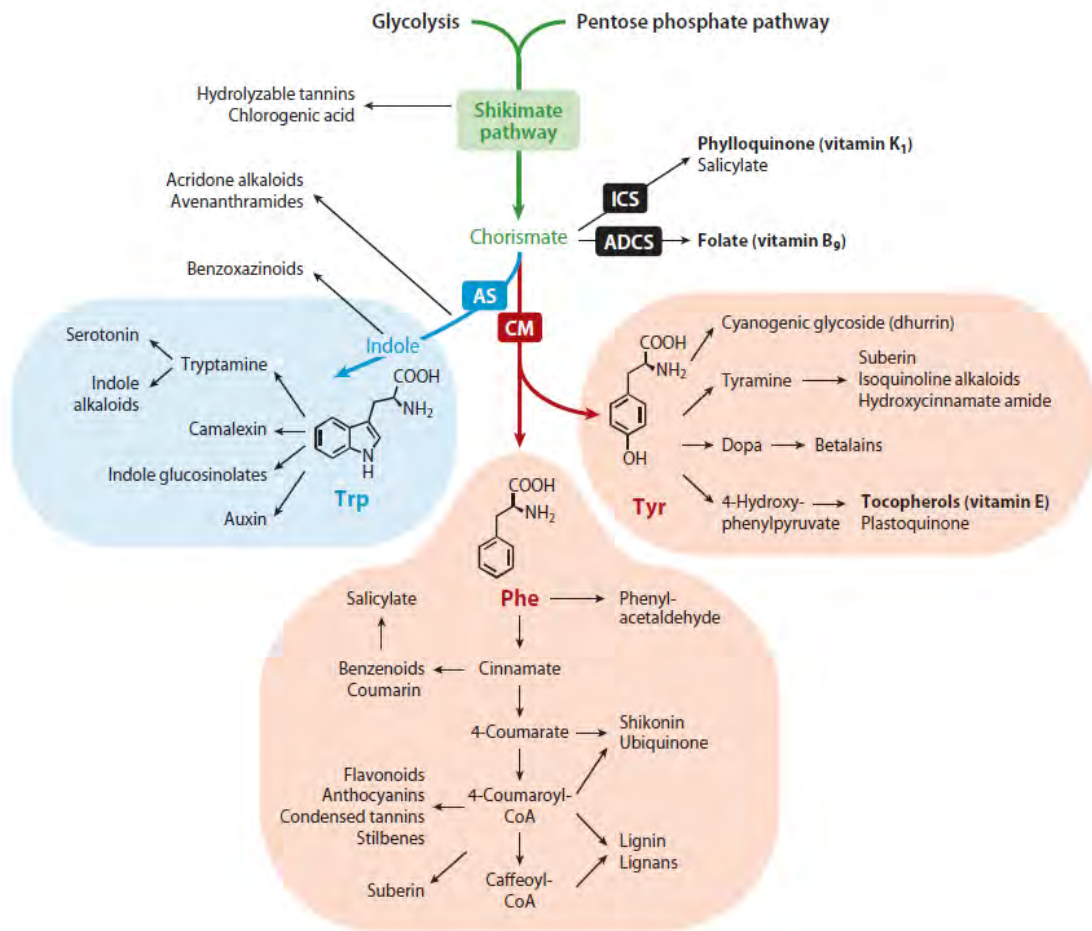
	Συγκέντρωση σαλικυλικού οξέως			
	0 mM (μάρτυρας)	0,02 mM	0,1 mM	1 mM
Αναγεννηθέντες βλαστοί ανά g κάλλου	0.43	0.60	1.24	1.78
Ολικός αριθμός βλαστών	16	13	27	13
gr κάλλου	37,2	21,7	21,7	7,3
<b>1</b>	8	6	13	4
<b>2</b>	3	7	10	6
<b>3</b>	5		4	3

## 4. Συζήτηση

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες, τα αλκαλοειδή, τα φαινολικά και τα τερπενοειδή. Αυτοί που απορροφούν υπεριώδες φως από τα 260 nm και πάνω είναι κατά το μεγαλύτερο ποσοστό φαινολικά, λιγότερο είναι το ποσοστό των αλκαλοειδών, ενώ τα τερπενοειδή είναι ελάχιστα. Επίσης η μοριακή τους δομή αποτελείται από αρωματικούς δακτυλίους, με τα αλκαλοειδή και τα φαινολικά που απορροφούν υπεριώδες φως να προέρχονται κατά την πλειονότητά τους από τη βιοχημική οδό του σικιμικού οξέος (Εικ. 20).



**Εικόνα 20.** Το βιοχημικό μονοπάτι του σικιμικού οξέως, μέχρι το χορισμικό οξύ, για την σύνθεση φαινολικών ουσιών (προσαρμογή από Herrmann 1995). Η ονοματολογία των ενζύμων και των γονιδίων των (υπό συγκεκριμένη μορφή) εμφανίζονται πλάι από κάθε βιοχημική αντίδραση.

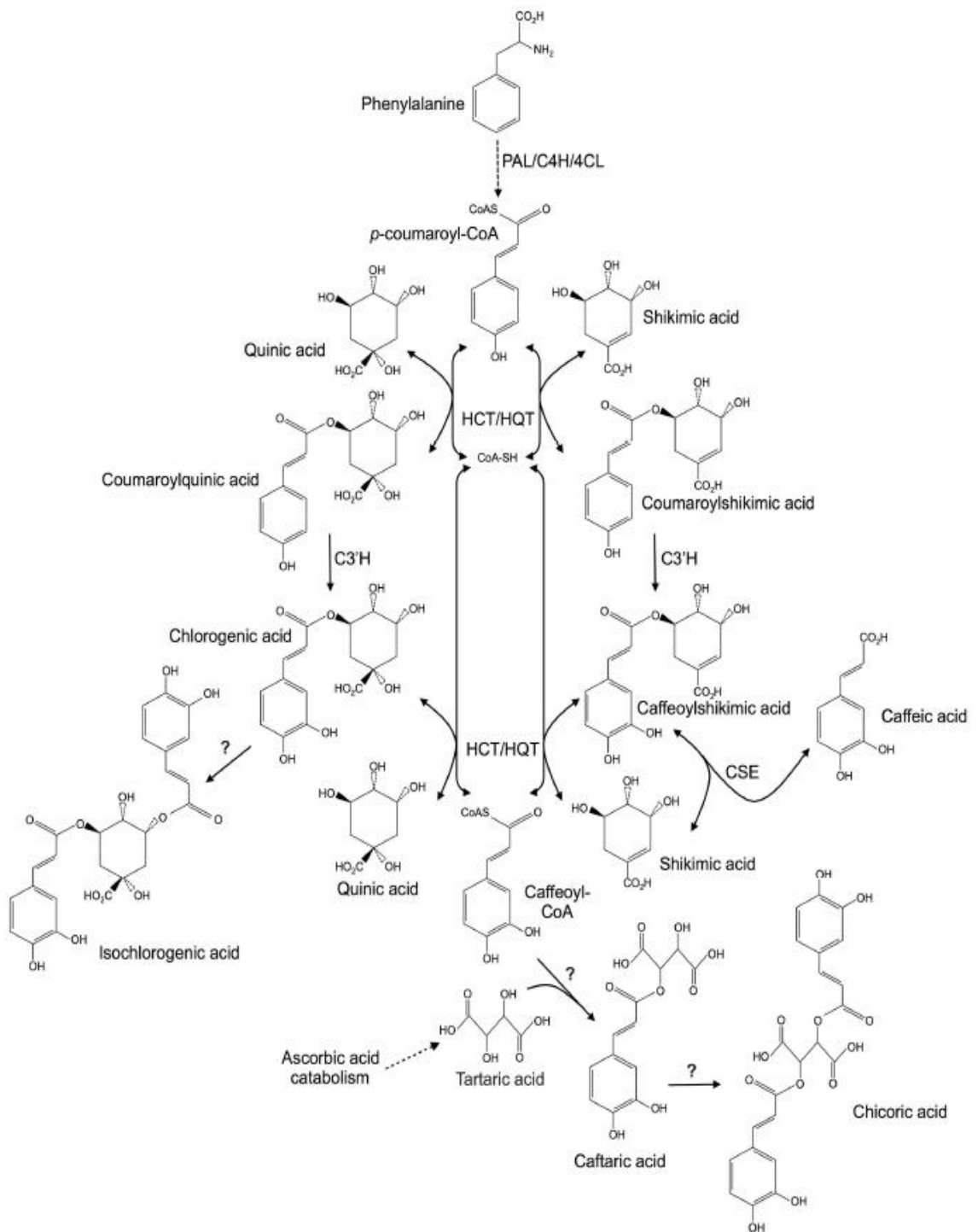


**Εικόνα 21.** Η σύνθεση των διαφόρων ομάδων φαινολικών ουσιών από το χορισμικό οξύ (chorismate), αναπαραχθείσα από το άρθρο Hiroshi Maede et al. 2012. Από την τρυπτοφάνη (Try) προέρχονται αλκαλοειδή τύπου ινδολίου. Από την τυροσίνη (Tyr) προέρχονται αλκολοειδή αλλά και φαινολικά τύπου κουϊνολών. Τα περισσότερα φαινολικά παράγονται από την φαινυλαλανίνη (Phe).

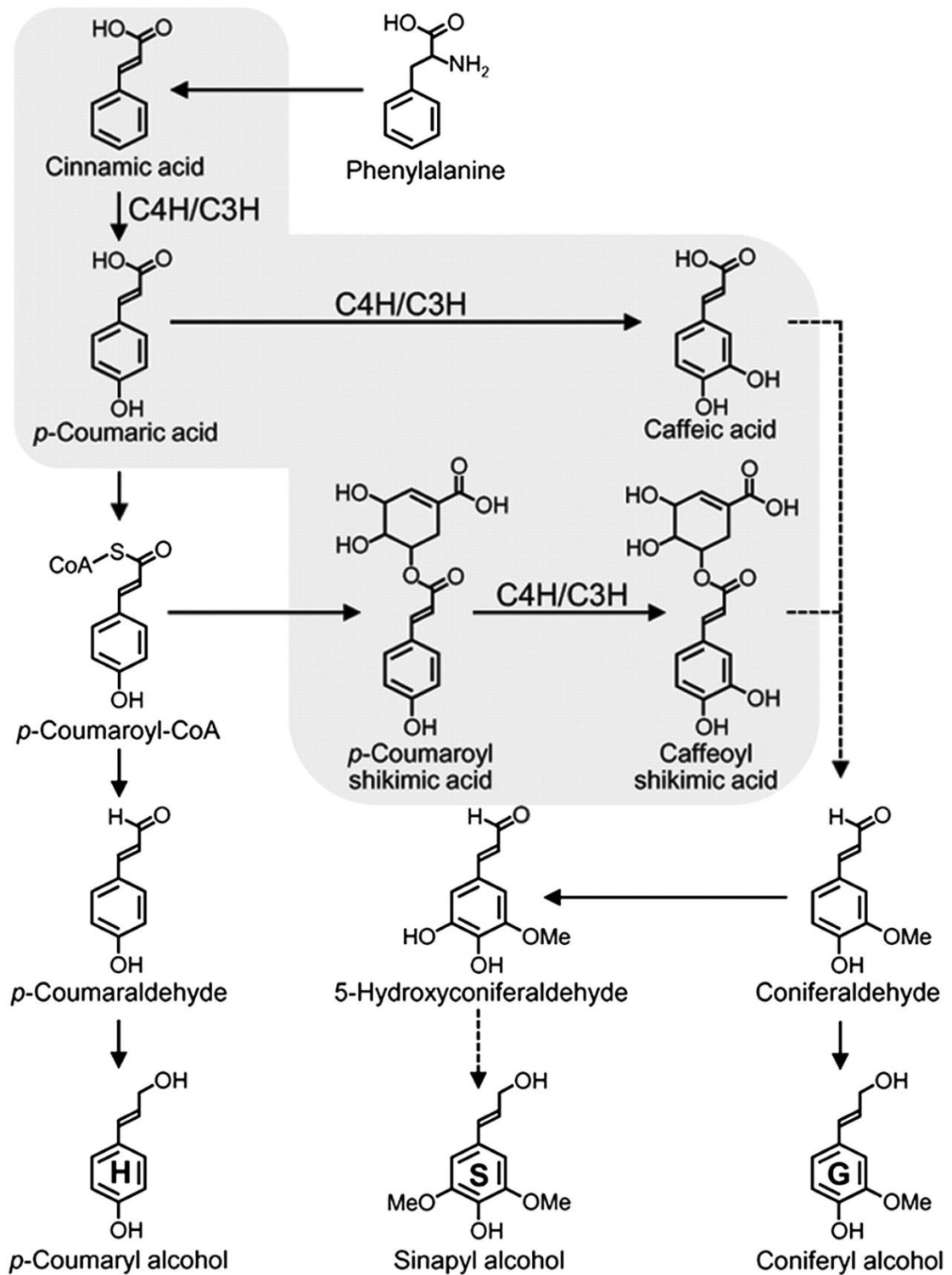
Οι κύριοι δευτεροταγής αρωματικοί μεταβολίτες στο *Cichorium spinosum* εμπίπτουν στις ομάδες των υδροξυκινναμικών οξέων (hydroxycinnamic acid). Μεταξύ αυτών είναι και το κιχορικό οξύ (cichoric acid) και καφταρικό οξύ (hydroxycinnamoyltartaric acid, caftaric acid. Sullivan 2014, Berner et al. 2006). Το βιοχημικό μονοπάτι της σύνθεσής των δίνεται στην εικόνα 22. Εκτός όμως αυτών, υπάρχουν και πολλά άλλα φαινολικά προερχόμενα επίσης από την φαινυλαλανίνη (Εικ. 23). Όλα τα φαινολικά απορροφούν υπεριώδες φως, αλλά με μέγιστο



απορρόφησης σε μήκος κύματος εξαρτώμενο από την τους υποκαταστάτες επί του αρωματικού δακτυλίου των.



**Εικόνα 22.** Σύνθεση του κιχορικού και καφταρικού οξέως από την φαινυλαλανίνη, όπως παρουσιάζεται από τους Legrand et al. 2016.



**Εικόνα 23.** Σύνθεση διαφόρων φαινολικών προδρομικών ουσιών από την φαινυλαλανίνη, όπως παρουσιάζεται από τους Chen et al. (2011).

Για να την πρώτη σύγκριση στις μετρήσεις των δευτερογενών μεταβολιτών στο *Cichorium spinosum*, έγινε καταγραφή του φάσματος απορροφήσεως στο υπεριώδες φως του εκχυλίσματος του φυτικού ιστού με αποτέλεσμα να βρούμε κορυφές στα 329, 294 και 272 nm όπου είναι πανομοιότυπα με αυτά του καθαρού κιχορικού (330, 294, 245 και 219) nm και καφταρικού (329, 294, 244 και 218 nm) οξέος. Επίσης από το φάσμα των μοριακών μαζών αρνητικών ιόντων στα 5,54 min, διακρίναμε διάφορες κύριες κορυφές, όμως παρατηρήσαμε μία κορυφή με 311 m/z όπου ταυτοποιήσαμε την ύπαρξη καθαρού καφταρικού οξέος με MW=312 καθώς η κορυφή εξηγείται  $312-H^+=311$  m/z. Το κιχορικό οξύ με MW=474 δεν ανιχνεύτηκε είτε γιατί ήταν προσκολλημένο με άλλες ουσίες οπότε δεν υπήρχε σε καθαρή μορφή ή γιατί οι δύο μορφές του κιχορικού οξέος (L-cichoric acid και meso-cichoric acid) δεν έχουν σταθερή αναγνωριστικότητα στα φυτά ακόμα και αν υπάρχουν σε αυτό ( Lee et al. 2013).

#### **4.1 Επίδραση του νιτρικού αργύρου (AgNO<sub>3</sub>) στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών στο *Cichorium spinosum*.**

Αρχικά ο AgNO<sub>3</sub> επιδρά θετικά στο φυτό μας, σε όλη την διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας που σκοπό έχει την δημιουργία κάλλου, την αναγέννησή του καθώς και στην ριζοβολία του. Η παραπάνω διαπίστωση επιβεβαιώνεται και από μία σειρά πειραμάτων που έχουν γίνει και έδειξαν αύξηση της καλλογέννησης, αναγέννησης και ριζοβολίας διαφόρων άλλων φυτών (Palmer et al., 1992, Williams et al., 1990, Shah et al., 2014, Uliiaie et al., 2008, Plus et al., 1993, Hayta et al., 2016, Songstad et al., 1988). Επίσης ο AgNO<sub>3</sub> παρεμποδίζει ως επί το πλείστον την δράση (Roustan et al., 1990, Knee et al., 1992, Kumar et al., 2007) και την βιοσύνθεση του (Ruey-Song., 1988) ανάλογα την δόση που εφαρμόστηκε στο καλλιεργητικό μέσο αλλά και το είδος του φυτού (Taylor et al., 1994).

Γενικά η εφαρμογή ή η βιοσύνθεση του αιθυλενίου αυξάνει τους δευτερογενής μεταβολίτες στα φυτά. Σε πείραμα με τραυματισμένους ιστούς μαρουλιού έδειξε ότι με την ακολουθούσα αύξηση του αιθυλενίου, το ποσοστό του ενζύμου φαινυλαλανίνη-αμμωνία λυάση καθώς και το καφεϊκό οξύ και τα παράγωγά του αυξήθηκαν εξίσου (Tomás-Barberán et al., 1997). Επίσης, τραυματισμοί σε πατάτα και τομάτα είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση του ενζύμου συνθάση 3-δεοξυ-D-5-

φωσφο-αραβινοεπτουλοσονικού οξέος (3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase, Muday et al., 1992, Dyer et al., 1989), του μονοπατιού σύνθεσης χορισμικού οξέως (Εικόνα 22). Τραυματισμός φυτών *Arabidopsis* ενεργοποίησε το γονίδιο ATMYBIS που οδήγησε στην αύξηση της έκφρασης όλων των γονιδίων του σικιμικού βιοχημικού μονοπατιού και πιο συγκεκριμένα τα γονίδια που είχαν μεγαλύτερο ποσοστό έκφρασης ήταν αυτά που κωδικοποιούσαν το ένζυμο 5-ενολπυρουβυλ-3-φωσφοσικιμικού οξύ (5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase), την συνθάση χορισμικού οξέος (chorismate synthase) και την κινάση σικιμικού οξέως (shikimate kinase) (Chen et al., 2006). Επίσης με τοποθέτηση καρότου σε περιβάλλον με αιθυλένιο 10 ppm, παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού του mRNA, των ενζύμων φαινυλαλανίνη-αμμωνία λυάση και λιγάση 4-κουμαρουλ-συνένζυμο A, 20 με 50 φορές, καθώς και της συνθάσης χαλκόνης όπου λαμβάνει μέρος στο μονοπάτι σύνθεσης των φαινολικών ουσιών (Ecker and Davis., 1987). Σε άλλο ένα πείραμα που συντελέστηκε σε καρότα τραυματισμένα και σε συνθήκες οσμωτικού στρες (water stress), εκτός από την αύξηση των ενζύμων συνθάση του 5-ενολπυρουβυλ-3-φωσφο-σικιμικού οξέος (5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase) και συνθάση του 3-δεοξυ-D-αραβινο-επτουλοζανικού οξέος (3-deoxy-D-arabino-heptulosanate synthase) και της αύξησης έκφρασης γονιδίων για σύνθεση λιγνίνης και φαινολικών ουσιών και αύξησης των ενζύμων και, παρατηρήθηκε και η μέγιστη τιμή της συγκέντρωσης του σικιμικού οξέος μετά από 24 ώρες (Becerra-Moreno et al., 2015). Τα ένζυμα που προαναφέρθηκαν συμβάλλουν στη βιοχημική οδό σύνθεσης του σικιμικού οξέος από το οποίο σχηματίζονται ουσίες με αρωματικούς δακτυλίους.

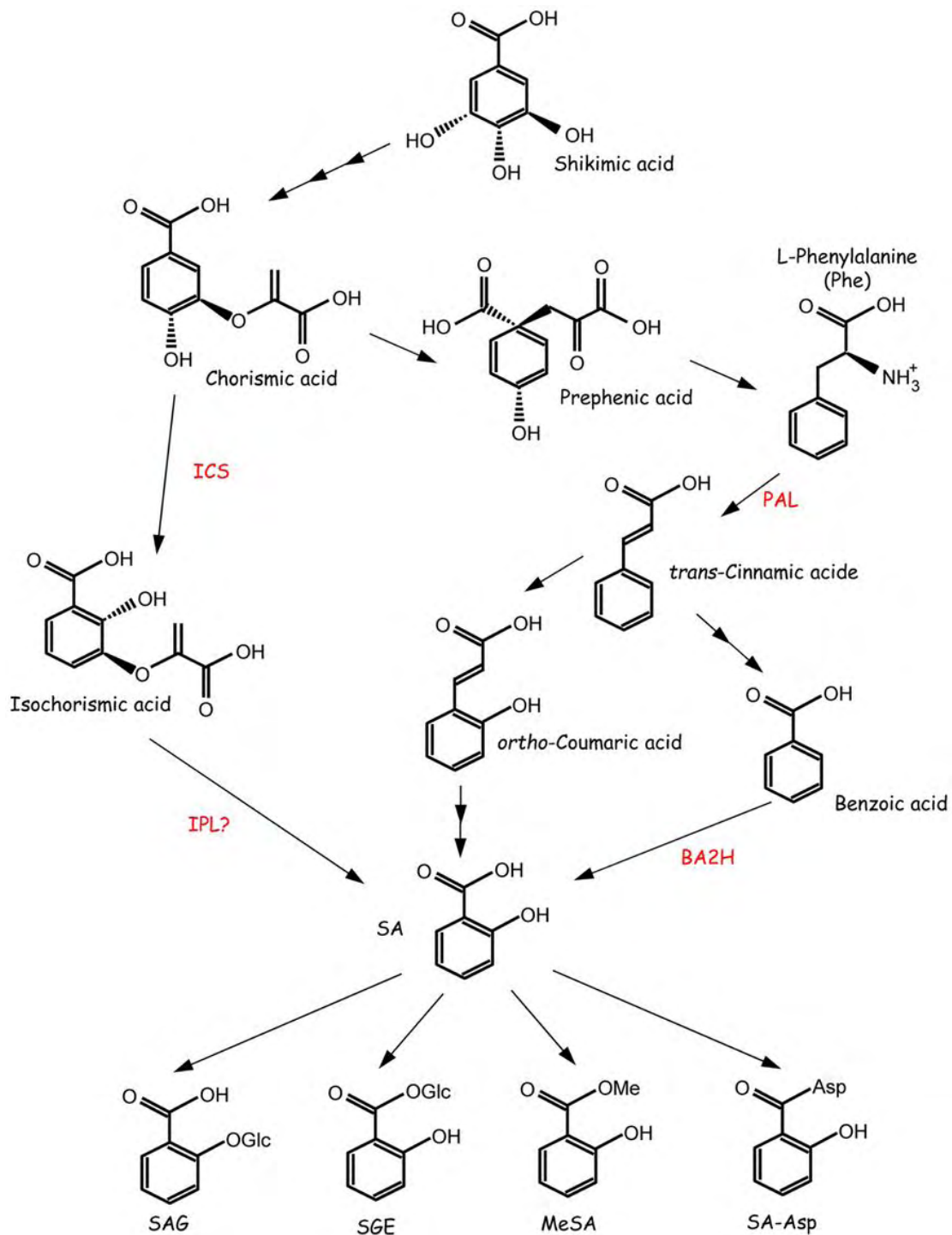
Οι συγκεντρώσεις των 100 και 500  $\mu\text{M}$  νιτρικού αργύρου που εφαρμόσαμε στο πείραμα φαίνεται να καταστέλλουν σταδιακά την σύνθεση των δευτεροταγών μεταβολιτών αφότου περάσει η πρώτη εβδομάδα και να ανακάμπτουν σιγά σιγά οι τιμές τους από την τέταρτη και μετά. Η αρχική αύξηση των δευτερογενών μεταβολιτών παρατηρείται ως αποτέλεσμα της αρχικής αύξησης του αιθυλενίου λόγω του stress που προκλήθηκε στους κάλλους του φυτού όταν τους βάλουμε εκ νέου για ιστοκαλλιέργεια με νέο καλλιεργητικό μέσο εμπλουτισμένο με νιτρικό άργυρο ( η δεν πρόλαβε να απενεργοποιήσει το κέντρο βιοσύνθεσης του αιθυλενίου οπότε αφού ο νιτρικός άργυρος προάγει την σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών, σύμφωνα με τα παραπάνω πειράματα, παρατηρείτε αύξησή τους την πρώτη εβδομάδα)

Παρόμοιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε σε κυτταρικές καλλιέργειες ζαχαροκάλαμου όπου,  $\text{AgNO}_3$  είναι τοξικός σε συγκεντρώσεις 29, 59 και 118  $\mu\text{M}$  καθώς αυξάνεται η σύνθεση αιθυλενίου δευτερογενώς, λόγω stress (Taylor et al., 1994). Η μετέπειτα καταστολή που διαπιστώνουμε ήταν αποτέλεσμα της ικανότητας του αργύρου να διακόπτει τη δράση του αιθυλενίου καθώς και της βιοσύνθεσής του. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με αποτελέσματα προερχόμενα από πείραμα σε κάλλους *Pennisetum glaucum*, στο οποίο η παραγωγή αιθυλενίου εξετάστηκε για 40 ημέρες με εφαρμογή διάφορων συγκεντρώσεων νιτρικού αργύρου, με αυτές των 117,7 και 294,3  $\mu\text{M}$  να παρουσιάζουν στις 30 ημέρες μειωμένη έκλυση αιθυλενίου συγκριτικά με το control ενώ στις 40 μέρες και μετά παραμένει ίδια τόσο στο control όσο και στις παραπάνω συγκεντρώσεις (Plus et al., 1993). Την τρίτη εβδομάδα στο πείραμά μας παρατηρείται το χαμηλότερο ποσοστό δευτεροταγών μεταβολιτών, το οποίο προκύπτει από την καταστολή του αιθυλενίου καθώς προκαλείται καταστολή κάποιων γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα που συμμετέχουν στο βιοχημικό μονοπάτι του σικιμικού οξέος. Την 4<sup>η</sup> και 5<sup>η</sup> εβδομάδα αρχίζει να περνάει η δράση του  $\text{AgNO}_3$  και παρατηρούμε αύξηση των δευτερογενών μεταβολιτών λόγω έκφρασης των γονιδίων που προαναφέρθηκαν.

#### **4.2 Επίδραση του σαλικυλικού οξέος στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών στο *Cichorium spinosum***

Το σαλικυλικό οξύ έχει θετική επίδραση στην διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας, με παρόμοια αποτελέσματα στις δύο εφαρμοζόμενες συγκεντρώσεις (0,02 και 0,1 mM) ενώ στην μεγαλύτερη συγκέντρωση 1 mM είχαμε διαφορετικά, διότι αρκετά από έκφυτα χάλασαν λόγω του stress που τους δημιούργησε η υψηλή συγκέντρωση SA. Αυτό φαίνεται και από τον πίνακα των αναγεννημένων εκφύτων, όπου τον μεγαλύτερο συνολικό αριθμό βλαστών είχε η τιμή των 0,1 mM, ενώ ο αριθμός βλαστών των (1 και 0,02 mM) είναι ίδιος με μία διαφορά ότι είχαμε μία απώλεια ενός δείγματος στην τιμή SA 0,02 mM, επειδή προσβλήθηκε από μύκητα.

Το σαλικυλικό οξύ είναι μία φαινολική ουσία που επίσης δημιουργείται από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος (εικόνα) και συντίθεται εντός των πλαστιδίων Dempsey et al. (2011).



**Εικόνα 24.** Σύνθεση του σαλικυλικού οξέως (SA) και συγγενών μορίων φαινολικών από την οδό του σικιμικού οξέως, όπως παρουσιάζεται από τους Dempsey et al. (2011).

Το σαλικυλικό οξύ σε χαμηλές συγκεντρώσεις ανακουφίζει από αβιοτικό stress (σε συνθήκες ξηρασίας ή ψύχους το SA βελτιώνει την ανθεκτικότητα του φυτού), αλλά

και σε βιοτική καταπόνηση, καθώς επάγει την άμυνα στις προσβολές από παθογόνα. Ενεργοποιεί το SAR και κλείνει τα στομάτια του φυτού λόγω της αύξησης των ελευθέρων ριζών, άρα και των δευτερογενών μεταβολιτών, με ταυτόχρονη απενεργοποίηση του καναλιού του καλίου. Όμως, σε υψηλές συγκεντρώσεις, από 1 mM και πάνω, το SA προκαλεί stress στα φυτά, οπότε αυξάνεται το αιθυλένιο και αυτό με την σειρά του δημιουργεί μεγαλύτερα ποσοστά ελευθέρων ριζών ROS (ενεργά είδη οξυγόνου). Το φυτό δεν μπορεί να ανταπεξέλθει στην αυξημένη ζήτηση δευτερογενών μεταβολιτών, ώστε να απενεργοποιηθούν οι ελεύθερες ρίζες και αυτό οδηγεί σε ταχεία οξειδωτική αντίδραση και τελικά τον θάνατό του (Kenji Miura et al., 2014).

Σε πείραμα που έγινε σε φυτά πατάτας, όπου εφαρμόστηκαν 0,5 mM SA η δραστηριότητα των ενζύμων καταλάση (CAT), περοξειδάση (POD) και δισμουτάση υπεροξειδίου (SOD), τα οποία μεταβολίζουν τα ενεργά είδη οξυγόνου και τις ελεύθερες ρίζες, βελτιώθηκε κατά 24,37%, 37,34% και 43,81% αντίστοιχα (Faried et al., 2017). Επίσης η δραστηριότητα των ενζύμων λυάση τυροσίνης-αμμωνίας (tyrosine ammonia-lyase) (Abbaspour et al., 2016), αμινοτρανσφεράσης της τυροσίνης (tyrosine aminotransferase), αλλά και της λυάσης φαινυλαλανίνης-αμμωνίας (PAL, phenylalanine ammonia-lyase) τα οποία είναι στοιχεία της βιοχημικής οδού του σικιμικού οξέος (Li et al., 2016). Επιπλέον, σε έκφυτα σιταριού 2 εβδομάδων, η εφαρμογή 0,2 mM SA, προκάλεσε αύξηση στα αντιοξειδωτικά ένζυμα SOD, POD, CAT, οξειδάση του ασκορβικού οξέως (APX) και περοξειδάση της γλουταθειόνης (GPX), όμως η εφαρμογή της συγκέντρωσης 2,5 mM SA είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της δραστηριότητας των CAT, SOD, και APX (Chen et al., 2016).

Όπως είδαμε και πιο πάνω το SA αυξάνει τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου οι οποίες ενεργοποιούν την μεταγραφή του ενζύμου κινάση του σικιμικού οξέως (shikimate kinase) καθώς και του ενζύμου αφυδρογονάση του σικιμικού οξέως (shikimate dehydrogenase) (Moon et al., 2016). Στο *Salvia miltiorrhiza*, η εφαρμογή 0,16 mM αύξησε τα φαινολικά οξέα καφεϊκό, ροζμαρινικό και σαλβιολικό οξύ B (Li et al., 2016), ενώ σε κάλλους εμβρύων των φυτών *L. aestivum* Gravity Giant και *Leucojum aestivum* L., η χρήση 5  $\mu$ M σαλικυλικού οξέος προκλήθηκε αύξηση της βιοσύνθεσης γαλανταμίνης 8 φορές παραπάνω στο Gravity Giant όμως η ίδια συγκέντρωση στο *L. aestivum* πενταπλασίασε την συγκέντρωση λυκορίνης σε σύγκριση με το control

(Ptak et al., 2017). Ο τρόπος δράσης του σαλικυλικού οξέως δεν είναι γνωστό αν είναι άμεσος επί της έκφρασης γονιδίων ή έμμεσος, δηλαδή αν το σαλικυλικό οξύ αυξάνει πρώτα την συγκέντρωση ενεργών ειδών οξυγόνου και ελευθέρων ριζών, τα οποία κατόπιν ενεργοποιούν τα γονίδια. Η γενική εικόνα όμως είναι ότι είναι έμμεσος. Πιθανότατα το σαλικυλικό οξύ αυξάνει τις ελεύθερες ρίζες αναγκάζοντας το φυτό να συνθέσει περισσότερα φαινολικά και αντιοξειδωτικά ένζυμα προς απενεργοποίηση των ελευθέρων ριζών.

Στο πείραμά μας, σε συγκέντρωση 0,02 mM σαλικυλικού οξέος οι δευτερογενείς μεταβολίτες αυξάνονται από την πρώτη εβδομάδα και αυτό συνεχίζει μέχρι το τέλος των μετρήσεων. Οι μεταβολίτες στην μεγαλύτερη συγκέντρωση 1 mM φαίνεται πως ενώ αυξάνουν από την πρώτη εβδομάδα ομαλά, την δεύτερη παρατηρούμε μία εκθετική αύξηση και αμέσως μετά την τρίτη εβδομάδα βλέπουμε μία εκθετική μείωση και τα αποτελέσματα μετά παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα καθώς έχουν καταστραφεί και τα φυτά. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται όπως είδαμε, στην παραγωγή αιθυλενίου λόγω stress, που αυξάνει τις ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα την ταυτόχρονη αύξηση των δευτερογενών μεταβολιτών, που όμως δεν είναι αρκετή ώστε να καλύψουν όλες τις ρίζες και τελικά το φυτό καταστρέφεται. Στην ενδιάμεση συγκέντρωση των 0,1 mM παρατηρείται μία περιοδική αυξομείωση των φαινολικών. Δεν υπάρχει προηγούμενη βιβλιογραφική αναφορά σε ένα τέτοιο φαινόμενο και η εξήγησή του θα απαιτούσε ειδικό πειραματικό σχεδιασμό που θα περιελάμβανε και μέτρηση των ελευθέρων ριζών, την δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων και του ενδοκυτταρικού ποσού σαλικυλικού οξέως. Η γενική εντύπωση που αποκομίζει κάποιος από την καμπύλη του διαγράμματος 2 είναι ότι το φυτό προσπαθεί κατά διαστήματα (εβδομάδες 2 και 4) να μειώσει την ποσότητα των ελευθέρων ριζών και το επιτυγχάνει πρόσκαιρα, αλλά τελικά, μετά την 4<sup>η</sup> εβδομάδα, το ποσό των ελευθέρων ριζών αυξάνεται κατά πολύ, όπως συμπεραίνεται από την ταυτόχρονη αύξηση των φαινολικών.



## 5. Συμπεράσματα

Αρχικά, ο νιτρικός άργυρος ( $\text{AgNO}_3$ ) και το σαλικυλικό οξύ (SA) επιδρούν θετικά καθόλη τη διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας (καλλογένεση- αναγέννηση- ριζοβολία), εκτός από τη συγκέντρωση 1 mM του SA η οποία αποδείχθηκε μεγάλη για το φυτό μας και λόγω στρες καταστράφηκαν τα περισσότερα φυτά. Από την άλλη, στις συγκεντρώσεις των δευτερογενών μεταβολιτών το SA και ο  $\text{AgNO}_3$  έχουν αντίθετη δράση καθώς το SA επάγει τη δημιουργία ελευθέρων ριζών και ενεργών ειδών οξυγόνου, ενώ ο  $\text{AgNO}_3$  τις καταστέλλει.

Για περαιτέρω διερεύνηση, προτείνεται ένας πειραματικός σχεδιασμός για μέτρηση ελεύθερων ριζών και τις δραστηριότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων προκειμένου να διαπιστωθεί για ποιο λόγο στην ενδιάμεση συγκέντρωση των 0,1 mM SA παρατηρείται η περιοδική αυξομείωση των φαινολικών.

## 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.
- Barbasz A, Kreczmer B, Ocwieja M. 2016. Effects of exposure of callus cells of two wheat varieties to silver nanoparticles and silver salt (AgNO<sub>3</sub>). *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. *Frontiers in Plant Science* 15; 6: 837.
- Berner, M., Krug, D., Bihlmaier, C., Vente, A., Müller, R., Bechthold, A. 2006, "Genes and enzymes involved in caffeic acid biosynthesis in the actinomycete *Saccharothrix espanaensis*", *Journal of Bacteriology*, 188, 7:, 2666-2673.
- 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, Y.E., Cui, J.M., Li, G.X., Yuan, M., Zhang, Z.W., Yuan, S., Zhang, H.Y. 2016. Effect of salicylic acid on the antioxidant system and photosystem II in wheat seedlings. *Biologia Plantarum* 60:139-147.
- Chen, H.-., Li, Q., Shuford, C.M., Liu, J., Muddiman, D.C., Sederoff, R.R., Chiang, V.L. 2011, "Membrane protein complexes catalyze both 4- and 3-hydroxylation of cinnamic acid derivatives in monolignol Fbiosynthesis", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, (52), : 21253-21258.

- Cincoz, G.S., 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.
- Dempsey, D.-A., Vlot, A. C., Wildermuth, M. C., Klessig, D.-F. (2011). Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *Arabidopsis Book* 9, e0156. doi:10.1199/tab.0156
- 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.
- Fariied, H.N., Ayyub, C.M., Amjad, M., Ahmed, R., Wattoo, F.M., Butt, M., Bashir, M., Shaheen, M.R., Waqas, M.A. 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.
- 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.
- 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.

- Herrmann, K. (-1995-). The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *The Plant Cell*, 7(7) :, 907–919.
- Idrees, M., Naeem, M., Aftab, T., Khan, M.M.A., 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.
- Kang, S.-M., Jung, H.-Y., Kang, Y.-M., & Yun, D.-J., Bahk, J.-D., Yang, J.-K., Choi, M.-S. (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, K.V., Tyunin, A.P., Karetin, Y.A. 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, D.L., Porter, J.R. 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, G.A. 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.
- Lee, J., Scagel, C. F. (2013). Chicoric acid: chemistry, distribution, and production. *Frontiers in Chemistry*, 1, 40. <http://doi.org/10.3389/fchem.2013.00040>
- Legrand, G., Delporte, M., Khelifi, C., Harant, A., Vuylsteker, C., Mörchen, M., Hance, P., Hilbert, J.-. Gagneul, D. 2016, -"Identification and characterization of

- five BAHD acyltransferases involved in hydroxycinnamoyl ester metabolism in chicory", *Frontiers in Plant Science*, vol. 7, no. June 2016.
- 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  $\beta$ -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.
- Luo, J., Jiang, S., Pan, L. 2001. Enhanced somatic embryogenesis by salicylic acid of *Astragalus adsurgens* Pall.: Relationship with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metabolizing enzyme activities. *Plant Science* 161:125-132.
- Maeda, H., Dudareva, N. (2012). The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology*. 63. 73-105. 10.1146/annurev-arplant-042811-105439.
- Mendoza-Sánchez, M., Guevara-González, R.G., Castaño-Tostado, Mercado-Silva E.M., Acosta-Gallegos, J.A., Rocha-Guzmán, N.E., 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.
- Miura, K., Tada, Y 2014. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Frontiers in Plant Science*. 2014;5:4. doi:10.3389/fpls.2014.00004.
- Moon, U.R., Mitra, A., 2016. A mechanistic insight into hydrogen peroxide-mediated elicitation of bioactive xanthenes in *Hoppea fastigiata* shoot cultures. *Planta* 244: 259–274.

- Muday, G.K., Herrmann, K.M. 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  $\beta$ -fructofuranosidase from tomato fruit. *Agricultural and Biological Chemistry* 36:18-26.
- Palmer, C.E. 1992. Enhanced shoot regeneration from *Brassica campestris* by silver nitrate. *Plant Cell Reports* 11(11):541-545.
- Park, E., Lim, H. 1999, Establishment of an efficient in vitro plant regeneration system in chicory (*Cichoriumintybus* L. var. *sativus*). *Acta Horticulturae* 483: 367-370.
- Plus, J., George, L., Eapen, S., Rao, P.S. 1993. Enhanced plant regeneration in pearl millet (*Pennisetum americanum*) by ethylene inhibitors and cefotaxime. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32:91-96.
- Prachi, Sharma, T.R., Singh, B.M. 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 AgNO<sub>3</sub> 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 AgNO<sub>3</sub>, an inhibitor of ethylene action: Effect on arginine decarboxylase activity. *Plant Science* 67:89-95.

- 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, S.H., Ali, S., Jan, S.A., Jalal-Ud-Din, Ali, G.M. 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, D.D., Duncan, D.R., Widholm, J.M. 1988. Effect of l-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.
- Sullivan, M. (2014). Perennial peanut (*Arachis glabrata* Benth.) leaves contain hydroxycinnamoyl-CoA:tartaric acid hydroxycinnamoyl transferase activity and accumulate hydroxycinnamoyl-tartaric acid esters. *Planta*, 239(5), 1091-1100.
- Taylor, P.W.J., Ko, H.L., Fraser, T.A., Masel, N., Adkins, S.W. 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.

- Uliaie, E.D., Farsi, M., Ghreyazie, B., Imani, J. 2008. Effects of Genotype and AgNO<sub>3</sub> on Shoot Regeneration in Winter Cultivars of Rapeseed (*Brassica napus*). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11: 2040-2043.
- Walker, T.S., Pal, Bais, H., Vivanco, J.M. 2002. Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort) *Phytochemistry* 60(3):289-293.
- Wee, S.L., Yap, W.S.P., Alderson, P.G., Khoo, T.J. 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, D.A.C., Biddington, N.L. 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.
- Zandalinas, S.I., 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.