



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Abiotinių veiksnių įtaka fitocheminių junginių kiekybiniam
kaupimuisi ir bioaktyvumui kryžmažiedžių (lot. *Cruciferae*)
augalų kaliaus kultūrose *in vitro***

Baigiamasis magistro projektas

Karolina Stonytė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Kaunas, 2022



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Abiotinių veiksnių įtaka fitocheminių junginių kiekybiniam kaupimuisi ir bioaktyvumui kryžmažiedžių (lot. *Cruciferae*) augalų kaliaus kultūrose *in vitro*

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Karolina Stonytė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Doc. dr. Vilija Kederienė

Recenzentė

Kaunas, 2022



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Karolina Stonytė

Abiotinių veiksnių įtaka fitocheminių junginių kiekybiniam kaupimuisi ir bioaktyvumui kryžmažiedžių (lot. *Cruciferae*) augalų kaliaus kultūrose *in vitro*

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Karolinos Stonytės, baigiamasis projektas tema „Abiotinių veiksnių įtaka fitocheminių junginių kiekybiniam kaupimuisi ir bioaktyvumui kryžmažiedžių (lot. *Cruciferae*) augalų kaliaus kultūrose *in vitro*“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

Karolina Stonytė

Pasirašyta elektroniniu būdu

Stonytė, Karolina. Abiotinių veiksnių įtaka fitocheminių junginių kiekybiniam kaupimuisi ir bioaktyvumui kryžmažiedžių augalų kaliaus kultūrose *in vitro*. Magistro baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė. Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): Biotechnologijos, Technologijų mokslai.

Reikšminiai žodžiai: fitochemikalai, kryžmažiedžiai augalai, brokoliai, *Brassica oleracea* var. *Italica*, rapsai, *Brassica napus* L., pipirnė, *Lepidium sativum* L., elicitoriai, metilžasmonatas, salicilo rūgštis, cinko nanodalelės, metioninas, *in vitro*, *in vivo*.

Kaunas, 2022. 86 p.

Santrauka

Kryžmažiedžių (lot. *Cruciferae*) augalų šeima apima daugybę ekonomiškai ir agronomiškai svarbių augalų rūšių. Kryžmažiedžiai augalai naudojami aliejų gamyboje, kaip valgomos daržovės ir pagardai. Dėl sintetinamų bioaktyvių junginių įvairovės, antioksidacinių ir antibakterinių savybių jie plačiai naudojami farmacijos, kosmetikos ir maisto pramonėje. Ypatingai vertinami šios augalų šeimos sintetinami antriniai metabolitai – gliukozinolatai, turintys antimikrobinių, antifungicidinių, antibakterinių ir tiroidinių savybių. Siekiant padidinti bioaktyvių medžiagų sintezę, brokolių (lot. *Brassica oleracea* var. *Italica*), rapsų (lot. *Brassica napus* L.) ir pipirnės (lot. *Lepidium sativum* L.) kaliaus kultūrose *in vitro* buvo pritaikyta elicitavimo procedūra. Pagrindinis šio tyrimo tikslas buvo įvertinti pasirinktų elicitorių (metilžasmonato ir salicilo rūgšties) poveikį kryžmažiedžių augalų *in vitro* bei kaliaus kultūrų ekstraktų antioksidaciniam ir fitocheminiam aktyvumui.

Tyrimo metu buvo suformuotos šių augalų kaliaus kultūros, kurios augintos MS terpėje papildytoje (2 mg/l) BAP ir (0,2 mg/l) 2,4-D augimo reguliatoriais ir 25, 50 μmol/l koncentracijos salicilo rūgšties ir metilžasmonato elicitoriais. Nustatyta, kad mitybinės terpės papildymas 25 μmol/l koncentracijos salicilo rūgšties elicitoriumi turėjo teigiamą poveikį fenolinių junginių, baltymų (baltymų koncentracija padidėjo 36,6 %) ir fotosintezės pigmentų sintezei (chlorofilo *a* ir chlorofilo *b* kiekiai padidėjo 3 kartus) rapsų kaliaus kultūrose. 50 μmol/l koncentracijos salicilo rūgšties elicitorius teigiamai veikė antioksidacinių junginių sintezę rapsų ir pipirnės kaliaus kultūrose *in vitro*. 25 μmol/l koncentracijos metilžasmonato elicitorius skatino antioksidacinių, fenolinių junginių bei gliukozinolatų sintezę rapsų ir pipirnių kaliaus kultūrose, taip pat 53,8 % padidino *L*-prolino ir pigmentų koncentraciją rapsų kaliaus kultūros ekstraktoje. 50 μmol/l koncentracijos metilžasmonato elicitorius pipirnių kaliaus kultūrose padidino sintetinio chlorofilo *a* koncentraciją 30 %, chlorofilo *b* koncentraciją – 39 %, o karotinoidų koncentracija padidėjo dvigubai. Taigi, įvertinus tyrimo rezultatus nustatyta, jog elicitoriaus poveikis priklauso nuo pasirinkto augalo rūšies, elicitoriaus ir jo koncentracijos. Apibendrinus galima teigti, kad salicilo rūgšties elicitorius yra tinkamas bioaktyvių medžiagų skatinimui rapsų kaliaus kultūrose, o metilžasmonato elicitorius – pipirnių kaliaus kultūrose. Pasirinkti elicitoriai ir jų koncentracijos neigiamai veikė bioaktyvių junginių sintezę brokolių kaliaus kultūrose *in vitro*. Tyrimo metu taip pat buvo įvertinta ZnO-ND ir metionino elicitorių įtaka brokolių *in vitro* kultūrų antioksidaciniam ir fitocheminiam aktyvumui ir nustatyta, kad stipriausiomis redukcinėmis savybėmis, didžiausiu antioksidaciniu ir SOD aktyvumu pasižymėjo brokolių lapų *in vitro* kultūros, augintos MS terpėje papildytoje 10 mg/l koncentracijos ZnO-ND elicitoriumi, ekstraktas. Taip pat šiame ekstraktoje nustatyta didžiausia fenolinių junginių, fenolinių rūgščių, flavonoidų, pigmentų, gliukozinolatų koncentracija.

Stonytė, Karolina. Influence of Abiotic Factors on Quantitative Accumulation and Bioactivity of Phytochemical Compounds in Cruciferous (*Cruciferae*) Plant Callus Cultures *in Vitro*. Master's Final Degree Project / supervisor assoc. prof. dr. Ilona Jonuškienė. Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area (study field group): Biotechnology, Technological Sciences.

Keywords: cruciferous plants, broccoli, *Brassica oleracea* var. *Italica*, oilseed rape, *Brassica napus* L., cress, *Lepidium sativum* L., elicitors, methyl jasmonate, salicylic acid, zinc nanoparticles, methionine, *in vitro*, *in vivo*.

Kaunas, 2022. 86.

Summary

The family of Cruciferous plants includes many economically and agronomically important plant species. Cruciferous plants used in the production of oils as edible vegetables and condiments. Due to the variety of the synthesized bioactive compounds and antioxidant, antibacterial properties they are widely used in the pharmaceutical, cosmetics, and food industries. Special secondary metabolites synthesized by this plant family are glucosinolates, which have antimicrobial, antifungicidal, antibacterial and thyroid properties. To increase the synthesis of bioactive compounds, *in vitro* elicitation procedure was applied in callus cultures of broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*), oilseed rape (*Brassica napus* L.) and cress (*Lepidium sativum* L.). The main objective of this study was to evaluate the effect of selected elicitors (methyl jasmonate and salicylic acid) on the antioxidant and phytochemical activity of Cruciferous plants *in vitro* and callus culture.

During the study, callus cultures of these plants cultured in MS medium supplemented with (2 mg/l) BAP, (0.2 mg/l) 2,4-D growth regulators also with 25, 50 $\mu\text{mol/l}$ salicylic acid and methyl jasmonate elicitors. Addition of 25 $\mu\text{mol/l}$ salicylic acid elicitor to the culture medium was found to have a positive effect on the synthesis of phenolic compounds, proteins (protein concentration increased by 36.6 %) and photosynthetic pigments (chlorophyll *a* and chlorophyll *b* levels increased 3-fold) in rapeseed callus cultures. Salicylic acid elicitor at a concentration of 50 $\mu\text{mol/l}$ had a positive effect on the synthesis of antioxidant compounds in rapeseed and cress callus cultures *in vitro*. Methyl jasmonate elicitor at a concentration of 25 $\mu\text{mol/l}$ stimulated the synthesis of antioxidants, phenolic compounds and glucosinolates in rapeseed and cress callus cultures, as well as increased the proline concentration in rapeseed culture extract by 53.8%. At 50 $\mu\text{mol/l}$, methyl jasmonate elicitor increased the concentration of synthesized chlorophyll *a* by 30%, chlorophyll *b* by 39% and doubled the concentration of carotenoids in cress callus cultures. Thus, after evaluating the results of the study, it was found that the effect of the elicitor depends on the selected plant species, the elicitor, and its concentration. In summary, the salicylic acid elicitor is suitable for the promotion of bioactive substances in rapeseed callus cultures and the methyl jasmonate elicitor in cress callus cultures. The selected elicitors and their concentrations negatively affected the synthesis of bioactive compounds in broccoli callus cultures *in vitro*. The study also evaluated the effect of ZnO-NP and methionine elicitors on the antioxidant and phytochemical activity of *in vitro* broccoli cultures. The strongest reducing properties, the highest antioxidant and SOD activity were observed in broccoli leaf cultures grown in MS medium supplemented with 10 mg ZnO-NP elicitor. The highest concentrations of phenolic compounds, phenolic acids, flavonoids, pigments and glucosinolates were determined also in this extract.

Turinys

Santrumpų ir terminų sąrašas	8
Įvadas.....	9
1. Literatūros apžvalga	11
1.1. Kryžmažiedžių augalų charakteristika	11
1.1.1. Rapsų (lot. <i>Brassica napus</i> L.) charakteristika.....	11
1.1.2. Brokolių (lot. <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Italica</i>) charakteristika.....	12
1.1.3. Pipirnės (lot. <i>Lepidium sativum</i> L.) charakteristika.....	12
1.2. Augalų biotechnologiniai metodai	12
1.2.1. Genų inžinerijos metodai.....	12
1.2.2. Augalų ląstelių ir audinių kultūrų metodai.....	13
1.3. Kryžmažiedžių augalų kaliaus kultūros <i>in vitro</i>	15
1.3.1. Brokolių kaliaus kultūros <i>in vitro</i>	15
1.3.2. Rapsų kaliaus kultūros <i>in vitro</i>	16
1.3.3. Pipirnės kaliaus kultūros <i>in vitro</i>	17
1.4. Fitochemikalai kaupiami augalų kaliaus kultūrose	17
1.4.1. Augalų augimo reguliatoriai.....	18
1.4.2. Elicitoriai	18
1.5. Kryžmažiedžių augalų antriniai metabolitai.....	20
1.5.1. Gliukozinolatai	20
1.5.2. Fenoliniai junginiai.....	22
1.6. Antrinių metabolitų vaidmuo	24
1.7. Brokolių augalinės žaliavos panaudojimas	25
1.8. Literatūros apžvalgos apibendrinimas	26
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	27
2.1. Tyrimų objektas.....	27
2.2. Tyrimų eiga	27
2.3. Tyrimų metu naudota įranga	27
2.4. Tyrimų metu naudoti reagentai	28
2.5. Sėklų sterilinimas	29
2.6. Augalų ląstelių maitinamosios terpės paruošimas ir kultivavimo sąlygos.....	29
2.7. Augimo reguliatorių paruošimas	29
2.8. Kryžmažiedžių augalų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas.....	30
2.8.1. Redukcinių savybių nustatymas	30
2.8.2. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu.....	30
2.8.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu	31
2.8.4. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu	32
2.8.5. Antioksidacinio fermento superoksido dismutazės (SOD) aktyvumo nustatymas	32
2.9. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos nustatymas Folin-Ciocalteu metodu	34
2.10. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos nustatymas.....	35
2.11. Flavonoidų koncentracijos nustatymas.....	35
2.12. Baltymų koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu.....	36
2.13. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų koncentracijos nustatymas	36

2.14. Gliukozinolatų koncentracijos nustatymas.....	37
2.15. L-prolino koncentracijos nustatymas.....	37
2.16. Mirozinazės aktyvumo nustatymas	38
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	40
3.1. Rapsų (lot. <i>Brassica napus</i> L.), brokolių (lot. <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Italica</i>) ir pipirnių (lot. <i>Lepidium sativum</i> L.) kaliaus kultūros <i>in vitro</i>	40
3.2. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas.....	40
3.2.1. Reducinių savybių nustatymo metodas	40
3.2.2. Antioksidacinių savybių įvertinimas FRAP metodu	42
3.2.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu	44
3.2.4. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu	47
3.2.5. Antioksidacinio fermento superoksido dismutazės (SOD) aktyvumo nustatymas	49
3.2.6. Antioksidacinių savybių, įvertintų skirtingais metodais, apibendrinimas.....	52
3.3. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos nustatymas Folin-Ciocalteu metodu.....	52
3.4. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos nustatymas.....	55
3.5. Baltymų koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu.....	57
3.6. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų nustatymas.....	59
3.7. Gliukozinolatų koncentracijos nustatymas.....	62
3.8. L-prolino koncentracijos nustatymas.....	64
3.9. Mirozinazės aktyvumo nustatymas	65
3.10. Cinko oksido nanodalelių ir metionino elicitorių įtaka brokolių <i>in vitro</i> kultūrų antioksidacinėms savybėms ir biologiškai aktyvių junginių sintezei.....	66
3.10.1. Reducinių savybių įvertinimas	67
3.10.2. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu.....	67
3.10.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu	68
3.10.4. Antioksidacinio fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas	69
3.10.5. Antioksidacinių savybių, įvertintų skirtingais metodais, apibendrinimas.....	69
3.10.6. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas	70
3.10.7. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos įvertinimas.....	70
3.10.8. Flavonoidų koncentracijos nustatymas.....	71
3.10.9. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų koncentracijos nustatymas	72
3.10.10. Gliukozinolatų koncentracijos nustatymas.....	72
3.10.11. Mirozinazės aktyvumo nustatymas	73
4. Rekomendacijų dalis	75
Išvados	77
Literatūros sąrašas	78
Priedai.....	86
1 priedas. Maitinamosios <i>Murashige</i> ir <i>Skoog</i> terpės sudėtis.....	86

Santrumpų ir terminų sąrašas

Santrumpos:

2,4-D – 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis;
ABTS – 2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sulfonrūgštis);
APX – askorbato peroksidazė;
BAP – 6-benzilaminopurinas;
CAT – katalazė;
DMSO – dimetilsulfoksidas;
DNR – deoksiribonukleorūgštis;
DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas;
DTT – ditionitritolis;
ESC-DAD – efektyvioji skysčių chromatografija-detekcija diodų matrica;
ESC-MS – efektyvioji skysčių chromatografija-masių spektrometrija;
ET – etilenas;
FRAP – geležies redukcijos antioksidacinės jėgos metodas;
G-POD – gvajakolio peroksidazė;
IAR – 3-indolilacto rūgštis;
IBR – 3-indolilbutano rūgštis;
JA – žasmono rūgštis;
Kin – kinetinas;
LB – *Luria Bertani*;
LC/MS – skysčių chromatografija/masių spektroskopija;
LPO – lipidų peroksidacija;
MS – *Murashige-Skoog*;
NAR – 1-naftilacto rūgštis;
ND – nanodalelės;
PAL – fenilalanino amonio liazė;
PMSF – fenilmetilsulfonilfluoridas;
ROS – reaktyviosios deguonies rūšys;
RNS – reaktyviosios azoto rūšys;
SA – salicilo rūgštis;
SOD – superoksido dismutazė;
TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazinas;
UV spinduliuotė – ultravioletinė spinduliuotė;
ZnO-ND – cinko oksido nanodalelės.

Įvadas

Augalai – nepakeičiama žmonių ir gyvūnų kasdienės mitybos dalis, o jų maistinė vertė ir sudėtis intensyviai tiriamos ir šiomis dienomis. Susirūpinimas savo sveikata šiuolaikinėje visuomenėje yra ypatingai padidėjęs, todėl vartotojai vis dažniau pasirenka maisto produktus, kurie ne tik aprūpina organizmą energija, bet ir suteikia papildomą naudą sveikatai. Augant susirūpinimui sveikata, auga ir funkcionalaus maisto populiarumas. Be svarbių pirminių metabolitų, aukštesnieji augalai sintetina daugybę antrinių metabolitų, tokių kaip alkaloidai, antocianinai, flavonoidai, chinonai, lignanai, steroidai ir terpenoidai, kurie naudojami medicinos ir maisto pramonės srityse, kaip gydomosios, kvapiosios medžiagos, dažikliai ir maisto priedai. Gliukozinolatai – svarbiausi kryžmažiedžiuose augaluose aptinkami bioaktyvūs junginiai, kurie dėl gydomųjų savybių gali būti puikūs funkcinio maisto šaltiniai [1]. Augalų antriniai metabolitai itin vertinami ne tik medicinoje ir maisto pramonėje, bet ir agrochemijoje. Nors antriniai metabolitai neatlieka reikšmingo vaidmens pagrindiniuose augalų metabolizmo procesuose, tačiau jie prisideda apsaugant augalus nuo vabzdžių, kenkėjų, žolėdžių, fitopatogenų ir padeda augalų prisitaikymui prie aplinkos [1, 2]. Augalų augimas ir bioaktyvių junginių sintezė *in vivo* sąlygomis – neintensyvi ir daugiausia priklauso nuo augalo fiziologijos, vystymosi ir aplinkos sąlygų. Siekiant padidinti antrinių metabolitų produktyvumą augaluose, buvo pritaikytos kelios biotechnologinės strategijos: audinių kultūros ir elicitavimas, kuris pripažįstamas kaip praktiška ir pelninga strategija, pageidaujama antrinių metabolitų gamybai augaluose ir augalų audinių kultūrose [3]. Kaliaus kultūrų formavimas leidžia augalams susintetinti didesnę kiekį antrinių metabolitų, kuriuos galima lengvai išskirti ir išgryninti bei pritaikyti įvairiose pramonės šakose. Elicitavimas – augalų sustiprintos antrinių metabolitų sintezės procesas, padedantis užtikrinti jų išlikimą nepalankiomis sąlygomis [2].

Viena iš ekonomiškai svarbiausių literatūroje aprašomų augalų šeimų, kaupiančių itin įvairius fitochemikalus – kryžmažiedžių (lot. *Brassicaceae*) šeima [1]. Rapsai (lot. *Brassica napus* L.) plačiausiai vakaruose auginami kryžmažiedžių šeimos augalai, kurie naudojami gyvūnų pašarams, augaliniam aliejui, biodyzelinui ir kitiems produktams gaminti [4, 5, 6]. Dėl didelės ekonominės svarbos, kaupiamų metabolitų įvairovės ir jų koncentracijos, jie buvo pasirinkti tyrimo atlikimui. Taip pat tyrimui buvo pasirinkti brokoliai (lot. *Brassica oleracea* var. *Italica*) ir pipirnės (lot. *Lepidium sativum* L.), šie augalai teigiamai vertinami dėl maistinių savybių ir kaupiamų gliukozinolatų įvairovės, kurie siejami su nauda žmogaus sveikatai [1, 3]. Auginant šias daržoves, jos susiduria su nepageidaujamais abiotiniais ir biotiniais veiksniais, kurie gali privesti prie naudingųjų medžiagų, maistinių savybių ar net pačio derliaus praradimo, dėl ko patiriami dideli ekonominiai nuostoliai [4]. Siekiant padidinti antrinių metabolitų kiekį pasirinktuose kryžmažiedžiuose augaluose buvo suformuotos šių augalų kaliaus kultūros, kurios augintos MS terpėje papildytoje (2 mg/l) BAP ir (0,2 mg/l) 2,4-D augimo reguliatoriais. Siekiant padidinti bioaktyvių junginių kiekį kryžmažiedžiuose augaluose mitybinė terpė buvo papildyta 25, 50 μmol/l koncentracijos salicilo rūgšties ir metilzasmonato elicitoriais. Tyrimo metu įvertinta šių elicitorių įtaka brokolių, rapsų ir pipirnių kaliaus kultūrų antioksidacinėms savybėms, kaupiamiems fitochemikalams ir jų koncentracijoms. Taip pat tyrimo metu įvertinta cinko nanodalelių ir metionino elicitorių įtaka brokolių *in vitro* kultūrų antioksidacinėms savybėms ir fitocheminių medžiagų sudėčiai. Viliamasi, jog atliktas brokolių, rapsų ir pipirnių *in vitro* kultūrų antioksidacinio ir fitocheminio aktyvumo tyrimas turės praktinę reikšmę tolimesniuose šių augalų tyrimuose.

Projekto tikslas – įvertinti ir palyginti pasirinktų elicitorių poveikį brokolių (lot. *Brassica oleracea* var. *Italica*), rapsų (lot. *Brassica napus* L.) ir pipirnių (lot. *Lepidium sativum* L.) *in vitro* kultūrų bei kaliaus kultūrų antioksidaciniam ir fitocheminiam aktyvumui.

Tyrimo uždaviniai:

1. įvertinti ir palyginti brokolių (lot. *Brassica oleracea* var. *Italica*), rapsų (lot. *Brassica napus* L.) ir pipirnių (lot. *Lepidium sativum* L.) *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro*, užaugintų mitybinėje terpėje papildytoje skirtingais elicitoriais, ekstraktų antioksidacinį aktyvumą;
2. nustatyti bendrąją fenolinių junginių bei fenolinių rūgščių koncentraciją brokolių, rapsų, pipirnių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro*, užaugintų mitybinėje terpėje papildytoje skirtingais elicitoriais, ekstraktuose ir jas palyginti;
3. įvertinti bei palyginti bendrąją baltymų ir *L*-prolino koncentraciją brokolių, rapsų, pipirnių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro*, užaugintų mitybinėje terpėje papildytoje skirtingais elicitoriais, ekstraktuose;
4. nustatyti pasirinktų elicitorių poveikį chlorofilo *a*, *b* bei karotinoidų, ir gliukozinolatų koncentracijai brokolių, rapsų, pipirnių kaliaus kultūrose *in vitro* ir palyginti su *in vivo* kultūromis;
5. ištirti elicitorių įtaką brokolių *in vitro* kultūrų antioksidaciniam ir fitocheminiam aktyvumui.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Kryžmažiedžių augalų charakteristika

Bastutinių, kryžmažiedžių (lot. *Brassicaceae*, *Cruciferae*) augalų šeima priklauso magnolijainių (lot. *Magnoliopsida*) klasei. Šiai šeimai priklauso virš 300 genčių ir virš 3500 rūšių, paplitusių visame pasaulyje. Didžiausios šeimos įvairovės centrai yra Irano-Turanijos regionas (150 genčių ir 900 rūšių, iš kurių apie 530 yra endeminiai), Šiaurės Amerika (99 gentys ir 778 rūšys, 600 rūšių yra endeminės) ir Viduržemio jūros regionas (apie 113 genčių ir 630 rūšių, 290 endeminių) [1, 2].

Šiai šeimai būdinga panaši morfologija, todėl ji lengvai atpažįstama. Tai vienmečiai, dvimečiai, daugiamečiai žoliniai augalai, rečiau – krūmai. Kryžmažiedžių šeimos priklauso ir daržovės, kurių žiedai sudaryti iš 4 taurėlapių, 4 vainiklapių, 6 kuokelių, 1 piestelės [1]. Žiedlapiai su taurėlapiais išsidėsto kryžmai, todėl šeimos vardas – kryžmažiedžiai (lot. *Cruciferae*). Žiedai – dvilyčiai, susitelkę į kekes, jų spalvos įvairios: balti, geltoni ar rausvi. Šeimoje yra vaistinių, maistinių, medingų, dekoratyvinių, prieskoninių augalų ar piktžolių. Šios šeimos augalams patinka drėgnas, šiltas klimatas. Svarbiausios šios šeimos gentys: bastutis (lot. *Brassica*), ankstyvė (lot. *Erophila*), kartenė (lot. *Cardamine*), rudgrūdėlė (lot. *Iberis*), pipirnė (lot. *Lepidium*), valgomasis ridikas (lot. *Raphanus sativus*), vaistutis (lot. *Arabis*), gražgarstė (lot. *Eruca*), stoklė (lot. *Cakile*), lobularija (lot. *Lobularia*), vairenis (lot. *Arabidopsis*), tvertikas (lot. *Erysimum*), rėžiukas (lot. *Nasturtium*), garstukas (lot. *Sinapis*), barborytė (lot. *Barbarea*), mėlžolė (lot. *Isatis*) ir česnakūnė (lot. *Alliaria*). Dažniausiai vartojamos šios šeimos daržovės yra kopūstai, žiediniai kopūstai, ridikai, Briuselio kopūstai, ropės, kaliaropės, rapsai bei brokoliai, kurie visame pasaulyje užima svarbią vietą žmonių mityboje [2].

Ši šeima apima keletą augalų rūšių, turinčių didelę ekonominę svarbą. *Brassica* genties augalai – svarbiausi šios šeimos daržoviniai augalai. Svarbiausios rūšys: juodasis bastutis (lot. *Brassica nigra*), sareptinis bastutis (lot. *Brassica juncea*), gūžinis kopūstas (lot. *Brassica oleracea*), griežtis (lot. *Brassica napobrassica*), paprastasis bastutis (lot. *Brassica rapa*). Labiausiai paplitusios *Brassica oleracea* daržovių veislės: yra kopūstai (var. *capitata*), žiediniai kopūstai (var. *botrytis*), brokoliai (var. *italica*), Briuselio kopūstai (var. *gemmifera*), kaliaropės (var. *gongylodes*) [3]. Taip pat kiti, ekonomiškai svarbūs *Brassica* genties augalai – aliejiniai augalai – rapsai (var. *napus*) [4].

1.1.1. Rapsų (lot. *Brassica napus* L.) charakteristika

Rapsai (lot. *Brassica napus* L.) priklauso bastutinių (*Cruciferae* arba *Brassicaceae*) šeimai. Tai itin vertingas aliejinis augalas, kurio aukštą kokybę nulemia puikus riebalų rūgščių derinys. Rapsų sėklos – pagrindinis maistinio aliejaus, aliejaus biokuro gamybai šaltinis. Aliejaus gamybos metu susidaro šalutiniai produktai – išspaudos, kurios yra vertingas baltyminis papildas gyvulių pašarams [4]. Populiariausias kepimo aliejus vakaruose – rapsų aliejus, išgaunamas iš *Brassica napus* subsp. *Napus*. Nustatyta, kad *Brassicaceae* šeimos augalų aliejai užima pirmąją vietą pasaulyje toninėje gamyboje [5].

Skiriami du rapsų porūšiai: žieminiai (*biennis* forma) ir vasariniai (*annua* forma). Lietuvoje vieni iš dažniausiai auginamų žemės ūkio augalų – žieminiai rapsai [6]. Rapsai yra vienmečiai augalai. Rapsų lapai stiebo apačioje yra su koreliais, o viršuje – apglėbiantys stiebą, melsvo atspalvio. Žiedai nedideli, gelsvi. Sėklos – mažos, apvalios, dažniausiai rudos spalvos, rečiau juodos, gelsvos spalvos. Rapsų šaknys ilgos, smarkiai išsišakojusios, o stiebas stačias, šakotas, padengtas vašku, galintis užaugti iki daugiau nei 1-1,5 m aukščio. Rapsai – savidulkiai augalai, reiklūs klimatui ir dirvožemiui,

gerai auga esant drėgnam ir švelniam klimatui. Rapsai labai anksti sužaliuoja, nupjauti gerai atželia [6, 7].

1.1.2. Brokolių (lot. *Brassica oleracea* var. *Italica*) charakteristika

Brokoliai – kopūstinė vienmetė daržovė. Brokolio stiebas užauga iki 20-25 cm aukščio, lapų skrotelė reta, lapai pailgi, lapalakščiai suskaidyti. Maistui vartojama puri galvutė (žiedynas), arba brokolių daigai, kurie yra intensyviai žalios spalvos [1]. Brokoliai puikiai dera drėgnuose, išdirbtuose smėlinguose ir molinguose dirvožemiuose. Sėjami gegužės-birželio mėnesiais. Derlius nuimamas vos tik atsiradus pumpurams (50-60 d. po pasodinimo). Yra brokolių veislių, kurių galvutės žalios, violetinės, gelsvos bei baltos. Plačiausiai auginami brokoliai žaliomis galvutėmis, jų vegetacijos periodas 70-150 dienų. Manoma, kad brokolių daigų vartojimas maisto racione vaidina svarbų vaidmenį žmogaus sveikatai ir sumažina lėtinių ligų riziką [8]. *In vitro* ir *in vivo* tyrimai rodo turtingą fitocheminę brokolių daigų sudėtį, dėl kurios brokolis pasižymi įvairiu poveikiu: antioksidaciniu, antikarcinogeniniu, antimikrobiniu, priešuždegiminiu ir antidiabetiniu [1, 2].

1.1.3. Pipirnės (lot. *Lepidium sativum* L.) charakteristika

Pipirnė (lot. *L. sativum*) yra greitai auganti valgomoji žolė, kuri pasižymi pipiriniu, aštroku skoniu ir aromatu. *Lepidium sativum*, liaudiškai vadinamas pipirne, sodine pipirne, šis augalas – *Brassicaceae* šeimos narys [9]. Pipirnės komerciniais tikslais daugiausiai auginamos Europoje. Augalo augimui reikia drėgnų sąlygų, jis gali išaugti iki 35-50 cm aukščio. Augalo stiebas yra tiesus, cilindro formos, o jo viršutinėje dalyje yra daug šakų ant kurių tankiai susitelkę 2 mm skersmens žiedai, turintys balsvus ar rausvus žiedlapius. Pipirnių lapai plunksniški, kartais dantyti, apatiniai lapai turi ilgus 4 cm ilgio lapkočius. Augalo vaisiai – elipsinės ankštarėlės, 5-6 mm skersmens. Sėklos ovalios, rudai raudonos spalvos [9].

1.2. Augalų biotechnologiniai metodai

Platesnis augalų mikroskopijos supratimas, nauji biocheminiai metodai ir manipuliavimas genetinė medžiaga organizmuose padėjo pamatus, moderniosios augalų biotechnologijos metodų atsiradimui. Augalų biotechnologiją galima apibrėžti kaip audinių kultūros ir genų inžinerijos metodų panaudojimą, siekiant užauginti genetiškai modifikuotus augalus, pasižyminčius naujomis arba patobulintomis pageidaujamomis savybėmis [10].

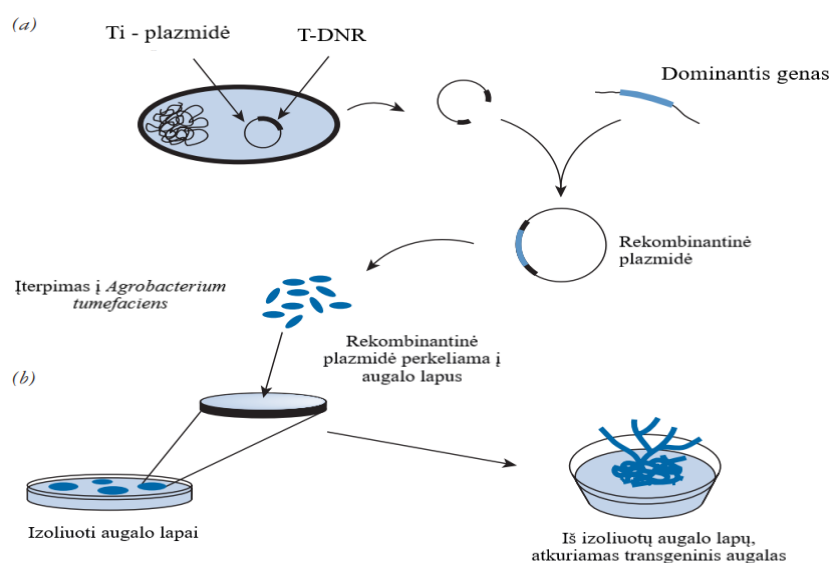
1.2.1. Genų inžinerijos metodai

Genų inžinerijos ir molekulinės biologijos metodų tobulinimas ir pritaikymas biotechnologijos mokslų šakoje, leido sukurti augalus, atsparius įvairiems virusams, grybeliams, bakterijoms, insekticidams bei herbicidams, sausrui, drėgmei, UV spinduliuotei, cheminiams junginiams (abiotiniam stresui). Taip pat taikant genetines augalų modifikacijas buvo padidintas augalų derlius ir bioaktyvių junginių sintezė augaluose [10].

Rekombinantinės DNR technologija pagrįstos genetinės transformacijos technikos leido tiesiogiai į pasirinktą augalą įvesti naudingus genus. Genetinės informacijos perkėlimas iš vieno organizmo į kitą organizmą ar ląstelę su svetima DNR bei vėlesnė stabili svetimimo geno integracija bei ekspresija genome vadinama – genetinė transformacija, perduotas genas – transgenas, o organizmai ar augalai, kurie išsivysto po sėkmingo genų perdavimo, vadinami transgeniniais [10]. Yra įvairių metodų – fizikinių, cheminių ir biologinių – kurie naudojami, genetinės medžiagos įvedimui į daugelį

ekonomiškai svarbių augalų: biolistinis DNR įterpimas į ląstelę (bombardavimas), elektroporacija, pernešimas polietilenglikoliu, mikroinjekcija [11].

Genetiškai modifikuotų augalų sukūrimui, nauja genetinė medžiaga į augalo genomą dažniausiai įvedama panaudojant natūralius vektorius, kurie sukurti agrobakterijų Ti plazmidės pagrindu [10]. Šios Ti plazmidės, kurios aptinkamos *Agrobacterium tumefaciens* bakterijoje, atlieka natūralią genų inžineriją ir genai lengvai pernešami į dviskilčių augalų genomą. Metodo apibendrinimas pateiktas 1.1 pav. a) Tikslinis genas įterpiamas į vektorių, pagrįstą Ti plazmide. Rekombinantinė plazmidė naudojama transformuoti *Agrobacterium tumefaciens*. Sukūrus tinkamą *A. tumefaciens* padermę, turinčią rekombinantinę Ti plazmidę, atliekamas augalų audinių užkrėtimas. Tai dažnai daroma naudojant lapų diskus, iš kurių gali būti lengvai išauginami tiksliniai augalai. Transgeninis augalas regeneruojamas iš lapų disko, dauginant atitinkamoje audinių auginimo terpėje *in vitro* [12].



1.1 pav. Transgeninių augalų formavimas, panaudojant natūralius vektorius, kurie sukurti agrobakterijų Ti plazmidės pagrindu [12]

Metodo pasirinkimas priklauso nuo metodo efektyvumo perduodant genetinę medžiagą į atitinkamą augalo ląstelę, nuo eksplantų gebėjimo atsinaujinti ir nuo to, ar genetinė medžiaga pernešama į branduolio ar plastidės genomą [11, 12].

Daugelis augalų kultūrų genetiškai modifikuojamos, siekiant pagerinti šių augalų savybes: atsparumą vabzdžiams ir ligoms, toleranciją herbicidams ir insekticidams, toleranciją abiotiniui stresui, azoto fiksacijos pagerinimui, galutinių produktų modifikacijai (kokybinis arba kiekybinis pagerinimas), daržovių ir vaisių galiojimo laiko prailginimui. Be geresnių augalų savybių, transgeniniai augalai taip pat labai vertinami dėl rekombinantinių baltymų sintezės, kurie gali būti išskiriami rekombinantinės DNR technologijos būdu [13]. Augalų auginimas yra pigus, palyginti su brangiais mikrobu ar žinduolių ląstelių poreikiais, todėl dėl sąnaudų mažinimo ir potencialiai neribotų augimo galimybių transgeniniai augalai yra patraukli galimybė rekombinantinių baltymų gamybai pramoniniu mastu, kurie plačiai naudojami aplinkosaugos, maisto, žemės ūkio bei farmacijos srityse [11, 12, 13].

1.2.2. Augalų ląstelių ir audinių kultūrų metodai

Specifinės sudėties augalus galima užauginti taikant ne tik genetinės inžinerijos metodus, bet ir augalų audinių kultūras [11]. Haberlandas 1902 m. nustatė *in vitro* auginamų augalų audinių

totipotencijos mechanizmą. Skoog ir Miller 1957 m. nustatė santykinę auksino ir citokinino koncentracijos įtaką, organų regeneracijai iš augalų ląstelių [12]. Nuo to laiko daugelio įvairių augalų eksplantai, įvairios maistinės medžiagos ir augimo reguliatorių deriniai buvo naudojami, siekiant atkurti visą augalą iš atskirų ląstelių ar augalų audinių [12, 13]. Izoliuoti augalų audiniai ir ląstelių kultūra apibūdina sterilų augalų ląstelių, audinių ir organų augimą bei dauginimąsi *in vitro*. Augalų ląstelės, kultivuojamos ant maitinamųjų terpių dirbtinėje aplinkoje tam, kad greičiau išaugtų subrendę ir ligų neturintys, specifinėmis savybėmis bei sudėtimi pasižymintys augalai. Užauginti aukštos kokybės augalai, gali būti greitai padauginoti ir pritaikyti molekulinei genų inžinerijai, augalų veisimui, sodininkystei ir aplinkos apsaugai. Augalų audinių bei ląstelių kultūros yra vertingų biologiškai aktyvių junginių šaltinis [13].

Augalų kultūros *in vitro*, kurios kultivuojamos biotechnologijos tikslais [14]:

- 1) Augalų ląstelių kultūra (gametinės ląstelės, ląstelių suspensija bei protoplastų kultūra);
- 2) Augalų audinių kultūra (kaliaus kultūra ir diferencijuoti audiniai);
- 3) Augalų organų kultūra (pavyzdžiui, zigotiniai embrionai, šaknys, ūgliai).

Dažniausiai, biotechnologiniams tikslams naudojama kaliaus kultūra [12]. Kalias (lot. *callus* – stora oda, nuospauda), tai augalo audinys, kuris susidaro ir natūraliai padengia pažeistas augalų dalis, padėdamas joms užgyti. Kalias dirbtinai gali būti suformuojamas auginant izoliuotas augalų ląsteles ar audinius *in vitro* [14]. Kaliaus gavimui naudojamos mažos augalo dalys arba audiniai, vadinami eksplantais. Bet koks eksplantas, auginamas maitinamojoje terpėje gali išsivystyti į visą augalą *in vitro* sąlygomis. Eksplantais gali būti: sėklos, gemalai, lapų bei šaknų ar stiebų segmentai, žiedynai. Taigi, augalų kaliaus kultūroms kultivuoti, svarbu parinkti sveikas augalų lapų ar stiebų dalis bei užtikrinti sterilias sąlygas [13, 14].

Augalų kaliaus kultūros auginamos ant kietos agarų terpės, kuri papildyta specifinėmis maistinėmis medžiagomis, mineralinėmis druskomis, vitaminais, aminorūgštimis ir elementais (pvz., azotu, fosforu, geležimi ir kaliumu) [12]. Augalų ląstelių kultūroms, kurios nėra fotosintetinančios reikia papildomo anglies šaltinio cukraus pavidalu, o azotas naudojamas amonio jonų pavidalu. Paprastai didelės amonio jonų koncentracijos slopina antrinių metabolitų susidarymą, o sumažinus amonio azoto kiekį jį padidina [13]. Augalų kaliaus kultūrų auginimui dažniausiai renkama *Murashige-Skoog* terpė (MS terpė). Tai yra plačiausiai naudojama terpė daugelio augalų rūšių vegetatyviam dauginimui *in vitro*. Svarbus aspektas yra terpės pH, turintis įtakos tiek augalų augimui, tiek augalų augimo reguliatorių veiklai. Jis sureguliuojamas iki 5,4–5,8 vertės. Kultivavimui gali būti naudojama ir kieta, ir skysta terpė [15].

Pagrindiniai augalų ląstelių kultūros sistemų pranašumai, palyginti su įprastu viso augalo auginimu, yra šie [15]:

- pasirinktus augalus galima išauginti nepriklausomai nuo išorinių veiksnių (pvz., dirvožemio sudėties ar klimato);
- auginamoms ląstelėms negresia mikroorganizmų ar vabzdžių atakos, nes kultivuojama steriliomis sąlygomis;
- retų ar nykstančių augalų ląsteles galima lengvai išauginti bei išsaugoti;
- galima užtikrinti pageidaujamą kiekį tikslių antrinių metabolitų;
- sutrumpinamas augalo augimo laikas.

Taigi, augalų biotechnologiniai metodai turi itin didelę pramoninę reikšmę ne tik kaip mokslinių tyrimų priemonė, bet ir augalų dauginimo, jų ligų šalinimo, augalų savybių gerinimo ir antrinių metabolitų bei kitų biologiškai aktyvių produktų gamybos srityse, kurie gali būti panaudojami pramoniniams tikslams [11, 15].

1.3. Kryžmažiedžių augalų kaliaus kultūros *in vitro*

Kryžmažiedžių augalų šeima sintetina ir kaupia įvairios struktūros bei savybių cheminius junginius. Dauguma šių cheminių junginių – antriniai metabolitai, kurie pasižymi biologiniu aktyvumu ir yra plačiai naudojami medicinos, maisto, agrochemijos pramonės srityse. Pastaruoju metu biotechnologijos siūlo patrauklias galimybes padidinti šių kaupiamų junginių kiekį auginamuose augaluose, pritaikius *in vitro* sistemas (augalų audinių kultūras) ar genetinę manipuliaciją [14].

Kaliaus susidarymą arba somatinę embriogenezę skatina augalų hormonai, tokie kaip auksinai, citokininai ir giberelinai. Išties augalų regeneracijai iš kaliaus audinio taip pat reikalingi specifiniai augalų hormonai. Auksinai ir citokininai naudojami kartu, jų santykis lemia regeneruojamo audinio tipą. Didelė auksinų koncentracija paprastai skatina šaknų formavimąsi, o didelė citokininų koncentracija skatina ūglių regeneraciją [11].

Naudojamų hormonų tipas ir koncentracija daugiausia priklauso nuo augalo rūšies, kultivuojamo eksplanto ir eksperimento tikslo. Kadangi kaliaus kultūros turi komercinį potencialą, dažniausiai eksperimento tikslas būna orientuotas į: antrinių metabolitų gamybą pramoniniams tikslams, terapinių antikūnų ir kitų rekombinantinių baltymų gamybą, žemės ūkio augalų auginimą bei augalų regeneravimą. Kaliaus kultūroms auginti svarbu tinkamai pasirinkti kultivuojamą augalo eksplantą bei rūšį, mitybinę terpę su priedais ir kultivavimo sąlygas [15].

1.3.1. Brokolių kaliaus kultūros *in vitro*

Auksinų ir citokininų sąveika bei pusiausvyra lemia nediferencijuotų ląstelių, žinomų kaip kaliaus kultūra augimą [15]. S. Hossain 2016 m. atliko tyrimą [16] su skirtingomis auksinų ir citokininų koncentracijomis, siekiant išsiaiškinti, kuris santykis labiausiai skatina brokolių kaliaus kultūros augimą ir antrinių metabolitų sintezę. Atliekant bandymą į MS terpę buvo patalpinti brokolio eksplantai. Mitybinė terpė buvo papildyta skirtingomis 1-naftilacto rūgšties (NAR), 3-indolilbutano rūgštis (IBR), 3-indolilacto rūgšties (IAR) koncentracijomis kartu su skirtingomis 6-benzilaminopurino (BAP) koncentracijomis. Atlikus bandymą nustatyta, jog kaliaus formavimasis pastebimas bandiniuose, kuriuose terpė buvo papildyta 1-3,5 mg/l IBR su 1-2 mg/l BAP. Tačiau didžiausias brokolių kaliaus kultūros kiekis buvo nustatytas terpėje esant 1,5 mg/l IBR su 1 mg/l BAP. Šie augimo reguliatoriai skatina ląstelių dalijimąsi, ilgėjimą ir ląstelių sienelių plastiškumą [16].

Po keturių metų S. J. Sultan [17] ir kolegų atlikto tyrimo rezultatai taip pat parodė, jog iš visų tirtų augimo reguliatorių didžiausios įtakos kaliaus kultūros iniciacijai turėjo 3-indolilbutano rūgštis (IBR) ir 6-benzilaminopurino (BAP). Įvertinus gautus rezultatus, didžiausia kaliaus kultūros masė, iš sodinukų hipokotilinių stiebų, buvo gauta MS terpėje, kuri buvo papildyta 1 mg/l IBR su 2 mg/l BAP [17].

Žinoma, kad augalų augimo reguliatoriaus koncentracija bei eksplanto rūšis, turi didelę įtaką brokolių kaliaus kultūros formavimuisi [13]. 2021 m. R. M. Abdullah [18] atlikto tyrimo metu, buvo siekta nustatyti augimo reguliatorių koncentracijas, kurios skatintų brokolio kaliaus kultūrų iniciaciją.

Brokolio daigų lapų, stiebų ir šaknų eksplantai, buvo kultivuojami MS terpėje, turinčioje skirtingas koncentracijas BAP ir NAR augalų augimo reguliatorių. Stiebų segmentai suformavo didžiausią kaliaus kultūrų masę bei parodė didžiausią kaliaus kultūrų formavimosi greitį, MS terpėje papildytoje 0,2 mg/l NAR ir 0,5 mg/l BAP [18].

Skirtingos koncentracijos auksino 2,4-D ir citokinino BAP buvo pridėtos į MS terpę, siekiant iširti šių augimo reguliatorių įtaką kaliaus kultūrų formavimuisi iš stiebų eksplantų. Atlikus bandymą nustatyta, kad atskirai į terpę įdėjus, tik auksino 2,4-D ar citokinino BAP, neįvyko kaliaus kultūros iniciacija. Tačiau dviejų šių augimo reguliatorių derinys davė teigiamą rezultatą. Mitybinėje terpėje, kurioje buvo BAP (1 mg/l) ir 2,4-D (0,5 mg/l) arba BAP (1 mg/l) ir 2,4-D (1 mg/l) susiformavo didžiausias kiekis kaliaus kultūros [19].

Mokslininkai teigia, kad brokolių kaliaus formavimui optimalus auksino šaltinis yra 2,4-D, o citokininų – BAP ir kinetinas. Lyginant juos, BAP – veiksmingesnis už kinetiną esant tokiai pat koncentracijai. Tačiau maitinamojoje terpėje, derinyje su 2,4-D, kinetinas inicijuoja didesnę kaliaus kultūros susiformavimo procentą nei BAP [20].

1.3.2. Rapsų kaliaus kultūros *in vitro*

Atlikta įvairių tyrimų su rapsų augalų kultūromis *in vitro*, siekiant įvertinti pasirinkto eksplanto bei augimo reguliatorių įtaką kaliaus kultūrų augimui bei antrinių metabolitų sintezei. Vienas iš tokių tyrimų buvo atliktas S. Naz ir bendraautorių 2018 m. [21]. Rapsų (lot. *Brassica napus* L.) kaliaus kultūroms suformuoti, buvo naudojama MS terpė į kurią buvo patalpinti rapsų stiebai, lapai ir šaknys. MS terpė buvo papildyta skirtingų koncentracijų 2,4-D, NAR, IBR, BAP, 2,4-D+BAP augimo reguliatoriais. Įvertinus skirtingų koncentracijų augimo reguliatorių įtaką kaliaus kultūrų iniciacijai, nustatyta, kad stiebų eksplantai buvo tinkamiausi kaliaus kultūrų formavimui MS terpėje, kurioje yra 0,1 mg/l 2,4-D, palyginti su kitais augimo reguliatoriais, tokiais kaip NAR, BAP, IBR ar net 2,4-D kartu su BAP [21]. S. Naz ir bendraautoriai taip pat pranešė, kad didesnę augimo reguliatoriaus 2,4-D efektyvumą lemia geresnis jo prieinamumas audiniuose. 2,4-D kaupimasis augalo audinyje atsiranda dėl didesnio jo mobilumo ir riboto oksidacijos bei konjugacijos greičio, lyginant su kitais augimo reguliatoriais, pavyzdžiui, tokiais kaip NAR, kurių skilimo greitis ir judrumas augaluose yra mažas, o būtent tai ir lemia didesnę 2,4-D efektyvumą [22].

S. Dubey ir bendraautoriai [23] pranešė apie geriausią kaliaus kultūrų iniciaciją iš rapsų stiebų eksplantų MS terpėje, kurioje yra 0,5 mg/l 2,4-D ir 0,5 mg/l NAR arba BAP. Šis tyrimas parodė, kad rapsų kaliaus kultūrų formavimuisi BAP, NAR ir 2,4-D augimo reguliatorių tarpusavio sąveika MS terpėje buvo veiksmingesnė nei naudojant vien 2,4-D [23].

2017 m. S. M. Kouhi ir bendraautoriai atliko tyrimą [24], kurio metu, norint rasti geriausią hormonų derinį, skatinantį kaliaus kultūros formavimąsi, rapsų stiebų segmentai buvo auginami MS terpėje papildytoje skirtingų koncentracijų augalų augimo reguliatorių (2,4-D, BAP, NAR, kinetino) deriniais. Tyrimo metu didžiausias kaliaus kultūros masės prieaugis buvo nustatytas MS terpėje, kuri buvo papildyta 1 mg/l NAR ir 1 mg/l BAP. Šis tyrimas patvirtina 2014 m. S. Dubey ir bendraautorių anksčiau aprašyto tyrimo rezultatus. Šio tyrimo rezultatai parodė, jog derinant 2,4-D kartu su NAR ar BAP, gaunami didesni kaliaus kultūros masės prieaugiai nei terpę papildžius vien tik 2,4-D [24].

1.3.3. Pipirnės kaliaus kultūros *in vitro*

Siekiant suformuoti pipirnės kaliaus kultūros svarbu pasirinkti tinkamą augalo eksplantą bei tinkamas mitybines terpės sudėtinės medžiagas, tokias, kaip augimo reguliatoriai [9]. 2015 m. atlikto tyrimo metu, sodo pipirnės (lot. *Lepidium sativum* L.) eksplantai (sėklos ir stiebai) buvo naudojami kaliaus kultūros inicijavimui *in vitro* sąlygomis [25]. Įvairūs skirtingų koncentracijų augalų augimo reguliatorių (NAR, 2, 4-D, Kin) deriniai buvo pridėti į MS terpę. Nustatyta, kad 4,0 ir 6,0 mg/l 2, 4-D ir 2,0 mg/l Kin augalų augimo reguliatorių deriniai yra veiksmingiausi formuojant kaliaus kultūras, tiek iš stiebų, tiek iš šaknų. Didesnės kinetino koncentracijos (daugiau nei 2,0 mg/l) nepagerino kaliaus kultūrų susiformavimo iš abiejų eksplantų [25].

Reikšmingą sąsają tarp kitų fitohormonų 2019 m. nustatė P. Golkar kartu su bendraautoriais [26]. Mokslininkai atliko tyrimą, siekdami išsiaiškinti tinkamiausią kaliaus kultūrų formavimui rapsų eksplantą bei tikslias augimo reguliatorių koncentracijas, kurios skatintų kaliaus kultūrų iniciaciją bei antrinių metabolitų sintezę. Tyrimo metu rapsų stiebai ir lapai buvo patalpinti į MS terpę, papildytą dvylikos skirtingų augalų augimo reguliatorių derinių. Įvertinus rezultatus, didžiausias kaliaus kultūros prieaugis (0,4 g šviežios masės) buvo gautas iš lapų eksplantų, augusių MS terpėje, papildytoje 1 mg/l 2, 4-D ir 2 mg/l BAP, augimą vykdant šviesoje. Stiebo eksplanto suformuotame pažaidos taške kaliaus kultūros masės prieaugis buvo 0,1 g šviežios masės. Citokininas BAP buvo naudotas dėl aktyvinančių ląstelių dalijimąsi savybių, jaunų ūglių formavimosi bei morfogenezės skatinimo [26].

1.4. Fitochemikalai kaupiami augalų kaliaus kultūrose

Augalų audinių metodo vienas iš tikslų – užauginti gausias kaliaus kultūras, kurios intensyviai sintetintų bei kauptų fitochemikalus. Šie cheminiai junginiai gausiai išskiriami iš kaliaus kultūrų, taikant ląstelių suspensijos metodą [12]. Bioaktyvioms fitocheminėms medžiagoms priskiriami augalų antriniai metabolitai. Augalai, pasižymi dviem metabolizmo keliais: pirminiu ir antriniu metabolizmu. Pirminio metabolizmo metu ląstelės sintetina junginius, kurie yra būdingi beveik visiems organizmams. Jų tarpe yra įprasti angliavandeniai, riebalai, baltymai. Pirminiai augalų metabolitai augalams yra gyvybiškai būtini [13, 14]. Antriniai metabolitai yra tarpiniai bei galutiniai medžiagos apykaitos produktai. Esminis jų vaidmuo – augalų adaptacijos aplinkoje padidinimas. Taigi, augalų ląstelės gamina svarbius augalo sąveikos su aplinka (apsaugos nuo plėšrūnų, patogenų ar aplinkos streso) antrinius metabolitus kai kurie iš jų – susiję su augalo reprodukcinio mechanizmu (pritraukia vabzdžius siekdami apdulkinimo). Jie gali apsaugoti nuo augalo ligos sukėlėjų, nuo vabzdžių, žolėdžių augalų [15]. Fitocheminės medžiagos esančios augaluose suteikia naudą ir žmonių sveikatai, kuomet jos gaunamos kartu su maisto produktais: vaisiais, daržovėmis, grūdais, riešutais ir sėklomis. Veiksniai darantys įtaką antrinių metabolitų kaupimuisi augalo audinių kultūrose: pačių metabolitų kiekis, augalo rūšis, genotipas, genetinė prigimtis, amžius, augimo ir vystymosi fazės, aplinkos veiksniai [27].

Nustatyta, jog iš augalų audinių kultūrų *in vitro* galima išskirti šiuos augalų kaupiamus antrinius metabolitus, kurie suskirstyti į 5 klases [27]:

- Alkaloidai (betalainai, akridinai, galantaminas, fluorochinolonai, piperidinas, tropano alkaloidai, indoliniai alkaloidai ir kt.);
- Terpenoidai (monoterpenai, diterpenai, triterpenai, seksviterpenai, arteminizinas, ginsenzoidai ir kt.);

- Steroidai (brasinolidas, steroidiniai glikozidai, steroidiniai laktonai, digoksinas ir kt.)
- Chinonai (naftochinonai, alavijo emodinas, chrizofenolis, šikoninas, timochinonai, benzochinonai ir kt.);
- Fenilpropanoidai (flavonoidai, ferulo rūgštis, antocianinai, kumarinai, kavos rūgštis, izoflavonoidai ir kt.)

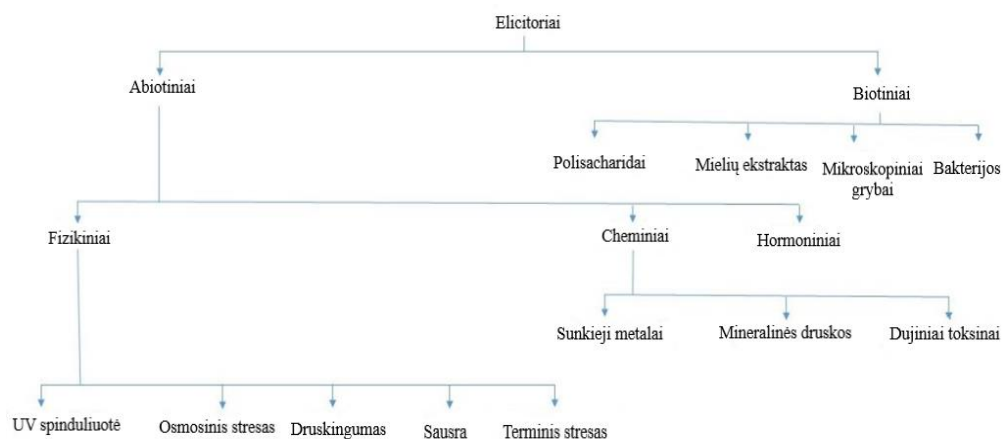
Šie junginiai labai svarbūs augalų biotechnologijai, kurios pagrindinis tikslas yra bioaktyvių antrinių metabolitų išskyrimas iš kaliaus kultūrų *in vitro*. Taikant biotechnologinius metodus didesni biologiškai aktyvių medžiagų kiekiai išskiriami pigiau nei naudojant natūralioje aplinkoje išaugintus augalus. Iš augalų kaliaus kultūrų išskirtos fitocheminės medžiagos turi tikslią cheminę sudėtį, jos išskiriamos grynos ir natūralios. Išskirti metabolitai naudojami farmacijos, kosmetikos pramonės srityse, taip pat kaip maisto priedai ir insekticidai. Dauguma antrinių metabolitų išsiskiria specifiniu biologiniu aktyvumu [26, 27].

1.4.1. Augalų augimo reguliatoriai

Siekiant sutrumpinti augalų augimo laiką, pagausinti derlių, pagerinti augalų savybes bei padidinti sintetinių ir kaupiamų bioaktyvių medžiagų kiekį – naudojami augalų augimo reguliatoriai [23, 25]. Šios medžiagos plačiai naudojamos dauginant augalus iš įvairių eksplantų *in vitro* sąlygomis. Naudojamų reguliatorių tipas ir koncentracija daugiausia priklauso nuo augalo rūšies, kultivuojamo audinio ar organo ir eksperimento tikslo. Šios cheminės medžiagos skirstomos į dvi kategorijas: natūralius ir sintetinius augalų augimo reguliatorius. Natūralūs augalų augimo reguliatoriai – augalų hormonai (fitohormonai), kuriuos augalai natūraliai sintetina augalų medžiagų apykaitos procesų metu [25]. Dažniausiai augaluose aptinkami fitohormonai: auksinai, citokininai, giberelinai, etilenas, abscizo rūgštis. Sintetiniai augalų augimo reguliatoriai yra žmonių dirbtinai sintezuojamos cheminės medžiagos, reguliuojančios augalų augimą ir vystymąsi. Augalų augimo reguliatoriai imituoja natūralių augalų fitohormonų funkciją ir mažomis koncentracijomis reguliuoja augalų augimą, vystymąsi, organogenezę ir atsaką į stresą [21].

1.4.2. Elicitoriai

Veiksmingi metodai, skirti augalų antrinių metabolitų biotechnologinei gamybos sustiprinimui – elicitorių panaudojimas. Šios medžiagos inicijuodamos abiotinį stresą tam, kad būtų apsaugotos augalų ląstelės, augaluose suaktyvina antrinį metabolizmo kelią. Elicitorius gali būti apibrėžiamas kaip cheminis arba biocheminis junginys, kuris mažomis koncentracijomis įvedamas į gyvą sistemą tam, kad būtų skatinama tikslinio bioaktyvaus junginio biosintezė [27]. Pagal prigimtį elicitoriai gali būti suskirstyti į dvi grupes: abiotinius ir biotinius (žr. 1.2 pav.). Abiotiniai elicitoriai – nebiologinės kilmės medžiagos, biotiniai elicitoriai – tai biologinės kilmės medžiagos, į kurias įeina polisacharidai, esantys augalų ląstelių sienelėse (pvz., chitinas, pektinas ir celiuliozė) ir mikroorganizmai [28]. Saikingas bei tikslingas abiotinių ir biotinių elicitorių naudojimas skatina bioaktyvių medžiagų sintezę augaluose, tačiau priešingu atveju, šiems veiksniams viršijus tam tikrą ribą, antrinių metabolitų sintezė sustoja, augalas nebesivysto ir miršta.



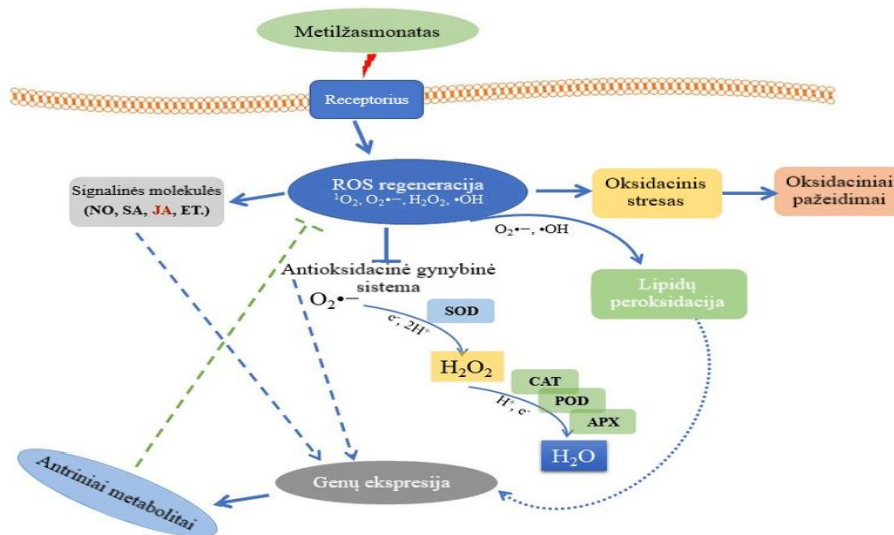
1.2 pav. Elicitorių skirstymas [28]

Nanodalelės (ND) – stiprūs cheminiai elicitoriai. Metalų ND, taip pat ir ZnO-ND dėl didelio elektronų mobilumo, didelio paviršiaus ploto ir katalizinio aktyvumo turi teigiamą poveikį augalų augimui, ląstelių dalijimuisi, membranos struktūrai bei funkcijai [29]. Dauguma naujausių tyrimų yra skirti ND poveikiui augalų sėklų daigumui, augalų augimo greičiui, fiziologiniams atsakams. 2021 m. S. Awan atliktame tyrime [30] nustatyta, kad brokolių sėklas apdorojus ZnO-ND, sėklų daigumas padidėjo 37,5 %, šaknų ilgis – 56,6 %, ūglių ilgis – 16,6 %, sodinukų svoris – 41 %, lapų skaičius – 11,5 %, augalo aukštis – 17,1 %, lapų plotas – 24,4%. Taip pat pastebėta, kad chlorofilo *a* ir *b*, fenolinių junginių, prolino koncentracija brokolyje padidėjo atitinkamai 50 %, 67,4 % ir 14,6 %. Tačiau, metalų ND vaidmuo antriniame augalų metabolizme, ypač kaliaus kultūrose, vis dar neaiškus [32]. Mokslinėje literatūroje teigiama, kad metalų ND įtraukimas į kaliaus kultūrų mitybinę terpę gali padidinti morfogenetinį eksplantų potencialą, somakloninę variaciją, antioksidacinį aktyvumą ir pakeisti bioaktyvių junginių koncentraciją augaluose [30, 31, 32].

Aminorūgštis metioninas gali būti panaudojamas, kaip biosintetinis pirmtakas, siekiant padidinti gliukozinolatų koncentraciją kryžmažiedžiuose augaluose. Alifatiniai gliukozinolatai, tokie kaip gliukorafaninas ir gliukoiberinas, sintetinami iš aminorūgščių, daugiausia metionino. Gliukozinolatų biosintezėje metioninas yra transaminuojamas į atitinkamas α -keto rūgštis, susidariusios aminorūgšties šoninė grandinė pailgėja, o po to susidaro pagrindinė gliukozinolato struktūra, tarpininkaujant citochromo P₄₅₀ monoooksigenazei [33, 34]. 2014 m. N. Baenas atliktame tyrime nustatyta, kad elicitavimas metioninu, padidino bendrą gliukozinolatų koncentraciją brokolių ir rūtų daiguose atitinkamai 19 % ir 85 %, kininių ridikėlių daiguose bendra gliukozinolatų koncentracija išliko nepakitusi, o ropių ir raudonųjų ridikų daiguose bendra gliukozinolatų koncentracija sumažėjo [33]. Mokslinėje literatūroje yra nedaug pranešimų apie metionino, kaip elicitoriaus poveikį, tačiau remiantis nagrinėtais straipsniais, galima daryti išvadą, kad mažos metionino koncentracijos, pavyzdžiui, 5 ir 10 mM, kurias taikė S. Pérez-Balibrea ir kt. [34], gali padidinti bendrą gliukozinolatų koncentraciją tiriamuosiuose augaluose (23 % ir 21 % atitinkamai) labiau nei didesnės koncentracijos, pavyzdžiui, 200 mM, kurias taikė E. Scheuner ir kt. [35].

Fitochemikalų sintezės skatinimui augaluose gali būti pasirenkami salicilo rūgšties ar metilžasmonato elicitoriai. Cheminio elicitoriaus metilžasmonato veikimo principas pateiktas 1.3 pav. Pirmajame žingsnyje elicitoriai atpažįstami specifiniais, plazminėje membranoje lokalizuotais, receptoriais, kurie inicijuoja signalizacijos procesus, aktyvinančius augalų apsaugos mechanizmą. Mokslinėje literatūroje teigiama, kad elicitorių prisijungimas prie receptorių sukelia su patogenezė susijusių baltymų indukciją ir reaktyvių deguonies formų (ROS) susidarymą, oksidacinio streso apsaugos

fermentų gamybą, su gynyba susijusių genų aktyvavimą. Signalo perdavimo proceso metu vyksta baltymų fosforilimas, lipidų oksidacija, antioksidacinių fermentų aktyvumo padidėjimas (superoksido dismutazės, gvajakolio peroksidazės, askorbato peroksidazės, katalazės), transkripcijos faktorių aktyvinimas ir *de novo* biosintezė bei vėlesnė antrinių metabolitų biosintezės genų ekspresija [28, 36].



1.3 pav. Cheminio elicitoriaus – metilžasmonato veikimo principas [36]

T. Ho ir kt. 2020 m. pranešė, kad užauginus augalą mitybinėje terpėje, kuri buvo papildyta cheminiu metilžasmonato elicitoriumi, o vėliau sukėlus papildomą oksidacinį stresą rapsuose, patirtas streso lygis palaipsniui buvo sumažintas iki minimumo, įvertinus ROS sintezės lygį rapsų lapuose [36]. Šis tyrimas įrodo, kad cheminiai elicitoriai, vaidina veiksmingą vaidmenį signalinių molekulių sintezėje, pastarosios reguliuodamos daugybę transkripcijos būdų, kurie atitinkamai susiję su oksidacinio streso atsakais, padidina svarbių antioksidantų sintezės aktyvumą ir genų ekspresiją [28, 36].

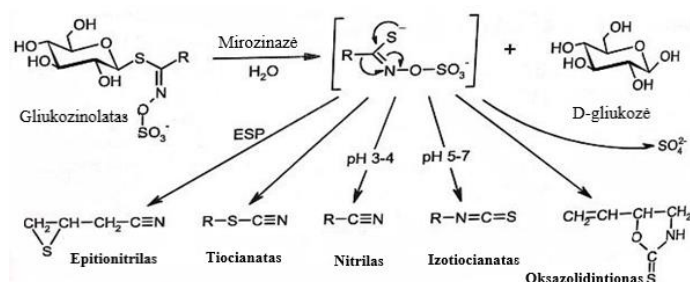
1.5. Kryžmažiedžių augalų antriniai metabolitai

Kryžmažiedžiai augalai itin vertinami dėl augalų ir žmogų apsaugančių antioksidacinių ir priešvėžinių savybių [37]. Kryžmažiedžiai augalai daugiausiai žinomi, kaip pagrindinis svarbių bioaktyvių junginių – gliukozinolatų, kurie pasižymi įvairiomis, sveikatai naudingomis savybėmis, šaltinis. Šių bioaktyvių junginių galima aptikti beveik kiekviename *Cruciferae* šeimos naryje [1, 2, 37].

1.5.1. Gliukozinolatai

Gliukozinolatai – labai svarbūs antriniai metabolitai, kuriuos kaupia dauguma kryžmažiedžių augalų [1]. Dažniausiai aptinkamų *Brassicaceae* daržovėse gliukozinolatų pavadinimai ir jų molekulinės formulės pateikti 1.1 lentelėje. Jie pasižymi įvairiais poveikiais: antimikrobinu, antifungiciniu, antibakteriniu ir tiroidiniu [37]. Jų struktūra yra sudaryta iš β -D-tiogliukozės grupės, susijungusios su sulfoninta okso dalimi ir kintančios šoninės grandinės, kurią sudaro aminorūgštys. Pagal šoninės grandinės sandarą gliukozinolatai skirstomi į: alifatinus (dažniausiai šoninė grandinė yra gaunama iš metionino, izoleucino, leucino ar valino), aromatinius (iš fenilalanino ar tirozino) arba indolinius (iš triptofano). Alifatiniai gliukozinolatai dažniausiai aptinkami beveik visose kryžmažiedžių augalų sėklose ir *B. oleraceae*, *B. napus*, *B. rapa* ir *R. sativus* daiguose [38].

Gliukozinolatai dar vadinami natūraliais pesticidais, nes gali sukelti toksinų išsiskyrimą ir repelentinius efektus, taip padidindami atsparumą kenkėjams, parazitams bei plėšrūnams. Kai augalas yra pažeidžiamas, aktyvuojasi augalo apsaugos sistema – fermentas mirozinazė arba tiogliukozidazė, kuri hidrolizuoja augalo sintetinius ir kaupiamus gliukozinolatus (žr. 1.4 pav.) [37, 38].



1.4 pav. Fermentinis gliukozinolatu skaidymas [39]

Agliukonas, susidaręs fermentinės reakcijos metu, spontaniškai atpalaiduoja sulfato fragmentą ir persitvarko sudarydamas tiocianatą, izotiocianatą, nitrilą, epitionitrilą arba oksazolidintioną, priklausomai nuo reakcijos sąlygų ir gliukozinolato pobūdžio. Alifatiniai gliukozinolatai paprastai hidrolizuojami iki izotiocianatų, esant neutraliam pH [39]. Izotiocianatai, susidarę iš indolinių gliukozinolatu, yra nestabilūs ir suskyla į 3-karbinolio ir tiocianato jonus. Izotiocianatai žinomi kaip stiprūs II fazės fermentų induktoriai, kurie yra svarbūs elektrofilų detoksikacijai ir apsaugai vėžio bei nuo oksidacinio streso [37, 38].

1.1 lentelė. Dažniausiai aptinkami gliukozinolatai *Brassicaceae* daržovėse [39].

Bendrinis junginio pavadinimas	Molekulinė formulė
Alifatiniai gliukozinolatai	
<u>Šoninė grandinė turinti 3 anglies atomus:</u>	
Gliukoiberverinas	C ₁₁ H ₂₀ NO ₉ S ₃ ⁻
Gliukoiberinas	C ₁₁ H ₂₀ NO ₁₀ S ₃ ⁻
Sinigrinas	C ₁₀ H ₁₆ KNO ₉ S ₂
<u>Šoninė grandinė turinti 4 anglies atomus:</u>	
Gliukoerucinas	C ₁₂ H ₂₃ NO ₉ S ₃
Gliukorafaninas	C ₁₂ H ₂₃ NO ₁₀ S ₃
Gliukorafeninas	C ₁₂ H ₂₁ NO ₁₀ S ₃
Gliukonapinas	C ₁₁ H ₁₉ NO ₉ S ₂
Progoitrinas	C ₁₁ H ₁₉ NO ₁₀ S ₂
<u>Šoninė grandinė turinti 5 anglies atomus:</u>	
Gliukobreteroinas	C ₁₃ H ₂₅ NO ₉ S ₃
Gliukobrasikanapinas	C ₁₂ H ₂₁ NO ₉ S ₂
Gliukonapoleiferinas	C ₁₂ H ₂₁ NO ₁₀ S ₂
Aromatiniai gliukozinolatai	
Gliukonasturinas	C ₁₅ H ₂₁ NO ₉ S ₂
Indoliniai gliukozinolatai	
Gliukobrasicinas	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₉ S ₂
4-hidroksigliukobrasicinas	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₁₀ S ₂
4-metoksigliukobrasicinas	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₁₀ S ₂
Neogliukobrasicinas	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₁₀ S ₂

Brokoliuose daugiausia aptinkami gliukozinolatai – gliukorafaninas, gliukoiberinas, gliukoerucinas, progoitrinas, gliukonapinas, gliukobrasicinas, o rapsų – gliukonapinas, gliukobrasikanapinas, progoitrinas, gliukonapoliferinas, gliukobrasicinas ir gliukonasturtinas [8]. Šių junginių buvimas rapsų žaliavoje, buvo patvirtintas 2021 m. A. V. Mikalavčiū ir bendraautorių atlikto tyrimo metu [39]. Tyrimo tikslas buvo nustatyti gliukozinolatų rūšis ir kiekius rapsų žaliavoje taikant didelio efektyvumo skysčių chromatografijos metodą [39]. Gliukozinolatų kiekis ir sudėtis skiriasi priklausomai nuo tiriamojo augalo, jo amžiaus, rūšies, augimo sąlygų [40]. Gliukozinolatų kiekio nustatymo tyrimas, atliktas 2020 m. A. Sharma atskleidė, jog pipirnių sėklose daugiausiai kaupiama gliukozinolato gliukotropaeolino ir 2-feniletilgliukozinolato. O ištyrus šviežią pipirinės augalą, nustatyta, jog daugiausia vyrauja 2-etilbutilgliukozinolatas, butilgliukozinolatas ir gliukotropaeolinas. Taigi kaupiamų gliukozinolatų kiekis ir jų tipas priklauso nuo tiriamo augalo rūšies ir tiriamos dalies [40].

Kai kurie gliukozinolatai gali turėti įtakos augalų antioksidacinėms savybėms [41]. 2020 m. T. N. Lu ir bendraautoriai pranešė [41], kad gliukorafasatinas, kuris yra pagrindinis ridikėlių daigų gliukozinolatas, gliukoerucinas ir 4-metoksigliukobrasicinas pasižymėjo antioksidaciniu aktyvumu, skaidant hidroperoksidą ir vandenilio peroksidą. Taip pat, nustatyta, kad šeši gliukozinolatai (gliukoiberinas, sinigrinas, gliukorafaninas, gliukonapinas, gliukobrasicinas ir indolo gliukozinolatas) turėjo teigiamą koreliaciją su antioksidaciniu pajėgumu kryžmažiedžiuose augaluose. Koreliacijos procentas tarp gliukobrasicino kiekio ir antioksidacinio aktyvumo viršijo 60 %. Rezultatai parodė, kad šių rūšių gliukozinolatai, ypač gliukobrasicinas, yra susiję su augalų antioksidacine veikla [41].

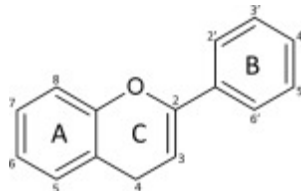
Šiose kryžmažiedžių augalų daržovėse randamų gliukozinolatų tipui ir koncentracijai įtakos turi daugybė veiksnių, tokių kaip augalo genotipas, veislė, augimo sąlygos (pvz., temperatūra, maistinių medžiagų prieinamumas, vandens kiekis), augalo augimo stadija, analizuojamas augalo audinys, laikymo sąlygos ir paruošimo bei gaminimo būdai [38, 39, 41, 42]. Be to, vystymosi stadija ir specifinis augalo audinys taip pat turi įtakos gliukozinolatų koncentracijai [42].

1.5.2. Fenoliniai junginiai

Tarp fitocheminių medžiagų, turinčių antioksidacinį poveikį, fenoliniai junginiai yra viena iš svarbiausių grupių. Fenoliniai junginiai – bendras terminas, jungiantis daugiau nei 8000 junginių, plačiai paplitusių visoje augalų karalystėje. Jie pasiskirstę įvairiose augalo dalyse, tokiose, kaip vaisiai, sėklos, lapai, stiebai, šaknys. Šie junginiai pasižymi tuo, jog struktūroje turi bent vieną aromatinį žiedą su viena ar keliomis prijungtomis hidroksilo grupėmis [43]. Fenoliniai junginiai sintetunami augaluose kaip antriniai metabolitai per šikimo rūgštį. Fenilalanino amonio liažė (PAL) yra pagrindinis fermentas, katalizuojantis fenolių biosintezę iš aromatinės fenilalanino amino rūgšties. Fenolinius junginius galima klasifikuoti pagal anglies atomų skaičių ir išsidėstymą, į: flavonoidus ir ne flavonoidus, kurie dažniausiai randami konjuguoti su sacharidais ir organinėmis rūgštimis [44]. Fenoliniai junginiai pasižymi tokiomis savybėmis, kaip augalo struktūros palaikymu ir apsauga nuo biotinio ar abiotinio streso. Be to, fenoliniai junginiai, taip pat turi įtakos vaisių ir daržovių kokybės savybėms, tokioms kaip kartumas, spalva ir skonis [43, 44]. Plačiausiai paplitusi *Brassica* šeimos polifenolių grupė yra flavonoidai (daugiausia flavonoliai ir antocianinai) ir hidroksicinamono rūgštys [1, 8].

1.5.2.1. Flavonoidai

Flavonoidai yra polifenoliniai junginiai, susidedantys iš penkiolikos anglies atomų su dviem aromatiniais žiedais, sujungtais trijų anglies tilteliu. Jų struktūros pagrindas – fenilbenzopirano skeletas: du fenilo žiedai (A ir B), susijungę per heterociklinį pirano žiedą (žiedas C). Pagrindinis flavonoidų karkasas ir anglies atomų numeracija parodyta paveikslėlyje [44].



1.5 pav. Bendra flavonoidų struktūra [44]

Pagal pirano žiedo skirtumus flavonoidus galima suskirstyti į šešias grupes arba šeimas: flavonoliai, flavonai, flavan-3-oliai, antocianidinai, flavanonai, izoflavonai. Kiekvienoje šeimoje atskiri junginiai skiriasi savo hidroksilinimo bei žiedų A ir B metilinimo modeliu. Plačiausiai paplitę *Brassica* šeimos flavonoidai – flavonoliai ir antocianinai [43].

Flavonoliai yra flavonai, hidroksilinti ties C3 anglies atomu. Jie yra vieni iš geriausių antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčių flavonoidų. Manoma, kad ties C3 esantis OH padidina flavonoidų radikalo, susidarančio, kai junginys veikia kaip radikalų gaudytojas, stabilumą. Kryžmažiedžiuose augaluose, pagrindiniai flavonoliai yra kemferolis, kvercetas ir jų glikozidai. Jie taip pat dažnai randami acilinti skirtingomis hidroksicinamono rūgštimis [44].

Tai patvirtino, E. Koh ir bendraautoriai, kurie 2009 m. atliktame tyrime su 80 komercinių brokolių mėginių, aptiko didelius kiekius kvercetino ir kemferolio, šie svyravo atitinkamai 0,03-10,85 ir 0,24-13,20 mg/100 g šviežios masės, o bendras fenolinis aktyvumas svyravo nuo 48,15 iki 157,77 mg/100 g šviežios masės [45]. X. Wu ir bendraautoriai 2019 m. [46] taikydami ESC-MS būdą patvirtino 2009 m. atlikto E. Koh tyrimo rezultatus [45], nustatydami, jog brokolių žaliavoje iš tiesų gausu kvercetino ir kemferolio, be to, buvo nustatyti septyni kemferolio glikozidai ir vienas kvercetino glikozidas. 2021 m. Y. Duan atlikto tyrimo metu [47], buvo siekta įvertinti brokolių lapuose ir žieduose kaupiamus kemferolio ir kvercetino kiekius. Jų kiekis buvo įvertintas po rūgštinės glikozidų hidrolizės. Tyrimo metu buvo pastebėti dideli kemferolio ir kvercetino kiekio skirtumai. Nustatyta, jog brokolių lapai sukauptė daugiau kemferolio (274,3 μg/g šviežios masės) nei kvercetino (32,2 μg/g šviežios masės). Brokolių žiedynuose, kemferolio ir kvercetino kiekis buvo mažesnis nei lapuose [47]. Šie flavonoliai laikomi stipriais antioksidantais, nes apsaugo ląsteles nuo laisvųjų radikalų sukeltos žalos [48]. Pasinaudojus ESC-DAD metodu pipirnės sėklose buvo nustatyti 1,82 mg/g kemferolio bei 2,81 mg/g kvercetino (flavonoliai) [49]. Daugelis atliktų mokslinių tyrimų patvirtina, kad flavonoliai apsaugo nuo vėžio, diabeto, opų ir osteoporozės ir aterosklerozės, nes slopina mažo tankio lipoproteinų (MTL) oksidaciją [43, 44, 48].

Taip pat labai svarbi flavonoidų grupė – antocianidinai, kurie turi OH grupę prie C3 bei dvi dvigubas jungtis žiede C (žr. 1.5 pav.). Dėl šių struktūrinių savybių jie yra vieninteliai joniniai flavonoidai. Pagrindinis antocianidinų karkasas yra flavilio katijonas, suteikiantis šiems flavonoidams unikalių savybių: jie sudaro didžiausią ir bene svarbiausią vandenyje tirpių augalinių pigmentų grupę [43]. Jie susiję su augalų apsauga nuo UV spinduliuotės, taip pat atlieka svarbų vaidmenį pritraukiant apdulkinančius vabzdžius. Antocianinų cheminė struktūra lemia stabilumą, spalvos intensyvumą ir

galimą biologinį aktyvumą [43]. Labiausiai kryžmažiedžiuose augaluose paplitęs antocianinas – cianidinas [8].

1.5.2.2. Fenolinės rūgštys

Neflavonoidų grupei priklauso fenoliniai junginiai su labai įvairia chemine struktūra, dauguma jų yra mažesni ir paprastesni už flavonoidus. Svarbiausia neflavonoidų grupė – fenolinės rūgštys, kuriose yra viena fenilo grupė, pakeista viena karboksilo grupe ir viena ar daugiau OH grupių. Fenolinės rūgštys gali būti toliau skirstomos į hidroksibenzenkarboksirūgštis, hidroksicinamono rūgštis ir kitas hidroksifenilo rūgštis (acto, propano ir kt. rūgštis), kurios skiriasi grandinės, kurioje yra karboksilo grupė, ilgiu. Hidroksibenzenkarboksirūgštys retai aptinkamos laisvos formos, jos dažniausiai randamos glikozilintos, susietos su mažomis organinėmis rūgštimis (chino, maleino ar vyno rūgštimis) arba surištos su augalų ląstelių struktūriniais komponentais (celiulioze, baltymais ar ligninu). Kiti įprasti hidroksibenzenkarboksirūgšties dariniai yra hidroksibenzenkarboksirūgšties aldehydai, tokie kaip vanilinas (gaunamas iš vanilo rūgšties). Hidroksicinamono rūgštys turi C6-C3 (fenilpropano) bazinį skeletą [42, 43, 44].

Pagrindinės *Brassica* daržovių hidroksicinamono rūgštys yra (*p*)-kumaro rūgštis, kavos rūgštis bei metilintos jų formos – ferulo ir sinapo rūgštys. Tačiau, kaip ir kitos fenolinės rūgštys, hidroksicinamono rūgštys yra susietos su kitomis molekulėmis. Augaliniame maiste gausiausias hidroksicinamono rūgšties darinys – kavos ir chino rūgščių esteris, pavadintas chlorogenine rūgštimi (5-kofoeilchinino rūgštis). Yra žinoma, kad žeminių rapsų veislių (lot. *Brassica napus* var. *oleifera*) sėklose gausiausiai aptinkami fenoliniai junginiai – sinapo rūgšties dariniai, (*p*)-hidroksibenzenkarboksirūgštis, vanilo, protokatecho, siringo, (*p*)-kumaro, ferulo, kavos ir chlorogeno rūgštys [6, 20]. 2018 m. S. Naz ir kolegų atliktame tyrime rapsų lapuose buvo nustatytos keturios hidroksicinamono rūgštys (kavos, (*p*)-kumaro, ferulo ir sinapo rūgštis) [21]. 2021 m. atlikto tyrimo metu taikant LC/MS analizę, buvo tiriami pipirnės kaliaus kultūrų etanoliniai ekstraktai [50]. LC/MS analizė parodė, kad pipirnės lapų kaliaus kultūrų (augintų MS terpėje papildytoje 1 mg/ml 2,4-D augimo reguliatoriumi) ekstraktuose gausu sinapo rūgšties, chlorogeno rūgšties ir (*p*)-kumaro rūgšties [50].

1.6. Antrinių metabolitų vaidmuo

Ankstesniame skyriuje išvardinti ir kiti, augaluose sintetinami antriniai metabolitai, atlieka labai svarbų vaidmenį. Augaluose ROS susidaro augalą veikiant biotiniams ir abiotiniams veiksniams, kurie sutrikdo ląstelėje vykstančius metabolizmo procesus ir sukelia oksidacinį ląstelės stresą [43]. Medžiagos, mažinančios biologinių molekulių oksidacines pažaidas, vadinamos antioksidantais. Antioksidantai ląstelėje sudaro sudėtingą antioksidacinę sistemą, kurios pagrindinis tikslas – užtikrinti laisvųjų radikalų modifikaciją, surišimą, slopinimą arba suardymą. Laisvieji radikalai yra žalingi tiek augalams, tiek ir žmogaus organizmui. Kai antioksidacinė sistema išsibalansuoja, ROS sukeltos grandininės reakcijos sutrikdo organizmo ir ląstelių veiklą, dėl ko atsiranda įvairūs susirgimai [43, 44, 45].

Antioksidacinę ląstelės apsaugą sudaro [43]:

- antioksidaciniai fermentai (superoksido dismutazė, katalazė, glutationo peroksidazė);
- mažos molekulinės masės junginiai, prijungiantys laisvuosius radikalus.

Mažos molekulinės masės junginiai (redukuotas glutationas, α -tokoferolis, karotenoidai, fenolinės rūgštys, flavonoidai, taninai ir kt.) ne tik apsaugo skirtingus ląstelės komponentus nuo oksidacinių pažeidimų, bet taip pat atlieka svarbų vaidmenį augalų augime ir vystymesi, reguliuodami ląstelių procesus, tokius kaip mitozė, ląstelių pailgėjimas, senėjimas ir ląstelių mirtis. Antioksidantų gausu vaisiuose ir daržovėse [1, 44].

1.7. Brokolių augalinės žaliavos panaudojimas

Brokoliai yra itin svarbus gliukozinolatų šaltinis, tačiau šie augalai svarbūs ir ekonomine prasme. Pasaulyje kasmet užauginama daugiau nei 21 milijonas tonų brokolių [2]. Tačiau bloga derliaus nuėmimo praktika sukelia augalinio maisto vizualinės kokybės suprastėjimą, todėl jie tampa netinkamais vartoti. Apskaičiuota, kad iki 35 % išaugintos kultūros prarandama dėl netinkamos derliaus nuėmimo praktikos. Tačiau susidariusios atliekos – geras bioaktyvių junginių šaltinis, kurie gali būti išskiriami, gryninami ir panaudojami įvairiose pramonės šakose. Labai svarbu, atrasti alternatyvą, kaip panaudoti nebetinkamą vartojimui derlių ir kompensuoti patirtus didelius ekonominius nuostolius [51, 52]. Brokoliai dėl dideliais kiekiais sintetinamų ir kaupiamų gliukozinolatų gali būti panaudojami maisto papildų gamybai.

Magistro projekte rekomendacijų dalyje pateikta siūloma principinė aparatūrinė schema, kaip gliukozinolatus išskirti iš brokolių kaliaus kultūrų *in vitro*, maisto papildų gamybai (žr. 4 skyrių).

Mokslinėje literatūroje aprašyti brokolių ekstraktų gavimo metodai, apima sudėtingų ekstrahavimo tirpiklių sistemų panaudojimą [53, 54]. Pavyzdžiui, gliukozinolatų išskyrimui ir jų gryninimui J. Fahey ir bendraautoriai [54] panaudojo priešpriešinių srovių chromatografija, kurioje eluentu pasirinktas labai polinis 1-propanolio-acetonitrilo-amonio sulfato vandens mišinys (santykiu 1:0,5:1,2:1). Autoriai nurodė >95%, gliukozinolatų iš brokolių žaliavos, ekstrakto grynumą [54].

Nors brokoliai, neatitinkantys kokybės standartų – vertingas gliukozinolatų šaltinis, vis dar vykdomi įvairūs tyrimai siekiant išsiaiškinti, kaip galima padidinti šių bioaktyvių medžiagų koncentraciją augalinėje žaliavoje. Moksliniai tyrimai atskleidžia, kad brokoliai patyrę abiotinį stresą gali kaupti didesnius fitocheminių medžiagų kiekius [36]. 2016 m. D. Villarreal-García ir bendraautoriai pranešė apie intensyvų gliukozinolatų kaupimąsi apdorojus sveikus ir pažeistus brokolių mėginius elicitoriais (etilenu ir metilžasmonatu) [51]. Taigi, buvo nustatyta, kad iš abiotinio streso paveiktų brokolio audinių atlikus efektyvias išskyrimo ir gryninimo procedūras, galima išgauti didesnius gliukozinolatų kiekius [51, 53].

1.8. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Kryžmažiedžiai augalai yra ne tik puikus maisto medžiagų, bet ir fitocheminių junginių šaltinis. Brokoliuose (lot. *Brassica oleracea* var. *Italica*), rapsuose (lot. *Brassica napus* L.) ir pipirnėje (lot. *Lepidium sativum* L.) kaupiami bioaktyvūs junginiai ne tik prisideda prie augalo apsaugos sistemos, padėdami prisitaikyti prie kintančių nepalankių aplinkos sąlygų ar apsaugodami augalą nuo kenkėjų, patogenų ir kt., bet ir suteikia naudą žmogui ir jo sveikatai. Kryžmažiedžiuose kaupiami fitocheminiai junginiai plačiai naudojami įvairiose pramonės srityse: vaistų, dažiklių, maisto papildų, biopesticidų, kosmetikos, agrochemijos produktų gamyboje.

Fitocheminiai junginiai pramoniniam naudojimui dažnai išgaunami iš natūraliomis sąlygomis augančių augalų, dėl ko susiduriama su tam tikromis problemomis. Natūralioje aplinkoje augantys augalai pasižymi lėtu augimu, lėtesne fitocheminių junginių biosinteze, augdami jie susiduria su nepalankiomis aplinkos sąlygomis, dėl ko gali kisti šių bioaktyvių junginių kiekis augalinėje žaliavoje. Taip pat susiduriama su ribotu fitocheminių junginių prieinamumu ir sudėtinga šių cheminių junginių sinteze.

Magistro baigiamajame darbe fitocheminių junginių *panaudojimui* siūloma pritaikyti biotechnologines strategijas: suformuoti kaliaus kultūras *in vitro* bei praturtinti šias kultūras didesnės pridėtinės vertės bioaktyviais junginiais pritaikius elicitavimo procedūrą. Tyrimo tikslas buvo įvertinti pasirinktų elicitorių poveikį brokolių, rapsų, pipirnių kaliaus kultūrų *in vitro* antioksidaciniam ir fitocheminiam aktyvumui ir palyginti su tiriamųjų augalų *in vivo* kultūromis. Šiam tikslui pasiekti tiriamųjų augalų kaliaus kultūros buvo kultivuojamos maitinamojoje terpėje papildytoje augimo reguliatoriais bei 25 ir 50 $\mu\text{mol/l}$ salicilo rūgšties ir metilžasmonato elicitoriais.

Taigi, šiuolaikinėje visuomenėje sparčiai augant natūralių fitocheminių junginių paklausai reikalinga technologija užtikrinanti pastovią ir didelę sukauptų antrinių metabolitų koncentraciją tiksliniuose augaluose ar jų kultūrose.

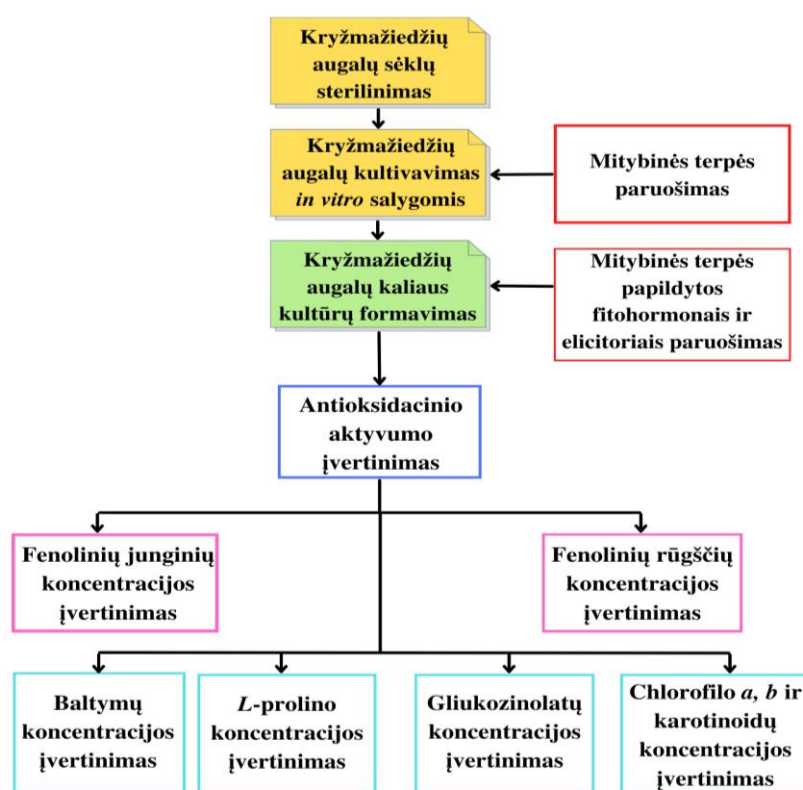
2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Tyrimų objektas

Apžvelgus mokslinę literatūrą, kaip tiriamieji objektai buvo pasirinkti kryžmažiedžių (lot. *Cruciferae*) šeimos augalai. Tyrime naudotos brokolio (lot. *Brassica oleracea* var. *Italica*), rapsų (lot. *Brassica napus* L.) ir pipirnės (lot. *Lepidium sativum* L.) komercinės sėklos, siekiant įvertinti šių augalų fitocheminį, antoksidacinį ir antibakterinį aktyvumą. Tiriamasis mokslinis darbas buvo atliktas Kauno technologijos universiteto, Cheminės technologijos fakulteto, Biotechnologijos laboratorijoje.

2.2. Tyrimų eiga

Rengiant tiriamąjį projektą, išsikeltas tikslas ir uždaviniai buvo įgyvendinami pagal žemiau pateiktą schemą:



2.1 pav. Tiriamojo projekto tyrimų atlikimo schema

2.3. Tyrimų metu naudota įranga

Tyrimuose naudotos įrangos sąrašas:

1. Autoklavas „CertoClav“;
2. Centrifuga „Universal 320R“, HETTICH;
3. Mikrocentrifuga „D-6015 Mini Centrifuge“, neoLab;
4. Laminaras „BV-100 Laminar Flow Cabinet“, Telstar;
5. pH-metras, „WinLab“
6. Spektrofotometras „UV-1280 UV-VIS Spectrophotometer“, Shimadzu;
7. Svarstyklės, „ATX84“, Shimadzu;

8. Kratytuvas „ZX3“, VELP Scientific;
9. Distiliatorius „Elix Type 2 Water Purification Systems“, Merc;
10. Termostatas „Binder“;
11. Termostatas „Mettler IN55“;
12. Termostatuojama vandens vonelė ULTRATHERM „BWT-U“, Biosan;
13. Termostatuojamas kratytuvas *Environmental Shaker-Incubator* „ES – 20“, Biosan.

2.4. Tyrimų metu naudoti reagentai

Tyrimuose naudotų reagentų sąrašas:

1. C₂H₅OH (70 %);
2. NaOH (0,1 M);
3. Fosfatinis buferis (0,2 M; pH=6,6);
4. K₃[Fe(CN)₆] (1 %);
5. Trichloracto rūgštis (10 %);
6. FeCl₃ (0,1 %);
7. DPPH;
8. ABTS· (2 mM);
9. K₂S₂O₈ (0,17 mM);
10. Fosfatinis buferis (20 mM; pH=7,4);
11. Acetatinis buferis (300 mM; pH=3,6);
12. TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinas) (10 mM);
13. HCl (40 mmol/l);
14. FeCl₃·6H₂O (20 mmol/l);
15. DTT (ditiotreitolis) (1 mM);
16. Fenilmetilsulfonilfluoridas (0,5 mM);
17. DMSO (dimetilsulfoksidas);
18. Polivinilpirolidonas;
19. Bradfordo reagentas;
20. Tris-HCl buferis (200 mM, pH=7,8);
21. L-metioninas (100 mM);
22. Nitromėlynasis tetrazolis (540 μM);
23. Tritonas X-100 (0,1 %);
24. Riboflavinas (300 μM);
25. Tanino rūgšties tirpalas (0,25 mg/ml);
26. Na₂CO₃ (7,5 %);
27. Folin-Ciocalteu'o reagentas;
28. Acetonas (70 %);
29. Kvercetas (1 mg/ml);
30. C₂H₅OH (80 %);
31. AlCl₃ (2 %);
32. CH₃OH.

2.5. Sėklų sterilinimas

Rapsų (lot. *Brassica napus* L.) sėklos sterilintos, laminaro sąlygomis, mirkant sėklas 3 min 70 % C₂H₅OH tirpale. C₂H₅OH tirpalą nupylus, sėklos toliau sterilintos 10 % NaClO tirpalu – 10 min. Po sterilinimo, sėklos 3 kartus plautos steriliu distiliuotu vandeniu.

Brokolių (lot. *Brassica oleracea* var. *Italica*) sėklos sterilintos 70 % C₂H₅OH – 90 s, 0,1 % HgCl₂ – 12 min ir 3 kartus plautos steriliu distiliuotu vandeniu.

Pipirnės (lot. *Lepidium sativum* L.) sėklos sterilintos 70 % C₂H₅OH – 90 s, 0,1 % HgCl₂ – 10 min. Atlikus sterilinimą, sėklos 3 kartus plautos steriliu distiliuotu vandeniu.

Sėklos buvo sodinamos į *Petri* lėkšteles steriliomis sąlygomis (laminare). Laminaras sterilintas ultravioletiniais spinduliais bei etanolu (70 %).

2.6. Augalų ląstelių maitinamosios terpės paruošimas ir kultivavimo sąlygos

Augalų ląstelių kultūros kultivavimui būtina užtikrinti optimalias sąlygas, t. y. optimali maitinamoji terpė bei optimali šviesa ir temperatūra.

Po atliktos literatūros analizės, kryžmažiedžių augalų sėklų kultivavimui buvo pasirinkta MS terpė, kurios sudėtis nurodoma 1 priede. Maitinamoji terpė buvo sudaryta iš makroelementų, mikroelementų, geležies šaltinio, organinių priedų ir anglies šaltinio. Ši terpė pasižymi aukšta nitrato, kalio ir amonio jonų koncentracija. 2.1. lentelėje nurodyti reagentai ir jų kiekis, kurie buvo naudojami MS terpės paruošimui.

Maitinamoji terpė buvo sterilizuota autoklave 120 °C temperatūroje 15 min, esant 0,75–1 atm. slėgiui. Eksperimento metu tiriamųjų augalų kultivavimas buvo vykdomas 20–22 °C temperatūroje, fotoperiodo trukmė – 24 val. Optimalus MS terpės pH 5,7–5,8, kuris buvo reguliuotas su 0,1 M NaOH ir 0,1 M H₂SO₄. Eksplantai reguliariai, kas mėnesį, buvo perkelti į šviežią maitinamąją terpę, siekiant užtikrinti pastovų maistinių medžiagų kiekį reikalingą augalams. Atsižvelgus į tiriamuosius augalus, tiriamųjų augalų kaliaus kultūrų terpė buvo papildyta skirtingų rūšių ir kiekių fitohormonais.

2.1 lentelė. MS terpės reagentų kiekis, paimamas iš pradinių tirpalų

Reagentai	Reagentų kiekiai, reikalingi 1 l terpės
Makroelementai	50 ml
Mikroelementai	5 ml
Fe-EDTA	5 ml
Organiniai priedai	5 ml
Sacharozė	30 g
Agaras	5 g

2.7. Augimo reguliatorių paruošimas

Mitybinės terpės papildymas augalų reguliatoriais, buvo vykdomas siekiant užtikrinti ir pagerinti augalų ląstelėse vykstančius procesus. Pradinis tiriamosios medžiagos (0,1 mg/ml) tirpalas buvo ruošiamas 100 ml kolboje, 2-5 ml distiliuoto vandens ištirpinus 10 mg tiriamojo junginio. Ištirpus tiriamajam junginiui, tirpalas buvo skiedžiamas iki 100 ml žymos. Reikalingas paimti tiriamųjų medžiagų tirpalo tūris apskaičiuotas pagal (2.1) formulę:

$$X = \frac{C_{galutinė} \cdot V}{C_{pradinė}} ; \quad (2.1)$$

X – reikalingas paimti tirpalo tūris iš pradinio paruošto tirpalo su tiriamąja medžiaga, ml;
 $C_{galutinė}$ – reikalinga gauti galutinė koncentracija, mg/l;
 V – praskiedimo tūris, l;
 $C_{pradinė}$ – pradinio tirpalo, paruošto su tiriamąja medžiaga, koncentracija, mg/ml.

Tyrimui buvo paruoštos 8 terpės, kurios tarpusavyje skyrėsi augimo hormonų sudėtimi bei koncentracija (žr. 2.2 lentelę). Jos buvo naudojamos tiriamųjų augalų kaliaus kultūrų *in vitro* kultivavimui.

2.2 lentelė. Tyrimui paruoštų terpių sudėtis

Terpės nr.	Terpės sudėtis
1 terpė	MS
2 terpė	MS + (2 mg/l) BAP + (0,2 mg/l) 2,4-D
3 terpė	MS + (2 mg/l) BAP + (0,2 mg/l) 2,4-D + (25 μmol/l) salicilo rūgšties
4 terpė	MS + (2 mg/l) BAP + (0,2 mg/l) 2,4-D + (50 μmol/l) salicilo rūgšties
5 terpė	MS + (2 mg/l) BAP + (0,2 mg/l) 2,4-D + (25 μmol/l) metilzasmonato
6 terpė	MS + (2 mg/l) BAP + (0,2 mg/l) 2,4-D + (50 μmol/l) metilzasmonato
7 terpė	MS + (10 mg/l) ZnO-ND
8 terpė	MS + (0,75 g/l) metionino

2.8. Kryžmažiedžių augalų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

2.8.1. Redukcinių savybių nustatymas

Ekstrakto paruošimas: pasveriami 0,1 g išdžiovintos augalinės medžiagos. Augalinė medžiaga ekstrahuojama 5 ml metanoliu 30 min termostatinėje vonelėje, 45 °C temperatūroje. Gautas ekstraktas buvo centrifuguojamas 9000 aps/min greičiu, 4 °C temperatūroje 5 min. Vėliau surenkamas gautas supernatantas ir naudojamas tyrimui.

Tiriamąjo tirpalo paruošimas: iš surinkto pradinio ekstrakto (20 mg/ml) supernatanto paruošti kelių koncentracijų (10, 5, 2,5 mg/ml) tirpalai, kurie buvo praskiesti metanoliu iki 0,5 ml.

Redukcinių savybių įvertinimas: į 0,5 ml skirtingų koncentracijų ekstraktų mėginius, buvo įpilta 1,25 ml (0,2 M; pH=6,6) fosfatinio buferio bei 1,25 ml $K_3[Fe(CN)_6]$. Tirpalai sumaišyti ir mišiniai inkubuoti vandens vonelėje 50 °C temperatūroje 20 min. Į pašildytus mėginius buvo pridėta 1,25 ml 10 % trichloracto rūgšties, mišiniai sumaišyti ir centrifuguoti 4 °C 10 min 9000 aps/min greičiu. Gautas supernatantas buvo sumaišytas su 1,25 ml distiliuotu vandeniu ir 0,25 ml 0,1 % $FeCl_3$.

Kontrolinio mėginio paruošimas: mėgintuvėlyje buvo sumaišyta 1 ml (0,2 M; pH=6,6) fosfatinio buferio ir 1 ml $K_3[Fe(CN)_6]$.

Paruoštų tirpalų šviesos sugertis buvo matuojama spektrofotometru 700 nm bangos ilgyje.

2.8.2. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu

Ekstrakto paruošimas: 0,1 g išdžiovintos, susmulkintos augalinės medžiagos buvo supiltas į 10 ml mėgintuvėlį. Augalinė medžiaga buvo užpilta 5 ml metanoliu ir termostatinėje vonelėje 45 °C

temperatūroje 30 min buvo vykdoma ekstrakcija. Gautas augalinis ekstraktas centrifuguotas 4 °C temperatūroje 10 min 9000 aps/min greičiu, o gautas supernatantas naudotas tyrimui.

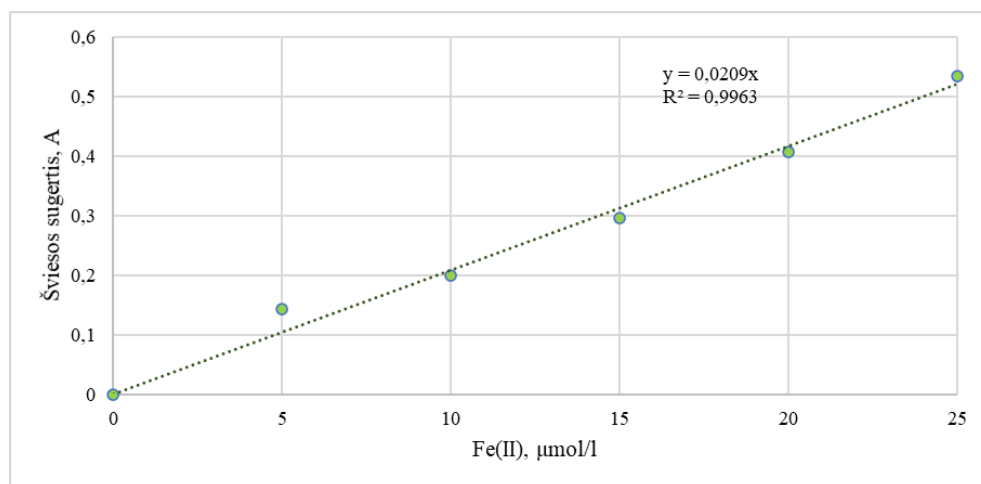
FRAP reagento paruošimas: į 30 ml mėgintuvėlį įpilama 20 ml (300 mM) acetatinio buferio, 3 ml (10 mM) TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazino) ir 3 ml (20 mmol/l) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Tiriamąjo tirpalo paruošimas: 20 μl pradinio ekstrakto buvo sumaišyta su 80 μl metanolio. Vėliau, tirpalai buvo sumaišyti su 3 ml FRAP reagento.

Kontrolinio tirpalo paruošimas: į 10 ml mėgintuvėlį buvo įpilta 100 μl metanolio ir 3 ml FRAP reagento.

Kalibravimo kreivė paruošimas: ruošti $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ skirtingų koncentracijų (5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{mol/l}$) tirpalai, kurie vėliau buvo sumaišyti su 3 ml FRAP reagentu ir praskiesti su distiliuotu vandeniu iki 10 ml.

Paruoštų tirpalų šviesos sugertis buvo išmatuota spektrofotometru. Kryžmažiedžių augalų antioksidacinio aktyvumo reikšmė apskaičiuojama pagal Fe(II) , $\mu\text{mol/l}$ kalibracinę kreivę.



2.2 pav. FeSO_4 kalibracinė kreivė

2.8.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu

Etaloninio DPPH tirpalo paruošimas: 0,0024 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo buvo ištirpinta metanolyje, tirpalas praskiestas metanolio iki 100 ml.

Ektrakto paruošimas: 0,2 išdžiovintos, susmulkintos augalinės medžiagos buvo suberta į 10 ml mėgintuvėlį. Augalinė žaliava buvo užpilta 2 ml metanolio ir homogenizuota 10 min. Homogenatas centrifuguotas 4 °C temperatūroje 9000 aps/min greičiu 10 min, o supernatantas surinktas ir naudotas tyrimui.

Tiriamąjo tirpalo paruošimas: į mėgintuvėlį įpilta 0,077 ml (100 mg/ml) paruošto ekstrakto ir 3 ml etaloninio DPPH tirpalo.

Palyginamojo tirpalo ruošimas: į mėgintuvėlį įpilta 0,077 ml metanolio ir 3 ml etaloninio DPPH

Tiriamąjo bei palyginamojo mėginių tirpalai buvo sumaišyti ir laikyti tamsoje 15 min. Vėliau buvo išmatuota paruoštų reakcijos mišinių šviesos sugertis spektrofotometru 515 nm bangos ilgyje.

Kryžmažiedžių augalų antioksidacinės savybės buvo apskaičiuotos pagal (2.2) formulę:

$$\text{DPPH radikalo slopinimas (\%)} = \frac{A_{\text{palyginamasis}} - A_{\text{tiriamasis}}}{A_{\text{palyginamasis}}} \cdot 100 \% ; \quad (2.2)$$

$A_{\text{tiriamasis}}$ – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis;

$A_{\text{palyginamasis}}$ – palyginamojo tirpalo šviesos sugertis.

2.8.4. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu

ABTS radikalo tirpalo paruošimas: 10 mg (2 mM) ABTS buvo ištirpintas 10 ml (20 mM; pH=7,4) fosfatinio buferio, kuris buvo paruoštas su (0,17 mM) $K_2S_2O_8$. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimui paruoštas pradinis ABTS tirpalas buvo skiedžiamas (20 mM; pH=7,4) fosfatinio buferiu, kad tirpalo šviesos sugertis būtų lygi $A=0,9$.

Ekstrakto paruošimas: 0,1 g išdžiovintos augalinės medžiagos buvo sumaišyta su 5 ml metanolio. Ekstrakcija buvo vykdyta termostatinėje vonelėje 45 °C temperatūroje 30 min. Ekstraktas centrifuguotas 4 °C temperatūroje 9000 aps/min greičiu 10 min. Gautas supernatantas surinktas ir naudotas tyrimui. Į 0,5 ml ekstraktą buvo įpilta 1,7 ml fosfato buferio (20 mM) ir 0,3 ml praskiesto ABTS tirpalo. Kaip kontrolinis mėginys buvo naudotas (20 mM; pH=7,4) fosfatinis buferis, o kaip palyginamasis – praskiestas ABTS tirpalas.

Paruoštų tirpalų šviesos sugertis buvo matuota 734 nm bangos ilgyje. Pagal (2.3) formulę apskaičiuojamas ABTS radikalo slopinimas (%):

$$\text{ABTS slopinimas (\%)} = \frac{A_{\text{palyginamasis}} - A_{\text{tiriamasis}}}{A_{\text{palyginamasis}}} \cdot 100 \% ; \quad (2.3)$$

$A_{\text{tiriamasis}}$ – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis;

$A_{\text{palyginamasis}}$ – palyginamojo tirpalo šviesos sugertis.

2.8.5. Antioksidacinio fermento superoksido dismutazės (SOD) aktyvumo nustatymas

Ekstrakto paruošimas: 0,1 g susmulkintos augalinės žaliavos ir tirpių baltymų ekstrakcija buvo vykdyta 0,066 M K/Na fosfatiname buferyje (pH=7,4) 4 ml tūryje, turinčiame 1 mM ditionitretolio (DTT), 0,5 mM fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF), ištirpinto DMSO, 1 mg polivinilpirolidono. Mėginys maišytas kratytuve 10 min 25 °C temperatūroje. Vėliau, mėginys centrifuguotas 4 °C temperatūroje 9000 aps/min greičiu 10 min, o gautas supernatantas surinktas ir dar kartą centrifuguotas „Eppendorf“ mėgintuvėliuose.

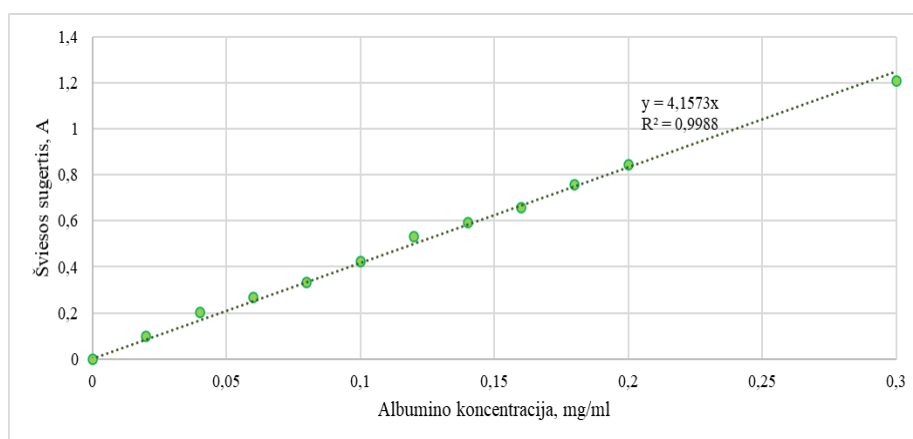
Baltymų koncentracijos nustatymo tiriamojo mėginio paruošimas: 200 μl mėginio (supernatanto) buvo sumaišyta su 2 ml Bradfordo reagento. Kaip kontrolinis mėginys, buvo naudotas 200 μl 0,066 M K/Na fosfatinio buferio (pH=7,4) ir 2 ml Bradfordo reagento mišinys. Tiriamojo mėginio šviesos sugertis buvo išmatuotas spektrofotometru 595 nm bangos ilgyje. Baltymų koncentracijos nustatymui tiriamojoje augalinėje žaliavoje buvo ruošiama baltymų kalibravimo kreivė pagal albuminą.

Kalibravimo kreivės sudarymas pagal albuminą: 25 mg albumino buvo ištirpinta 25 ml vandens. Iš pradinio tirpalo buvo imami žinomo tūrio mėginiai ir skiedžiami iki 10 ml distiliuotu vandeniu (žr. 2.3 lentelę).

2.3 lentelė. Kalibracinės kreivės sudarymui naudoti reagentai ir jų kiekiai

Mėgintuvėlio nr.	Pradinio albumino tirpalo tūris, ml	Distiliuoto vandens tūris, ml	Iki 10 ml skiesto tirpalo koncentracija, mg/ml
1	0,2	9,8	0,02
2	0,4	9,6	0,04
3	0,6	9,4	0,06
4	0,8	9,2	0,08
5	1,0	9,0	0,1
6	1,2	8,8	0,12
7	1,4	8,6	0,14
8	1,6	8,4	0,16
9	1,8	8,2	0,18

Kalibracinės kreivės sudarymui į kontrolinį mėgintuvėlį buvo įpilta 0,2 ml distiliuoto vandens. Vėliau į visus mėgintuvėlius buvo įpilta 2 ml Bradfordo reagento. Mėginiai sumaišyti ir išmatuota mėginių šviesos sugertis spektrofotometru 595 nm bangos ilgyje. Pagal gautus rezultatus buvo sudaryta kalibravimo kreivė (žr. 2.3 pav.).



2.3 pav. Kalibracinė kreivė pagal albuminą

SOD aktyvumo nustatymui tiriamojo tirpalo paruošimas: į 40 µl fermentinio preparato, buvo įpilta 400 µl 200 mM Tris-HCl buferio (pH=7,8), 200 µl 100 mM L-metionino, 200 µl 540 µM nitromėlynojo tetrazolio, 500 µl 0,1% Tritono X-100 ir 20 µl 300 µM riboflavino bei 620 µl distiliuoto vandens. Kontrolinis mėginys ruoštas, kaip ir tiriamasis, tik be fermentinio preparato. Vėliau tiriamasis ir kontrolinis tirpalai buvo apšviesti liuminescencinėmis lempomis 30 min. Po 30 min buvo išmatuota šių tirpalų šviesos sugertis 560 nm bangos ilgyje.

SOD aktyvumas (vnt./mg) apskaičiuojamas pagal (2.4) formulę:

$$A = \frac{\log \frac{E(k)}{E(t)}}{\log 2 \cdot m} ; \quad (2.4)$$

A – fermento aktyvumas (vnt./mg);

E_k – kontrolinio mėginio šviesos sugertis;

E_t – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis;

m – baltymų koncentracija iš kalibravimo kreivės (mg/ml).

2.9. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos nustatymas Folin-Ciocalteu metodu

Ekstrakto paruošimas: 0,05 g sausos, susmulkintos augalinės medžiagos buvo sumaišoma su 10 ml acetono (70 %) tirpalu. Ekstrakcija vykdyta termostatuojamame kratytuve 20 min 25 °C temperatūroje. Gautas ekstraktas centrifuguotas 4 °C temperatūroje 10 min 9000 aps/min greičiu. Supernatantas surinktas ir toliau naudotas tolimesniems tyrimams.

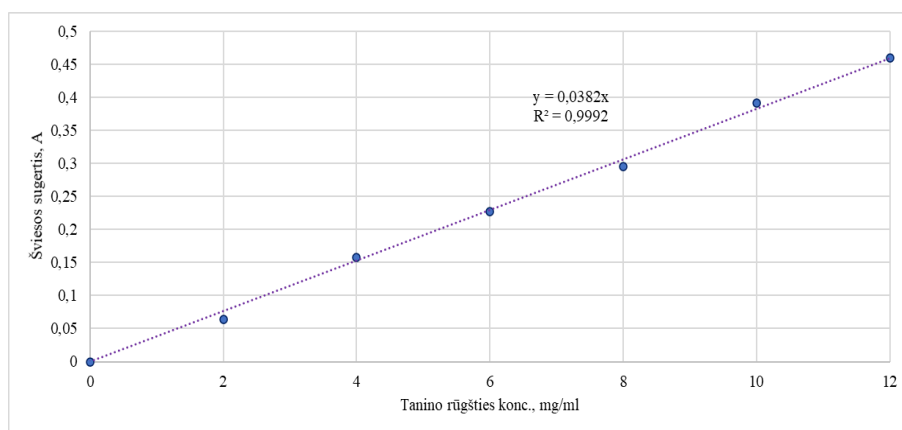
1 M Folin-Ciocalteu reagentas paruoštas: praskiedžiant komercinį reagentą (2 M) su distiliuotu vandeniu santykiu 1:1. Praskiestas tirpalas laikytas kolboje apsaugant nuo šviesos.

Tiriamąjo tirpalo paruošimas: 50 µl paruošto ekstrakto praskiesta distiliuotu vandeniu iki 500 µl. Tuomet įpilta 250 µl 1 M Folin-Ciocalteu reagento ir 1,25 ml 7,5 % Na₂CO₃ tirpalo. Tirpalas sumaišytas kratytuvu ir laikytas 40 min tamsoje kambario temperatūroje.

Kontrolinio mėginio paruošimas: 50 µl acetono (70 %) tirpalas praskiestas distiliuotu vandeniu iki 500 µl. Tuomet įpilta 250 µl 1 M Folin-Ciocalteu reagento ir 1,25 ml 7,5 % Na₂CO₃ tirpalo. Tirpalas sumaišytas kratytuvu ir laikytas 40 min tamsoje kambario temperatūroje.

Kalibravimo kreivei, standartinis tanino rūgšties tirpalas (0,1 mg/ml) buvo paruoštas: 25 mg tanino rūgšties ištirpinant 25 ml distiliuoto vandens ir praskiedžiant distiliuotu vandeniu santykiu 1:10.

Kalibravimo kreivės paruošimas: 0,0; 20; 40; 60; 80; 100; 120 µl standartinio tanino rūgšties tirpalo buvo sumaišyta su distiliuotu vandeniu, tokiu kiekiu, kad kiekis mėgintuvėliuose būtų 500 µl. Į šį tirpalą buvo pridėta 250 µl 1 M Folin-Ciocalteu reagento ir 1,25 ml 7,5 % Na₂CO₃ tirpalo. Tirpalai sumaišyti kratytuvu ir inkubuoti kambario temperatūroje 40 min tamsoje. Naudojantis kalibravimo kreive (žr. 2.3 pav.) buvo apskaičiuota tanino rūgšties koncentracija tiriamajame mėginyje.



2.4 pav. Tanino rūgšties kalibracinė kreivė

Po 40 min buvo išmatuoti tiriamųjų tirpalų bei kalibracinės kreivės tirpalų šviesos sugertis 725 nm bangos ilgyje prieš tuščią mėginį.

Bendra fenolinių junginių koncentracija mg/100 mg apskaičiuojama pagal (2.4) formulę.

$$X = \frac{a \cdot V \cdot 100}{n}; \quad (2.4)$$

X – bendra fenolinių junginių koncentracija, mg/100mg;

a – tanino rūgšties koncentracija, paimta iš kalibracinės kreivės, mg/ml;

V – pradinis ekstrakto tūris, ml;

n – augalinė masė, mg.

2.10. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos nustatymas

Arnou`o reagento paruošimas: 10 g natrio molibdato ir 10 g natrio nitrito buvo sumaišyti su 100 ml metanoliu.

Ekstrakto paruošimas: 0,1 g išdžiovintos ir susmulkintos augalinės žaliavos homogenizuota su 2,5 ml distiliuoto vandens. Ekstrakcija vykdyta termostatuojame kratytuve 30 min 25 °C temperatūroje. Vėliau, gautas augalinis ekstraktas 9000 aps/min greičiu buvo centrifuguotas 10 min 4 °C temperatūroje.

Tiriamąjo tirpalo paruošimas: gautas supernatantas (2 ml) buvo praskiestas distiliuotu vandeniu iki 5 ml. 1 ml praskiesto ekstrakto buvo sumaišomas su 5 ml distiliuoto vandens, 1 ml HCl (18 g/l), 1 ml Arnou`o reagentu, 1 ml natrio šarmu (40 g/l) ir praskiestas iki 10 ml distiliuotu vandeniu.

Tiriamųjų tirpalų šviesos sugertis buvo išmatuota spektrofotometru 490 nm bangos ilgyje. Fenolinių rūgščių koncentracija (%) pagal kavos rūgštį buvo apskaičiuota naudojantis (2.5) formule:

$$\text{Fenolinių rūgščių koncentracija (\%)} = \frac{A \cdot 1,7544}{m}; \quad (2.5)$$

A – šviesos sugerties reikšmė;

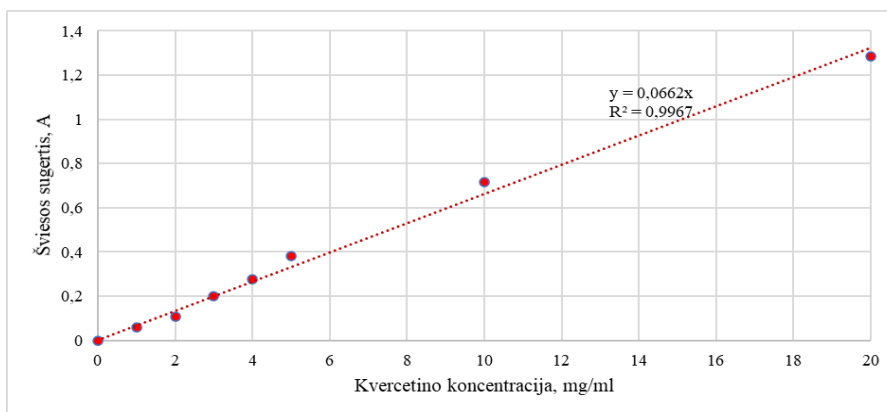
m – augalinė masė, g.

2.11. Flavonoidų koncentracijos nustatymas

Ekstrakto paruošimas: 0,2 g išdžiovintos ir susmulkintos augalinės žaliavos maišoma su 2 ml 80 % metanoliu parą kratyklėje 150 aps/min greičiu. Po išlaikymo homogenatas nucentrifuguotas 4 °C temperatūroje 4 min 9000 aps/min greičiu supernatantas surenkamas ir naudojamas.

Tiriamąjo mėginio paruošimas: į 0,1 ml tiriamojo mėginio įpilama 1 ml 80 % metanolio ir 1 ml 2 % aliuminio chlorido. Mišinys paliekamas stovėti 30 min ir absorbcija išmatuojama 415 nm bangos ilgyje.

Kalibravimo kreivės paruošimas: kvercetas (1 mg/ml) ištirpinamas metanolyje. 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,1; 0,2 ml kverceto sumaišomi su 0,15 ml 2 % aliuminio chloridu ir praskiedžiama iki 10 ml su 80 % metanoliu. Išmatuojama šviesos sugertis 415 nm bangos ilgyje, iš gautų rezultatų sudaroma kalibracinė kreivė.



2.5 pav. Kverceto kalibracinė kreivė

Flavonoidų koncentracija (mg/g sausos masės) apskaičiuojama pagal kvercetiną naudojantis (2.6) formule.

$$C = \frac{C_1 \cdot V}{m}; \quad (2.6)$$

C_1 – kvercetino koncentracija mg/ml pagal kalibravimo kreivę;

V – ekstrakto pradinis tūris, ml;

m – augalinė masė, g.

2.12. Baltymų koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu

Ekstrakto paruošimas: į atskirus mėgintuvėlius buvo pasverta 0,05 g išdžiovintos augalinės medžiagos, kuri buvo užpilta dviem atskirais buferiais (1 ir 2) po 1 ml. Mišiniai maišyti termostatuojamame kratytuve vieną valandą, o po to centrifuguoti 4 °C temperatūroje 9000 aps/min greičiu 15 min. Gauti supernatantai surinkti ir naudoti tolimesniuose tyrimuose.

Tiriamąjo mėginio paruošimas: 200 µl ekstrakto buvo sumaišyta su 2 ml Bradfordo reagento.

Po 2 minučių buvo išmatuota tiriamųjų mėginių šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje. Baltymų ekstrakcija buvo vykdyta naudojant du skirtingų pH buferius, siekiant įvertinti, kuris yra tinkamesnis baltymų ekstrakcijai. Baltymų ekstrakcijai naudoti buferiai:

I. 0,1 M Natrio acetatas (pH = 6,0):

0,1 M CH₃COOH;

0,1 M Natrio acetatas;

II. 0,1 M Natrio boratas (pH = 10);

Abu buferiniai tirpalai turi 0,15 M NaCl

Bendra baltymų koncentracija X (mg/100 mg) apskaičiuota iš (2.7) formulės:

$$X = \frac{a \cdot V \cdot 100}{n \cdot V_1}; \quad (2.7)$$

a – baltymo koncentracija iš albumino kalibracinės kreivės, mg/ml;

V – pradinis ekstrakto tūris, ml;

V_1 – pradinis ekstrakto tūris paimtas praskiedimui, ml;

n – augalinė masė, mg.

2.13. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijos nustatymas

Ekstrakto paruošimas: 0,1 g išdžiovintos ir susmulkintos augalinės žaliavos sumaišoma su 10 ml etanoliu. Iki vientisos masės sumaišytas mišinys buvo centrifuguotas 9000 aps/min greičiu 10 min 4 °C temperatūroje.

Gauto ekstrakto tūris išmatuotas cilindru. Paruošto kryžmažiedžių augalų ekstrakto optinis tankis išmatuojamas spektrofotometru, 662 nm, 644 nm ir 441 nm bangos ilgiuose. Mišiniai buvo skiedžiami etanoliu, jei jų optinis tankis viršijo 0,8 vertę.

Pigmentų koncentracijos apskaičiuotos pagal (2.8), (2.9), (2.10), (2.11) formules:

$$C_{\text{(chlorofilas a (mg l}^{-1}\text{))}} = (9,784 \cdot D_{662}) - (0,99 \cdot D_{644}); \quad (2.8)$$

$$C_{\text{(chlorofilas b (mg l}^{-1}\text{))}} = (21,426 \cdot D_{644}) - (4,65 \cdot D_{622}); \quad (2.9)$$

$$C_{\text{(chlorofilas a + chlorofilas b)}} = (5,134 \cdot D_{662}) + (20,436 \cdot D_{644}); \quad (2.10)$$

$$C_{\text{(karotinoidai (mg l}^{-1}\text{))}} = (4,695 \cdot D_{441}) - (0,268 \cdot C_{\text{(chlorofilas a + chlorofilas b)}}). \quad (2.11)$$

Pigmentų koncentracija mg/100 g apskaičiuota pagal (2.12) formulę:

$$X = \frac{C \cdot V \cdot V_2 \cdot 100}{n \cdot V_1 \cdot 1000}; \quad (2.12)$$

C – pigmentų koncentracija, mg/l;

V – pradinis ekstrakto tūris, ml;

V₁ – pradinis ekstrakto tūris paimtas praskiedimui, ml;

V₂ – praskiesto ekstrakto tūris, ml;

n – augalinė masė, g.

2.14. Gliukozinolatų koncentracijos nustatymas

Ekstrakto paruošimas: 0,1 g išdžiovintos ir susmulkintos kryžmažiedžių augalinės medžiagos sumaišyta su 2 ml 80% metanolio. Šis homogenatas laikytas per naktį kambario temperatūroje. Po išlaikymo homogenatas nucentrifuguotas 4 °C temperatūroje 4 min 9000 aps/min greičiu.

Tiriamąjo tirpalo paruošimas: surinktas supernatantas buvo praskiestas 80% metanoliumi iki 2 ml. Gliukozinolatų nustatymui naudota 100 µl šio ekstrakto, į jį pridėta 0,3 ml distiliuoto vandens ir 3 ml 2 mM natrio tetrachlorpaladato. Sumaišytas mišinys inkubuotas vieną valandą kambario temperatūroje.

Po inkubacijos, tirpalo šviesos sugertis išmatuota 425 nm bangos ilgyje. Bendras gliukozinolatų kiekis (µmol/g) apskaičiuotas pagal (2.13) formulę:

$$y = 1,40 + 118,86 \cdot A_{425} \quad (2.13)$$

A – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis 425 nm bangos ilgyje

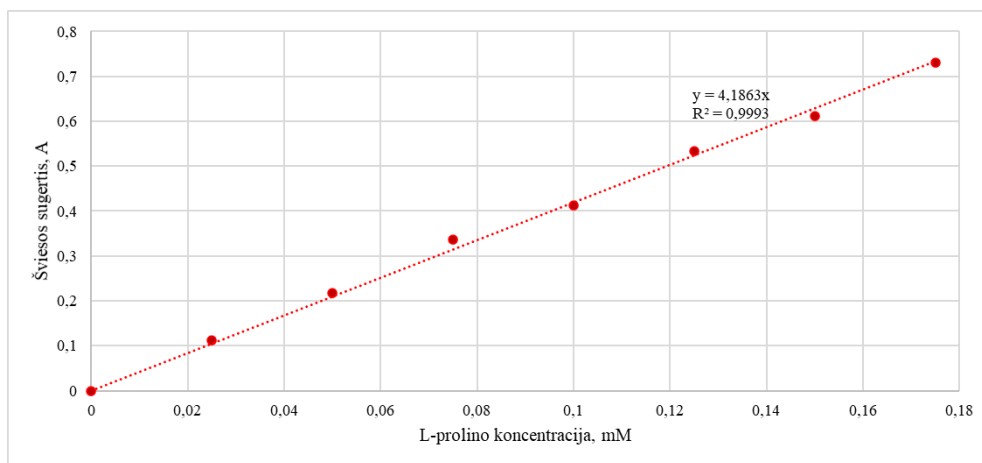
2.15. L-prolino koncentracijos nustatymas

Ekstrakto paruošimas: 100 mg išdžiovintos ir susmulkintos augalinės žaliavos buvo užpilta 4 ml distiliuotu vandeniu. Mėgintuvėlis su augaline žaliava 3 min kaitintas 95 °C temperatūroje ir atšaldytas. Procedūra kartota tris kartus. Ekstraktas centrifuguotas 10 min 9000 aps/min greičiu 4 °C temperatūroje. Gautas supernatantas surinktas ir naudotas tyrimui.

Tiriamąjo tirpalo paruošimas: gautas supernatantas (2 ml) buvo praskiestas distiliuotu vandeniu iki 6 ml. 1 ml praskiesto ekstrakto buvo sumaišyta su 1 ml acto rūgšties, 1 ml ninhidrininio reagento ir mišinys kaitintas 1 val. vandens vonelėje 37 °C temperatūroje.

Kalibravimo kreivės paruošimas: L-prolino 0,0011 g ištirpinta 10 ml distiliuoto vandens. 0,0; 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175 µl paruošto tirpalo (1 mM) sumaišyta su vandeniu, tokiu kiekiu, kad kiekis mėgintuvėliuose būtų 1 ml.

Tiriamųjų bei kalibravimo kreivės tirpalų šviesos sugertis buvo matuota spektrofotometru 520 nm bangos ilgyje.



2.6 pav. *L*-prolino kalibracinė kreivė

L-prolino koncentracija apskaičiuota pagal (2.14) formulę naudojantis *L*-prolino kalibracine kreive (žr. 2.6 pav.).

$$C_x = \frac{E \cdot k \cdot V_{bendras}}{n \cdot V_{paimta}}; \quad (2.14)$$

C_x – prolino koncentracija $\mu\text{mol/g}$;

E – tirpalo šviesos sugertis;

k – *L*-prolino koncentracija, gauta pagal kalibracinę kreivę (μmol);

$V_{bendras}$ – bendras ekstrakto tūris, ml;

V_{paimta} – paimto ekstrakto tūris, ml;

n – augalinės žaliavos kiekis, g.

2.16. Mirozinazės aktyvumo nustatymas

Ekstrakto paruošimas: 50 mg išdžiovintų susmulkintų kryžmažiedžių augalų buvo sumaišyti su 2 ml distiliuoto vandens. Mišinys homogenizuotas 15 min termostatuojamame kratytuve 25 °C temperatūroje ir centrifuguotas 10 min 9000 aps/min greičiu. Supernatantas surinktas ir pakartotinai centrifuguotas „Eppendorf“ mėgintuvėliuose.

Tiriamąjį tirpalą paruošimas: į 2940 μl 80 mM NaCl įpilta 30 μl 20 mM sinigrino tirpalo, mišinys pašildytas vandens vonelėje iki 37 °C temperatūros. Po to įpilta 30 μl paruošto vandeninio augalų ekstrakto. Mėginys buvo praskiestas iki 10 ml su distiliuotu vandeniu.

Tiriamąjį mėginio šviesos sugertis buvo matuota spektrofotometru 230 nm bangos ilgyje, pradžioje ir po 30 min išlaikant 37 °C temperatūroje. Matavimui naudotos kvarcines kiuvetes. Mirozinazės aktyvumas pateikiamas, kaip hidrolizuotų gliukozinolatų kiekis (mol) per minutę, perskaičiuotas 1 g augalinės medžiagos (vnt./g augalo mėginio per minutę).

Mirozinazės aktyvumas vnt./g apskaičiuotas iš (2.15) formulės [55]:

$$\text{Aktyvumas (vnt./g)} = \frac{1000 \cdot V_{bendras}}{C \cdot V_{paimta}} \cdot \frac{2 \cdot (A_0 - A_t)}{E \cdot t}; \quad (2.15)$$

A_0 – pradinė šviesos sugertis;

A_t – šviesos sugertis po 30 min;

t – trukmė, min;

E – ekstinkcijas koeficients (7500 l/mol·cm);

V_{bendras} – bendras mēģinīo tūris, ml;

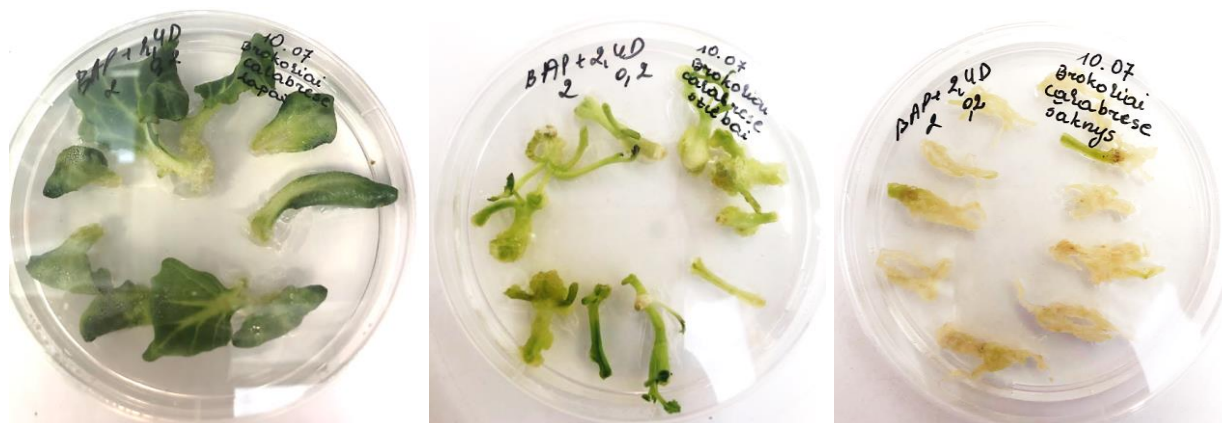
V_{paimta} – paimto ekstrakto tūris, ml;

C – ekstrakto koncentrācija (g/ml).

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Rapsų (lot. *Brassica napus* L.), brokolių (lot. *Brassica oleracea* var. *Italica*) ir pipirnių (lot. *Lepidium sativum* L.) kaliaus kultūros *in vitro*

Tiriamąjo projekto metu, buvo suformuotos kryžmažiedžių augalų kaliaus kultūros *in vitro*. Siekiant suformuoti gausias tiriamųjų augalų kaliaus kultūras, po atliktos literatūrinės analizės, buvo nuspręsta brokolių (žr. 3.1 pav.), rapsų bei pipirnių kaliaus kultūrų mitybinę terpę papildyti 0,2 mg/l 2,4-D ir 2 mg/l BAP augimo regulatoriais.



3.1 pav. Brokolių lapų, stiebų ir šaknų eksplantų kaliaus kultūros *in vitro*

Siekiant padidinti biologiškai aktyvių junginių biosintezę ir koncentraciją, tiriamųjų augalų kaliaus kultūrose, buvo pritaikyta viena iš biotechnologinių strategijų – elicitavimas. Brokolių, rapsų bei pipirnių kaliaus kultūros mitybinės terpės buvo papildytos 25, 50 $\mu\text{mol/l}$ salicilo rūgšties ir metilzasmonato elicitoriais.

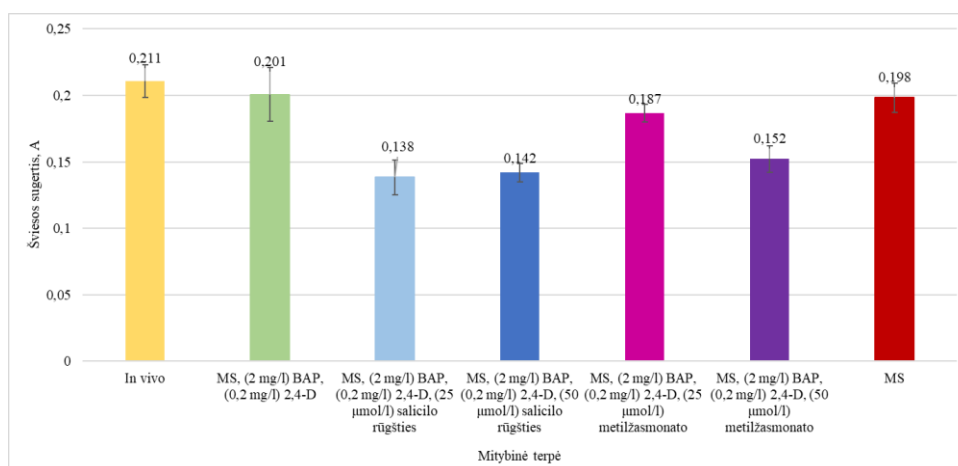
3.2. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Tiriamųjų kryžmažiedžių augalų kaliaus kultūrų gebėjimui kaupti antioksidacinius bioaktyvius junginius įvertinti, tiriamąjo projekto metu buvo atlikti redukcinių savybių nustatymo, DPPH, ABTS radikalo surišimo, FRAP ir SOD aktyvumo spektrofotometrinės analizės metodai. Kiekvienas mėginys tiriamajame darbe buvo tiriamas 3 kartus (3 pakartojimai).

3.2.1. Reducinių savybių nustatymo metodas

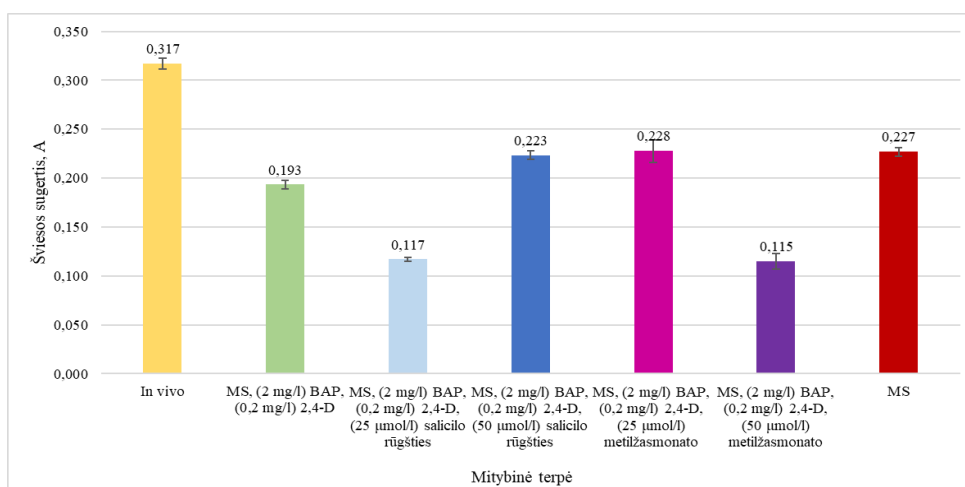
Biologiškai aktyvių junginių redukcinių savybių įvertinimui naudotas metodas, kurio metu vertinta šių junginių geba redukuoti Fe^{3+} fericianido kompleksą ($\text{Fe}[(\text{CN})_6]_3$) iki Fe^{2+} komplekso ($\text{Fe}[(\text{CN})_6]_2$). Pridėjus geležies chlorido tirpalo į reakcijos mišinį, susiformavo mėlynos spalvos kompleksas. Tyrimo metu redukcinės savybės įvertintos spektrofotometriškai matuojant tiriamųjų tirpalų šviesos sugertį. Vykstant reakcijai didėjo tiriamąjo mišinio šviesos sugertis, tai vyko dėl padidėjusio $\text{Fe}[(\text{CN})_6]_2$ kompleksų kiekio, kas lėmė ir didesnes redukcines savybes [56].

Išanalizavus gautus rezultatus, kurie pateikiami 3.2 pav. matyti, jog brokolių *in vivo* ekstraktas pasižymėjo geriausiomis redukcinėmis savybėmis ($A - 0,211 \pm 0,01$). Nustatyta, jog mitybinės terpės papildymas cheminiais elicitoriais nepagerino brokolių kaliaus kultūrų ekstraktų redukcinių savybių ir netgi atvirksčiai – jas sumažino.



3.2 pav. Brokolių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų redukcinių savybių įvertinimo rezultatai

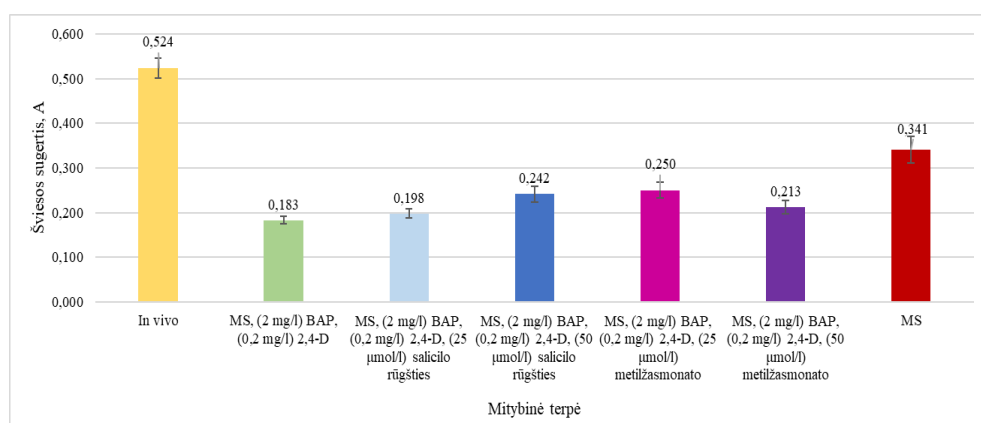
Iš pateiktų rezultatų (žr. 3.3 pav.) matyti, kad rapsų *in vitro* kultūros (MS) ekstrakte nustatytos geresnės redukcinės savybės ($A = 0,227 \pm 0,004$), nei rapsų kaliaus kultūros, augintos MS terpėje papildytoje 2 mg/l BAP ir 0,2 mg/l 2,4-D augimo regulatoriais, ekstrakte ($A = 0,193 \pm 0,004$). Įvertinus rezultatus nustatyta, kad papildžius rapsų kaliaus kultūrų mitybinę terpę 50 μmol/l salicilo rūgštis ($A = 0,223 \pm 0,004$) bei 25 μmol/l metilžasmonato ($A = 0,228 \pm 0,01$) elicitoriais, ekstraktų redukcinės savybės padidėjo atitinkamai 15,5 % ir 18,1 %. Lyginant šių ekstraktų redukcines savybes, 1,5 karto didesnėmis antioksidacinėmis savybėmis ($A = 0,317 \pm 0,005$) pasižymėjo rapsų *in vivo* ekstraktas.



3.3 pav. Rapsų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų redukcinių savybių įvertinimo rezultatai

Pipirnių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų redukcinių savybių įvertinimo rezultatai pateikiami 3.4 pav., kuriuose matyti, jog geriausiomis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo pipirnių *in vivo* ekstraktas ($A = 0,524 \pm 0,008$). Pipirnių *in vitro* kultūros (MS) ekstraktas pasižymėjo 1,5 karto mažesnėmis redukcinėmis savybėmis ($A = 0,341 \pm 0,029$), lyginant su pipirnių *in vivo* ekstraktu. Iš gautų rezultatų nustatyta, kad pipirnių kaliaus kultūros ekstraktų redukcinės savybės padidėjo papildžius mitybinę terpę (25, 50 μmol/l) salicilo rūgštis bei (25, 50 μmol/l) metilžasmonato elicitoriais. Papildžius mitybinę terpę 25 μmol/l salicilo rūgštimi, pipirnių kaliaus kultūrų ekstrakto redukcinės savybės padidėjo 8,2 % ($A = 0,198 \pm 0,009$), o terpę papildžius 50 μmol/l salicilo rūgštimi – 32 % ($A = 0,242 \pm 0,018$). Mitybinę terpę papildžius 25 μmol/l metilžasmonatu pipirnių kaliaus kultūrų ekstrakto antioksidacinės savybės padidėjo 36 % ($A = 0,250 \pm 0,02$), o terpę papildžius 50

$\mu\text{mol/l}$ metilžasmonatu – 16,4 % ($A = 0,213 \pm 0,014$). Geriausiu elicitavimo efektyvumu pasižymėjo 50 $\mu\text{mol/l}$ metilžasmonato elicitorius.

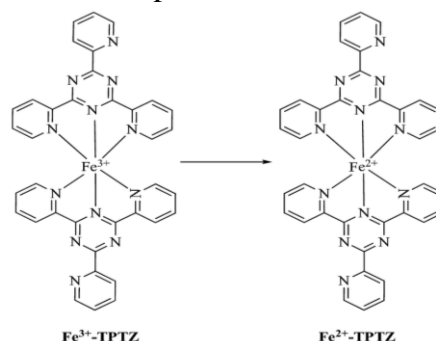


3.4 pav. Pipirnių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų redukcinių savybių įvertinimo rezultatai

Lyginant visų tirtų augalų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* rezultatus, matyti jog pipirnių *in vivo* ekstraktas pasižymėjo didžiausiomis redukcinėmis savybėmis ($A = 0,524 \pm 0,008$), 2,5 karto didesnėmis nei brokolių *in vivo* ekstraktas ($A = 0,198 \pm 0,01$) ir 1,7 karto didesnėmis nei rapsų *in vivo* ekstraktas ($A = 0,317 \pm 0,005$). Papildžius tiriamųjų augalų kaliaus kultūrų mitybinę terpę cheminiais elicitoriais teigiamas poveikis nustatytas rapsų ir pipirnių kaliaus kultūroms, o brokolių kaliaus kultūrų redukcinėms savybėms pasirinkti elicitoriai teigiamos įtakos neturėjo. Pastebėta, kad didesnė salicilo rūgšties koncentracija (50 $\mu\text{mol/l}$) turėjo įtakos geresnėms tiriamųjų augalų kaliaus kultūrų ekstraktų redukcinėms savybėms lyginant su mažesne salicilo rūgšties (25 $\mu\text{mol/l}$) koncentracija. Metilžasmonato mažesnė (25 $\mu\text{mol/l}$) koncentracija mitybinėje terpėje lėmė geresnes tiriamųjų augalų kaliaus kultūrų ekstraktų redukcines savybes, nei didesnė (50 $\mu\text{mol/l}$) metilžasmonato koncentracija.

3.2.2. Antioksidacinių savybių įvertinimas FRAP metodu

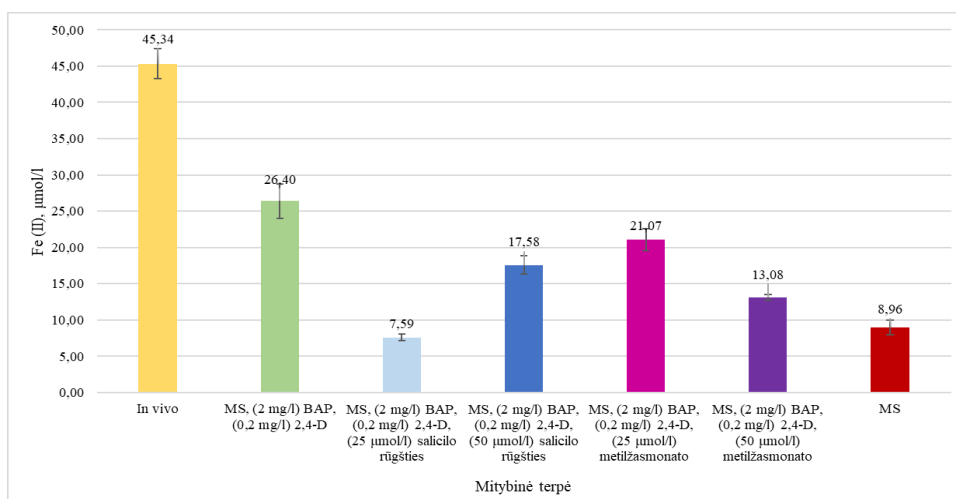
Kryžmažiedžių augalų antioksidacinių savybių įvertinimui buvo naudotas geležies redukcijos antioksidacinės jėgos (FRAP) metodas. Metodo metu įvertinama biologiškai aktyvių medžiagų, esančių tiriamųjų augalų ekstrakto, geba redukuoti Fe^{3+} – 2,4,6-tripiridil-*s*-triazino kompleksą iki Fe^{2+} –2,4,6-tripiridil-*s*-triazino komplekso (žr. 3.5 pav.). Tirpale, sudarius rūgštinę aplinką, bespalvis Fe^{3+} tirpalas, virsta mėlynos spalvos Fe^{2+} tirpalu [56].



3.5 pav. Fe^{3+} – 2,4,6-tripiridil-*s*-triazino komplekso redukcija iki Fe^{2+} – 2,4,6-tripiridil-*s*-triazino komplekso [56]

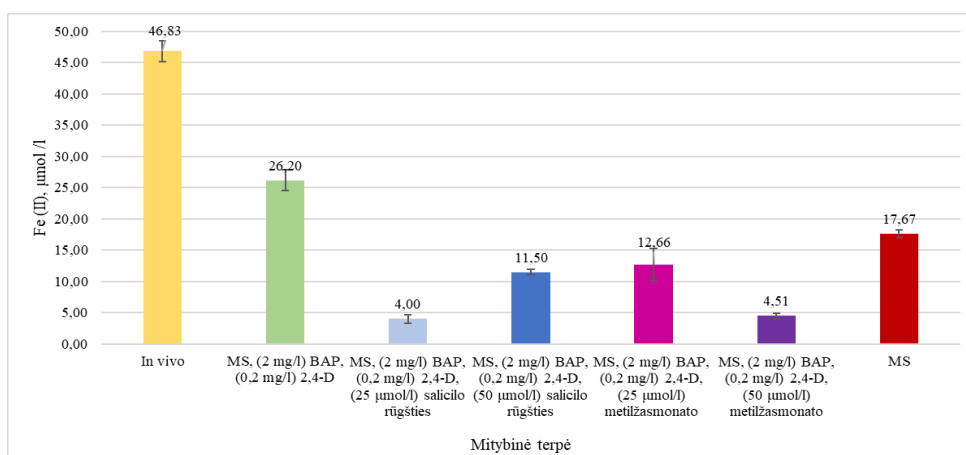
Išanalizavus gautus rezultatus, kurie pateikiami 3.6 pav. matyti, jog šie sutapo su brokolių redukcinių savybių įvertinimo metodo rezultatais. Šiame tyrime, brokolių *in vivo* ekstraktas taip pat pasižymėjo

geriausiomis antioksidacinėmis savybėmis ($45,34 \pm 2,11 \mu\text{mol/l}$), o 5 kartus mažesnės antioksidacinės savybės ($8,96 \pm 0,97 \mu\text{mol/l}$) nustatytos brokolių *in vitro* kultūros (MS) ekstrakto. Suformavus brokolių kaliaus kultūras iš išaugintų MS terpėje augalo eksplantų, kurios buvo auginamos ant MS terpės papildytos 2 mg/l BAP ir 0,2 mg/l 2,4-D augimo reguliatoriais, šių augalų ekstraktų antioksidacinės savybės padidėjo 3 kartus ($26,40 \pm 2,40 \mu\text{mol/l}$). Iš gautų rezultatų galima matyti, kad mitybinė terpės papildymas elicitoriais, nepagerino brokolių kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinių savybių.



3.6 pav. Brokolių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimo FRAP metodu rezultatai

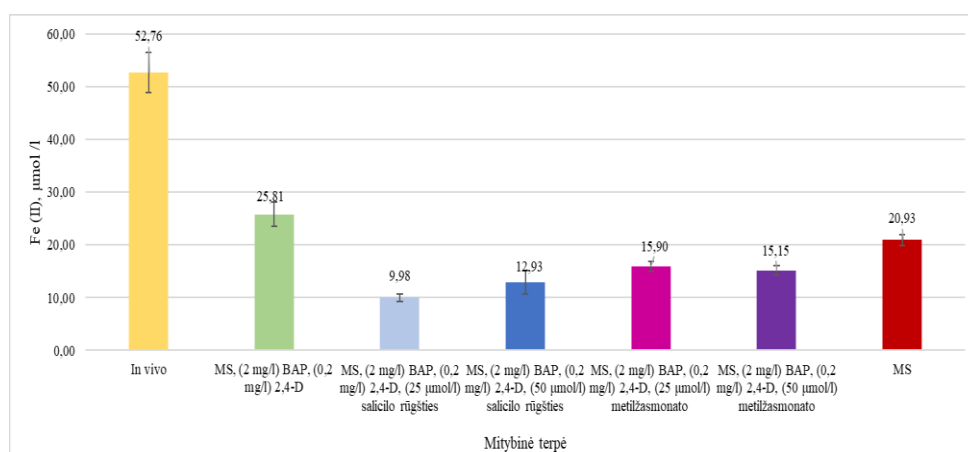
Iš 3.7 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad geriausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo rapsų *in vivo* ekstraktas ($46,83 \pm 1,67 \mu\text{mol/l}$). Rapsų kaliaus kultūros, kuri buvo auginama ant MS terpės papildytos 2 mg/l BAP ir 0,2 mg/l 2,4-D augimo reguliatoriais, ekstraktas pasižymėjo 1,5 karto didesnėmis antioksidacinėmis savybėmis ($26,20 \pm 1,64 \mu\text{mol/l}$), nei rapsų *in vitro* kultūros ekstraktas ($17,67 \pm 0,62 \mu\text{mol/l}$). Šio tyrimo metu nustatyta, kad papildžius mitybinę terpę cheminiais elicitoriais, rapsų kaliaus kultūrų antioksidacinis aktyvumas sumažėjo nuo 2 iki 6,5 kartų.



3.7 pav. Rapsų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimo FRAP metodu rezultatai

Pipirnių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimo rezultatai pateikiami 3.8 pav. iš kurių matyti, kad didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo pipirnių *in vivo* ekstraktas ($52,76 \pm 3,8 \mu\text{mol/l}$). Pipirnių *in vitro* kultūros ekstraktas pasižymėjo 2,5 karto mažesnėmis redukcinėmis savybėmis ($20,93 \pm 1,05 \mu\text{mol/l}$), lyginant su pipirnių *in vivo* ekstraktu.

Tačiau suformavus pipirnių kaliaus kultūras, šių kultūrų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas padidėjo 1,2 karto ($25,81 \pm 2,32 \mu\text{mol/l}$).



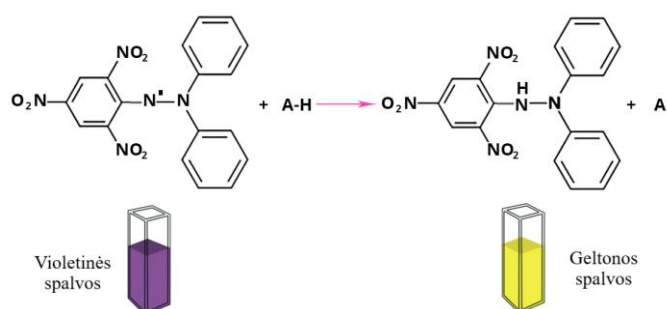
3.8 pav. Pipirnių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimo FRAP metodu rezultatai

Iš pateiktų rezultatų matyti, kad papildžius mitybinę terpę cheminiais elicitoriais, pipirnių kaliaus kultūrų ekstraktų antioksidacinės savybės sumažėjo 1,6-2,6 karto.

Palyginus tirtų kryžmažiedžių augalų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinį aktyvumą įvertintą FRAP metodu, iš gautų rezultatų nustatyta, jog didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo pipirnių *in vivo* ekstraktas ($52,76 \pm 3,8 \mu\text{mol/l}$), 12,7 % didesniu, nei rapsų *in vivo* ekstraktas ir 16 % didesniu nei brokolių *in vivo* ekstraktas. FRAP metodo rezultatai parodė, jog visų tiriamųjų augalų suformuotos kaliaus kultūros sukaupe didesnius antioksidacinių junginių kiekius, nei MS terpėje *in vitro* sąlygomis užauginti augalai. Tiriamųjų augalų kaliaus kultūrų mitybinės terpės papildymas (25, 50 $\mu\text{mol/l}$) salicilo rūgšties bei (25, 50 $\mu\text{mol/l}$) metilžasmonato elicitoriais turėjo neigiamos įtakos, kaliaus kultūrų antioksidacinėms savybėms. Šio tyrimo rezultatai parodė, kad pasirinkti elicitoriai neigiamai veikė brokolių, rapsų ir pipirnių kaliaus kultūras.

3.2.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu

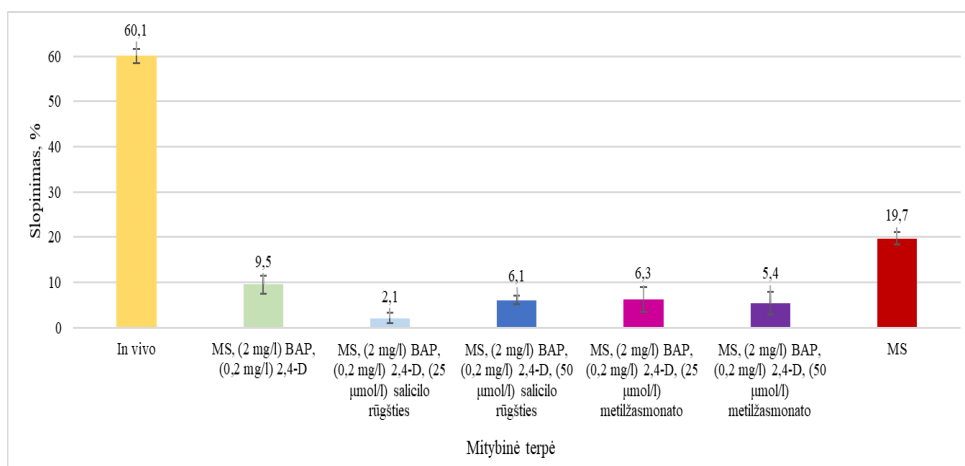
Kryžmažiedžių augalų antioksidacinio aktyvumo įvertinimui buvo naudojamas kitas spektrofotometrinis metodas. Šis metodas pagrįstas kryžmažiedžių augalų antioksidacinių junginių geba neutralizuoti 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH•) radikalą. Tyrimo metu 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH•) radikalas (violetinės spalvos) sureagavo su tiriamųjų augalų ekstraktuose esančiais biologiškai aktyviais junginiais, kurie atidavę vieną vandenilio atomą, redukavo DPPH• radikalą paversdami jį (geltonos spalvos) 2,2-difenil-1-pikrilhidrazinu (žr. 3.9 pav.) [57].



3.9 pav. Antioksidanto (A-H) reakcija su DPPH• radikalų [57]

Geltonos spalvos intensyvumas priklauso nuo antioksidacinių junginių koncentracijos tiriamųjų augalų ekstrakto. Šis metodas dažnai atliekamas laboratorijoje ir itin teigiamai vertinamas dėl savo paprastumo, greito atlikimo, pigumo, tačiau vienas iš pagrindinių trūkumų – tyrimo metu biologiškai aktyvios medžiagos gali sąveikauti su kitais kryžmažiedžių augalų ekstrakto esančiais junginiais, dėl ko gauti rezultatai gali būti klaidingi. Šie stabilūs radikalai gali reaguoti su reduktoriais, neturinčiais antioksidacinio aktyvumo, pavyzdžiui, DPPH• gali būti visiškai redukuojamas į DPPH-H vandenilio peroksido [58].

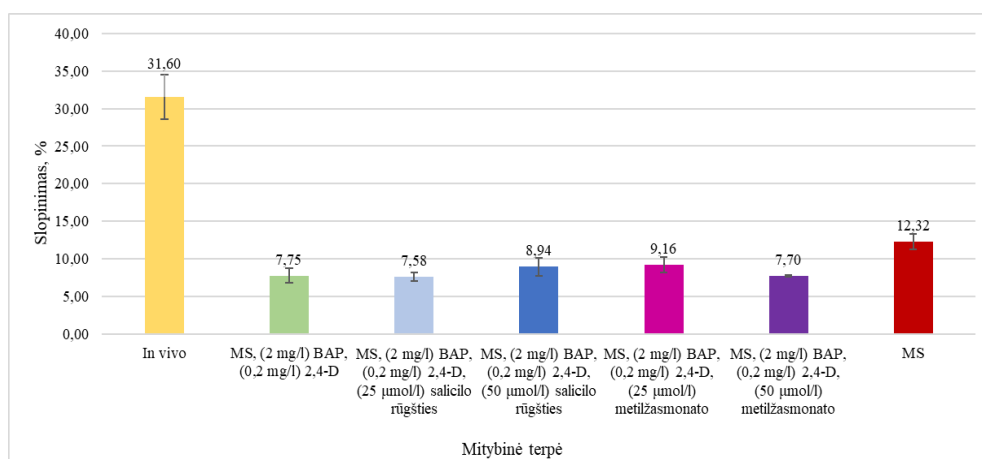
Brokolių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimo DPPH metodu rezultatai pateikiami 3.10 pav.



3.10 pav. Brokolių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimo DPPH metodu rezultatai

Iš pateiktų rezultatų galima pastebėti, jog stipriausiu DPPH• radikalo slopinimu pasižymėjo brokolių *in vivo* ekstraktas ($60,1 \pm 1,9$ %). Brokolių kaliaus kultūrų ekstraktas pasižymėjo 2 kartais mažesnėmis DPPH• radikalo slopinimo savybėmis ($9,5 \pm 1,9$ %), nei brokolių *in vitro* kultūros ekstraktas ($19,7 \pm 1,2$ %). Iš gautų rezultatų nustatyta, kad mitybinės terpės papildymas salicilo rūgšties bei metilzasmonato elicitoriais, brokolių kaliaus kultūrų ekstraktų DPPH• radikalo slopinimo gebą veikė neigiamai.

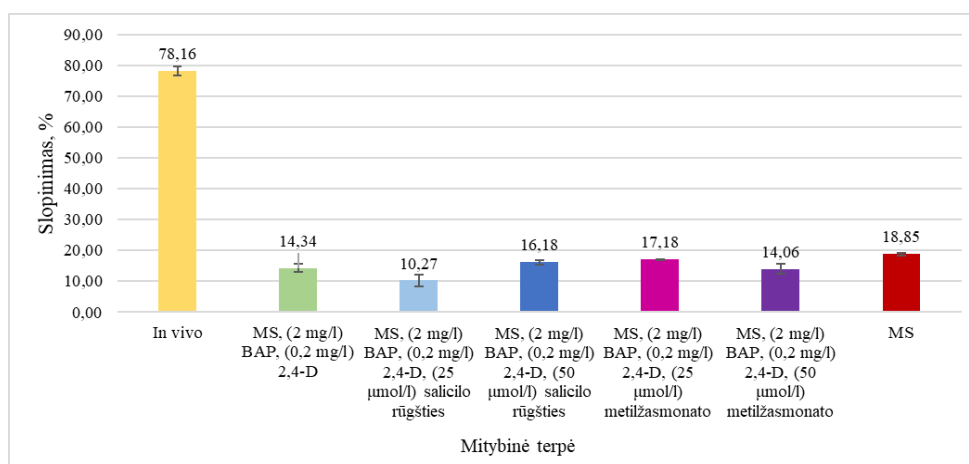
Įvertinus rapsų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų DPPH• radikalo slopinimo gebą, iš 3.11 pav. matyti, jog didžiausias DPPH• radikalo slopinimas nustatytas rapsų *in vivo* ekstrakto ($31,60 \pm 2,96$ %). Iš gautų rezultatų galima pastebėti, jog rapsų antioksidacinių savybių įvertinimo DPPH metodu rezultatai sutampa su redukcinių savybių įvertinimo metodo rezultatais. Rapsų *in vitro* kultūros ekstraktas pasižymėjo 2,5 kartais mažesne DPPH• radikalo slopinimo geba ($12,32 \pm 1,04$ %), nei rapsų *in vivo* ekstraktas. Tačiau, 1,5 kartais didesne DPPH• radikalo slopinimo geba, nei rapsų kaliaus kultūros ekstraktas ($7,75 \pm 0,96$ %).



3.11 pav. Rapsų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimo DPPH metodu rezultatai

Įvertinus rapsų kaliaus kultūros, augintos mitybinėje terpėje papildytoje 50 μmol/l salicilo rūgšties (8,94±1,20 %) bei 25 μmol/l metilžasmonato (9,16±1,04 %) elicitoriais, ekstraktų antioksidacines savybes, nustatytas teigiamas šių elicitorių poveikis rapsų kaliaus kultūrų antioksidacinių junginių biosintezei. Rapsų kaliaus kultūrų mitybinę terpę papildžius 50 μmol/l salicilo rūgštimi DPPH• radikalo slopinimo geba padidėjo 15,4 %, o terpę papildžius 25 μmol/l metilžasmonatu – 18,2 %.

Pipirnių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimo DPPH metodu rezultatai pateikiami 3.12 pav.



3.12 pav. Pipirnių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimo DPPH metodu rezultatai

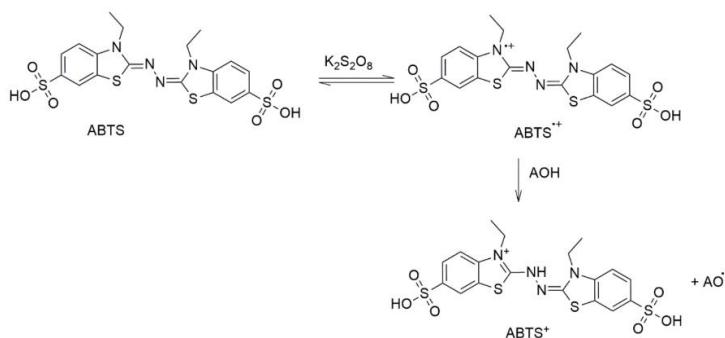
Iš rezultatų galima pastebėti, jog DPPH metodo rezultatai sutampa su pipirnių redukcinių savybių įvertinimo rezultatais. 3.12 pav. pateiktuose rezultatuose matyti, jog didžiausia DPPH• radikalo slopinimo geba (78,16±1,5 %), pasižymėjo pipirnių *in vivo* ekstraktas. Pipirnių *in vitro* kultūros ekstraktas pasižymėjo 4 kartais mažesne antioksidacine geba (18,85±0,39 %), lyginant su pipirnių *in vivo* ekstraktu. Tyrimo metu nustatyta, kad kaliaus kultūrų mitybinės terpės papildymas (50 μmol/l) salicilo rūgštimi bei (25 μmol/l) metilžasmonatu turėjo teigiamos įtakos šių kultūrų antioksidacinių savybių padidėjimui. Papildžius mitybinę terpę 50 μmol/l salicilo rūgštimi, pipirnių kaliaus kultūrų ekstrakto DPPH• radikalo slopinimo geba padidėjo 12,8 % (16,18±0,7 %), o terpę papildžius 25 μmol/l metilžasmonatu – 19,8 % (17,18±0,08 %).

Palyginus tiriamųjų kryžmažiedžių augalų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinio aktyvumo rezultatus, didžiausia DPPH• radikalo slopinimo geba nustatyta pipirnių *in vivo* ekstrakto (78,16±1,5 %), kuri buvo 1,3 karto didesnė nei brokolių ir 2,5 karto didesnė nei rapsų *in vivo* ekstraktų. Šio tyrimo metu nustatyta, jog visų tiriamųjų augalų suformuotos kaliaus kultūros sukaupė mažesnius antioksidacinių junginių kiekius, nei tiriamųjų augalų *in vitro* sąlygomis užauginti augalai.

Papildžius tiriamųjų augalų mitybinę terpę salicilo rūgšties ir metilžasmonato elicitoriais, nustatytas teigiamas poveikis rapsų ir pipirnių kaliaus kultūrų antioksidacinių junginių biosintzei, neigiamas – brokolių. Nustatyta, kad didesnė salicilo rūgšties koncentracija (50 µmol/l) lėmė tiriamųjų augalų kaliaus kultūrų ekstraktų didesnę slopinimo gebą, nei mažesnė salicilo rūgšties (25 µmol/l) koncentracija. Metilžasmonato mažesnė (25 µmol/l) koncentracija mitybinėje terpėje lėmė geresnes tiriamųjų augalų kaliaus kultūrų ekstraktų antioksidacines savybes, nei didesnė (50 µmol/l) metilžasmonato koncentracija. Didžiausias antioksidacinis aktyvumas, naudojant cheminį elicitorių nustatytas pipirnių kaliaus kultūros, augintos mitybinėje terpėje papildytoje 2 mg/l BAP ir 0,2 mg/l 2,4-D augimo reguliatoriais ir 25 µmol/l metilžasmonatu, ekstrakto (17,18±0,08 %).

3.2.4. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu

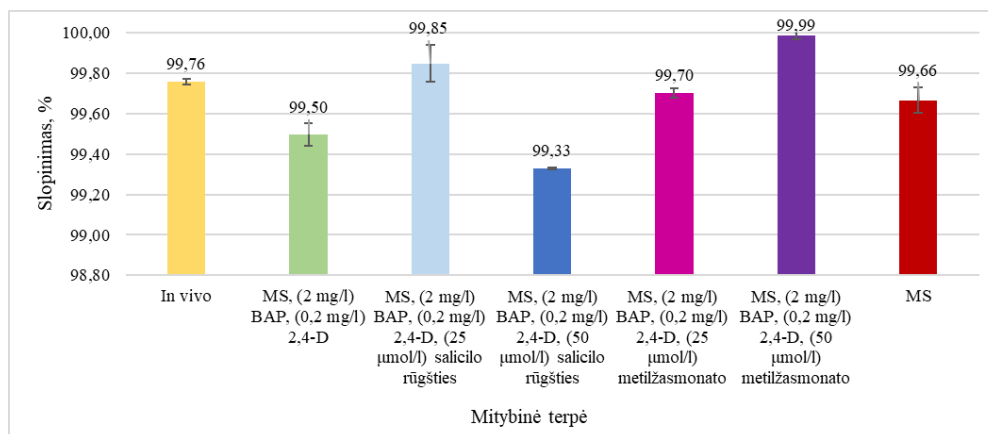
Tiriamųjų augalų ekstraktuose esančių natūralių biologiškai aktyvių junginių antioksidacinėms savybėms įvertinti buvo naudojamas spektrofotometrinis – ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sulfonrūgšties)) metodas. Vykdytame metode, kalio persulfato tirpalu oksidavus ABTS, susiformavo stabilus radikalo katijonas ABTS^{•+}, kuris tirpalą nudažė intensyvia, mėlynai žalsva, spalva (žr. 3.13 pav.) [56].



3.13 pav. ABTS oksidacija, ir ABTS^{•+} reakcija su antioksidantu (AOH) [59].

Sureagavęs su augalų ekstraktuose esančiais antioksidaciniais junginiais ABTS^{•+} buvo surištas, o tirpalo spalva neutralizuota. Šis metodas yra jautrus, greitas – mėginio analizė užtrunka 30 min, metodo atlikimui nereikia brangių reagentų ar sudėtingų prietaisų. Šį chromogeną lengva naudoti, jis yra labai jautrus ir leidžia greitai išanalizuoti daugelio lipofilinių bei hidrofiliųjų junginių antioksidacinį aktyvumą [59].

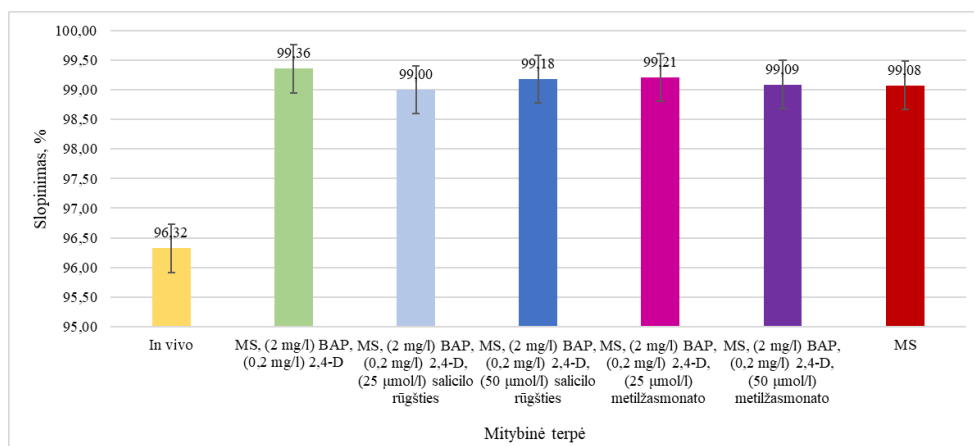
Įvertinus gautus rezultatus, nustatyta, kad brokolių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktai pasižymėjo visišku ABTS^{•+} slopinimu. Rezultatai, kurie pateikti 3.14 pav. rodo, jog didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo brokolių kaliaus kultūros, augintos mitybinėje terpėje papildytoje 50 µmol/l metilžasmonatu, ekstraktas (99,99±0,01 %), o mažiausiu – brokolių kaliaus kultūros, augintos mitybinėje terpėje papildytoje 50 µmol/l salicilo rūgštimi, ekstraktas (99,33±0,00 %).



3.14 pav. Brokolių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimo ABTS metodu rezultatai

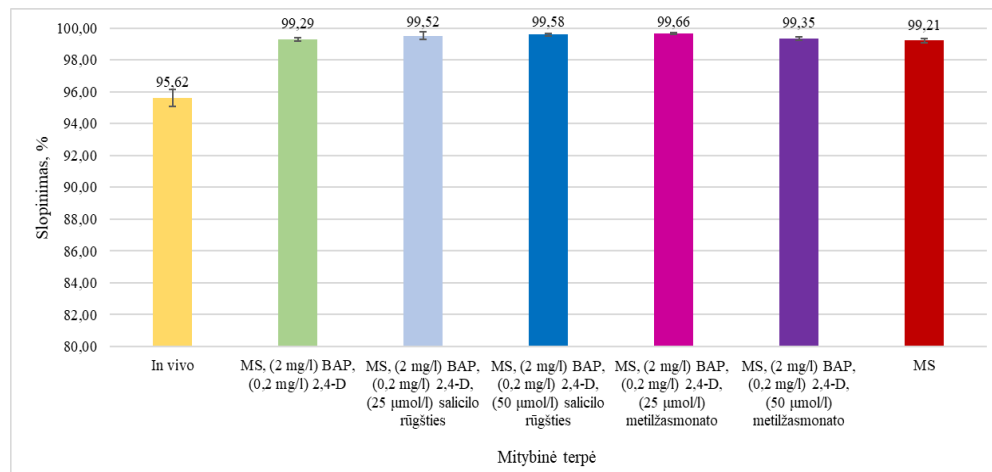
Vertinant elicitorių poveikį, kaliaus kultūrų, augintų mitybinėje terpėje papildytoje 25 µmol/l salicilo rūgšties (99,85±0,09 %), 25 µmol/l metilžasmonato (99,70±0,02 %) bei 50 µmol/l metilžasmonato (99,99±0,00 %) elicitoriais, ekstraktai parodė nežymų ABTS radikalo katijono slopinimo gebos padidėjimą.

Įvertinus rezultatus, kurie pateikti 3.15 pav. nustatyta, jog didžiausiu ABTS·⁺ slopinimu pasižymėjo rapsų kaliaus kultūros, augintos MS terpėje papildytoje 2 mg/l BAP ir 0,2 mg/l 2,4-D augimo regulatoriais, ekstraktas (99,36±0,04 %), o mažiausiu – rapsų *in vivo* ekstraktas (96,32±0,08 %). Šio tyrimo rezultatai parodė, kad rapsų kaliaus kultūrų mitybinės terpės papildymas (25, 50 µmol/l) salicilo rūgštimi bei (25, 50 µmol/l) metilžasmonatu neturėjo reikšmingos įtakos jų antioksidacinėms savybėms.



3.15 pav. Rapsų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimo ABTS metodu rezultatai

Pipirnių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų, antioksidacinio aktyvumo įvertinimo ABTS metodu, rezultatai pateikiami 3.16 pav. Iš gautų rezultatų matyti, jog didžiausiu ABTS·⁺ slopinimu pasižymėjo pipirnių kaliaus kultūros, augintos mitybinėje terpėje papildytoje 25 µmol/l metilžasmonatu, ekstraktas (99,66±0,05 %), o mažiausiu – pipirnių *in vivo* ekstraktas (95,62±0,24 %).



3.16 pav. Pipirnių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimo ABTS metodu rezultatai

Pipirnių kaliaus kultūros, kurios suformuotos MS terpėje papildytoje 2 mg/l BAP ir 0,2 mg/l 2,4-D augimo reguliatoriais, ekstraktai pasižymėjo geresnėmis ABTS⁺ slopinimo savybėmis (99,29±0,09 %), nei pipirnių *in vitro* kultūros ekstraktas (99,21±0,14 %). Įvertinus rezultatus nustatyta, jog pipirnių kaliaus kultūrų mitybinės terpės papildymas (25, 50 μmol/l) salicilo rūgštimi bei (25, 50 μmol/l) metilžasmonatu turėjo nedidelės įtakos šių kultūrų antioksidacinių savybių padidėjimui.

Palyginus tirtų kryžmažiedžių augalų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinį aktyvumą įvertintą ABTS metodu, didžiausiu ABTS⁺ slopinimu pasižymėjo brokolių kaliaus kultūros, augintos mitybinėje terpėje papildytoje 50 μmol/l metilžasmonatu, ekstraktas (99,99±0,01 %), o mažiausiu – pipirnių *in vivo* ekstraktas (95,62±0,24 %). Bendru atveju, visi tiriamųjų augalų kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktai pasižymėjo 99 % ABTS⁺ slopinimu.

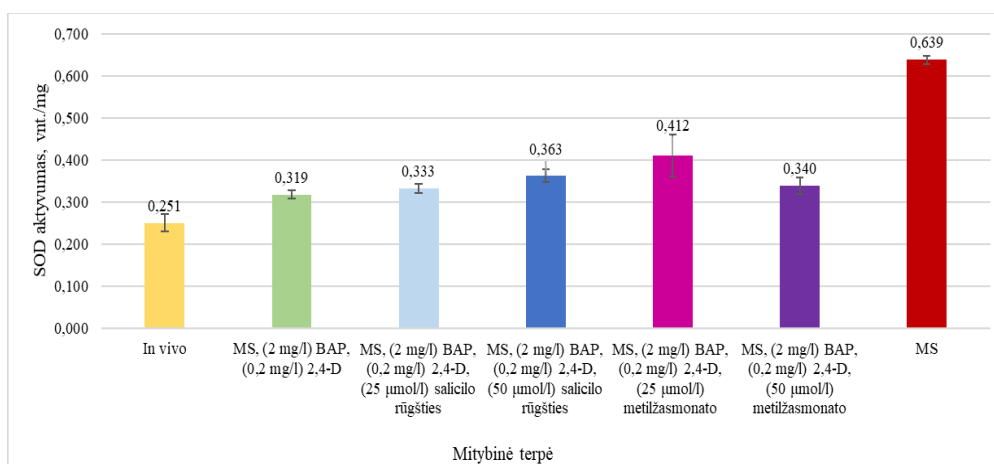
Taigi, įvertinus tiriamųjų kryžmažiedžių augalų antioksidacinį aktyvumą ABTS radikalo surišimo metodu nustatyta, kad augalų kaliaus kultūrų mitybinės terpės papildymas (25, 50 μmol/l) salicilo rūgštimi bei (25, 50 μmol/l) metilžasmonatu turėjo nedidelės įtakos šių kultūrų antioksidacinių savybių padidėjimui.

3.2.5. Antioksidacinio fermento superoksido dismutazės (SOD) aktyvumo nustatymas

SOD – fermentinis antioksidantas, kuris saugo augalus nuo nepageidaujamų veiksnių sukkelto streso bei jo metu susiformavusių laisvųjų radikalų ar reaktyvių deguonies formų poveikio (ROS) [60]. Šis fermentas augalų ląstelių mitochondrijose neutralizuoja superoksido radikalo anijonus (O₂^{•-}), paversdamas juos vandenilio peroksidu (H₂O₂) ir molekulinio deguonimi (O₂). Tačiau, per didelę H₂O₂ koncentracija gali sukelti oksidacines audinių pažeidas ar ląstelių mirtį [61]. H₂O₂ per *Haber-Weiss* reakciją gali virsti kitomis kenksmingesnėmis reaktyviomis rūšimis, pavyzdžiui hidroksilo radikalu (OH[•]) – reaktyviausia ir toksiškiausia žinoma ROS. Šis radikalas gali pažeisti įvairius ląstelių komponentus vykdydamas lipidų peroksidaciją (LPO), baltymų ir membranos pakitimus. Taigi, peroksisomose esanti CAT ir GPx veikia sinergiškai su SOD ir suskaido H₂O₂ iki vandens (H₂O) ir molekulinio deguonies (O₂), tokiu būdu sumažindama laisvųjų radikalų poveikį [60, 61].

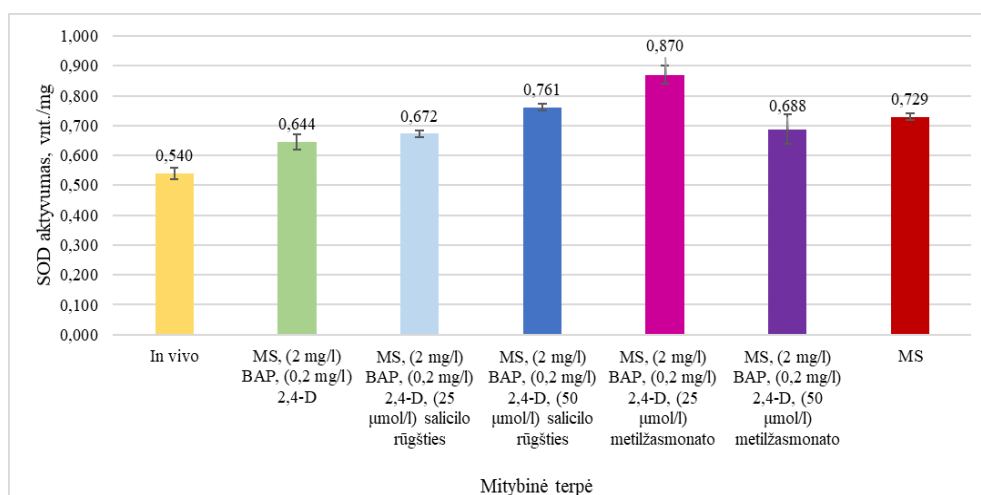
Siekiant įvertinti fermentinį SOD aktyvumą augalinėje žaliavoje tyrime buvo naudotas nitromėlynojo tetrazolio/riboflavino autooksidacijos metodas, kurio metu nustatyta SOD geba slopinti nitromėlynojo tetrazolio redukciją [60].

SOD aktyvumo tyrimo rezultatai brokolių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose pateikti 3.17 pav. Iš gautų rezultatų matyti, jog didžiausiu SOD aktyvumu pasižymėjo brokolių *in vitro* kultūros ekstraktas ($0,639 \pm 0,01$ vnt./mg). Mažiausias SOD aktyvumas buvo nustatytas brokolių *in vivo* ekstrakte ($0,251 \pm 0,02$ vnt./mg). Brokolių kaliaus kultūros, augintos MS terpėje papildytoje 2 mg/l BAP ir 0,2 mg/l 2,4-D augimo regulatoriais, ekstraktas pasižymėjo dvigubai mažesniu SOD aktyvumu ($0,319 \pm 0,01$ vnt./mg), lyginant su brokolių *in vitro* kultūros ekstraktu. Papildžius mitybinę terpę 25 $\mu\text{mol/l}$ salicilo rūgštimi, SOD aktyvumas brokolių kaliaus kultūrų ekstrakte padidėjo 4,4 % ($0,333 \pm 0,011$ vnt./mg), o terpę papildžius 50 $\mu\text{mol/l}$ salicilo rūgštimi – 13,8 % ($0,363 \pm 0,015$ vnt./mg). Mitybinę terpę papildžius 25 $\mu\text{mol/l}$ metilžasmonatu SOD aktyvumas brokolių kaliaus kultūrų ekstrakte padidėjo 29 % ($0,412 \pm 0,05$ vnt./mg), o terpę papildžius 50 $\mu\text{mol/l}$ metilžasmonatu – 6,6 % ($0,340 \pm 0,02$ vnt./mg). Taigi, didžiausios įtakos SOD aktyvumui turėjo 25 $\mu\text{mol/l}$ metilžasmonato elicitorius.



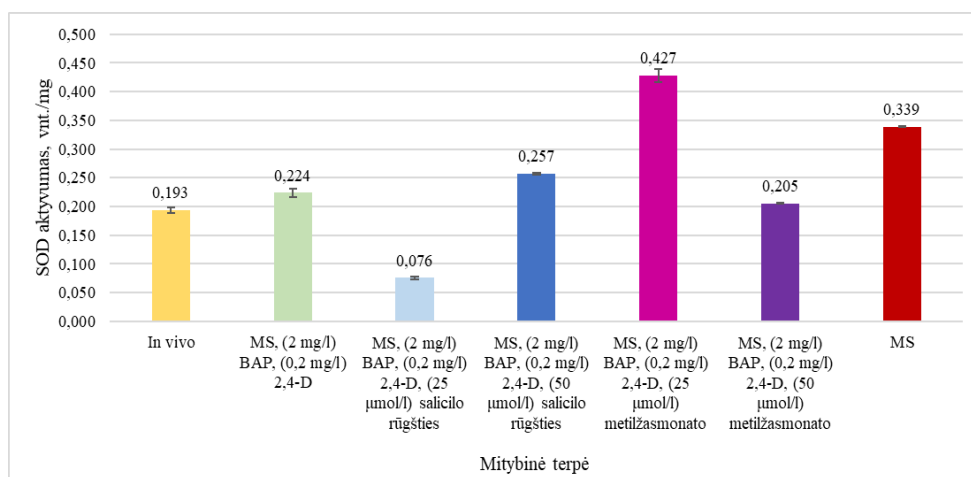
3.17 pav. Superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas brokolių *in vivo* ir kaliaus kultūros *in vitro* ekstraktuose

Ištyrus rapsų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktus ir įvertinus gautus rezultatus, iš 3.18 pav. matyti, kad didžiausias SOD aktyvumas nustatytas rapsų kaliaus kultūros, augintos mitybinėje terpėje papildytoje 50 $\mu\text{mol/l}$ metilžasmonatu, ekstrakte ($0,870 \pm 0,03$ vnt./mg). Mažiausiu SOD aktyvumu pasižymėjo rapsų *in vivo* ekstraktas ($0,540 \pm 0,02$ vnt./mg). Rapsų, augintų MS terpėje *in vitro* sąlygomis, ekstrakte nustatytas 13 % didesnis SOD aktyvumas ($0,729 \pm 0,011$ vnt./mg), lyginant su rapsų kaliaus kultūros, augintos MS terpėje papildytoje 2 mg/l BAP ir 0,2 mg/l 2,4-D augimo regulatoriais, ekstraktu ($0,644 \pm 0,025$ vnt./mg). Tyrimo rezultatai parodė teigiamą pasirinktų elicitorių įtaką SOD aktyvumui rapsų kaliaus kultūrose. Papildžius mitybinę terpę 25 $\mu\text{mol/l}$ salicilo rūgštimi, SOD aktyvumas rapsų kaliaus kultūrų ekstrakte padidėjo 4,4 % ($0,672 \pm 0,01$ vnt./mg), o terpę papildžius 50 $\mu\text{mol/l}$ salicilo rūgštimi – 18,2 % ($0,761 \pm 0,012$ vnt./mg). Mitybinę terpę papildžius 25 $\mu\text{mol/l}$ metilžasmonatu SOD aktyvumas rapsų kaliaus kultūrų ekstrakte padidėjo 35 % ($0,870 \pm 0,03$ vnt./mg), o terpę papildžius 50 $\mu\text{mol/l}$ metilžasmonatu – 6,8 % ($0,688 \pm 0,05$ vnt./mg). Išanalizavus gautus rezultatus nustatyta, kad didžiausios įtakos SOD aktyvumui turėjo 25 $\mu\text{mol/l}$ koncentracijos metilžasmonato elicitorius.



3.18 pav. Superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas rapsų *in vivo* ir kaliaus kultūros *in vitro* ekstraktuose

Įvertinus SOD aktyvumą pipirnių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose, iš 3.19 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad didžiausias SOD aktyvumas nustatytas pipirnių kaliaus kultūros, augintos mitybinėje terpėje papildytoje 50 µmol/l metilžasmonatu, ekstrakto (0,427±0,011 vnt./mg), o mažiausias – pipirnių kaliaus kultūros, augintos mitybinėje terpėje papildytoje 25 µmol/l salicilo rūgštimi, ekstrakto (0,076±0,003 vnt./mg).



3.19 pav. Superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas pipirnių *in vivo* ir kaliaus kultūros *in vitro* ekstraktuose

Pipirnių, augintų MS terpėje *in vitro* sąlygomis, ekstraktas pasižymėjo 75,6 % didesniu SOD aktyvumu nei pipirnių *in vivo* ekstraktas (0,193±0,005 vnt./mg). Šio tyrimo rezultatai parodė, jog mitybinės terpės papildymas elicitoriais, siekiant padidinti SOD aktyvumą pipirnių kaliaus kultūrų ekstraktuose, turėjo teigiamos įtakos. Papildžius mitybinę terpę 50 µmol/l salicilo rūgštimi, pipirnių kaliaus kultūrų ekstrakto SOD aktyvumas padidėjo 14,7 % (0,257±0,001 vnt./mg), o terpę papildžius 25 µmol/l metilžasmonatu – 91 % (0,427±0,0011 vnt./mg).

Palyginus SOD aktyvumą tiriamųjų kryžmažiedžių augalų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose, rapsų kaliaus kultūros, augintos MS terpėje papildytoje 2 mg/l BAP ir 0,2 mg/l 2,4-D augimo reguliatoriais ir 50 µmol/l metilžasmonatu, ekstraktas pasižymėjo didžiausiu fermento aktyvumu (0,870±0,03 vnt./mg). Tyrimo metu nustatyta, jog pasirinkti cheminiai elicitoriai SOD aktyvumo skatinimui buvo veiksmingi, tačiau jų veiksmingumas priklauso nuo naudojamos

koncentracijos ir tiriamojo augalo rūšies. Tyrimo metu nustatyta, kad efektyviausiai SOD aktyvumą tiriamųjų kryžmažiedžių augalų kaliaus kultūrose skatino metilžasmonato elicitorius, kurio koncentracija mitybinėje terpėje buvo 25 $\mu\text{mol/l}$.

3.2.6. Antioksidacinių savybių, įvertintų skirtingais metodais, apibendrinimas

Atliktų tyrimų metu buvo įvertintas brokolių, rapsų ir pipirnių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinis aktyvumas. Augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas buvo iširtas 5 skirtingais metodais. Redukcinių savybių įvertinimo, FRAP bei DPPH radikalo slopinimo metodu įvertinus tiriamųjų kryžmažiedžių augalų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinį aktyvumą, pastebėta, jog didžiausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo tiriamųjų augalų *in vivo* ekstraktai. Redukcinių savybių įvertinimo (A – 0,524 \pm 0,008), FRAP (52,76 \pm 3,8 $\mu\text{mol/l}$) bei DPPH radikalo slopinimo (78,16 \pm 1,5 %) metodu didžiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas pipirnių *in vivo* ekstraktoje. L. Hariprasath ir bendraautorai 2015 m. atlikę DPPH antioksidacinių savybių tyrimą [62], pilkšvalapės žilės (lot. *Senecio candicans*) *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro* taip pat nustatė, kad didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo tiriamojo augalo *in vivo* ekstraktas (81,16 \pm 2,42 %). Taip pat didžiausią gelsvosios soforos (lot. *Sophora flavescens*), augusios *in vivo* sąlygomis, antioksidacinį aktyvumą (84 %), lyginant su augalo kaliaus kultūromis *in vitro*, 2020 m. DPPH metodu nustatė J. S. Park ir bendraautorai [63].

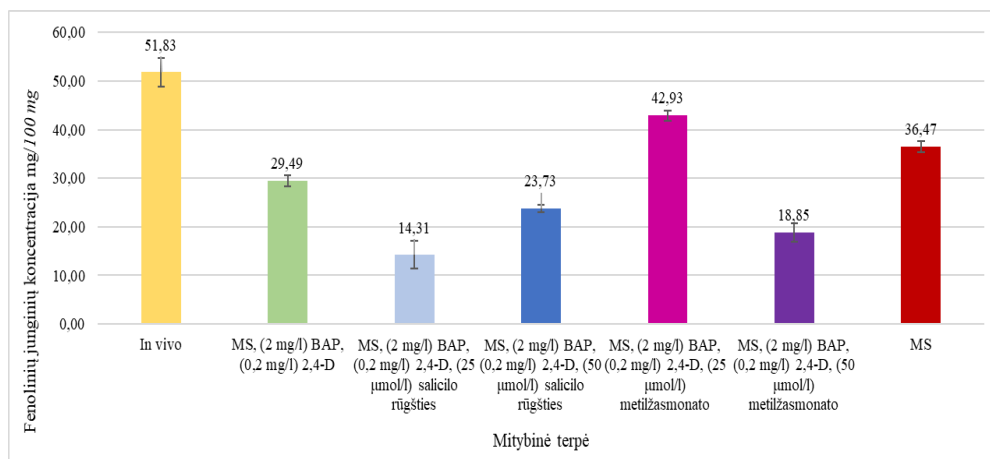
ABTS metodu įvertinus, tiriamųjų kryžmažiedžių augalų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų, antioksidacinį aktyvumą nustatyta, kad stipriausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo brokolių kaliaus kultūros, augintos mitybinėje terpėje papildytoje 50 $\mu\text{mol/l}$ metilžasmonatu, ekstraktas (99,99 \pm 0,01 %). Tyrimų apie brokolių kaliaus kultūrų elicitavimą metilžasmonatu ir jų antioksidacinių savybių įvertinimą ABTS metodu – mažai. Tačiau 2020 m. atliktas tyrimas, parodė, jog žilojo bėručio (lot. *Teucrium polium*) kaliaus kultūrų, augintų MS terpėje papildytoje 2 mg/l BAP ir 1 mg/l 2,4-D augimo reguliatoriais bei 50 $\mu\text{g/l}$ metilžasmonatu, ekstraktai pasižymėjo geriausiomis antioksidacinėmis savybėmis [64].

Įvertinus SOD aktyvumą pasirinktų kryžmažiedžių augalų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose nustatyta, kad didžiausiu SOD aktyvumu pasižymėjo rapsų kaliaus kultūros, augintos mitybinėje terpėje papildytoje 50 $\mu\text{mol/l}$ metilžasmonatu, ekstraktas (0,870 \pm 0,03 vnt./mg). A. M. Farooq ir bendraautorai 2016 m. vykdytame tyrime [65] pranešė, kad metilžasmonato elicitoriaus panaudojimas padėjo sumažinti laisvųjų radikalų koncentraciją tiriamųjų rapsų (lot. *Brassica napus* L.) lapuose. Šis tyrimas parodė, kad metilžasmonatas atlieka reikšmingą vaidmenį reguliuojant daugybę transkripcijos būdų, kurie susiję su oksidacinio streso atsakais, todėl padidėja svarbių antioksidacinių fermentų (SOD, APX, CAT, POD), antrinių metabolitų aktyvumas ir genų ekspresija [65].

3.3. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos nustatymas Folin-Ciocalteu metodu

Augalų ekstraktuose esantys fenoliniai junginiai buvo įvertinti spektrofotometriškai Folin-Ciocalteu metodu. Jo principas pagrįstas fenolinių junginių oksidacija Folin-Ciocalteu reagentu (fosfomolibdeno ir fosfovolframo rūgšties mišiniu), reakcijos metu gelsvos spalvos tirpalas nusidažė mėlyna spalva, dėl tirpale susiformavusių kompleksų. Metodas taikomas bendrai fenolinių junginių koncentracijai įvertinti ne tik augalų ekstraktuose, bet ir maisto produktuose [66].

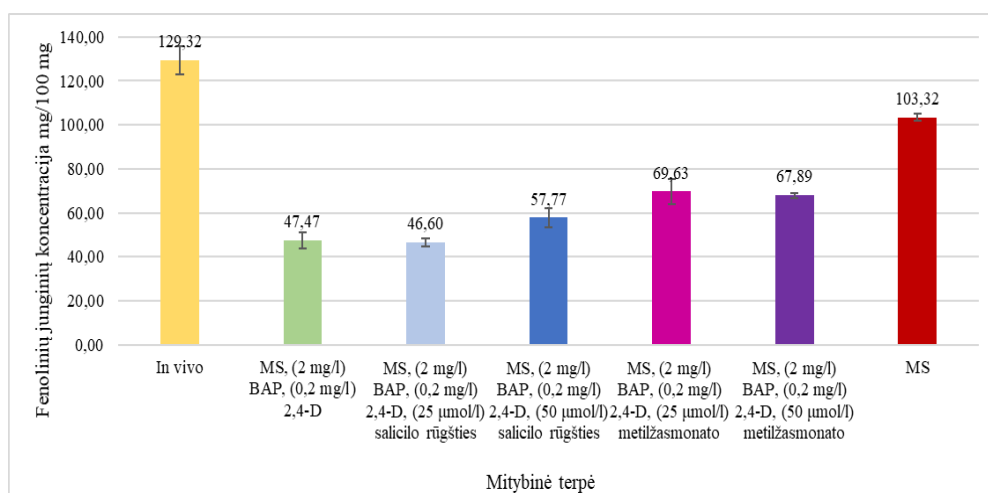
Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos nustatymo, brokolių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose, rezultatai pateikiami 3.20 pav. iš kurių matyti, jog didžiausia fenolinių junginių koncentracija nustatyta brokolių *in vivo* ekstrakto (51,83±2,9 mg/100 mg). Brokolių kaliaus kultūros, augintos mitybinėje terpėje papildytoje 25 µmol/l salicilo rūgštimi, ekstrakto nustatyta mažiausia fenolinių junginių koncentracija (14,31±2,9 mg/100 mg). Brokolių *in vitro* kultūros ekstraktas pasižymėjo 42 % mažesne fenolinių junginių koncentracija (36,47±1,1 mg/100 mg), lyginant su brokolių *in vivo* ekstraktu.



3.20 pav. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimo, brokolių *in vivo* ir kaliaus kultūros *in vitro* ekstraktuose, rezultatai

Įvertinus brokolių kaliaus kultūrų, augintų mitybinėje terpėje papildytoje cheminiais elicitoriais, ekstraktų fenolinių junginių koncentraciją, nustatyta, jog mitybinės terpės papildymas 25 µmol/l koncentracijos metilzasmonato elicitoriumi 46 % padidino brokolių kaliaus kultūrų gebą kaupti fenolinius junginius (42,93±1,04 mg/100 mg). Taigi, elicitorių poveikis priklauso nuo pasirinkto elicitoriaus ir jo koncentracijos, šiuo atveju efektyviausiai fenolinių junginių sintezę brokolių kaliaus kultūrose skatino buvo 50 µmol/l metilzasmonato elicitorius.

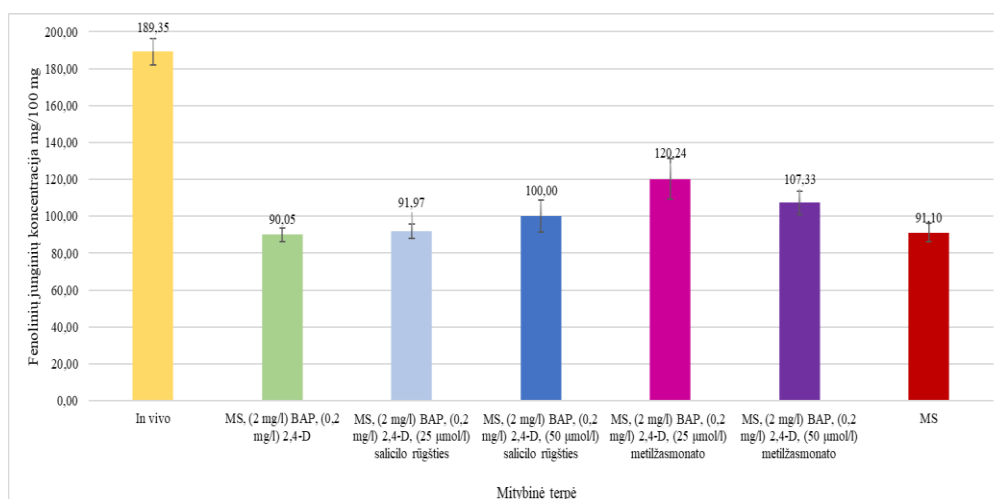
Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos nustatymo, rapsų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose, rezultatai pateikiami 3.21 pav. Iš pateiktų rezultatų galima matyti, jog didžiausia fenolinių junginių koncentracija nustatyta rapsų *in vivo* ekstrakto (129,32±2,9 mg/100 mg).



3.21 pav. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimo, rapsų *in vivo* ir kaliaus kultūros *in vitro* ekstraktuose, rezultatai

Rapsų *in vitro* kultūros ekstraktas pasižymėjo 25 % mažesne fenolinių junginių koncentracija ($103,32 \pm 1,6$ mg/100 mg), lyginant su brokolio *in vivo* ekstraktu, tačiau dvigubai didesnė fenolinių junginių koncentracija, nei rapsų kaliaus kultūros, augintos MS terpėje papildytoje 2 mg/l BAP ir 0,2 mg/l 2,4-D augimo reguliatoriais, ekstrakto ($47,47 \pm 3,68$ mg/100 mg). Iš gautų rezultatų galima matyti, kad papildžius mitybinę terpę 50 μ mol/l koncentracijos salicilo rūgštimi, fenolinių junginių koncentracija rapsų kaliaus kultūrų ekstrakto padidėjo 21,7 % ($57,77 \pm 4,23$ mg/100 mg). Taip pat mitybinę terpę papildžius 25 μ mol/l koncentracijos metilžasmonatu fenolinių junginių koncentracija rapsų kaliaus kultūrų ekstrakto padidėjo 46,7 % ($69,63 \pm 5,54$ mg/100 mg), o terpę papildžius 50 μ mol/l koncentracijos metilžasmonatu – 43 % ($67,89 \pm 1,1$ mg/100 mg). Taigi, tyrimas parodė, kad elicitorių panaudojimas fenolinių junginių kaupimo gebos padidinimui rapsų kaliaus kultūrose gali būti efektyvus, tačiau reikia atsižvelgti į tiriamąjį augalą, naudojamą elicitorių ir jo koncentraciją. Šiame tyrime fenolinių junginių sintezę rapsų kaliaus kultūroje efektyviausiai skatino 50 μ mol/l koncentracijos metilžasmonato elicitorius.

Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos nustatymo, pipirnių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose, rezultatai pateikiami 3.22 pav. iš kurių matyti, jog didžiausia fenolinių junginių koncentracija nustatyta pipirnių *in vivo* ekstrakto ($189,35 \pm 7,14$ mg/100 mg). Dvigubai mažesnė fenolinių junginių koncentracija nustatyta pipirnių *in vitro* kultūros ($91,10 \pm 4,99$ mg/100 mg).



3.22 pav. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimo, pipirnių *in vivo* ir kaliaus kultūros *in vitro* ekstraktuose, rezultatai

Mitybinės terpės papildymas elicitoriais, siekiant padidinti fenolinių junginių koncentraciją pipirnių kaliaus kultūrose *in vitro*, turėjo teigiamos įtakos. Papildžius mitybinę terpę 25 μ mol/l koncentracijos salicilo rūgštimi, fenolinių junginių koncentracija pipirnių kaliaus kultūrų ekstrakto padidėjo 2 % ($91,97 \pm 3,96$ mg/100 mg), o terpę papildžius 50 μ mol/l koncentracijos salicilo rūgštimi – 11 % ($100 \pm 8,75$ mg/100 mg). Mitybinę terpę papildžius 25 μ mol/l koncentracijos metilžasmonatu fenolinių junginių koncentracija pipirnių kaliaus kultūrų ekstrakto padidėjo 33,5 % ($120,24 \pm 11,0$ mg/100 mg), o terpę papildžius 50 μ mol/l koncentracijos metilžasmonatu – 19,2 % ($107,23 \pm 6,35$ mg/100 mg). Taigi, tyrimo rezultatai parodė, jog efektyviausiai fenolinių junginių koncentraciją pipirnių kaliaus kultūroje padidino 50 μ mol/l metilžasmonato elicitorius.

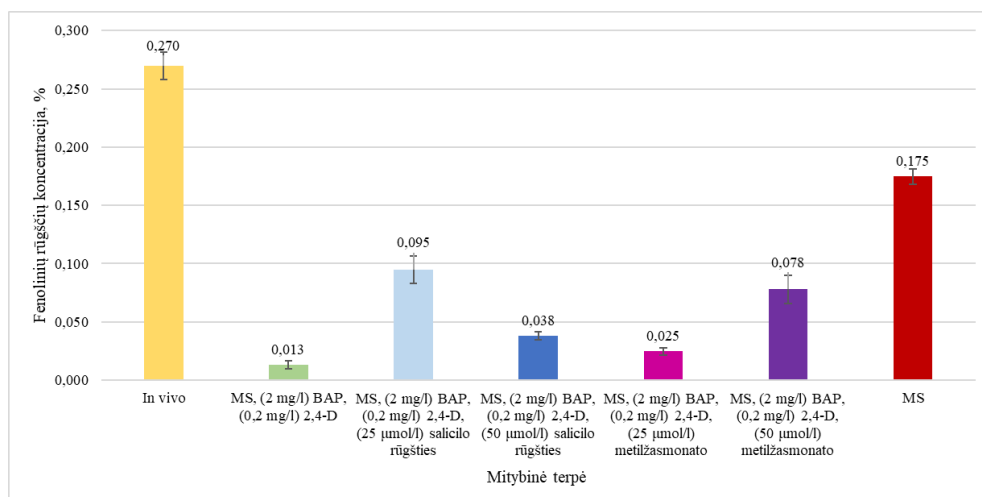
Apibendrinus tyrimo rezultatus nustatyta, kad efektyviausiai fenolinių junginių biosintezę, visų tiriamųjų kryžmažiedžių augalų kaliaus kultūrose, skatino 25 μ mol/l koncentracijos metilžasmonato elicitorius. Didžiausia fenolinių junginių koncentracija nustatyta pipirnių kaliaus kultūros, augintos

mitybinėje terpėje papildytoje 25 $\mu\text{mol/l}$ koncentracijos metilžasmonatu, ekstrakto (120,24 \pm 11,0 mg/100 mg). Tačiau didžiausias fenolinių junginių koncentracijos padidėjimas 46,7 % (69,63 \pm 5,54 mg/100 mg), naudojant 25 $\mu\text{mol/l}$ koncentracijos metilžasmonato elicitorių, nustatytas rapsų kaliaus kultūroje. Fenolinių junginių koncentracija kryžmažiedžių augalų kaliaus kultūrose mažėjo, didėjant elicitoriaus koncentracijai. Tokia fenolinių junginių koncentracijos mažėjimo tendencija nustatyta ir 2019 m. M. S. Iqobal atliktame tyrime [67]. Tyrimo metu nustatyta, kad bendras fenolinių junginių bei kvercetino kiekis buvo didžiausias svogūno (lot. *Allium cepa* L.) kaliaus kultūrose, augintose mitybinėje terpėje papildytoje 100 μM metilžasmonato elicitoriumi. Fenolinių junginių ir kvercetino koncentracija mažėjo, didinant metilžasmonato koncentraciją mitybinėje terpėje. Tokie veiksniai kaip netinkamas mitybinės terpės ir elicitorių pasirinkimas, netinkamos elicitoriaus koncentracijos neigiamai veikia fenolinių junginių sintezės procesus [68]. Preliminarūs tyrimai parodė, kad antrinių metabolitų sintezės skatinimas cheminiais elicitoriais priklauso nuo pasirinkto augalo rūšies ir auginamos kultūros [69].

3.4. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos nustatymas

Bendras hidroksicinamono rūgščių kiekis buvo nustatytas taikant Europos farmakopėjos devintojo leidimo metodą iš monografijos „*Fraxini folium*“, naudojant kavos rūgštį vietoje chlorogeno rūgšties [70]. Bendras hidroksicinamono rūgščių kiekis buvo įvertintas spektrofotometriiniu metodu naudojant Arnou reagentą (natrio nitrito ir natrio molibdato vandeninį tirpalą). Hidroksicinamono rūgščių procentas, buvo nustatytas pritaikius lygtį, gautą iš kavos rūgšties standartinės kalibracinės kreivės [70]. Fenolinių rūgščių koncentracija buvo nustatyta rapsų ir pipirnių augalinėje žaliavoje.

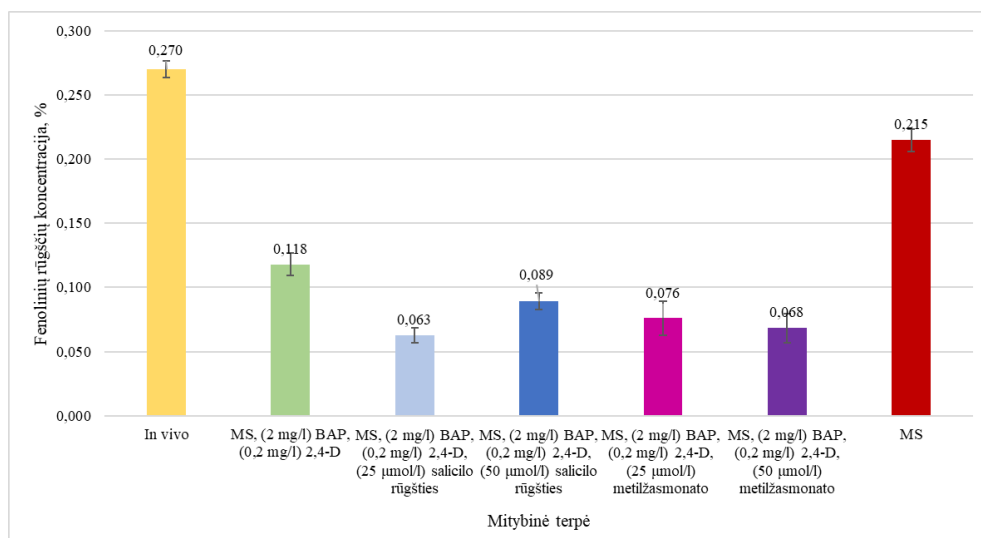
Rapsų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose įvertinus bendrąją fenolinių rūgščių koncentraciją, buvo gauti rezultatai, kurie pateikiami 3.23 pav. Iš pateiktų rezultatų matyti, kad didžiausia fenolinių rūgščių koncentracija nustatyta rapsų *in vivo* ekstraktoje (0,270 \pm 0,012 %), o mažiausia – rapsų kaliaus kultūros, augintos MS terpėje papildytoje 2 mg/l BAP ir 0,2 mg/l 2,4-D augimo reguliatoriais, ekstraktoje (0,013 \pm 0,003 %). Rapsų *in vitro* kultūros ekstraktas pasižymėjo 54 % mažesne fenolinių rūgščių koncentracija (0,175 \pm 0,007 %), lyginant su rapsų *in vivo* ekstraktu.



3.23 pav. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos nustatymo, rapsų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose, rezultatai

Tyrimo metu nustatyta, kad papildžius mitybinę terpę 25 $\mu\text{mol/l}$ koncentracijos salicilo rūgštimi, fenolinių rūgščių koncentracija rapsų kaliaus kultūrų ekstraktoje padidėjo 7,3 karto (0,095 \pm 0,012 %),

o terpę papildžius 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentracijos salicilo rūgštimi – 3 kartus ($0,038\pm 0,003$ %). Rapsų kaliaus kultūrų mitybinę terpę papildžius 25 $\mu\text{mol/l}$ koncentracijos metilžasmonatu fenolinių rūgščių koncentracija rapsų kaliaus kultūrų ekstrakto padidėjo 2 kartus ($0,025\pm 0,003$ %), o terpę papildžius 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentracijos metilžasmonatu – 6 kartus ($0,078\pm 0,012$ %).



3.24 pav. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos nustatymo, pipirnių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose, rezultatai

Iš pateiktų rezultatų (žr. 3.24 pav.) nustatyta, jog didžiausia fenolinių junginių koncentracija pasižymėjo pipirnių *in vivo* ekstraktas ($0,270\pm 0,007$ %), o 25,5 % mažesnė fenolinių rūgščių koncentracija nustatyta pipirnių *in vitro* kultūros ekstrakto ($0,215\pm 0,009$ %). Pipirnių kaliaus kultūros, augintos MS terpėje papildytoje 2 mg/l BAP ir 0,2 mg/l 2,4-D augimo reguliatoriais, ekstraktas pasižymėjo 82,2 % mažesne fenolinių rūgščių koncentracija ($0,118\pm 0,009$ %), nei minėtas pipirnių *in vitro* kultūros ekstraktas. Iš pateiktų rezultatų matyti, kad mitybinės terpės papildymas cheminiais elicitoriais neturėjo teigiamos įtakos fenolinių rūgščių koncentracijos padidėjimui.

Apibendrinus gautus rezultatus nustatyta, kad fenolinių rūgščių gamybą rapsų kaliaus kultūroje efektyviausiai skatino 25 $\mu\text{mol/l}$ salicilo rūgšties elicitorius. Padidinus salicilo rūgšties koncentraciją terpėje iki 50 $\mu\text{mol/l}$, fenolinių rūgščių koncentracija rapsų kaliaus kultūros ekstrakto sumažėjo 2,5 karto. Fenolinių rūgščių kiekio sumažėjimą, didinant salicilo rūgšties koncentraciją vaistinio šalavijo (lot. *Salvia officinalis*) augalų kultūrose pastebėjo ir apie tai 2015 m. pranešė R. S. Ejtahed su kolegomis [71]. Apie teigiamą salicilo rūgšties poveikį fenolinių junginių gamybai, 2019 m. pranešė T. Khan ir bendraautorai [72]. Tyrime teigiama, kad salicilo rūgšties elicitorius, vaistinio arūto (lot. *Fagonia indica*) kalio kultūrose, paskatino fenolinių junginių, tokių kaip galo rūgšties, kofeino rūgšties, katechino, kaemferolio, izorhamnetino, apigenino ir kt., kaupimąsi [72].

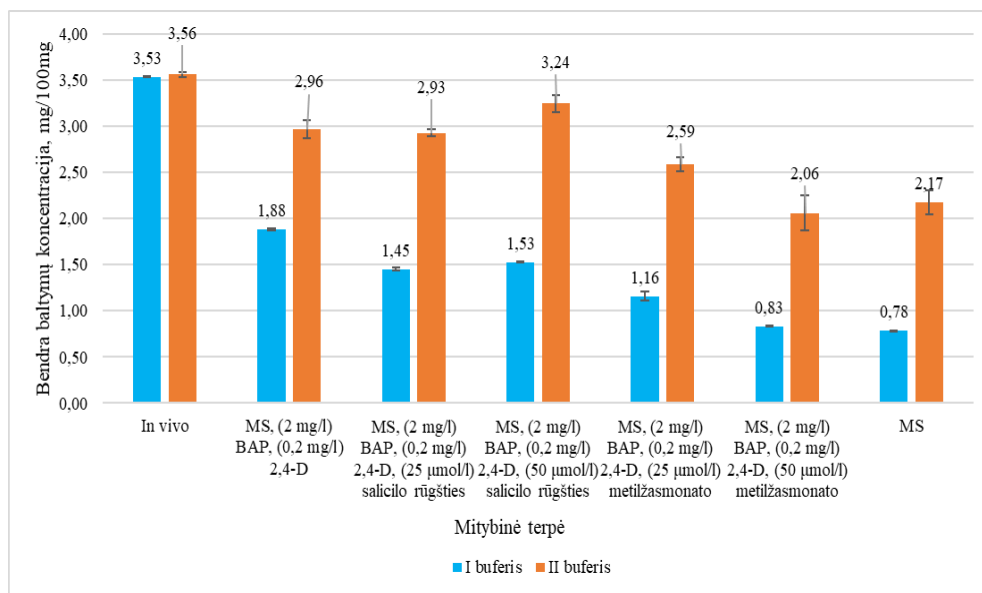
Pipirnių kaliaus kultūroje pasirinkti elicitoriai fenolinių rūgščių sintezę veikė neigiamai. Mokslinėje literatūroje teigiama, kad elicitoriaus efektyvumas labai priklauso nuo augalo rūšies, jei pasirenkamas netinkamas elicitorius tiriamojo augalo antrinių metabolitų skatinimui, jis sukelia neveiksmingą elicitavimą [37]. Pavyzdžiui, iš mielių ekstrakto gautas elicitorius neinicijuoja fenilpropanoido sintezės kelio vijoklinės orchidėjos (lot. *Vanilla planifolia*) ląstelių suspensijose. Tačiau tas pats elicitorius inicijuoja fitoaleksino gamybą sojos pupelių (lot. *Glycine max*) kultūroje ir alkaloidų gamybą tankiojo vingrio (lot. *Thalictrum dasycarpum*) ir geltonžiedės ešolcijos (lot. *Eschscholzia californica*) kultūrose [73].

3.5. Baltymų koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu

Žinoma, kad laisvuosius radikalus ląstelėse gali sunaikinti įvairūs antriniai metabolitai, tačiau tą pačią funkciją atlieka ir antioksidaciniai fermentai (superoksido dismutazė SOD, katalazės CAT, peroksidazė POD ir glutationo peroksidazė) [74]. Skirtingi antioksidaciniai baltymai turi skirtingus antioksidacinius mechanizmus [75]. Bradfordo metodo kolorimetrinis tyrimas – greitas ir jautrus metodas skirtas bendrai baltymų koncentracijai mėginyje nustatyti. Jis pagrįstas Bradfordo reagento (Coomassie briliantinio mėlio G-250 dažo) absorbcijos maksimumo poslinkiu nuo 465 iki 595 nm po to, kai jis prisijungia prie denatūruotų baltymų tirpale [76].

Tirpalo spalva tyrimo metu kito nuo rudos iki tamsiai mėlynos spalvos, priklausomai nuo baltymų koncentracijos tirpale.

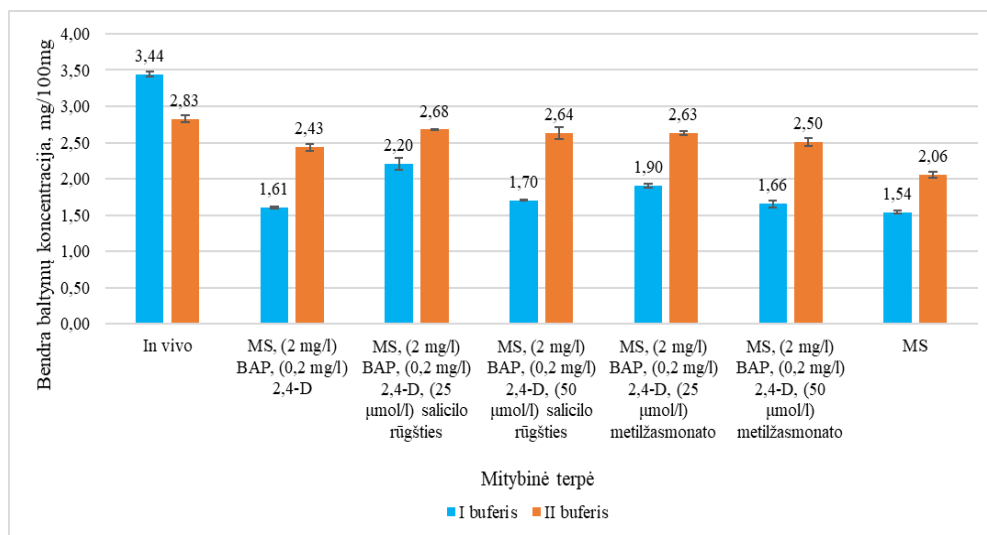
Bendros baltymų koncentracijos nustatymo, brokolių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose, rezultatai pateikiami 3.25 pav. Didžiausia baltymų koncentracija nustatyta brokolių *in vivo* ekstrakto (3,56±0,024 mg/100 mg), kai baltymų ekstrakcijai buvo naudotas II buferis (pH=10). Iš pateiktų rezultatų galima matyti, jog daugiausiai baltymų, iš brokolių kaliaus kultūrų, buvo ekstrahuota naudojant II buferį (pH=10).



3.25 pav. Baltymų koncentracijos nustatymo brokolių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose Bradfordo metodu rezultatai (baltymų ekstrakcijai buvo naudotas I buferis ir II buferis)

Nagrinėjant 3.25 pav. pateiktus rezultatus pastebėtas neigiamas salicilo rūgšties ir metilžasmonato elicitorių poveikis baltymų sintezei brokolių kaliaus kultūrose. Tačiau II buferio brokolių kaliaus kultūrų ekstrakto nustatytas 9 % baltymų koncentracijos padidėjimas, kai elicitavimui buvo naudota 50 μmol/l salicilo rūgštis.

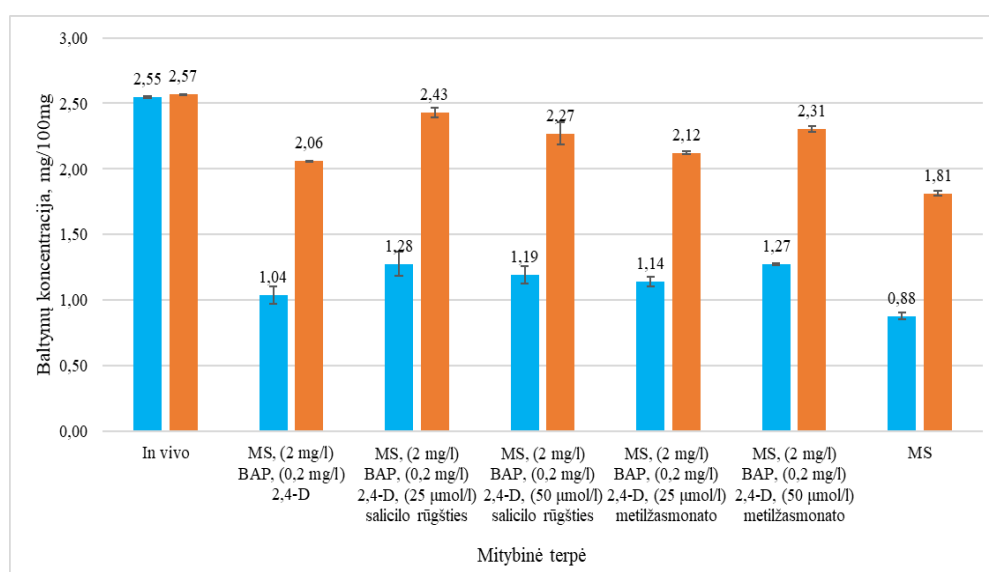
Panašius rezultatus, galima pastebėti įvertinus bendrą baltymų koncentraciją rapsų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose, rezultatai pateikiami 3.26 pav. Pagrindinis skirtumas – mitybinės terpės papildymas 25, 50 μmol/l koncentracijos salicilo rūgšties ir metilžasmonato elicitoriais, padidino baltymų koncentraciją rapsų kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose.



3.26 pav. Baltymų koncentracijos nustatymo rapsų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose Bradfordo metodu rezultatai (baltymų ekstrakcijai buvo naudotas I buferis ir II buferis)

Papildžius mitybinę terpę 25 μmol/l salicilo rūgštimi, baltymų koncentracija rapsų kaliaus kultūrų I buferio (pH=6) ekstrakte padidėjo 36,6 % (2,20±0,083 mg/100 mg), o II buferio (pH=10) ekstrakte – 10 % (2,68±0,01 mg/100 mg). Terpę papildžius 50 μmol/l salicilo rūgštimi, baltymų koncentracija rapsų kaliaus kultūrų I buferio ekstrakte padidėjo 5,6 % (1,70±0,01 mg/100 mg), o II buferio ekstrakte – 8,6 % (2,64±0,083 mg/100 mg). Rapsų kaliaus kultūrų mitybinę terpę papildžius 25 μmol/l koncentracijos metilzasmonatu baltymų koncentracija rapsų kaliaus kultūrų I buferio ekstrakte padidėjo 18 % (1,90±0,032 mg/100 mg), o II buferio ekstrakte – 8,2 % (2,63±0,026 mg/100 mg). Terpę papildžius 50 μmol/l koncentracijos metilzasmonatu baltymų koncentracija rapsų kaliaus kultūrų I buferio ekstrakte padidėjo 3 % (1,66±0,049 mg/100 mg), o II buferio ekstrakte – 2,9 % (2,50±0,058 mg/100 mg).

Bendros baltymų koncentracijos nustatymo, pipirnių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose, rezultatai pateikiami 3.27 pav.



3.27 pav. Baltymų koncentracijos nustatymo pipirnių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose Bradfordo metodu rezultatai (baltymų ekstrakcijai buvo naudotas I buferis ir II buferis)

Įvertinus bendrą baltymų koncentraciją pipirnių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose, pastebimi tie patys dėsniniai, kaip brokolių bei rapsų tyrime. Šiuo atveju, taip pat matomas teigiamas elicitorių poveikis baltymų sintezei pipirnių kaliaus kultūrose. Papildžius mitybinę terpę 25 $\mu\text{mol/l}$ koncentracijos salicilo rūgštimi, baltymų koncentracija pipirnių kaliaus kultūrų I buferio (pH=6) ekstrakto padidėjo 23 % ($1,28 \pm 0,09$ mg/100 mg), o II buferio (pH=10) ekstrakto – 18 % ($2,43 \pm 0,037$ mg/100 mg). Terpę papildžius 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentracijos salicilo rūgštimi, baltymų koncentracija pipirnių kaliaus kultūrų I buferio ekstrakto padidėjo 14,4 % ($1,19 \pm 0,066$ mg/100 mg), o II buferio ekstrakto – 10,2 % ($2,27 \pm 0,085$ mg/100 mg). Pipirnių kaliaus kultūrų mitybinę terpę papildžius 25 $\mu\text{mol/l}$ koncentracijos metilžasmonatu baltymų koncentracija pipirnių kaliaus kultūrų I buferio ekstrakto padidėjo 9,6 % ($1,14 \pm 0,036$ mg/100 mg), o II buferio ekstrakto – 2,9 % ($2,12 \pm 0,01$ mg/100 mg). Terpę papildžius 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentracijos metilžasmonatu baltymų koncentracija pipirnių kaliaus kultūrų I buferio ekstrakto padidėjo 22,1 % ($1,27 \pm 0,005$ mg/100 mg), o II buferio ekstrakto – 12,1 % ($2,31 \pm 0,022$ mg/100mg).

Apibendrinus rezultatus, didžiausia baltymų koncentracija nustatyta brokolių *in vivo* I buferio ekstrakto ($3,53 \pm 0,007$ mg/100 mg). Brokolių *in vivo* I buferio ekstraktas ($3,53 \pm 0,007$ mg/100 mg) pasižymėjo 2,6 % didesne nei brokolių ($3,44 \pm 0,036$ mg/100 mg) ir 37,7 % didesne ($2,57 \pm 0,036$ mg/100 mg) nei pipirnių baltymų koncentracija. Daugiau baltymų buvo ekstrahuota iš tiriamųjų augalų *in vitro* kultūrų naudojant II buferį (pH=10), tačiau didesnę elicitorių poveikį tiriamiesiems augalams ir jų kaupiamiems baltymams atspindėjo I buferio ekstraktai. 2021 m. R. Nugraha atliktame tyrime taip pat teigiama [77], kad aukšto pH buferiai gali ekstrahuoti didesnes baltymų koncentracijas nei žemo pH buferiai. Teigiama, jog aukšto pH buferiai pakeičia baltymų krūvį į neigiamą, taip padidindami vandens surišimo pajėgumą ir pagerindami baltymų tirpumą. Manoma, kad druskos vaidina svarbų vaidmenį gerinant buferių ekstrahavimo savybes, joms sąveikaujant su priešingais krūviais esančiais baltymų paviršiuose [77].

Elicitorių poveikis tiriamiesiems augalams buvo skirtingas. Brokolių kaliaus kultūrų baltymų sintezę elicitoriai veikė neigiamai, o rapsų ir pipirnių kaliaus kultūras – teigiamai. Didžiausiu teigiamu elicitavimo efektyvumu pasižymėjo 25 $\mu\text{mol/l}$ salicilo rūgšties elicitorius, kuris rapsų kaliaus kultūrų I buferio ekstrakto, baltymų koncentraciją padidino 36,6 %. 2006 m. atliktas tyrimas tai pat parodė [78], kad saldžiųjų vyšnių (lot. *Prunus avivum* L. cv. *Hongdeng*) apdorojimas salicilo rūgšties elicitoriumi, padidino bendrą saldžiųjų vyšnių ekstrakto baltymų kiekį. Atlikto kryžmažiedžių augalų tyrimo metu nustatyta, kad didinant salicilo rūgšties koncentraciją mitybinėje terpėje baltymų koncentracija tiriamųjų augalų kaliaus kultūrų ekstraktuose sumažėjo. Tiriamųjų augalų kaliaus kultūrų mitybinės terpės papildymas didesne metilžasmonato koncentracija sumažino baltymų koncentraciją rapsų kaliaus kultūrose, o pipirnių kaliaus kultūrose – padidino.

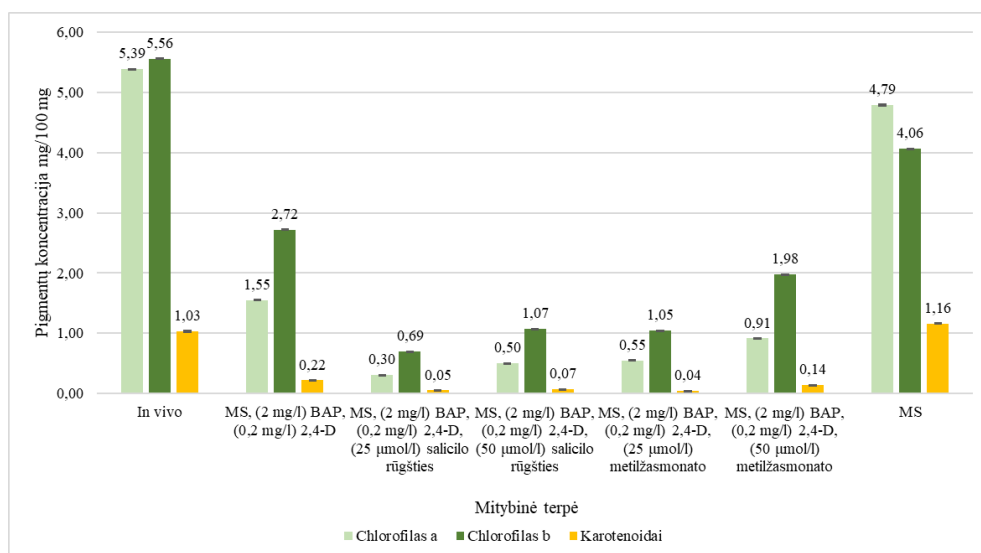
3.6. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų nustatymas

Chlorofilai ir karotenoidai yra dvi pagrindinės augaluose ir dumbliuose randamų fotosintezės pigmentų klasės. Karotenoidai yra natūralūs pigmentai, dalyvaujantys fiziologiniuose procesuose, tokiuose kaip kvėpavimas, fotosintezė ir augimo bei vystymosi reguliavimas. Dėl esminio vaidmens fotosintezėje chlorofilai – labiausiai fotosintezę skatinantys pigmentai.

2019 m. H. A. Allalou atliktame tyrime pranešta, kad šie fotocheminiai junginiai pasižymi antioksidaciniu pajėgumu pašalinant laisvuosius radikalus ir užkertant kelią lipidų oksidacijai augaluose [79]. Chlorofilas *a* ir *b* yra du pagrindiniai pigmentai, dalyvaujantys fotosintezėje.

Chlorofilas *a* yra pagrindinis fotosintezės pigmentas, sulaikantis šviesos energiją ir skleidžiantis didelės energijos elektronus į dvi fotosistemas P₆₈₀ ir P₇₀₀. Chlorofilas *b* yra papildomas pigmentas, sulaikytą energiją perduodantis chlorofilui *a*. Chlorofilų antioksidacinės savybės labai priklauso nuo chlorofilo darinio tipo [80].

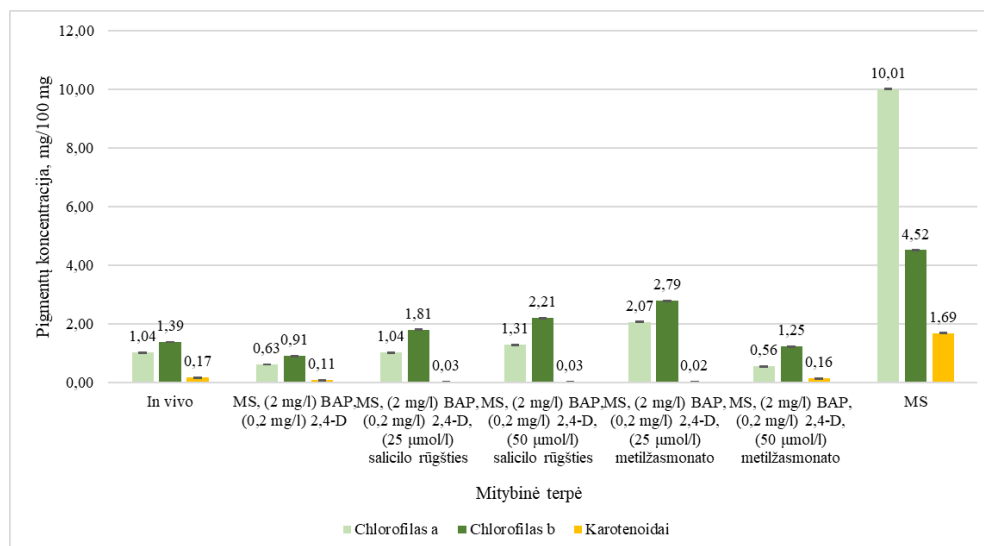
Įvertinus sintetinių pigmentų koncentraciją brokolių *in vivo* ir kaliaus kultūros *in vitro* ekstraktuose iš gautų rezultatų (žr. 3.28 pav.) matyti, kad didžiausia chlorofilo *a* (5,39±0,003 mg/100 mg) ir chlorofilo *b* (5,56±0,006 mg/100 mg) koncentracija nustatyta brokolių *in vivo* ekstrakte. Didžiausia karotinoidų koncentracija (1,16±0,005 mg/100 mg) pasižymėjo brokolių *in vitro* kultūros ekstraktas.



3.28 pav. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų įvertinimo, brokolių *in vivo* ir kaliaus kultūros *in vitro* ekstraktuose, rezultatai

Mitybinės terpės papildymas salicilo rūgšties ir metilzasmonato elicitoriais, siekiant padidinti sintetinių pigmentų koncentraciją brokolių kaliaus kultūrose turėjo neigiamos įtakos pigmentų sintezei. Elicitoriai, brokolių kaliaus kultūrose sumažino sintetinio chlorofilo *a* koncentraciją 1,7-5,2 kartus, chlorofilo *b* – 1,4-4 kartus, o karotinoidų – 1,6-5,5 kartus.

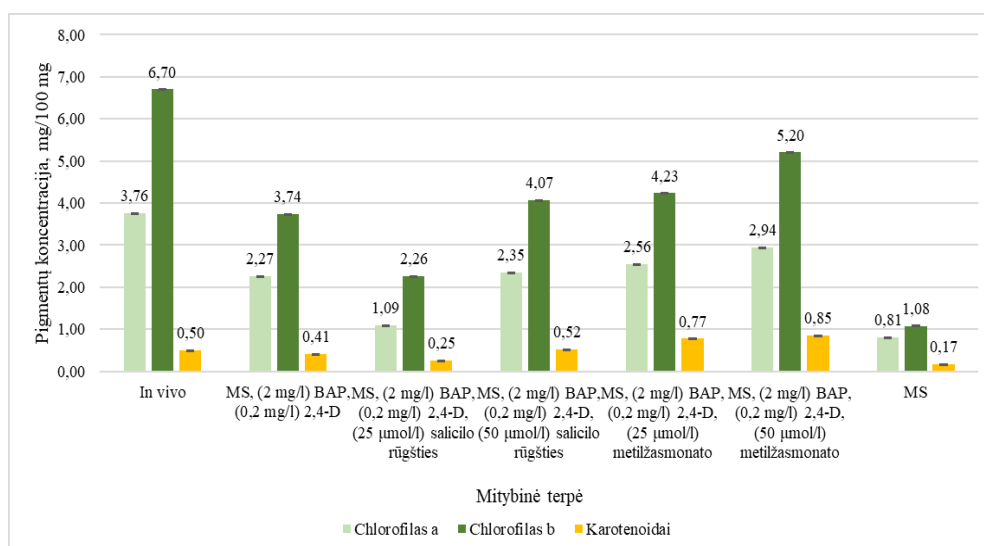
Įvertinus sintetinių pigmentų koncentraciją rapsų *in vivo* ir kaliaus kultūros *in vitro* ekstraktuose iš gautų rezultatų (žr. 3.29 pav.) matyti, kad didžiausia chlorofilo *a* (10,01±0,006 mg/100 mg) ir chlorofilo *b* (4,52±0,005 mg/100 mg) ir karotinoidų koncentracija (1,69±0,003 mg/100 mg) pasižymėjo rapsų *in vitro* kultūros ekstraktas. Nustatyta chlorofilo *a* koncentracija buvo dvigubai didesnė už chlorofilo *b* koncentraciją. Tyrimo metu nustatyta, kad didesnė salicilo rūgšties koncentracija (50 μmol/l) mitybinėje terpėje lėmė nuo 2 iki 2,5 karto didesnę sintetinio chlorofilo *a* (1,31±0,004 mg/100 mg) ir chlorofilo *b* (2,21±0,001 mg/100 mg) koncentraciją rapsų kaliaus kultūros ekstrakte. Priešingai salicilo rūgšties elicitoriui, metilzasmonato elicitoriaus mažesnė koncentracija (25 μmol/l) mitybinėje terpėje lėmė 3 kartais didesnę chlorofilo *a* (2,07±0,008 mg/100 mg) ir chlorofilo *b* (2,79±0,001 mg/100 mg) koncentraciją rapsų kaliaus kultūros ekstrakte.



3.29 pav. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų įvertinimo, rapsų *in vivo* ir kaliaus kultūros *in vitro* ekstraktuose, rezultatai

Salicilo rūgštis elicitorius neskatino karotinoidų biosintezės rapsų kaliaus kultūrose ir netgi atvirkščiai – veikė neigiamai. Metilžasmonato 50 μmol/l koncentracija mitybinėje terpėje lėmė 45 % karotinoidų koncentracijos padidėjimą (0,16±0,006 mg/100 mg) rapsų kaliaus kultūros ekstrakto, o 25 μmol/l metilžasmonato koncentracija karotinoidų koncentraciją sumažino (0,02±0,002 mg/100 mg).

Įvertinus sintetinių pigmentų koncentraciją pipirnių *in vivo* ir kaliaus kultūros *in vitro* ekstraktuose iš gautų rezultatų, kurie pateikti 3.30 pav. matyti, kad didžiausia chlorofilo *a* (3,76±0,001 mg/100 mg) ir chlorofilo *b* (6,70±0,001 mg/100 mg) koncentracija pasižymėjo pipirnių *in vivo* ekstraktas. Nustatyta chlorofilo *b* koncentracija buvo dvigubai didesnė už chlorofilo *a* koncentraciją. Didžiausia karotinoidų koncentracija nustatyta pipirnių kaliaus kultūros, augintos mitybinėje terpėje papildytoje 50 μmol/l koncentracijos metilžasmonatu, ekstrakto (0,85±0,003 mg/100 mg).



3.30 pav. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų įvertinimo, pipirnių *in vivo* ir kaliaus kultūros *in vitro* ekstraktuose, rezultatai

Įvertinus elicitorių poveikį pipirnių kaliaus kultūrų sintetinių pigmentų koncentracijai nustatyta, kad 50 μmol/l koncentracijos salicilo rūgštis padidino sintetinio chlorofilo *a* koncentraciją 3,5 %

($2,35 \pm 0,001$ mg/100 mg), chlorofilo *b* koncentraciją padidino 8,8 % ($4,07 \pm 0,002$ mg/100 mg), o karotinoidų – 26,8 % ($0,52 \pm 0,004$ mg/100 mg). Mitybinės terpės papildymas 25 ir 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentracijos metilzasmonato elicitoriumi turėjo teigiamos įtakos pigmentų sintezei. Didesnė (50 $\mu\text{mol/l}$) metilzasmonato koncentracija mitybinėje terpėje lėmė didesnę sintetinių pigmentų koncentraciją, nei mažesnė (25 $\mu\text{mol/l}$) metilzasmonato koncentracija. Didesnės koncentracijos metilzasmonato elicitorius 30 % padidino sintetinio chlorofilo *a* koncentraciją ($2,94 \pm 0,004$ mg/100 mg), chlorofilo *b* koncentraciją padidino 39 % ($5,20 \pm 0,001$ mg/100 mg), o karotinoidų koncentracija padidėjo dvigubai ($0,85 \pm 0,003$ mg/100 mg).

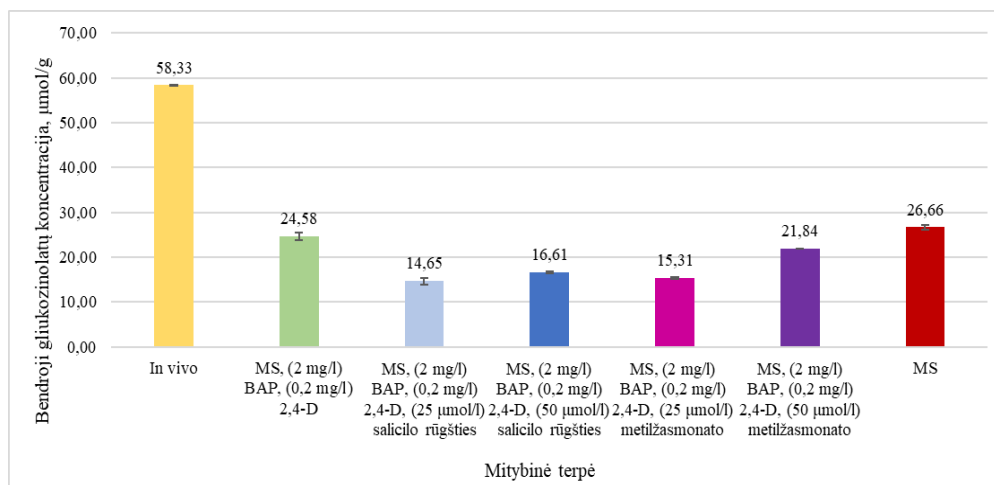
Taigi, apibendrinus tyrimo rezultatus, didžiausia sintetinių pigmentų koncentracija pasižymėjo rapsų *in vitro* kultūra. Nustatyta, kad mitybinės terpės papildymas cheminiais elicitoriais sumažino brokolių kaliaus kultūrų sintetinių pigmentų koncentraciją. S. Jung atliktame tyrime [81] taip pat buvo pastebėtas reikšmingas chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijų sumažėjimas apdorojus baltažiedžio vairo (lot. *Arabidopsis thaliana*) lapus metilzasmonato elicitoriumi.

Tačiau, atliktas kryžmažiedžių augalų tyrimas parodė, kad salicilo rūgštis ir metilzasmonato elicitoriai padidino sintetinių pigmentų koncentraciją rapsų ir pipirnių kaliaus kultūrose. 2016 m. atliktuose tyrimuose taip pat buvo nustatyta didesnė chlorofilo *a* ir *b* koncentracija datulinio finiko (lot. *Phoenix dactylifera*) ir daržinės baladūnės (lot. *Atriplex aucheri*) ūglių kultūrose, apdorotose salicilo rūgšties elicitoriumi [82, 83]. Be to, daržinės baladūnės (lot. *Atriplex aucheri*) kultūros pasižymėjo išaugusia karotinoidų koncentracija [82]. Padidėjęs karotinoidų sintezės *in vitro* kultūrose intensyvumas, kurį inicijavo salicilo rūgšties elicitorius, buvo įrodytas 2017 m. bombėjinio svaidenio (lot. *Momordica dioica*) ląstelių kultūrose [84]. 2015 m. buvo pranešta apie metilzasmonato elicitoriaus įtaką bendrai karotinoidų koncentracijai penkialapės kleomės (lot. *Cleome rosea*) kaliaus kultūrose [85].

3.7. Gliukozinolatų koncentracijos nustatymas

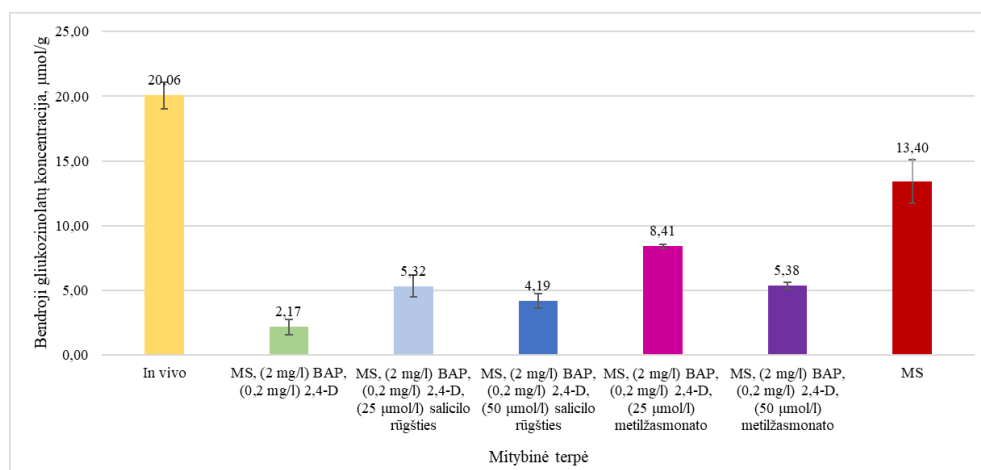
Bendra gliukozinolatų koncentracija tiriamuosiuose kryžmažiedžiuose augaluose buvo įvertinta pritaikius 2017 m. aprašytą I. Mawlong spektrofotometrinių metodą [86]. Šio metodo privalumai – pigus, nesudėtingas ir greitas metodas.

Ištirus brokolių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktus, iš 3.31 pav. matyti, kad didžiausia gliukozinolatų koncentracija pasižymėjo brokolių *in vivo* ekstraktas ($58,33 \pm 0,17$ $\mu\text{mol/g}$). Brokolių *in vitro* kultūros ekstrakto gliukozinolatų koncentracija buvo dvigubai mažesnė ($26,66 \pm 0,59$ $\mu\text{mol/g}$), nei brokolių *in vivo* ekstrakto. Iš gautų rezultatų galima pastebėti, kad mitybinės terpės papildymas salicilo rūgšties ir metilzasmonato elicitoriais nepadidino brokolių kaliaus kultūrų *in vitro* sintetinių gliukozinolatų koncentracijos ir netgi atvirkščiai – ją sumažino nuo 12,5 iki 67,8 %.



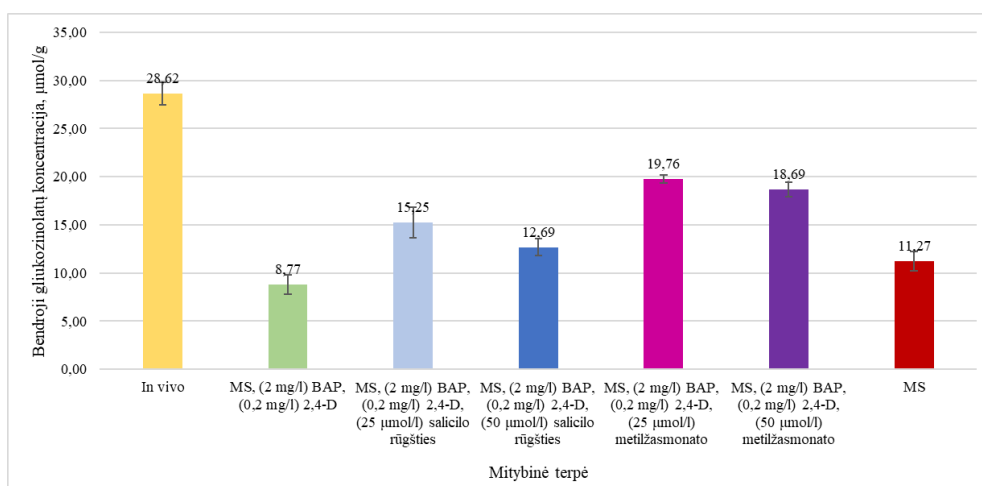
3.31 pav. Brokolių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų gliukozinolatų koncentracijos įvertinimo rezultatai

Įvertinus gliukozinolatų koncentraciją rapsų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose, iš pateiktų rezultatų matyti (žr. 3.32 pav.), kad didžiausia gliukozinolatų koncentracija nustatyta rapsų *in vivo* ekstraktoje ($20,06 \pm 1,01$ μmol/g).



3.32 pav. Rapsų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų gliukozinolatų koncentracijos įvertinimo rezultatai

Rapsų *in vivo* ekstraktoje nustatyta gliukozinolatų koncentracija buvo 50 % didesnė, nei rapsų *in vitro* kultūros ekstraktoje ($13,40 \pm 1,68$ μmol/g). Įvertinus salicilo rūgšties elicitavimo poveikį sintetinamų gliukozinolatų koncentracijai, nustatyta, kad didesnė salicilo rūgšties koncentracija sintetinamų gliukozinolatų koncentraciją padidino 2 kartus ($4,19 \pm 0,59$ μmol/g), o mažesnė salicilo rūgšties koncentracija – 2,45 karto ($5,32 \pm 0,25$ μmol/g). Taigi, mažesnė salicilo rūgšties koncentracija mitybinėje terpėje lėmė didesnę sintetinamų gliukozinolatų koncentraciją. Tyrimo metu nustatyta, kad 25 μmol/l metilzasmonato koncentracija efektyviai skatino gliukozinolatų sintezę rapsų kaliaus kultūroje ir gliukozinolatų koncentraciją padidino 3,9 karto. Didesnė (50 μmol/l) metilzasmonato koncentracija gliukozinolatų koncentraciją padidino 2,48 karto. Taigi, metilzasmonato elicitorius gliukozinolatų sintezę rapsų kaliaus kultūrose skatino efektyviau, nei salicilo rūgšties elicitorius.



3.33 pav. Pipirnių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų gliukozinolatų koncentracijos įvertinimo rezultatai

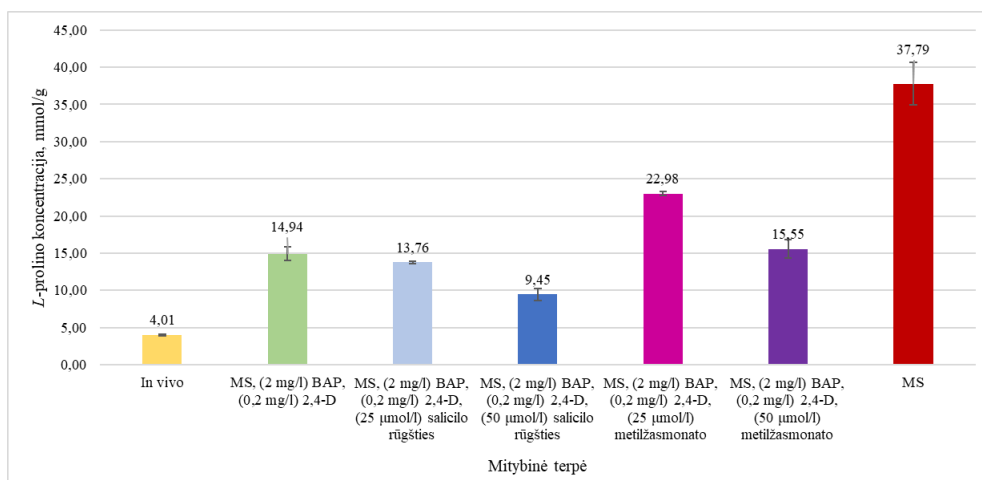
Įvertinus gliukozinolatų koncentraciją pipirnių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose, iš pateiktų rezultatų matyti (žr. 3.33 pav.), kad didžiausia gliukozinolatų koncentracija nustatyta pipirnių *in vivo* ekstraktoje ($28,62 \pm 1,18$ µmol/g), o 2,5 karto mažesnė gliukozinolatų koncentracija nustatyta pipirnių *in vitro* kultūros ekstraktoje ($11,27 \pm 1,01$ µmol/g). Iš pateiktų rezultatų matyti, kad mitybinės terpės papildymas 25 µmol/l koncentracijos salicilo rūgštimi, gliukozinolatų koncentraciją pipirnių kaliaus kultūrų ekstraktoje padidino 75 % ($15,25 \pm 1,60$ µmol/g), o terpę papildžius 50 µmol/l koncentracijos salicilo rūgštimi – 45 % ($12,69 \pm 0,84$ µmol/g). Mitybinę terpę papildžius 25 µmol/l koncentracijos metilžasmonatu gliukozinolatų koncentracija pipirnių kaliaus kultūrų ekstraktoje padidėjo 125 % ($19,76 \pm 0,42$ µmol/g), o terpę papildžius 50 µmol/l koncentracijos metilžasmonatu – 113 % ($18,69 \pm 0,76$ µmol/g). Lyginant elicitorių poveikį tarpusavyje, intensyviausiai gliukozinolatų sintezę pipirnių kaliaus kultūrose skatino metilžasmonato elicitorius.

Taigi, apibendrinus gautus rezultatus nustatyta, kad didžiausia gliukozinolatų koncentracija pasižymėjo brokolių *in vivo* ekstraktas ($58,33 \pm 0,17$ µmol/g). Šiame ekstraktoje nustatyta gliukozinolatų koncentracija buvo 3 kartus didesnė, nei rapsų *in vivo* ekstraktoje ($20,06 \pm 1,01$ µmol/g) ir 2 kartus didesnė, nei pipirnių *in vivo* ekstraktoje ($28,62 \pm 1,18$ µmol/g). Gliukozinolatų sintezę pasirinkti elicitoriai intensyviai skatino rapsų kaliaus kultūrose, šiek tiek mažiau – pipirnių kaliaus kultūrose, o brokolių kaliaus kultūrose pasirinkti elicitoriai gliukozinolatų sintezę veikė neigiamai. Pastebėta, jog mažesnė salicilo rūgštis koncentracija ir didesnė metilžasmonato koncentracija lėmė didesnę gliukozinolatų koncentraciją rapsų ir pipirnių kaliaus kultūrose. Tačiau efektyviausiai gliukozinolatų sintezę skatino metilžasmonato elicitorius. 2014 m. N. Baenas atlikto tyrimo metu nustatyta [33], kad metilžasmonato elicitorius (25 µM) yra labai veiksmingas beveik visiems tirtiems kryžmažiedžių augalų daigams. Gliukozinolatų koncentracija ropėse, rūtose, kiniškuose rožiniuose ridikuose ir raudonuosiuose ridikuose atitinkamai padidėjo 50 %, 123 %, 25 % ir 23 % [33].

3.8. L-prolino koncentracijos nustatymas

L-prolinas – aminorūgštis, vaidinanti svarbų vaidmenį augaluose. Prolinas apsaugo augalus nuo abiotinio ir biotinio streso bei jų sukeltų padarinių, taip pat padeda augalams greičiau atsiguoti po patirto streso pašalindamas susidariusius laisvuosius radikalus bei reaktyvias deguonies formas. Jo kaupimasis paprastai vyksta citoplazmoje, kur jis veikia kaip molekuliniai šaperonai, stabilizuojantys baltymų struktūrą ir citozolinį pH bei palaikantys ląstelių redokso būseną [87].

Anksčiau atliktame tyrime, rezultatai (žr. 3.26 pav.) parodė, kad naudoti elicitoriai efektyviausiai veikė rapsus *in vivo* ir rapsų kaliaus kultūras *in vitro* inicijuodami intensyvesnę baltymų sintezę. Todėl prolino koncentracija ir elicitorių poveikis prolino sintezei buvo įvertintas tik rapsų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose. Rezultatai pateikiami 3.34 pav.

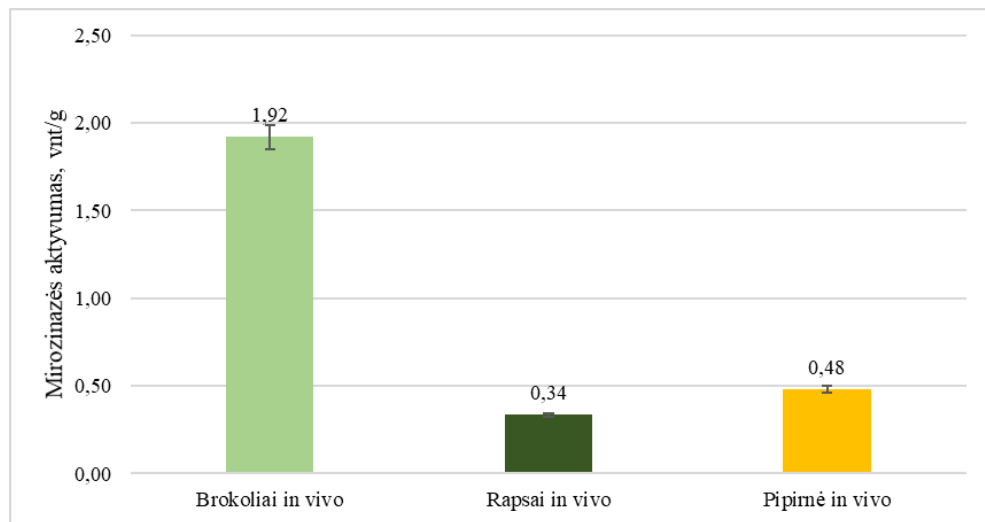


3.34 pav. Rapsų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų prolino koncentracijos įvertinimo rezultatai

Iš pateiktų rezultatų matyti, kad didžiausia prolino koncentracija nustatyta rapsų *in vitro* kultūros ekstrakto ($37,79 \pm 2,82$ mmol/g). Lyginant su šiuo ekstraktu, rapsų kaliaus kultūros, augintos MS terpėje papildytoje 2 mg/l BAP ir 0,2 mg/l 2,4-D augimo reguliatoriais, ekstrakto nustatyta 2,5 karto mažesnė prolino koncentracija ($14,94 \pm 0,94$ mmol/g). Mažiausia prolino koncentracija pasižymėjo rapsų *in vivo* ekstraktas ($4,01 \pm 0,09$ mmol/g). Įvertinus elicitorių poveikį rapsų kaliaus kultūrų prolino sintezei, nustatyta, jog mitybinę terpę papildžius 25 μmol/l koncentracijos metilžasmonatu prolino koncentracija rapsų kaliaus kultūros ekstrakto padidėjo 53,8 % ($22,98 \pm 0,27$ mmol/g), o terpę papildžius 50 μmol/l koncentracijos metilžasmonatu – 4 % ($15,55 \pm 1,25$ mmol/g). Taigi, mažesnė metilžasmonato koncentracija rapsų kaliaus kultūros mitybinėje terpėje intensyviau skatino prolino sintezę. Salicilo rūgšties elicitoriaus poveikis prolino sintezei rapsų kaliaus kultūroje veikė neigiamai. Panašūs rezultatai buvo aprašyti 2019 m. D. Mendoza atliktame tyrime, kuriame peruvinės tevecijos (lot. *Thevetia peruviana*) ląstelių suspensijos kultūra buvo veikama salicilo rūgšties ir metilžasmonato elicitoriais [88]. Tyrimo rezultatai atskleidė, kad metilžasmonatas efektyviai skatino prolino sintezę augalo ląstelių suspensijos kultūroje. Skirtingai nuo metilžasmonato, salicilo rūgšties elicitorius neskatino prolino sintezės ir netgi atvirkščiai – peruvinės tevecijos ląstelių suspensijoje prolino koncentracija sumažėjo [88].

3.9. Mirozinazės aktyvumo nustatymas

Mirozinazės aktyvumo nustatymo tyrimas atliktas brokolių, rapsų ir pipirnių *in vivo* ekstraktuose, kadangi šie ekstraktai pasižymėjo didžiausia gliukozinolatų koncentracija. Gauti rezultatai pateikiami 3.35 pav. Iš pateiktų rezultatų matyti, kad didžiausias mirozinazės aktyvumas nustatytas brokolių *in vivo* ekstrakto ($1,92 \pm 0,07$ vnt./g). Šis ekstraktas pasižymėjo 3 kartus didesniu mirozinazės aktyvumu, nei rapsų *in vivo* ekstraktas ($0,34 \pm 0,01$ vnt./g) ir 2 kartus didesniu mirozinazės aktyvumu nei pipirnių *in vivo* ekstraktas ($0,48 \pm 0,02$ vnt./g).



3.35 pav. Mirozinazės aktyvumo įvertinimo brokolių, rapsų ir pipirnių *in vivo* ekstraktuose, rezultatai

Palyginus rezultatus pateiktus 3.7 skyriuje, matyti, jog gauti mirozinazės aktyvumo rezultatai koreliuoja su gliukozinolatų koncentracijos įvertinimo rezultatais brokolių, rapsų ir pipirnių *in vivo* ekstraktuose.

3.10. Cinko oksido nanodalelių ir metionino elicitorių įtaka brokolių *in vitro* kultūrų antioksidacinėms savybėms ir biologiškai aktyvių junginių sintezei

Atlikus tyrimus su salicilo rūgšties bei metilžasmonato elicitoriais ir jų koncentracijomis, iš gautų rezultatų nustatyta, kad pasirinkti elicitoriai nepadarė reikšmingos įtakos biologiškai aktyvių junginių sintezės ir antioksidacinio aktyvumo padidėjimui brokolio kaliaus kultūrose. Lyginant su brokolio kaliaus kultūromis, geresnėmis savybėmis pasižymėjo brokolių *in vitro* kultūros, užaugintos MS terpėje be papildomų augimo reguliatorių ir elicitorių. Geriausiomis savybėmis pasižymėjo brokolių *in vivo* ekstraktas.

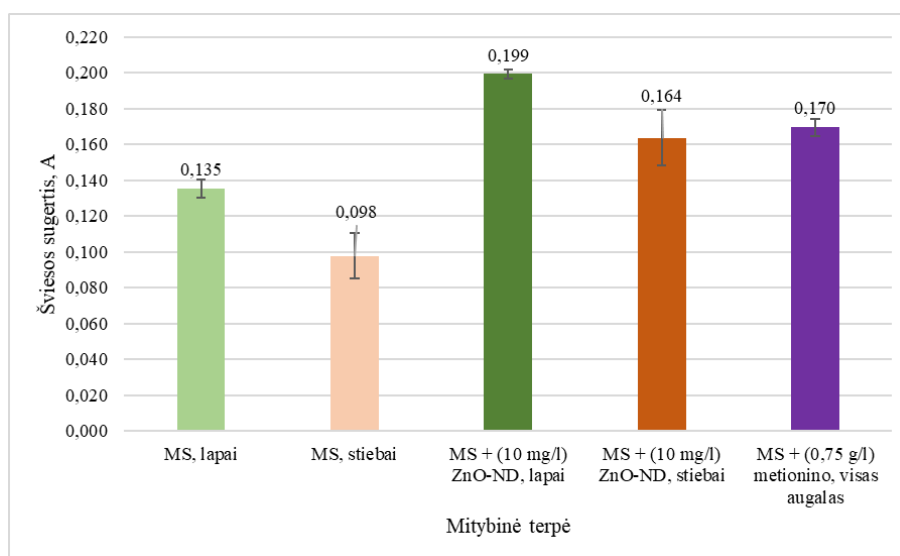
Tolimesniems tyrimams buvo pasirinkti cinko oksido nanodalelių < 50 nm dydžio (ZnO-ND) ir metionino elicitoriai, kuriais buvo papildyta brokolių *in vitro* kultūrų mitybinė terpė (žr. 3.36 pav.), siekiant įvertinti ar šie elicitoriai geba padidinti brokolių *in vitro* kultūrų fitochemikalų sintezę ir antioksidacines savybes.



3.36 pav. Brokolių *in vitro* kultūros, augintos MS terpėje papildytoje (10 mg/l) ZnO-ND ir (0,75 g/l) metionino elicitoriais

3.10.1. Redukcinių savybių įvertinimas

Šiame tyrime buvo vertinamos brokolių lapų ir stiebų *in vitro* kultūrų, augintų MS terpėje papildytoje 10 mg/l ZnO-ND elicitoriumi ir brokolio viso augalo *in vitro* kultūros, augintos MS terpėje papildytoje 0,75 g/l metionino elicitoriumi, ekstraktų redukcinės savybės.

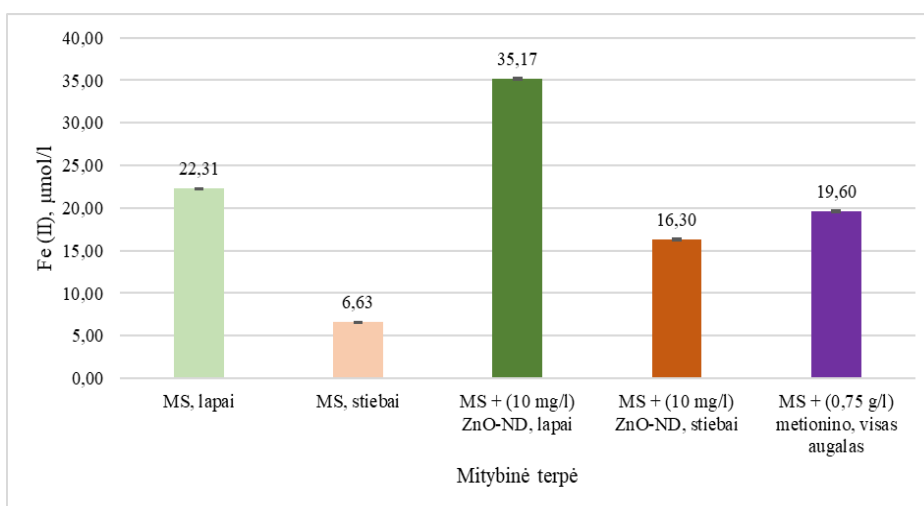


3.37 pav. Brokolių *in vitro* ekstraktų redukcinių savybių įvertinimo rezultatai

Iš rezultatų, kurie pateikiami 3.37 pav. matyti, kad brokolių lapų kultūros, augintos MS terpėje *in vitro* sąlygomis, ekstraktas pasižymėjo 37,8 % stipresnėmis redukcinėmis savybėmis ($A = 0,135 \pm 0,005$), lyginant su brokolių stiebų *in vitro* kultūros ekstraktu ($A = 0,098 \pm 0,013$). Papildžius MS terpę ZnO-ND elicitoriumi, brokolių lapų ($A = 0,199 \pm 0,003$) ir stiebų ($A = 0,164 \pm 0,016$) *in vitro* kultūrų ekstraktų redukcines savybes atitinkamai padidėjo 47,7 % ir 67,3 %. Susumavus brokolių lapų ir stiebų *in vitro* ekstraktų rezultatus ir palyginus su rezultatais gautais MS terpę papildžius metionino elicitoriumi matyti, kad pastarasis nepagerino brokolių kultūros redukcinių savybių ($A = 0,170 \pm 0,005$) ir netgi atvirkščiai – jas sumažino.

3.10.2. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu

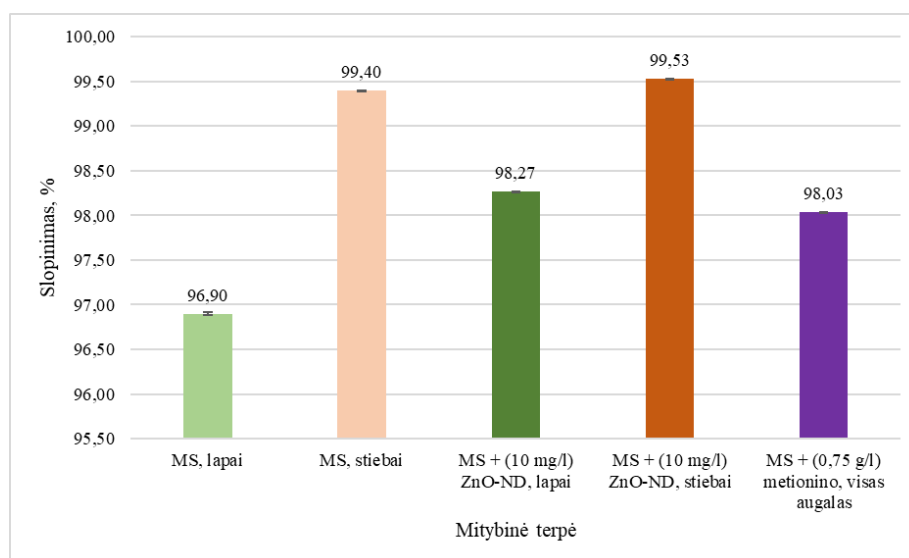
Įvertinus brokolių lapų ir stiebų *in vitro* kultūrų, augintų MS terpėje papildytoje 10 mg/l ZnO-ND elicitoriumi ir brokolio viso augalo *in vitro* kultūros, augintos MS terpėje papildytoje 0,75 g/l metionino elicitoriumi, ekstraktų antioksidacinį aktyvumą FRAP metodu, rezultatai pateikiami 3.38 pav.



3.38 pav. Brokolių *in vitro* ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimo, FRAP metodu, rezultatai

Iš gautų rezultatų matyti, kad FRAP metodo rezultatai sutampa su redukcinių savybių įvertinimo rezultatais. Brokolių lapų kultūros, augintos MS terpėje *in vitro* sąlygomis, ekstraktas pasižymėjo 3,4 karto didesniu antioksidaciniu aktyvumu ($22,31 \pm 0,049$ µmol/l) nei brokolių stiebų *in vitro* kultūros ekstraktas ($6,63 \pm 0,02$ µmol/l). MS terpės papildymas ZnO-ND elicitoriumi, padidino brokolių lapų ($35,17 \pm 0,104$ µmol/l) ir stiebų ($16,30 \pm 0,083$ µmol/l) *in vitro* kultūrų ekstraktų antioksidacinį aktyvumą – 1,6 ir 2,5 karto. Susumavus brokolių lapų ir stiebų kultūrų, augintų MS terpėje, ekstraktų rezultatus ir palyginus su rezultatais gautais MS terpę papildžius metionino elicitoriumi ($19,60 \pm 0,158$ µmol/l), brokolių kultūros antioksidacinio aktyvumo padidėjimas nebuvo užfiksuotas.

3.10.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu

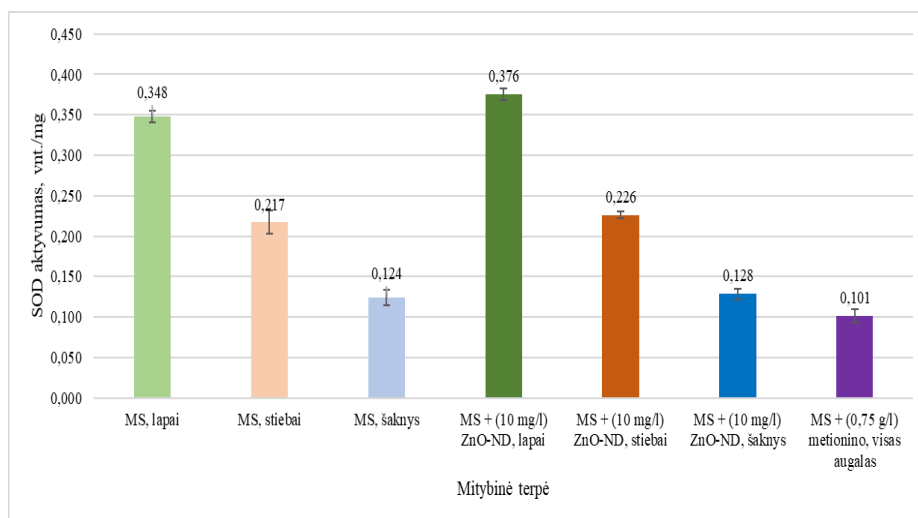


3.39 pav. Brokolių *in vitro* ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimo ABTS metodu, rezultatai

Rezultatai, kurie pateikti 3.39 pav. atskleidžia, kad brokolių stiebų *in vitro* kultūros ekstraktas pasižymėjo 2,6 % didesniu antioksidaciniu aktyvumu ($99,40 \pm 0,003$ %), nei brokolių lapų *in vitro* kultūros ekstraktas ($96,90 \pm 0,015$ %). Papildžius mitybinę terpę ZnO-ND elicitoriumi brokolių stiebų ($98,27 \pm 0,003$ %) ir lapų ($99,53 \pm 0,003$ %) *in vitro* kultūrų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas padidėjo atitinkamai 1,4 % ir 0,13 %. Susumavus brokolių lapų ir stiebų *in vitro* kultūrų, ekstraktų rezultatus bei išvedus vidurkį ir palyginus su rezultatais gautais MS terpę papildžius metionino

elicitoriumi ($98,03 \pm 0,005$ %) nustatyta, kad šis elicitorius brokolių kultūros antioksidacinio aktyvumo nepadidino.

3.10.4. Antioksidacinio fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas



3.40 pav. Superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimo rezultatai brokolių *in vitro* ekstraktuose

Iš rezultatų pateiktų 3.40 pav. matyti, kad brokolių lapų *in vitro* kultūros ekstraktas pasižymėjo didžiausiu SOD aktyvumu ($0,348 \pm 0,003$ vnt./mg), lyginant su brokolių stiebų ($0,217 \pm 0,014$ vnt./mg) ir šaknų ($0,124 \pm 0,010$ vnt./mg) *in vitro* kultūros ekstraktais. Papildžius MS terpę ZnO-ND, brokolių lapų ($0,376 \pm 0,008$ vnt./mg), stiebų ($0,226 \pm 0,005$ vnt./mg) ir šaknų ($0,128 \pm 0,007$ vnt./mg) *in vitro* kultūros ekstraktuose nustatytas atitinkamai 8 %, 4,2 % ir 3,2 % SOD aktyvumo padidėjimas. Susumavus brokolių lapų, stiebų, šaknų *in vitro* kultūrų ekstraktų rezultatus ir palyginus su rezultatais gautais MS terpę papildžius metionino elicitoriumi ($0,101 \pm 0,009$ vnt./mg) nustatyta, kad šis elicitorius brokolių *in vitro* kultūroje SOD aktyvumą sumažino.

3.10.5. Antioksidacinių savybių, įvertintų skirtingais metodais, apibendrinimas

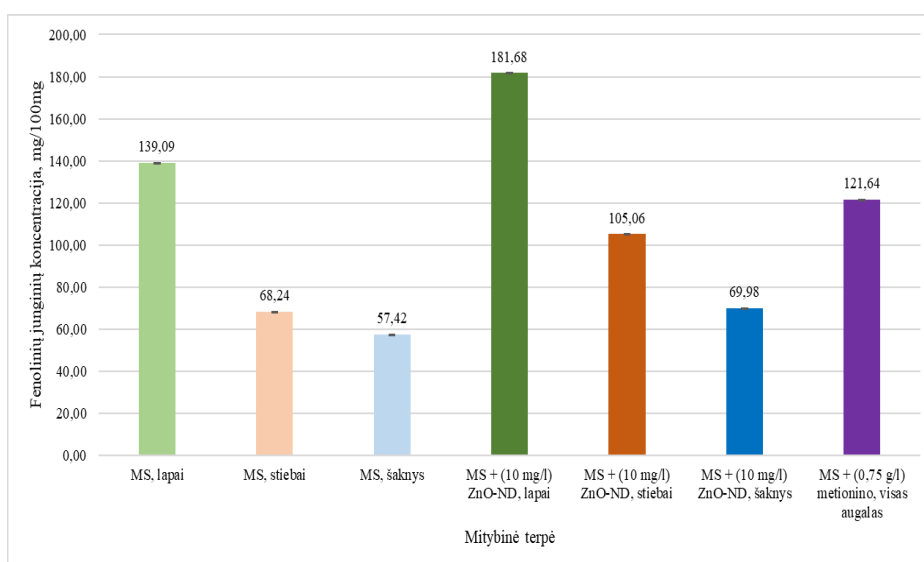
Brokolių *in vitro* kultūrų gebėjimas kaupti antioksidacinius bioaktyvius junginius įvertintas redukcinių savybių nustatymo, FRAP, ABTS radikalo surišimo ir superoksido dismutazės (SOD) aktyvumo spektrofotometrinės analizės metodais. Atlikus tyrimus minėtais metodais nustatyta, kad redukcinių savybių nustatymo ir antioksidacinių aktyvumo įvertinimo FRAP metodu rezultatai sutapo. Tyrimų rezultatuose matyti, kad didžiausias antioksidacinių junginių kiekis sukaupiamas brokolių *in vitro* kultūrų lapuose, o mažiausias – šaknyse. Rezultatuose aiškiai matoma ZnO-ND elicitoriaus teigiama įtaka brokolių *in vitro* kultūrų antioksidacinėms savybėms. Stipriausiomis redukcinėmis savybėmis ($A = 0,199 \pm 0,005$) ir didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu ($35,17 \pm 0,104$ $\mu\text{mol/l}$) įvertintu FRAP metodu pasižymėjo brokolių lapų *in vitro* kultūros, augintos MS terpėje papildytoje 10 mg/l koncentracijos ZnO-ND elicitoriumi, ekstraktas. Šiame ekstrakto taip pat nustatytas didžiausias SOD aktyvumas ($0,376 \pm 0,008$ vnt./mg). Apie teigiama ZnO-ND elicitoriaus įtaką SOD aktyvumui 2020 m. pranešė A. Zaeem ir bendraautorai [90]. Mokslininkai nustatė, kad 10 mg/l koncentracija mitybinėje terpėje padidino SOD aktyvumą linų (lot. *Linum Usitatissimum*) kaliaus kultūrose *in vitro*, o didinant ZnO-ND koncentraciją terpėje, SOD aktyvumas taip pat didėjo [90].

Priešingai šiems rezultatams, įvertinus antioksidacinį aktyvumą ABTS metodu nustatyta, kad stipriausia ABTS radikalo surišimo geba pasižymėjo ne brokolių lapų, o brokolių stiebų *in vitro*

kultūros ekstraktas ($99,40 \pm 0,003$ %). Šio tyrimo rezultatai taip pat atskleidžia teigiamą ZnO-ND elicitoriaus įtaką antioksidacinių junginių sintezei brokolių *in vitro* kultūrose.

3.10.6. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas

Įvertinus bendrąją fenolinių junginių koncentraciją brokolių *in vitro* kultūros ekstraktuose, iš gautų rezultatų (žr. 3.41 pav.) matyti, kad 2–2,5 karto didesne fenolinių junginių koncentracija pasižymėjo brokolių lapų *in vitro* kultūros ekstraktas ($139,09 \pm 0,022$ mg/100mg) nei brokolių stiebų ($68,24 \pm 0,039$ mg/100mg) ir šaknų ($57,42 \pm 0,013$ mg/100mg) *in vitro* kultūros ekstraktai.



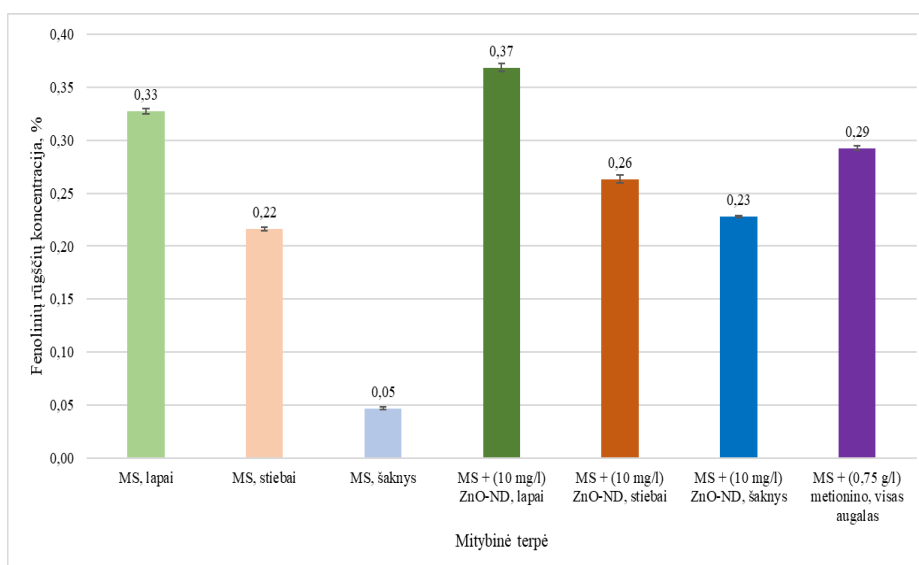
3.41 pav. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimo rezultatai brokolių *in vitro* ekstraktuose

Mitybinės terpės papildymas ZnO-ND elicitoriumi padidino fenolinių junginių koncentraciją brokolių lapų ($181,68 \pm 0,017$ mg/100mg), stiebų ($105,06 \pm 0,008$ mg/100mg) ir šaknų ($69,98 \pm 0,024$ mg/100mg) *in vitro* kultūros ekstraktuose atitinkamai 31 %, 54 % ir 22 %. Apie ZnO-ND elicitoriaus įtaką fenolinių junginių koncentracijos padidėjimui pranešta 2020 m. atliktame tyrime [90], kuriame teigiama, kad ZnO-ND elicitorius (maža koncentracija: 25 mg/l) padidino fenolinių junginių kiekį linų (lot. *Linum Usitatissimum*) ūgliuose ir kaliaus kultūrose *in vitro*. 2018 m. R. Javed atliktame tyrime pranešama kad papildžius MS terpę 100 mg/l ZnO-ND, saldžiosios stevijos (lot. *Stevia rebaudiana*) lapų kaliaus kultūra pasižymėjo padidėjusia bendra fenolinių junginių koncentracija [91].

Susumavus brokolių lapų, stiebų, šaknų *in vitro* kultūrų ekstraktų rezultatus ir palyginus su rezultatais gautais MS terpę papildžius metionino elicitoriumi ($121,64 \pm 0,004$ vnt./mg) nustatyta, kad šis elicitorius nepadidino fenolinių junginių koncentracijos brokolių *in vitro* kultūrose.

3.10.7. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos įvertinimas

Iš rezultatų pateiktų 3.42 pav. matyti, kad brokolių lapų *in vitro* kultūros ekstrakte nustatyta didesnė fenolinių rūgščių koncentracija ($0,33 \pm 0,003$ vnt./mg) nei brokolių stiebų ($0,22 \pm 0,002$ vnt./mg) ir šaknų ($0,05 \pm 0,001$ vnt./mg) *in vitro* kultūrų ekstraktuose. MS terpės papildymas ZnO-ND padidino bendrą fenolinių rūgščių koncentraciją brokolių lapų ($0,37 \pm 0,004$ mg/100mg) ir stiebų ($0,26 \pm 0,004$ mg/100mg) *in vitro* kultūros ekstraktuose atitinkamai 12 %, 18 % ir 360 %.

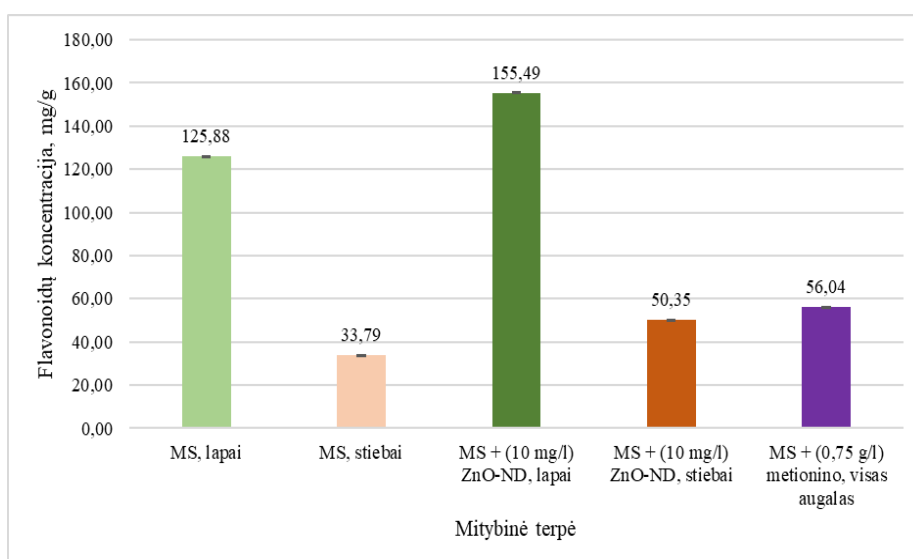


3.42 pav. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos įvertinimo rezultatai brokolių *in vitro* ekstraktuose

Didžiausias ZnO-ND elicitoriaus poveikis pastebėtas šaknų *in vitro* kultūros ekstraktuose, kuriame fenolinių rūgščių koncentracija po elicitoriaus pridėjimo padidėjo 4,6 kartus ($0,23 \pm 0,001$ mg/100mg). Susumavus brokolių lapų, stiebų, šaknų *in vitro* kultūrų ekstraktų rezultatus ir palyginus su rezultatais gautais MS terpę papildžius metionino elicitoriumi ($0,29 \pm 0,002$ vnt./mg) nustatyta, kad pastarasis nepadidino fenolinių rūgščių koncentracijos brokolių *in vitro* kultūrose.

3.10.8. Flavonoidų koncentracijos nustatymas

Įvertinus flavonoidų koncentraciją brokolio *in vitro* kultūros ekstraktuose, iš gautų rezultatų (žr. 3.43 pav.) matyti, kad brokolių lapų kultūros, augintos MS terpėje *in vitro* sąlygomis, ekstraktas pasižymėjo 3,7 karto didesne flavonoidų koncentracija ($125,88 \pm 0,101$ mg/g) nei brokolių stiebų *in vitro* kultūros ekstraktas ($33,79 \pm 0,010$ mg/g).



3.43 pav. Flavonoidų kiekio įvertinimo rezultatai brokolių *in vitro* ekstraktuose

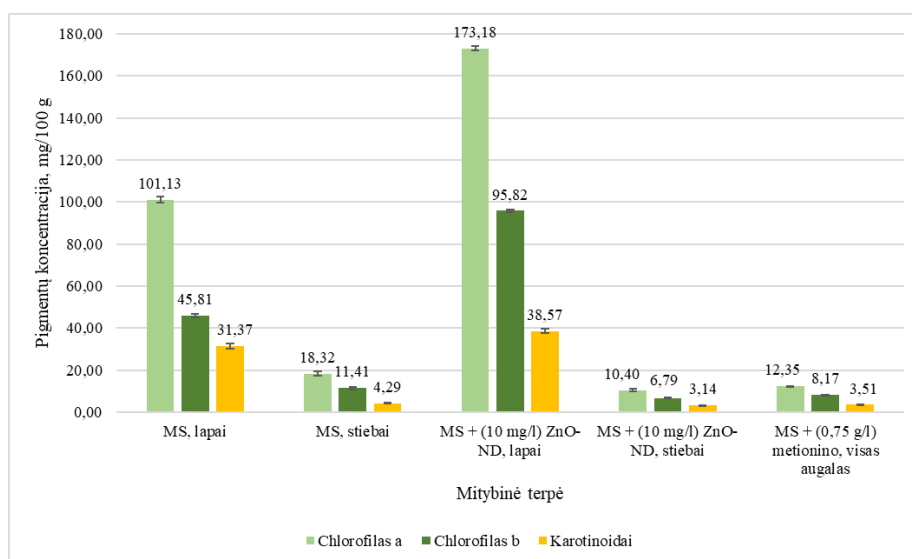
Nustatyta, kad MS terpę papildžius ZnO-ND elicitoriumi flavonoidų koncentracija brokolių lapų ($155,49 \pm 0,080$ mg/g) ir stiebų ($50,35 \pm 0,025$ mg/g) *in vitro* ekstraktuose padidėjo atitinkamai 23,5 % ir 49 %. Mokslinėje literatūroje pranešama, kad saldžiosios stevijos (lot. *Stevia rebaudiana*) ir

baltosios lelijos (lot. *Lilium ledebourii*) kultūros *in vitro* parodė padidėjusią bendrą flavonoidų koncentraciją, papildžius mitybinę terpę 1 mg/l ZnO-ND elicitoriumi [91, 92].

Susumavus brokolių lapų ir stiebų kultūrų, augintų MS terpėje, ekstraktų rezultatus ir palyginus su rezultatais gautais MS terpę papildžius metionino elicitoriumi (56,04±0,033 mg/g), flavonoidų koncentracijos padidėjimas brokolių *in vitro* kultūroje nebuvo nustatytas.

3.10.9. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijos nustatymas

Iš 3.44 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad 4-7 karto didesne chlorofilo *a* (101,13±1,57 mg/100 g) ir *b* (45,81±0,96 mg/100 g) bei karotinoidų (31,37±0,03 mg/100 g) koncentracija pasižymėjo brokolių lapų *in vitro* ekstraktas, lyginant su brokolių stiebų ir šaknų *in vitro* ekstraktais.

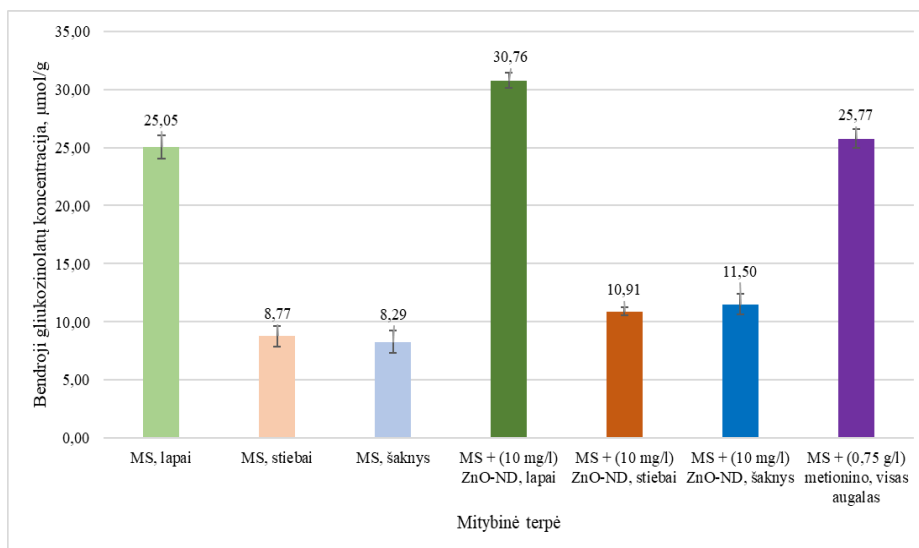


3.44 pav. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijos įvertinimo brokolių *in vitro* kultūros ekstraktuose, rezultatai

Papildžius MS terpę ZnO-ND elicitoriumi, chlorofilo *a* (173,18±1,13 mg/100 g) ir *b* (95,82±0,56 mg/100 g) bei karotinoidų (38,57±0,98 mg/100 g) koncentracija brokolių lapų *in vitro* ekstrakte atitinkamai išaugo 71 %, 109 % ir 23 %. Tačiau pastebėta, kad ZnO-ND elicitoriaus panaudojimas sumažino šių pigmentų koncentraciją brokolių stiebų *in vitro* ekstrakte. Iš gautų rezultatų matyti, kad metionino elicitoriaus panaudojimas pigmentų koncentracijos padidinimui brokolio *in vitro* kultūroje buvo neefektyvus.

3.10.10. Gliukozinolatų koncentracijos nustatymas

Iš rezultatų pateiktų 3.45 pav. matyti, kad brokolių lapų *in vitro* kultūros ekstraktas pasižymėjo 3 kartais didesne gliukozinolatų koncentracija (25,05±1,02 μmol/g), nei brokolių stiebų (8,77±0,87 μmol/g) ir šaknų (8,29±0,98 μmol/g) *in vitro* kultūros ekstraktai.

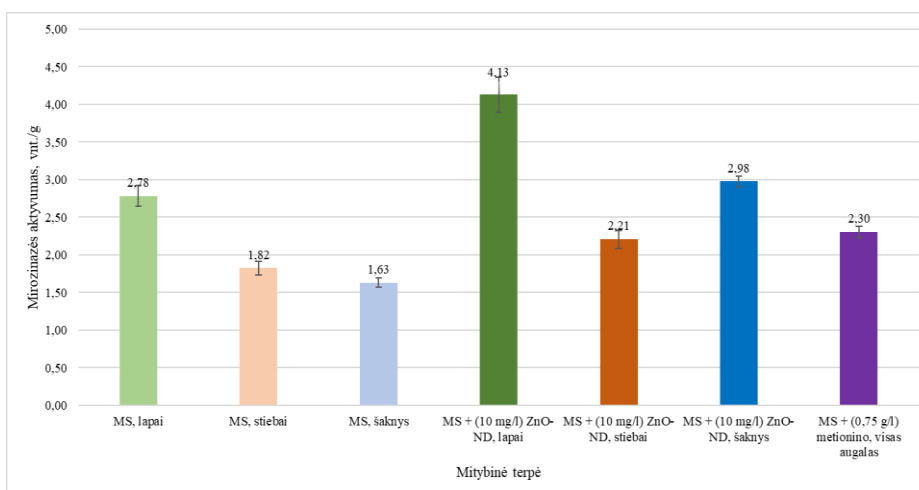


3.45 pav. Gliukozinolatų koncentracijos įvertinimo brokolių *in vitro* kultūros ekstraktuose, rezultatai

Mitybinės terpės papildymas ZnO-ND elicitoriumi davė teigiamų rezultatų, brokolių lapų ($30,76 \pm 0,64 \mu\text{mol/g}$), stiebų ($10,91 \pm 0,36 \mu\text{mol/g}$) ir šaknų ($11,50 \pm 0,89 \mu\text{mol/g}$) *in vitro* kultūros ekstraktai pasižymėjo atitinkamai 23 %, 25 % ir 39 % didesne gliukozinolatų koncentracija. Mitybinės terpės papildymas metionino elicitoriumi nepadarė reikšmingos įtakos gliukozinolatų koncentracijai ($25,77 \pm 0,78 \mu\text{mol/g}$) brokolių *in vitro* kultūroje.

3.10.11. Mirozinazės aktyvumo nustatymas

Įvertinus fermento mirozinazės aktyvumą brokolių *in vitro* kultūros ekstraktuose, iš gautų rezultatų (žr. 3.46 pav.) matyti, kad brokolių lapų kultūros, augintos MS terpėje *in vitro* sąlygomis, ekstraktas pasižymėjo 64 % didesniu mirozinazės aktyvumu ($2,78 \pm 0,14 \text{ vnt./g}$) nei brokolių stiebų *in vitro* kultūros ekstraktas ($1,82 \pm 0,09 \text{ vnt./g}$) ir 83 % didesniu mirozinazės aktyvumu nei brokolių šaknų *in vitro* kultūros ekstraktas ($1,63 \pm 0,06 \text{ vnt./g}$).



3.46 pav. Mirozinazės aktyvumo įvertinimo rezultatai brokolių *in vitro* ekstraktuose

Nustatyta, kad papildžius MS terpę ZnO-ND elicitoriumi mirozinazės aktyvumas brokolio lapų ($4,13 \pm 0,23 \text{ vnt./g}$), stiebų ($2,21 \pm 0,12 \text{ vnt./g}$) ir šaknų ($2,98 \pm 0,07 \text{ vnt./g}$) *in vitro* kultūrų ekstraktuose padidėjo atitinkamai 49 %, 21 % ir 83 %. Pastebėta, kad ZnO-ND elicitorius efektyviausiai veikė brokolių šaknų *in vitro* ekstraktą, kuriame padidino ne tik mirozinazės aktyvumą, bet ir gliukozinolatų

koncentraciją. MS terpės papildymas metionino elicitoriumi nepadarė ryškaus poveikio mirozinazės aktyvumui brokolio *in vitro* kultūroje ($2,30 \pm 0,08$ vnt./g).

4. Rekomendacijų dalis

Maisto papildų gamybai rekomenduojama gliukozinolatus išskirti iš brokolių (lot. *Brassica oleracea* var. *Italica*) kaliaus *in vitro* kultūrų užaugintų mitybinėje terpėje papildytoje ZnO-ND elicitoriumi. Rekomenduojama principinė aparatūrinė schema gliukozinolatus išskirti iš brokolių *in vitro* kultūrų pateikiama 4.1 paveiksle.

Biomasę rekomenduojama auginti vykdant du etapus. Pirmajame etape, paruošiama mitybinė terpė papildyta augimo reguliatoriais bei ZnO-ND elicitoriumi, kurie skatina fitocheminių medžiagų sintezę brokolių *in vitro* kultūrose (MT-1) ir autoklavuojama. Antrame etape, brokolių *in vitro* kultūra perkeliama į kolbą (K-1), kurioje toliau kultivuojama *in vitro* sąlygomis. Suformuota brokolių ląstelių suspensijos kultūra perkeliama į bioreaktorių (BR-1), į kurį taip pat tiekiami mitybinė terpė (MT-1). Gausiai užauginta kaliaus kultūra išdžiovinama liofilizatoriuje (L-1) ir sumalama rutuliniame malūne (RM-1). Išdžiovinta ir susmulkinta augalinė žaliava patalpinama į laikymo rezervuarą (R-1), iš kurio tiekiami į ekstraktorių (E-1).

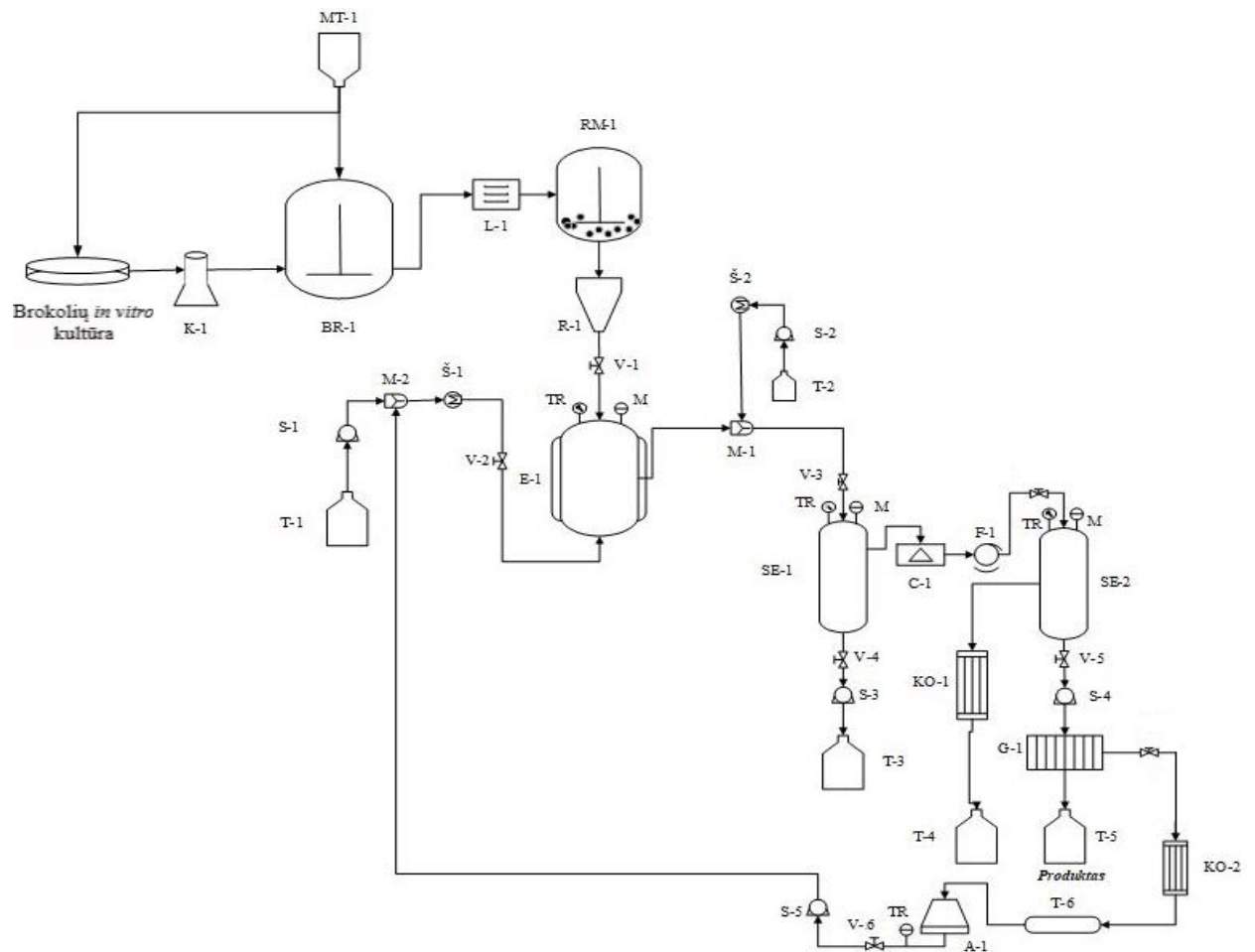
Ekstrahavimui rekomenduojama naudoti C1-C4 alkoholius (pvz., metanolis) arba C3-C4 ketonus (pvz., acetonas), arba jų vandeninius mišinius. Ekstrakcijai pasirinktas tirpiklis iš laikymo talpos (T-1) tiekiamas siurbliu (S-1) į šilumokaitį (Š-1), kuriame pašildomas ir tiekiamas į ekstrakcijos rezervuarą (E-1). Toliau vykdoma kietafazė ekstrakcija. Pagrindinė problema, su kuria susiduriama – ekstrahavimo metu augalinės ląstelės suyra, todėl fermentas mirozinazė ekstrakcijos metu yra inaktyvuojamas, tam, kad būtų galima išsaugoti nepakitusių sukauptų gliukozinolatus kiekį viso proceso metu. Tai padaroma ekstrahuojant 70 °C temperatūroje. Heksanas iš talpyklos (T-2) siurbliu (S-2) per šilumokaitį (Š-2) kartu su gautu ekstraktu tiekiami į maišyklę (M-1) ir maišomi 3 val. [93].

Gautas mišinys tiekiamas į separatorių (SE-1), kuriame nustačius tam tikrą temperatūrą ir slėgį, išsisluoksniuojama. Taip netirpios augalinės žaliavos medžiagos (riebalai) nusėda separatoriaus apačioje ir vėliau siurblio (S-3) pagalba surenkamos talpykloje (T-3). Toliau į antrąjį separatorių (SE-2) perduodamas augalinis ekstraktas su ištirpusiomis augalinės žaliavos medžiagomis, prieš tai jį nucentrifugavus (C-1) ir nufiltravus (F-1), siekiant pašalinti netirpius junginius.

Sekanti stadija – išgarinimas, kuris vykdomas antrajame separatoriuje (SE-2), kuriame sudarius tam tikrą slėgio ir temperatūros sąlygas lakiosios medžiagos atskiriamos nuo ekstrakto, tekėdamos pro kondensatorių (KO-1), skystu pavidalu surenkamos talpoje (T-4). Toliau ekstraktas siurbliu (S-4) tiekiamas į garintuvą (G-1), kuriame pašalinamas tirpiklis, pastarasis judėdamas pro kondensatorių (KO-2) surenkamas talpoje (T-6). Tirpiklis ataušinamas aušintuvu (A-1) ir siurbliu (S-5) bei maišykle (M-2) įmaišomas į pradinį tirpiklio srautą.

Norint geriau išvalyti, ekstraktą, rekomenduojamas papildomas ekstrakto įvedimas į katijonų mainų kolonėlę, kurioje gali būti patalpinta rūgštinės formos derva (kolonėlė turi atitikti maisto perdirbimo reikalavimus). Vėliau ekstraktas turi būti praleidžiamas pro bazinės formos dervą ant kurios adsorbuojami gliukozinolatai. Gliukozinolatus eliuavimą iš kolonėlės galima atlikti su natrio hidroksidu, vandenyje ištirpintu amoniaku, alkoholiu ar jų mišiniu [93].

Gautas sausas produktas, kuriame gausu gliukozinolatus, surenkamas talpoje (T-5). Gautus kietus miltelius rekomenduojama toliau mikrokapsuliuoti ir panaudoti, kaip maisto papildus.



4.1 pav. Principinė aparatūrinė schema gliukozinolatams išskirti iš brokolių kaliaus kultūrų *in vitro*

4.1 lentelė. Technologinėje schemoje pateiktų žymų reikšmės

Žyma:	Reikšmė:
MT – 1	Mitybinė terpė papildyta augimo reguliatoriais ir elicitoriais
BR – 1	Bioreaktorius
K – 1	Indas, kolba
L – 1	Liofilizatorius, džiovyklė
RM – 1	Rutulinis malūnas
R – 1	Rezervuarai
E – 1	Ekstrakcijos talpa
T – 1	Ekstrakcijos tirpiklio talpa
T – 2	Heksano laikymo talpa
T – 3	Riebalinių medžiagų surinkimo talpa
T – 4	Atskirtų lakiųjų medžiagų surinkimo talpa
T – 5	Produkto surinkimo talpa
T – 6	Tirpiklio surinkimo vieta
A – 1	Aušintuvas
S – 1, S – 2, S – 3, S – 4, S – 5	Siurblys
M – 1	Maišytuvas
Š – 1, Š – 2	Šilumokaitis
VO – 1, VO – 2, VO – 3	Grįžtamojo slėgio vožtuvas
KO – 1, KO – 2	Kondensatorius
TR	Temperatūros reguliatorius
M	Manometras
V – 1, V – 2, V – 3, V – 4, V – 5	Vožtuvas
G – 1	Garintuvas
C – 1	Centrifuga
F – 1	Filtravimo aparatas

Išvados

1. Nustatyta, kad 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentracijos salicilo rūgšties ir 25 $\mu\text{mol/l}$ koncentracijos metilžasmonato elicitoriai buvo tinkami antioksidacinių junginių sintezei skatinti rapsų (lot. *Brassica napus* L.) ir pipirnių (lot. *Lepidium sativum* L.) kaliaus kultūrose *in vitro*, tačiau netinkami brokolių kaliaus kultūroms.
2. Tyrimo metu nustatyta, kad 25 $\mu\text{mol/l}$ koncentracijos metilžasmonato elicitorius efektyviai padidino fenolinių junginių sintezę brokolių (46 %), rapsų (46,7 %) ir pipirnių (33,5 %) kaliaus kultūrose *in vitro*.
3. Įvertinus elicitorių poveikį tiriamųjų augalų baltymų sintezei nustatyta, kad didžiausiu teigiamu elicitavimo efektyvumu pasižymėjo 25 $\mu\text{mol/l}$ koncentracijos salicilo rūgšties elicitorius, kuris rapsų kaliaus kultūrose *in vitro*, baltymų koncentraciją padidino 36,6 %, o pipirnių – 23 %. Taip pat nustatyta, kad *L*-prolino koncentracija rapsų kaliaus *in vitro* kultūroje padidėjo 53,8 %, kai mitybinė terpė buvo papildyta 25 $\mu\text{mol/l}$ metilžasmonato elicitoriumi.
4. Tyrimo metu nustatyta, kad 25 $\mu\text{mol/l}$ koncentracijos metilžasmonato elicitoriaus pridėjimas į mitybinę terpę 3 kartais padidino chlorofilo *a* ir chlorofilo *b* koncentraciją rapsų kaliaus kultūrose *in vitro*, tačiau karotinoidų sintezę veikė neigiamai. Pipirnių kaliaus kultūrose *in vitro* 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentracijos metilžasmonato elicitorius padidino sintetinio chlorofilo *a* koncentraciją 30 %, chlorofilo *b* koncentraciją – 39 %, o karotinoidų koncentracija padidėjo dvigubai.
5. Įvertinus ZnO-ND ir metionino įtaką brokolių *in vitro* kultūrų antioksidaciniam ir fitocheminiam aktyvumui nustatyta, kad stipriausiomis redukcinėmis savybėmis, didžiausiu antioksidaciniu ir SOD aktyvumu pasižymėjo brokolių lapų *in vitro* kultūros, augintos MS terpėje papildytoje 10 mg/l koncentracijos ZnO-ND elicitoriumi, ekstraktas. Šiame ekstrakte nustatytas didžiausias fenolinių junginių, fenolinių rūgščių, flavonoidų, pigmentų, gliukozinolatų koncentracijos.

Literatūros sąrašas

1. ŠAMEC, D., B. SALOPEK-SONDI. Cruciferous (*brassicaceae*) vegetables. Iš *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements* [interaktyvus]. Elsevier, 2019. pp. 195–202. [žiūrėta 2021-01-20]. ISBN 9780128124918. Prieiga per DOI: [10.1016/B978-0-12-812491-8.00027-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812491-8.00027-8).
2. VASHISHT, I., N. SHARMA. Role of long noncoding RNAs in *Brassicaceae* family. Iš *Long Noncoding RNAs in Plants* [interaktyvus]. Academic Press, 2021, pp. 197-208. [žiūrėta 2021-01-20]. Prieiga per DOI: [10.1016/B978-0-12-821452-7.00013-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821452-7.00013-1).
3. O'KANE, S. L. *Brassicaceae*, Molecular Systematics and Evolution Of. Iš *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* [interaktyvus]. Elsevier Inc., 2013, pp. 374–376. [žiūrėta 2021-01-20]. ISBN 9780080961569. Prieiga per internetą: <https://scholarworks.uni.edu/facpub/1640>.
4. AL-SHEHBAZ, I. A. *Brassicaceae* (Mustard Family). Iš eLS [interaktyvus], 2011 [žiūrėta 2021-01-20]. Prieiga per DOI: [10.1038/npg.els.0003690](https://doi.org/10.1038/npg.els.0003690).
5. Richardson, A., *Cruciferae*. Iš *Plants of the Rio Grande Delta* [interaktyvus]. University of Texas Press, 2021, pp. 88-93, [žiūrėta 2021-01-20]. Prieiga per DOI: [10.7560/770683-047](https://doi.org/10.7560/770683-047).
6. KADŽIENĖ, G. ir kt. Vasariniai rapsai. Iš *Integruotos kenksmingųjų organizmų kontrolės gairės*. Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras. 2019.
7. ŠLAPAKAUSKAS, V. ir P. DUCHOVSKIS. Augalų produktyvumas. Iš PROJEKTAS „MAISTO ŽALIAVŲ IR AGRARINĖS APLINKOS STUDIJŲ TOBULINIMAS (MAST)“. 1. Ed. LŽŪU, Vilnius: UAB „IDP Solutions“, 2014. pp. 176–178. ISBN 978-9955-865-04-9.
8. LE, T. N. Ir kt. Bioactive Compounds and Bioactivities of *Brassica oleracea* L. var. *Italica* Sprouts and Microgreens: An Updated Overview from a Nutraceutical Perspective. Iš *Plants*, [interaktyvus]. 2020, 9(8), pp. 1–23, [žiūrėta 2021-01-20]. Prieiga per DOI: [10.3390/plants9080946](https://doi.org/10.3390/plants9080946).
9. AKBAR, S. *Lepidium sativum* L. (*Brassicaceae*). Iš *Handbook of 200 Medicinal Plants: A Comprehensive Review of Their Traditional Medical Uses and Scientific Justifications* [interaktyvus]. Springer, Cham, 2020, pp. 1095–1100, [žiūrėta 2021-01-20]. Prieiga per DOI: [10.1007/978-3-030-16807-0_118](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16807-0_118).
10. Espinosa-Leal, C. A. ir kt. In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. Iš *Planta* [interaktyvus]. Springer, Cham, 2018, 248(1), pp. 1-18. [žiūrėta 2021-01-20]. Prieiga per DOI: [10.1007/s00425-018-2910-1](https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1).
11. LOW, L. Y. et al. Transgenic Plants: Gene Constructs, Vector and Transformation Method. In *New Visions in Plant Science*. InTech, 2018, [žiūrėta 2021-01-20]. ISBN 1789237025, 9781789237023.
12. LOYOLA-VARGAS, V. M., N. OCHOA-ALEJO. An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. Iš *Methods in Molecular Biology* [interaktyvus]. Humana Press Inc., 2018, pp. 3–13, [žiūrėta 2021-01-20]. Prieiga per DOI: [10.1007/978-1-4939-8594-4_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_1).
13. KUMAR, P. P., C. S. LOH. Plant tissue culture for biotechnology. Iš *Plant Biotechnology and Agriculture* [interaktyvus]. Academic Press, 2012. pp. 131–138, [žiūrėta 2021-01-20]. ISBN 9780123814661.
14. TWAIJ, B. M. ir kt. Trends in the use of tissue culture, applications and future aspects. Iš *International Journal of Plant Biology* [interaktyvus]. 2020, 11(1), pp. 1–14, [žiūrėta 2021-01-20]. Prieiga per DOI: [10.4081/pb.2020.8385](https://doi.org/10.4081/pb.2020.8385).

15. EFFERTH, T. Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. Iš *Engineering* [interaktyvus]. 2019, 5(1), pp. 50–59, [žiūrėta 2021-01-20]. Prieiga per DOI: [10.1016/j.eng.2018.11.006](https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006).
16. SHARIF HOSSAIN, A. B. M. ir kt. Callus cell proliferation from broccoli leaf slice using IBA and BAP in vitro culture: Its biochemical and antioxidant properties. Iš *Data in Brief* [interaktyvus]. 2016, 6(3), pp. 214–220, [žiūrėta 2021-01-20]. Prieiga per DOI: [10.1016/j.dib.2015.11.061](https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.11.061).
17. SULTAN, S., A. MOHAMMED. Regenerated of Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) Plants from Differentiation of the Hypocotyl Stems Callus of its Seedlings. Iš *Rafidain Journal of Science* [interaktyvus]. 2020, 29(2), pp. 39–50, [žiūrėta 2021-01-28]. Prieiga per DOI: [10.33899/rjs.2020.165364](https://doi.org/10.33899/rjs.2020.165364).
18. ABDULLAH, R. ir kt. Thidiazuron Induced Plant Regeneration Via Organogenesis And Somatic Embryogenesis In Broccoli *Brassica Oleracea* Var. *Italica*. Iš *Nat. Volatiles & Essent. Oils* [interaktyvus]. 2021, 8(4), pp. 12658–12673, [žiūrėta 2021-01-05]. Prieiga per internetą: <https://www.nveo.org/index.php/journal/article/view/2670/2303>.
19. Metwali, R. E., O. A. Al-Maghrabi. Effectiveness of tissue culture media components on the growth and development of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *Botrytis*) seedling explants in vitro. Iš *African Journal of Biotechnology* [interaktyvus]. 2012, 11(76), pp. 14069–14076, [žiūrėta 2021-01-12]. Prieiga per DOI: [10.5897/AJB12.1984](https://doi.org/10.5897/AJB12.1984).
20. KAMAL, G. B. ir kt. Effects of genotype, explant type and nutrient medium components on canola (*Brassica napus* L.) shoot in vitro organogenesis. Iš *African Journal of Biotechnology* [interaktyvus]. 2010, 6(7), pp. 861–867, [žiūrėta 2021-02-13]. Prieiga per internetą: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/56918>.
21. NAZ, S. ir kt. Effect of different growth regulators on in vitro propagation of *brassica napus* L. Iš *Pakistan Journal of Botany*. 2018, 50(5), pp. 1871–1876. ISSN 0556-3321.
22. NAZ, S., K. KHATOON. The effect of auxins on callus induction in *achyranthes aspera*. Iš *Pakistan Journal of Botany*. 2014, 46(6), pp. 2203–2207. ISSN 0556-3321.
23. DUBEY, S. K., A. K. GUPTA. Original Research Article Callus Induction and Shoot Proliferation from Seedling Explants of Different Mustard Genotypes. Iš *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* [interaktyvus]. Excellent Publishers: 2014, 3(7), pp. 858–864, [žiūrėta 2021-02-13]. Prieiga per: [Researchgate](https://www.researchgate.net/publication/312211221)
24. KOUHI, S. M. M., M. LAHOUTI. Application of ZnO nanoparticles for inducing callus in tissue culture of rapeseed. Iš *International Journal of Nanoscience and Nanotechnology* [interaktyvus]. 2018, 14(2), pp. 133–141, [žiūrėta 2021-02-13]. Prieiga per internetą: http://www.ijnnonline.net/article_31221.html
25. SHARMA, S. ir kt. Effects of Plant Growth Regulator on *in Vitro* Callogenesis of Garden Cress (*Lepidium Sativum* L.). Iš *The Bioscan*. 2015, 10(1), pp. 167–171. ISSN: 0973-7049.
26. GOLKAR, P. ir kt. Production of a new mucilage compound in *Lepidium sativum* callus by optimizing *in vitro* growth conditions. Iš *Natural Product Research* [interaktyvus]. 2019, 33(1), pp. 130–135. Prieiga per DOI: [10.1080/14786419.2018.1437426](https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1437426).
27. CHANDRAN, H. ir kt. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. Iš *Biotechnology Reports* [interaktyvus]. 2020, 26(6), pp. 450, [žiūrėta 2021-02-13]. Prieiga per DOI: [10.1016/j.btre.2020.e00450](https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00450).
28. CABRERA-DE LA FUENTE, M. ir kt. Plant Nutrition and Agronomic Management to Obtain Crops With Better Nutritional and Nutraceutical Quality. Iš *Therapeutic Foods*

- [interaktyvus]. 2018, pp. 99–140, [žiūrėta 2021-02-13]. ISBN 9780128115176. Prieiga per internetą: [10.1016/B978-0-12-811517-6.00004-0](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811517-6.00004-0).
29. ALQAHTANI, F. Y. ir kt. Chemical composition and antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of *Lepidium sativum* seed oil. Iš *Saudi Journal of Biological Sciences* [interaktyvus]. 2019, 26(5), pp. 1089–1092, [žiūrėta 2022-04-12]. Prieiga per internetą: [10.1016/j.sjbs.2018.05.007](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.05.007).
 30. SAEED, F. ir kt. Green and chemically synthesized zinc oxide nanoparticles: effects on in-vitro seedlings and callus cultures of *Silybum marianum* and evaluation of their antimicrobial and anticancer potential. Iš *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* [interaktyvus]. 2021, 49(1), pp. 450–460. Prieiga per DOI: [10.1080/21691401.2021.1926274](https://doi.org/10.1080/21691401.2021.1926274).
 31. AWAN, S. ir kt. A preliminary study of influence of zinc oxide nanoparticles on growth parameters of *Brassica oleracea* var *italic*. Iš *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* [interaktyvus]. 2021, 20(1), pp. 18–24, [žiūrėta 2022-04-12]. Prieiga per DOI: [10.1016/j.jssas.2020.10.003](https://doi.org/10.1016/j.jssas.2020.10.003).
 32. WANG, X. P. ir kt. Effects of zinc oxide nanoparticles on the growth, photosynthetic traits, and antioxidative enzymes in tomato plants. Iš *Biologia Plantarum* [interaktyvus]. 2018, 62(4), pp. 801–808, [žiūrėta 2022-04-12]. Prieiga per DOI: [10.1007/s10535-018-0813-4](https://doi.org/10.1007/s10535-018-0813-4).
 33. BAENAS, N. ir kt. Biotic Elicitors Effectively Increase the Glucosinolates Content in Brassicaceae Sprouts. Iš *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2014, 62(8), pp. 1881–1889, [žiūrėta 2022-04-12]. Prieiga per DOI: [doi/10.1021/jf404876z](https://doi.org/10.1021/jf404876z).
 34. PÉREZ-BALIBREA, S. ir kt. Improving the phytochemical composition of broccoli sprouts by elicitation. Iš *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2011, 129(1), pp. 35–44, [žiūrėta 2022-04-14]. Prieiga per DOI: [10.1016/j.foodchem.2011.03.049](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.049).
 35. Scheuner, E. T., ir kt. Increasing the alkyl glucosinolate level in Broccoli by leafstalk infusion of methionine. Iš *Journal of applied botany and food quality* [interaktyvus]. 2005, 79(3), pp.175-178, [žiūrėta 2022-04-12]. Prieiga per internetą: <https://www.researchgate.net/publication/285941970>.
 36. HO, T. T. ir kt. Methyl Jasmonate Induced Oxidative Stress and Accumulation of Secondary Metabolites in Plant Cell and Organ Cultures. Iš *International journal of molecular sciences* [interaktyvus]. 2020, 21(3), pp. 716. Prieiga per DOI: [10.3390/ijms21030716](https://doi.org/10.3390/ijms21030716).
 37. AUGUSTIN, L. S. A. ir kt. Diet and cancer. Iš *Encyclopedia of Cancer* [interaktyvus]. Elsevier, 2018, pp. 471–500, [žiūrėta 2021-03-26]. ISBN 9780128124857. Prieiga per: [PubMed](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/).
 38. LE, T. N. Ir kt. Bioactive compounds and bioactivities of *Brassica oleracea* L. var. *Italica* sprouts and microgreens: An updated overview from a nutraceutical perspective. Iš *Plants* [interaktyvus]. 2020, 9(8), pp. 1–23, [žiūrėta 2022-02-24]. Prieiga per DOI: [10.3390/plants9080946](https://doi.org/10.3390/plants9080946).
 39. MIKLAVČIČ VIŠNJEVEC, A. ir kt. Glucosinolates and isothiocyanates in processed rapeseed determined by hplc-dad-qTOF. Iš *Plants* [interaktyvus]. 2021, 10(11), pp. 2548, [žiūrėta 2021-03-24]. Prieiga per DOI: [10.3390/plants10112548](https://doi.org/10.3390/plants10112548).
 40. SHARMA, A. A Comprehensive Review on Pharmacological Properties of Garden cress (*Lepidium sativum*) Seeds. Iš *Current Research in Pharmaceutical Sciences* [interaktyvus]. 2020, 10(2), pp. 13–18, [žiūrėta 2021-03-24]. Prieiga per DOI: [10.24092/CRPS.2020.100201](https://doi.org/10.24092/CRPS.2020.100201).
 41. LE, T. N. Ir kt. [interaktyvus]. Bioactive Compounds and Bioactivities of *Brassica oleracea* L. var. *Italica* Sprouts and Microgreens: An Updated Overview from a Nutraceutical

- Perspective. Iš *Plants* [interaktyvus]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020, 9(8), pp. 946, [žiūrėta 2021-03-24]. Prieiga per DOI: [10.3390/plants9080946](https://doi.org/10.3390/plants9080946).
42. SHAKOUR, Z. T. ir kt. Metabolic and biotransformation effects on dietary glucosinolates, their bioavailability, catabolism and biological effects in different organisms. Iš *Biotechnology Advances* [interaktyvus]. 2022, 54, pp. 107, [žiūrėta 2021-03-24]. Prieiga per DOI: [10.1016/j.biotechadv.2021.107784](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107784).
 43. LA ROSA, L. A. ir kt. Phenolic compounds. Iš *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables* [interaktyvus]. Elsevier, 2018, pp. 253–271, [žiūrėta 2021-03-25]. ISBN 9780128132784. Prieiga per DOI: [10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9).
 44. VUOLO, M. M. ir kt. Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. Iš *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications* [interaktyvus]. Elsevier, 2018, pp. 33–50. [žiūrėta 2021-04-27]. ISBN 9780128147757. Prieiga per DOI: [10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5).
 45. KOH, E. ir kt. Content of ascorbic acid, quercetin, kaempferol and total phenolics in commercial broccoli. Iš *Journal of Food Composition and Analysis* [interaktyvus]. 2009, 22(7–8), pp. 637–643, [žiūrėta 2021-03-24]. Prieiga per DOI: [10.1016/j.jfca.2009.01.019](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.01.019).
 46. WU, X. Ir kt. Effects of domestic cooking on flavonoids in broccoli and calculation of retention factors. Iš *Heliyon* [interaktyvus]. 2019, 5(3), pp. 1310, [žiūrėta 2021-04-05]. Prieiga per DOI: [10.1016/j.heliyon.2019.e01310](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01310).
 47. DUAN, Y. ir kt. Genotypic variation of flavonols and antioxidant capacity in broccoli. Iš *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2021, Vol. 338, [žiūrėta 2021-04-05]. Prieiga per DOI: [10.1016/j.foodchem.2020.127997](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127997).
 48. MAHN, A., A. REYES. An overview of health-promoting compounds of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and the effect of processing. Iš *Food Science and Technology International* [interaktyvus]. 2012, 18(6), pp. 503–514, [žiūrėta 2021-04-05]. Prieiga per DOI: [10.1177/1082013211433073](https://doi.org/10.1177/1082013211433073).
 49. L'HADJ, I. Ir kt. The nutraceutical potential of *Lepidium sativum* L. seed flavonoid-rich extract in managing metabolic syndrome components. Iš *Journal of Food Biochemistry* [interaktyvus]. 2019, 43(3), pp. 43, [žiūrėta 2021-04-05]. Prieiga per DOI: [10.1111/jfbc.12725](https://doi.org/10.1111/jfbc.12725).
 50. EL-HAGGAR, M. ir kt. Phytochemical investigation, antimicrobial and cytotoxic activities of suspension cultures of *Lepidium sativum* L. Iš *South African Journal of Botany* [interaktyvus]. 2021, Vol. 138, pp. 500–505, [žiūrėta 2021-05-06]. Prieiga per DOI: [10.1016/j.sajb.2020.12.024](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.12.024).
 51. VILLARREAL-GARCÍA, D. ir kt. Plants as biofactories: Postharvest stress-induced accumulation of phenolic compounds and glucosinolates in broccoli subjected to wounding stress and exogenous phytohormones. Iš *Frontiers in Plant Science* [interaktyvus]. 2016, Vol. 7. Prieiga per DOI: [10.3389/fpls.2016.00045](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00045).
 52. VANDUCHOVA, A. ir kt. Isothiocyanate from Broccoli, Sulforaphane, and Its Properties. Iš *Journal of Medicinal Food* [interaktyvus]. 2019, 22(2), pp. 121–126, [žiūrėta 2022-04-14]. Prieiga per DOI: [10.1089/jmf.2018.0024](https://doi.org/10.1089/jmf.2018.0024).
 53. LECHTENBERG, M., A. HENSEL. Determination of glucosinolates in broccoli-based dietary supplements by cyclodextrin-mediated capillary zone electrophoresis. Iš *Journal of Food Composition and Analysis* [interaktyvus]. 2019, Vol. 78, pp. 138–149, [žiūrėta 2022-04-14]. Prieiga per DOI: [10.1016/j.jfca.2019.02.007](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.02.007).

54. FAHEY, J. W. Ir kt. Separation and purification of glucosinolates from crude plant homogenates by high-speed counter-current chromatography. Iš *Journal of Chromatography* [interaktyvus]. 2003, 996(1–2), pp. 85–93. Prieiga per DOI: [10.1016/S0021-9673\(03\)00607-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00607-1).
55. PARCHEM, K. ir kt. Enzymatic activities behind degradation of glucosinolates. Iš *Glucosinolates: Properties, Recovery, and Applications* [interaktyvus]. Elsevier, 2020. pp. 79–106, [žiūrėta 2022-04-14]. ISBN 9780128164938. Prieiga per DOI: [10.1016/B978-0-12-816493-8.00003-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816493-8.00003-2).
56. GULCIN, Ī ir kt. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. Iš *Archives of Toxicology* [interaktyvus]. Springer, 2020, [žiūrėta 2022-03-21]. Prieiga per DOI: [10.1007/s00204-020-02689-3](https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3)
57. <http://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe>
58. AMORATI, R., L. VALGIMIGLI. Methods to Measure the Antioxidant Activity of Phytochemicals and Plant Extracts. Iš *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. Agric Food Chem, 2018, 66(13), pp. 3324–3329, [žiūrėta 2022-03-25]. Prieiga per DOI: [10.1021/acs.jafc.8b01079](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01079).
59. BEDLOVIČOVÁ, Z. ir kt. A Brief Overview on Antioxidant Activity Determination of Silver Nanoparticles. Iš *Molecules* [interaktyvus]. 2020, 25(14), pp. 3191, [žiūrėta 2022-03-25]. Prieiga per DOI: [10.3390/molecules25143191](https://doi.org/10.3390/molecules25143191).
60. STEPHENIE, S. ir kt. An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement. Iš *Journal of Functional Foods* [interaktyvus]. 2020, Vol. 68, pp. 103917, [žiūrėta 2021-05-24]. Prieiga per DOI: doi.org/10.1016/j.jff.2020.103917.
61. CUI, X. ir kt. Plant-Derived Antioxidants Protect the Nervous System From Aging by Inhibiting Oxidative Stress. Iš *Frontiers in Aging Neuroscience* [interaktyvus]. 2020, Vol. 12, [žiūrėta 2021-05-24]. Prieiga per DOI: [10.3389/fnagi.2020.00209](https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00209).
62. HARIPRASATH, L. ir kt. In vitro propagation of *Senecio candicans* DC and comparative antioxidant properties of aqueous extracts of the *in vivo* plant and *in vitro*-derived callus. Iš *South African Journal of Botany* [interaktyvus]. 2015, Vol. 98, pp. 134–141, [žiūrėta 2021-06-04]. Prieiga per DOI: [10.1016/j.sajb.2015.02.011](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.02.011).
63. PARK, J.-S. ir kt. Production of Flavonoids in Callus Cultures of *Sophora flavescens* Aiton. Iš *Plants* [interaktyvus]. 2020, 9(6), pp. 688, [žiūrėta 2021-06-04]. Prieiga per DOI: [10.3390/plants9060688](https://doi.org/10.3390/plants9060688).
64. HASHEMYAN, M., GANJEALI, A., CHENIANY, M. Effect of methyl jasmonate and salicylic acid elicitors on the production of secondary metabolites and antioxidant capacity of *Teucrium polium* L. *in-vitro*. Iš *Iranian Journal of Plant Biology*. 2020, 12(2), pp. 61–76, [žiūrėta 2021-05-17]. Prieiga per DOI: [10.22108/IJPB.2020.118410.1164](https://doi.org/10.22108/IJPB.2020.118410.1164).
65. FAROOQ, M. A. ir kt. Methyl Jasmonate Regulates Antioxidant Defense and Suppresses Arsenic Uptake in *Brassica napus* L. Iš *Frontiers in Plant Science* [interaktyvus]. 2016, Vol. 7, [žiūrėta 2021-05-17]. Prieiga per DOI: [10.3389/fpls.2016.00468/abstract](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00468/abstract).
66. GALVÃO, M. A. M. ir kt. Evaluation of the Folin-Ciocalteu Method and Quantification of Total Tannins in Stem Barks and Pods from *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul) L. P. Queiroz. Iš *Brazilian Archives of Biology and Technology* [interaktyvus]. 2018, Vol. 61, pp. 1–20, [žiūrėta 2022-03-30]. ISSN 1678-4324. Prieiga per DOI: [10.1590/1678-4324-2018170586](https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018170586).
67. PALACIO, L. ir kt. Phenolic compound production in relation to differentiation in cell and tissue cultures of *Larrea divaricata* (Cav.). Iš *Plant Science* [interaktyvus]. 2012, Vol. 193–194, pp. 1–7, [žiūrėta 2022-03-31]. Prieiga per DOI: [10.1016/j.plantsci.2012.05.007](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.05.007).

68. IQBAL, M. S. ir kt. Enhancement of total antioxidants and flavonoid (quercetin) by methyl jasmonate elicitation in tissue cultures of onion (*Allium cepa* L.). Iš *Acta Agrobotanica* [interaktyvus]. 2019, 72(3), pp. 1–11, [žiūrėta 2022-03-31]. Prieiga per DOI: [0000-0002-2162-7705](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.10.014).
69. GURU, A. ir kt. Exploring the role of elicitors in enhancing medicinal values of plants under *in vitro* condition. Iš *South African Journal of Botany* [interaktyvus]. 2021, 1(11), pp. 1-15, [žiūrėta 2022-03-31]. Prieiga per DOI: [10.1016/j.sajb.2021.10.014](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.10.014).
70. NARAYANI, M. ir SRIVASTAVA, S. Elicitation: a stimulation of stress in *in vitro* plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. Iš *Phytochemistry Reviews* [interaktyvus]. 2017, 16(6), pp. 1227–1252, [žiūrėta 2022-03-31]. Prieiga per DOI: [10.1007/s11101-017-9534-0](https://doi.org/10.1007/s11101-017-9534-0).
71. European Pharmacopoeia, 9th ed. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM): Strasbourg, France, 2016; pp. 1257–1258, 4465–4467.
72. EJTAHED, R. S. ir kt. Expression Analysis of Phenylalanine Ammonia Lyase Gene and Rosmarinic Acid Production in *Salvia officinalis* and *Salvia virgata* Shoots Under Salicylic Acid Elicitation. Iš *Applied Biochemistry and Biotechnology* [interaktyvus]. 2015, 176(7), pp. 1846–1858. Prieiga per DOI: [10.1007/s12010-015-1682-3](https://doi.org/10.1007/s12010-015-1682-3).
73. KHAN, T. ir kt. Effects of chitosan and salicylic acid on the production of pharmacologically attractive secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica*. Iš *Industrial Crops and Products* [interaktyvus]. 2019, Vol. 129, pp. 525–535. [žiūrėta 2022-04-06]. Prieiga per DOI: [10.1016/j.indcrop.2018.12.048](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.048).
74. FAZILI, M.A. ir kt. In vitro strategies for the enhancement of secondary metabolite production in plants: a review. Iš *Bulletin of the National Research Centre* [interaktyvus]. 2022, 46(1), pp. 35. [žiūrėta 2022-04-06]. Prieiga per DOI: [10.1186/s42269-022-00717-z](https://doi.org/10.1186/s42269-022-00717-z).
75. SHAO, L. ir kt. Identification of Antioxidant Proteins With Deep Learning From Sequence Information. Iš *Frontiers in Pharmacology* [interaktyvus]. 2018, 9(9), pp. 1036, [žiūrėta 2022-04-08]. Prieiga per DOI: [10.3389/fphar.2018.01036/full](https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01036/full).
76. STAUDACHER, V. ir kt. Redox-sensitive GFP fusions for monitoring the catalytic mechanism and inactivation of peroxiredoxins in living cells. Iš *Redox Biology* [interaktyvus]. 2018, Vol. 14, pp. 549–556, [žiūrėta 2022-04-08]. Prieiga per DOI: [10.1016/j.redox.2017.10.017](https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.017).
77. KIELKOPF, C. L. ir kt. Bradford Assay for Determining Protein Concentration. Iš *Cold Spring Harbor Protocols* [interaktyvus]. 2020, Vol. 4, pp. 102269, [žiūrėta 2022-04-08]. Prieiga per DOI: [10.1101/pdb.prot102269](https://doi.org/10.1101/pdb.prot102269).
78. NUGRAHA, R. ir kt. Effects of Extraction Buffer on the Solubility and Immunoreactivity of the Pacific Oyster Allergens. Iš *Foods* [interaktyvus]. 2021, 10(2), pp. 409, [žiūrėta 2022-04-09]. Prieiga per DOI: [10.3390/foods10020409](https://doi.org/10.3390/foods10020409).
79. CHAN, Z. ir TIAN, S. Induction of H₂O₂-metabolizing enzymes and total protein synthesis by antagonistic yeast and salicylic acid in harvested sweet cherry fruit. Iš *Postharvest Biology and Technology* [interaktyvus]. 2006, 39(3), pp. 314–320, [žiūrėta 2022-04-09]. Prieiga per DOI: [10.1016/j.postharvbio.2005.10.009](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.10.009).
80. AMRANI-ALLALOU, H. ir kt. Antioxidant activity, carotenoids, chlorophylls and mineral composition from leaves of *Pallenis spinosa*: an Algerian medicinal plant. Iš *Journal of Complementary and Integrative Medicine* [interaktyvus]. 2019., 17(1), pp. 1–9, [žiūrėta 2022-04-09]. Prieiga per DOI: [10.1515/jcim-2017-0081](https://doi.org/10.1515/jcim-2017-0081).

81. LEDEB, L. Estimation of some non-enzymatic antioxidants in leaves of *Betula platyphylla* Sukacz and *Larix sibirica* Ledeb. Iš *Mongolian Journal of Biological Sciences* [interaktyvus]. 2022, 20(1) pp. 29–34, [žiūrėta 2022-04-09]. Prieiga per DOI: [10.22353/MJBS.2022.20.02](https://doi.org/10.22353/MJBS.2022.20.02).
82. JUNG, S. Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. Iš *Plant Physiology and Biochemistry* [interaktyvus]. 2004, 42(3), pp. 225–231, [žiūrėta 2022-04-10]. Prieiga per DOI: [10.1016/j.plaphy.2004.01.001](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.01.001).
83. ABBASPOUR, J. ir EHSANPOUR, A. The impact of salicylic acid on some physiological responses of *Artemisia aucheri* Boiss. under *in vitro* drought stress. Iš *Acta agriculturae Slovenica* [interaktyvus]. 2016, 107(2), pp. 287, [žiūrėta 2022-04-10]. Prieiga per DOI: [10.14720/aas.2016.107.2.03](https://doi.org/10.14720/aas.2016.107.2.03).
84. AL-MAYAH, A. M. W. Influence of salicylic acid (SA) and ascorbic acid (ASA) on *in vitro* propagation and salt tolerance of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. ‘Nersy’. Iš *Australian Journal of Crop Science* [interaktyvus]. 2016, 10(7), pp. 969–976, [žiūrėta 2022-04-10]. Prieiga per DOI: [10.21475/ajcs.2016.10.07.p7640](https://doi.org/10.21475/ajcs.2016.10.07.p7640).
85. CHUNG, I. M. ir kt. Jasmonic and salicylic acids enhanced phytochemical production and biological activities in cell suspension cultures of spine gourd (*Momordica dioica* Roxb). Iš *Acta Biologica Hungarica* [interaktyvus]. 2017, 68(1), pp. 88–100, [žiūrėta 2022-04-10]. Prieiga per DOI: [10.1556/018.68.2017.1.8](https://doi.org/10.1556/018.68.2017.1.8).
86. SILVA DA ROCHA, A. ir kt. Production and optimization through elicitation of carotenoid pigments in the *in vitro* cultures of *Cleome rosea* Vahl (*Cleomaceae*). Iš *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* [interaktyvus]. 2015, 24(1), pp. 105–113, [žiūrėta 2022-04-10]. Prieiga per DOI: [10.1007/s13562-013-0241-7](https://doi.org/10.1007/s13562-013-0241-7).
87. MAWLONG, I. Ir kt. A simple spectrophotometric method for estimating total glucosinolates in mustard de-oiled cake. Iš *International Journal of Food Properties* [interaktyvus]. 2017, 20(12), pp. 3274–3281, [žiūrėta 2022-04-10]. Prieiga per DOI: [10.1080/10942912.2017.1286353](https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1286353).
88. SUEKAWA, M. ir kt. Exogenous proline has favorable effects on growth and browning suppression in rice but not in tobacco. Iš *Plant Physiology and Biochemistry* [interaktyvus]. 2019. Vol. 142, pp. 1–7, [žiūrėta 2022-04-11]. Prieiga per DOI: [10.1016/j.plaphy.2019.06.032](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.06.032).
89. MENDOZA, D. ir kt. 1H-NMR-based metabolomic of plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana* treated with salicylic acid and methyl jasmonate. Iš *Industrial Crops and Products* [interaktyvus]. 2019. Vol. 135, pp. 217–229, [žiūrėta 2022-04-11]. Prieiga per DOI: [10.1016/j.indcrop.2019.04.012](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.012).
90. ZAEEM, A. ir kt. Effects of Biogenic Zinc Oxide Nanoparticles on Growth and Oxidative Stress Response in Flax Seedlings vs. *In Vitro* Cultures: A Comparative Analysis. Iš *Biomolecules* [interaktyvus]. 2020, 10(6), pp. 918, [žiūrėta 2022-04-19]. Prieiga per DOI: [10.3390/biom10060918](https://doi.org/10.3390/biom10060918).
91. JAVED, R. ir kt. Elicitation of Secondary Metabolites in Callus Cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni Grown Under ZnO and CuO Nanoparticles Stress. Iš *Sugar Tech* [interaktyvus]. 2018, 20(2), pp. 194–201. Prieiga per DOI: [10.1007/s12355-017-0539-1](https://doi.org/10.1007/s12355-017-0539-1).
92. Chamani, E. ir kt. The effect of Zinc oxide nano particles and Humic acid on morphological characters and secondary metabolite production in *Lilium ledebourii* Bioss. Iran. Iš *Plant Breed.* 2015, Vol. 4, pp. 11–19.

93. DSM IP Assets BV. Process for extraction of glucosinolates from broccoli seeds. Inventors: Christof Wehrli, Jan Schutz. United States patent, US20130030162A1, US 8491944 B2, A61K36/31, 2013, [žiūrēta 2022-04-14]. Prieiga per [GooglePatents](#)

Priedai

1 priedas. Maitinamosios *Murashige* ir *Skoog* terpės sudėtis

Reagentai	Koncentracija tirpale, mg/l	Koncentracija terpėje
Makroelementai ^a		
NH ₄ NO ₃	33000	1650
KNO ₃	38000	1900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	8800	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7400	370
KH ₂ PO ₄	3400	170
Mikroelementai ^b		
KI	166	0,83
H ₃ BO ₃	1240	6,2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	4460	22,3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1720	8,6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	50	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	5	0,025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	5	0,025
Geležies šaltinis ^b		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5560	27,8
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	7460	37,3
Organiniai priedai ^b		
Mioinozitolis	20000	100
Nikotino rūgštis	100	0,5
Piridoksinas-HCl	100	0,5
Tiaminas-HC	100	0,5
Glicinas	400	2
Sacharozė		30000
Agar-agaras		5

a – pilama 50 ml tirpalo į terpę; *b* – pilama 5 ml tirpalo į terpę