



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

**Bioaktyvumo įvertinimas Astrinių šeimos augalų kaliaus  
kultūrose *in vitro***

Baigiamasis magistro projektas

---

**Živilė Leliūgaitė**

Projekto autorė

**Doc. dr. Ilona Jonuškienė**

Vadovė

---

**Kaunas, 2019**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

**Bioaktyvumo įvertinimas Astrinių šeimos augalų kaliaus  
kultūrose *in vitro***

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

---

**Živilė Leliūgaitė**

Projekto autorė

**Doc. dr. Ilona Jonuškienė**

Vadovė

**Lekt. dr. Kazimieras Anusevičius**

Recenzentas

---

**Kaunas, 2019**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

Živilė Leliūgaitė

## **Bioaktyvumo įvertinimas Astrinių šeimos augalų kaliaus kultūrose *in vitro***

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Živilės Leliūgaitės, baigiamasis projektas tema „Bioaktyvumo įvertinimas Astrinių šeimos 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.

---

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

---

(parašas)

## Turinys

Santrumpų ir terminų sąrašas .....	6
Santrauka .....	7
Summary .....	8
Įvadas .....	9
<b>1. Literatūros apžvalga .....</b>	<b>10</b>
1.1 Astrinių šeimos augalai .....	10
1.1.1 Vaistinė medetka ( <i>Calendula officinalis</i> L.) .....	10
1.1.2 Dažinis dygminas ( <i>Carthamus tinctorius</i> L.) .....	11
1.1.3 Paprastoji kraujažolė ( <i>Achillea millefolium</i> L.) .....	12
1.2 Fitohormonai .....	14
1.2.1 Auksinai .....	14
1.2.2 Citokininai .....	15
1.3 Oksidacinis stresas ir antioksidantai .....	16
1.3 Liuteinas .....	16
1.5 Kaliaus kultūra <i>in vitro</i> .....	18
<b>2. Medžiagos ir tyrimų metodai .....</b>	<b>20</b>
2.1 Terpių ruošimas .....	20
2.2 Sėklų sterilizavimas ir kaliaus kultūros formavimas .....	21
2.3 Augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu .....	22
2.3 Redukcinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas augaluose .....	22
2.4 Antioksidacinis aktyvumas vaistiniuose augaluose pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną .....	22
2.5 Bendras fenolinių junginių įvertinimas Folino-Kiokalto metodu .....	23
2.6 Karotinoidų įvertinimas .....	23
2.7 Flavonoidų kiekio įvertinimas .....	24
2.8 Fermento katalazės aktyvumo įvertinimas .....	24
2.9 Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas .....	25
2.10 Askorbatperoksidazės įvertinimas .....	25
2.11 L-prolino įvertinimas .....	26
2.12 Malondialdehido (MDA) kiekio įvertinimas .....	26
2.13 Augalinių ekstraktų antibakterinis įvertinimas <i>Rhizobium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> , <i>E. coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> bakterijoms .....	27
<b>3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas .....</b>	<b>28</b>
3.1 Augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu .....	28

3.2 Redukcinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas augaluose .....	29
3.3 Antioksidacinis aktyvumas vaistiniuose augaluose pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną .....	30
3.4 Bendras fenolinių junginių įvertinimas Folino-Kiokalto metodu.....	32
3.5 Karotinoidų įvertinimas .....	33
3.6 Flavonoidų kiekio nustatymas .....	35
3.7 Fermento katalazės aktyvumo nustatymas .....	35
3.8 Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas .....	37
3.9 Askorbatperoksidazės įvertinimas .....	38
3.10 L-Prolino įvertinimas .....	40
3.11 Malondialdehido (MDA) kiekio įvertinimas .....	41
3.12 Augalinių ekstraktų antibakterinis įvertinimas <i>Rhizobium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> , <i>E.Coli</i> , <i>Bacillus Subtilis</i> bakterijoms.....	43
<b>4. Rekomendacijų dalis.....</b>	<b>45</b>
<b>Išvados.....</b>	<b>47</b>
<b>Literatūros sąrašas .....</b>	<b>48</b>

## Santrumpų ir terminų sąrašas

### Santrumpos:

2,4-D – 2,4-dichlorofenoksiacto rūgštis;

BAP – benzilaminopurinas;

DMSO – dimetilsulfoksidai;

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas;

DTT – ditriotritolis;

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis;

FRAP – geležies redukcijos antioksidantinė galia (angl. *Ferric reducing antioxidant power*);

IAR – indolil-3-acto rūgštis;

LB – *Luria – Bertani* terpė;

MDA – malondialdehidai;

MS – *Murashige & Skoog* terpė;

NAR – naftilacto rūgštis;

PMSF – fenilmetilsulfonilfluoridai;

SOD – superoksido dismutazė;

TDZ – thiadiazuronai;

TPTZ – 2,4,6-tripiridyl-s-triazinai.

Živilė Leliūgaitė. Bioaktyvumo įvertinimas Astrinių šeimos augalų kaliaus kultūrose *in vitro*. Vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis: Technologijų mokslai, Biotechnologija

Reikšminiai žodžiai: medetka, kraujažolė, dygminas, fitohormonai, *in vitro*, antriniai metabolitai.

Kaunas, 2019. 50 p.

### Santrauka

Šiame darbe tiriamas astrinių šeimos augalų: medetkos, kraujažolės ir dygmino, antrinių metabolitų susidarymas, juos auginant *in vitro* ir veikiant skirtingomis fitohormonų koncentracijomis. Atlikti tyrimai nustatantys augalų antioksidacinį aktyvumą, fenolinių junginių, karotenoidų, prolino, MDA kiekį, fermento katalazės, superoksido dismutazės, askorbatperoksidazės aktyvumą. *In vitro* sąlygomis auginamos skirtingos augalų dalių nediferencijuotų ląstelių kultūros, iš kurių vėliau galima išgauti norimus antriniu metabolitus. Tai ypač svarbu farmacijos, kosmetikos, maisto pramonėje, siekiant užtikrinti kuo didesnę produkto išeią. Pasirinkti fitohormonų variantai medetkos auginimui: BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l); IAR (0,1 mg/l) + BAP (1 mg/l); IAR (0,1 mg/l) + TDZ (0,5 mg/l). Kraujažolei pasirinkti fitohormonai: BAP (2,4 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) bei TDZ (0,75 mg/l). Dygminui: TDZ (0,5 mg/l) + NAR (0,2 mg/l); NAR (5 mg/l) + BAP (0,25 mg/l); BAP (1,8 mg/l) + 2,4 – D (0,3 mg/l) + kazeinas 0,1 %. Nustatyti fitohormonų variantai *in vitro* augalų antioksidaciniam aktyvumui padidinti. Medetkos kaliaus kultūra iš stiebelių auginta su fitohormonais IAR (0,1 mg/l) + BAP (1 mg/l). Kraujažolės kaliaus kultūra iš stiebelių auginta su TDZ (0,75 mg/l). Dygmino *in vitro* kaliaus kultūros visais variantais pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu lyginant su dygmino *in vivo*. Ryškiausi antrinių metabolitų kiekio padidėjimai stebimi tiriant fermentą katalazę, taip pat naudojant tuos pačius fitohormonus, kaip ir antioksidaciniui aktyvumui padidinti. Antibakterinis atsparumas nustatytas geriausias medetkos stiebeliuose augintuose MS terpėje papildytoje fitohormonais IAR (0,1 mg/l) + TDZ (0,5 mg/l) prieš *Bacillus subtilis* bakterijas; kraujažolės ekstraktas prieš *Rhizobium radiobacter* bakteriją, kai naudoti fitohormonai BAP (2,4 mg/l) + NAR (0,5 mg/l); dygmino ekstraktas prieš bakteriją *Xanthomonas campestris*, kai naudoti fitohormonai TDZ (0,5 mg/l) + NAR (0,2 mg/l).

Leliūgaitė Živilė. Evaluation of bioactivity of Asteraceae family plants callus cultures *in vitro*. Master's Final Degree Project. Supervisor Dr. Assoc. Prof. Ilona Jonuškienė; Faculty of Chemical Technology Kaunas University of Technology.

Study field and area: Technology Sciences, Biotechnology.

Keywords: marigold, yarrow, safflower, phytohormones, *in vitro*, secondary metabolites.

Kaunas, 2019. 50 pages.

### Summary

This investigation is about the formation of secondary metabolites in Asteraceae family plants marigold, yarrow, safflower when they are grown *in vitro* with different variations of phytohormones. We choose methods with which levels of antioxidant activity, flavonoids, phenols, carotenoids, proline, MDA were identified. In addition activity of enzyme catalase, superoxide dismutase, ascorbate peroxidases, antibacterial properties were measured. By growing plant tissues *in vitro* we can increase the quantity of secondary metabolites. This research is key for pharmaceutical, cosmetics and food industries. Based on past research we choose different variations of phytohormones concentration. For marigold: BAP (2.5 mg/l) + NAR (0.5 mg/l); IAR (0.1 mg/l) + BAP (1 mg/l); IAR (0.1 mg/l) + TDZ (0.5 mg/l). Yarrow: BAP (2.4 mg/l) + NAR (0.5 mg/l) and TDZ (0.75 mg/l). Safflower: TDZ (0.5 mg/l) + NAR (0.2 mg/l); NAR (5 mg/l) + BAP (0.25 mg/l); BAP (1.8 mg/l) + 2,4-D (0.3 mg/l) + casein 0.1 %. According to the results best phytohormones option for increasing antioxidant activity for marigold was MS media with IAR (0.1 mg/l) + BAP (1 mg/l); yarrow TDZ (0.75 mg/l); in growing safflower *in vitro* all variations of phytohormones were significantly better than growing the plant *in vivo*, however the difference between variations of phytohormones were insignificant. Out of all measured secondary metabolites enzyme catalase had the largest increase compared with growing the plant *in vivo* while using the same phytohormones as when measuring antioxidant activity. The best antibacterial activity in marigold extract was produced against *Bacillus subtilis* bacteria when MS media with IAR (0.1 mg/l) + TDZ (0.5 mg/l) were used. The best yarrow extract was against *Rhizobium radiobacter* bacteria with phytohormones BAP (2.4 mg/l) + NAR (0.5 mg/l). Safflowers best antibacterial activity was found against *Xanthomonas campestris* bacteria, when phytohormones TDZ (0.5 mg/l) + NAR (0.2 mg/l) were used.



## Įvadas

Astrinių šeimos augalai nuo seno vertinami ir naudojami liaudies medicinoje. Dabar šie augalai taip pat plačiai pritaikomi farmacijos, maisto ir kosmetikos pramonėje. Jie pasižymi žaizdas gydančiu, antioksidaciniu, analgetiniu, skonį suteikiančiu poveikiu. Dėl plataus paplitimo pasaulyje ir nereiklių augimo sąlygų jie randami ir Lietuvoje. Augdami gyvojoje gamtoje augalai patiria daug išorinio streso, dėl maistinių medžiagų trūkumo, didelių temperatūros skirtumų, kenkėjų ar ligų. Augalus kultivuojant *in vitro*, suformuojamos įvairių augalo dalių kaliaus kultūros ir jų augimas skatinamas fitohormonais. Užtikrinant optimalias augimo sąlygas galima sumažinti išlaidas ir gauti didesnę reikalingų antrinių metabolitų kiekį. Šiame darbe bus tiriami keli pasirinktų fitohormonų variantai, kurie pasirinkti atsižvelgiant į ankstesnių publikuotų darbų naudotas fitohormonų koncentracijas. Kraujažolei pasirinkti fitohormonai: BAP (2,4 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) bei TDZ (0,75 mg/l). Medetkos MS terpė papildyta: BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l); IAR (0,1 mg/l) + BAP (1 mg/l); IAR (0,1 mg/l) + TDZ (0,5 mg/l). Dygminui pasirinktos fitohormonų koncentracijos: TDZ (0,5 mg/l) + NAR (0,2 mg/l); NAR (5 mg/l) + BAP (0,25 mg/l); BAP (1,8 mg/l) + 2,4 – D (0,3 mg/l) + kazeinas 0,1 %. Pagal numatytas metodikas įvertintas antioksidacinis aktyvumas, fenolinių junginių, karotenoidų, prolino, MDA, fermento katalazės, superoksido dismutazės, askorbatperoksidazės aktyvumas ir antibakterinis aktyvumas. Analizuoti pasirinktas antrinis metabolitas liuteinas, gautas iš medetkos lapelių kaliaus kultūros. Karotenoidas liuteinas ypač svarbus antrinis metabolitas, pasižymintis antioksidacinėmis savybėmis. Jo organizmas negamina, todėl svarbu jo gauti su maistu ar papildais.

**Darbo tikslas** – ištirti astrinių šeimos augalų: medetkos, kraujažolės ir dygmino, kaliaus kultūros augimą ir antrinių metabolitų susidarymą *in vitro* auginant mitybinėse terpėse papildytose skirtingais fitohormonais.

### Darbo uždaviniai:

1. įvertinti, kuris fitohormonų variantas buvo optimaliausias auginant pasirinktus augalus *in vitro*, siekiant išgauti didesnę antioksidacinę aktyvumą;
2. nustatyti, kurie fitohormonai lėmė didesnę fenolinių junginių, prolino, MDA kiekį ir fermento katalazės, superoksido dismutazės, askorbatperoksidazės aktyvumą;
3. įvertinti, kuriuo atveju buvo gautas didesnis antibakterinis aktyvumas;
4. pateikti liuteino išskyrimo aparatūrinę schemą.

## 1. Literatūros apžvalga

### 1.1 Astrinių šeimos augalai

Astriniai (lot. *Asteraceae, Compositae*, angl. *Sunflowers*) – magnolijūnų augalų šeima. Vienmetės, dvimetės arba daugiametės žolės, kurių daugumos šaknys liemeninės, kai kurios su šakniastiebiais. Stiebas šakotas, dažnai apatinė dalis sumedėjusi, pasitaiko bestiebių su lapų skrotele. Augalai neretai su liaukutėmis, plaukeliais, pūkeliais arba šereliais. Žiedai susitelkę į savitus žiedynus – graižus. Vaisius – lukštavaisis.

Žiedus apdulkina vabzdžiai. Šeimoje yra maistinių, vaistinių, dažinių, taip pat dekoratyvinių augalų, techninių kultūrų. Reikia paminėti, kad tai labai gausi rūšių skaičiumi šeima, kurioje yra apie 1300 genčių ir 25000-30000 rūšių. Lietuvoje žinomos 189 rūšys iš 64 genčių, kelios rūšys įrašytos į raudonąją knygą [1].

#### 1.1.1 Vaistinė medetka (*Calendula officinalis* L.)

Vaistinė medetka - tai vienmetis žolinis augalas, užaugantis iki 50 cm aukščio. Turi liemeninę šaknį. Stiebas stačias, šakotas. Lapai pražanginiai, lygiais kraštais, lancetiški. Kraštiniai žiedai geltonos spalvos, o viduriniai - oranžinės, susitelkę graižo formos žiedyne.

Vaistinės medetkos tėvynė driekiasi nuo Pietų Europos į Aziją. Vidurio Europoje dėl savybės gydyti žaizdas ji jau šimtmečius auginama daržuose. Lietuvoje auginamas kaip dekoratyvinis ir vaistinis augalas. Dauginamos sėklomis, mėgsta drėgną, neutralią arba silpnai rūgščių dirvą priemolį arba priemėlį. Geriausiai auga saulėtoje vietoje. Darželiuose, soduose pasitaiko auginamų medetkų pilnaviduriais žiedynais, kurie taip pat tinka vaistinei žaliavai [2].

Žydi birželio-spalio mėnesiais. Vaistinė augalinė žaliava – Medetkų žiedai renkami pradėjus augalams žydėti, kas 3-5 dienas. Džiovinama paskleidus plonu sluoksniu, pavėsyje arba specialioje džiovykloje 40-45 C temperatūroje. Svarbu, kad gerai išdžiūtų žiedynostis. Žiedai renkami iki 18 kartų per vasarą [3].

Lotynišką medetkos pavadinimą (*Calendula*) sugalvojo senovės romėnai, kurie pastebėjo, kad ši gėlė pražysta kiekvieno mėnesio pirmą dieną (lot. *Kalends*). Nenutrūkstantis medetkos žydėjimas jiems simbolizavo džiaugsmą, todėl gėlė buvo auginama soduose, kad skleistų laimę. Senovės egiptiečiai manė, kad medetka padeda atjaunėti, o indai ja puošdavo šventyklų altorius. Amerikos pilietinio karo metu augalas buvo plačiai naudojamas kovos laukuose, nes daktarai juo gydydavo atviras žaizdas [4].

Kaupia karotinoideus: likopiną, karotiną, violaksantiną, rubiksantiną ir kt. - apie 3 %; vitaminą C, flavonoidus, fenolkarbonines rūgštis; gleives [8]. Randami eterinio aliejaus pėdsakai: mentonas, izomentanas, kariofilenas, kartumynai (kalendenas), saponinai, imunostimuliuojančiomis savybėmis pasižymintys polisacharidai (galaktanai) [5].



**1.1 pav.** Vaistinė medetka (*Calendula officinalis* L.)

Flavanoidai skatina tulžies išsiskyrimą, todėl šiam tikslui geriama medetkos užpilai ir nuovirai. Ši gėlė naudojama konjunktyvitui gydyti. Medetkos priešuždegiminis ir antibakterinis veikimas ne tik sumažina patinimą, bet ir nužudo kenksmingas bakterijas akį supančioje membranoje [9]. Priešuždegiminis poveikis yra labai svarbus gydant uždegimines virškinimo sistemos ligas: gastritą, opaliges, storosios žarnos uždegimą. Užpilais bei nuovirais skalaujama gerklė sergant angina, faringitu, stomatitu [5]. Medetkos žiedai stimuliuoja kolageno sintezę, kuris veiksmingas prieš raukšles.

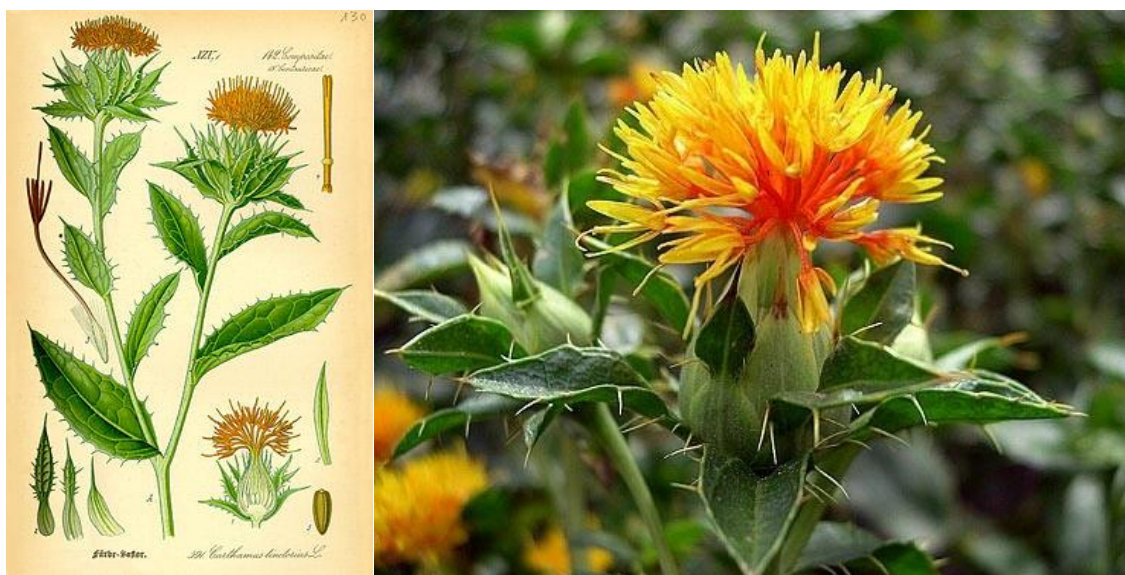
Triterpeniniai junginiai lemia baktericidinį – žaizdų gijimą skatinantį poveikį. Tepalais ir tinktūromis išoriškai gydomos sunkiai gyjančioms žaizdos, nudegimai [6]. Medetkų arbata turi silpną estrogeninį poveikį, todėl mažina menstruacijų skausmus ir gausų kraujavimą [7].

### **1.1.2 Dažinis dygminas (*Carthamus tinctorius* L.)**

Dygminas (*Carthamus*) – astrinių (*Asteraceae*) šeimos augalų gentis. Lietuvoje gana retai soduose, sodybose, kolekcijose auginamas dažinis dygminas (lot. *Carthamus tinctorius*). Augalas 40-80 cm aukščio, žydi liepos – rugpjūčio mėn. [3].

Dažinio dygmino žiedai turi kartamino, flavanoidų grupės dažomosios medžiagos, bet neturi eterinio aliejaus. Augalas gausiai auginamas valgomajam aliejui, kuris išgaunamas iš sėklų [10]. Jame yra dvigubai neprisotintos linoleinės rūgšties (70%) ir trigubai neprisotintos linoleninės rūgšties (10%) trigliceridų [14].

Palyginus didelis vitamino E kiekis pastaraisiais metais sudomino dažinio dygmino aliejumi mitybos specialistus [11]. Jodo indeksas yra šiek tiek didokas. Naudojamas geltonos, raudonos ir šafrano spalvos dažiklių gamyboje, taip pat ir maisto pramonėje, pvz., karamelės gamyboje [12].



**1.2 pav.** Dažinis dygminas (*Carthamus tinctorius* L.)

Dažinio dygmino žiedlapiai turi savyje skirtingų dažančių pigmentų - geltonų ir raudonų [13]. Geltonas pigmentas, saflorhelis, laikomas mažiau vertingu ir dažniausiai iš žaliavos išplaunamas vandeniu [15]. Raudonas pigmentas, kartaminas, sunkiai tirpsta vandenyje. Eteryje kartaminas netirpsta visai, tačiau puikiai tirpsta spirite ir šarmuose (kamparo spiritas). Be minėtų pigmentų yra ir kitų, turinčių tas pačias spalvas [16].

### 1.1.3 Paprastoji kraujažolė (*Achillea millefolium* L.)

Paprastoji kraujažolė – daugiametis žolinis 20–60 cm aukščio augalas, turintis šliaužiantį, trumpą šakniastiebį. Stiebas standus, status, dažniausiai nešakotas, išskyrus viršūnę, plaukuotas. Lapai 2–3 kartus plunksniškai suskaldyti, apatiniai kotuoti, viršutiniai – bekočiai. Bendra lapų forma lancetiška. Graižai 4–6 mm pločio, susibūrę į tankias skydiškas šluoteles. Liežuviški žiedai balti, kartais rausvi arba raudoni. Augalą patrynus, jaučiamas specifinis kvapas. Žydi liepos–spalio mėnesį. Vaisius – pailgas lukštavaisis [17].

Lietuvoje labai dažnas augalas. Mėgsta purias priemolio ir priemolio dirvas. Auga laukuose, ganyklose, pakelėse, pamiškėse. Gali būti kultyvuojamas. Be paprastosios kraujažolės Lietuvoje auga dar dvi *Achillea* genties augalų rūšys: čiaudulinė kraujažolė (*Achillea ptarmica* L.) ir krantinė kraujažolė (*Achillea cartilaginea* Ledeb. ex Rchb.) [1].



**1.2 pav.** Paprastoji kraujažolė (*Achillea millefolium* L.)



Vaistinei žaliai renkama kraujažolių žolė, ji kerpama apie 15 cm ilgio kartu su žiedynu. Kraujažolę tinkamiausia rinkti, kai žiedai nenužydėję, sausi. Džiovinama pavėsyje, gerai vėdinamoje patalpoje ar specialioje džiovykloje 35–40 °C temperatūroje. Tinkamai paruošta žaliava yra žalsvai pilkos spalvos, turi malonų, specifinį kvapą ir kartų skonį [18].

Kraujažolės žaliavoje yra eterinio aliejaus, kurio pagrindinę dalį sudaro azulenai (iki 40%), taip pat barneolis, cineolis, pinenas, kamparas. Be to, yra asparagino, dervų, inulino, tanidų, karčiųjų ir mineralinių medžiagų, fitoncidų, alkaloidų (achileino, stachidrinio), organinių rūgščių (acto, izovalerijono, skruzdžių), vitamino C, filochinono, karotino, flavonoidų (aspigenino, luteolino, kaempferolio) ir kt. [19].

Kraujažolė nuo seno vartojama gydymo tikslams. Dar Dioskaridas ją vadino žaizdos žole, nes ja buvo gydomos žaizdos ir kraujavimai. Kraujažolės preparatai žadina apetitą, gerina skrandžio liaukų veiklą, gydo sumažėjusio rūgštingumo gastritą, skrandžio ir dvylikapirštės žarnos opaligę, kolitą, hemorojų, stabdo vidinius ir išorinius kraujavimus, didina trombocitų kraujyje, greitina kraujo krešamumą. Taip pat jie atpalaiduoja žarnyno, tulžies latakų lygiuosius raumenis, gerina tulžies skyrimąsi į dvylikapirštę žarną, virškinimą. Be to, kraujažolė veikia baktericidiškai, slopina uždegimus, mažina alergiją. Ji padeda gyti žaizdoms, kepenų ir tulžies latakams, trauktis gimdai, o kartu mažina jos kraujavimą. Šviežios kraujažolių sultys stiprina kraujagysles, ypač venas, jei jos išsiplėtusios, gerina širdies darbą, savijautą klimakteriniu laikotarpiu, reguliuoja menstruacijų ciklą. Didelis biologiškai veikliųjų kraujažolės medžiagų kompleksas gerina organizmo medžiagų apykaitą, padeda ligoniams, linkusiems į akmenligę [20].

Sergančioms kiaušidžių uždegimu jau po pirmų sėdimųjų vonių sumažėja skausmas, pamažu išnyksta ir uždegimas. Tokios vonios padeda nevalingai besišlapinantiems seniems žmonėms ar vaikams. Šiuo atveju reikia dar gerti kasdien po 2 puodelius kraujažolių arbatos. Voniai 100 g žolės užpilama šaltu vandeniu nakčiai, kitą dieną pakaitinama iki virimo ir supilama į vonią. Užpilui 15 g smulkios augalinės žaliavos užplikoma stikline vandens, kaitinama 15 min. verdančio vandens vonelėje, aušinama 45 min., perkošiama. Į gautą užpilą įpilama iki 200 ml virinto vandens. Vėsioje vietoje užpilą galima laikyti 3-4 dienas. Patariama skalauti burnos ertmę kraujažolės užpilu arba praskiestomis sultimis, jei kraujuoja gleivinė, sergant stomatitu, gingivitu. Kraujuojant iš nosies gleivinės, reikia tamponuoti atitinkamą nosies skylę tamponu, suvilgytu kraujažolių sultimis [22].

Kraujažolė yra sudedamoji dalis vaistinių augalų mišinių, vartojamų apetitui gerinti, virškinamojo trakto, urologinėms ligoms gydyti ir medžiagų apykaitai reguliuoti. Pvz., viduriuojant rekomenduojamas mišinys iš jonažolės (30 g), kraujažolės (30 g), erškėtrožės vaisių (50 g), ažuolo žievės (30 g). Valgomasis šaukštas mišinio užplikomas stikline verdančio vandens ir virinama vandens vonelėje 15 min., šaldoma 45 min., perkošiama, pasaldoma medumi ir geriama po: vieną valgomąjį šaukštą 5-6 kartus per dieną. Sutrikus virškinimui, kaupiantis žarnyne dujoms, tinka toks vaistažolių mišinys: kraujažolės – 20 g, krapų ir kmynų vaisių – po 20 g, valerijono šaknų – 15 g. Nuovirui vienas valgomasis šaukštas mišinio užplikomas stikline vandens. Kraujuojant iš gimdos, padeda kraujažolės (50 g) ir didžiosios dilgėlės lapų (50 g) mišinys. Užpilui valgomas šaukštas mišinio: užplikomas stikline vandens, virinama vandens vonelėje 15 min. ir šaldoma 45 min. [21]

Liaudies medicina paprastąją kraujažolę gerina apetitą, gydo skrandžio bei žarnyno (opaligę, kolitą, dispepsiją), kepenų, tulžies ligas, stabdo plaučių, žarnyno, gimdos kraujavimus. Kraujažolių arbata padeda šalinti iš kraujo, kepenų, inkstų, tulžies ir šlapimo pūslės medžiagų apykaitos produktus. Gydomas peršalimas, taip pat kosulys, sloga, nevalingas šlapinimasis ir t.t. [20]

Žemės ūkyje kraujažolės nuoviras vartojamas kaip biologinė insekticidinė priemonė nuo žemės ūkio kenkėjų [21].

## 1.2 Fitohormonai

Augaliniai hormonai - augalų augimą ir vystymąsi reguliuojančios medžiagos dar vadinami augalų augimo reguliatoriais [23]. Evoliuciškai augalai išsivystė taip jog naudojamos penkios pagrindinės fitohormonų grupės, kurios reguliuoja augimą ir vystymąsi:

1. Auksinai
2. Citokininai
3. Giberelinai
4. Abcizo rūgštis
5. Etilenas

Šių grupių medžiagos ar jų tarpusavio sąveika augaluose gali daryti kiek skirtingą poveikį (priklausomai nuo augalo rūšies), bet pagrindiniai reguliacijos principai lieka tie patys. Hormonai augalo augime ir vystymesi iš esmės reguliuoja viską. Jų veikla prasideda vos užsimezgas sėklai. Juk sėklos turi ilgesnį ar trumpesnį ramybės periodą, jei reikia – gebėjimą išlaukti nepalankias klimato sąlygas. Šį procesą reguliuoja fitohormonai – supresoriai (inhibitoriai), sustabdantys beveik visus sėklos biocheminius procesus. Suirus inhibitoriams ir pradėjus sėklai dygti, į darbą įsijungia skatinantys ląstelių metabolitinius procesus fitohormonai, įtakojantys taip pat ir audinių tarpusavio sąveiką bei darnų vystymąsi, užtikrinantys net gi sėkmingą žydėjimą bei naujų sėklų subrandinimą. Jei augalai auga kintamo klimato sąlygomis ir turi ramybės periodą, jiems jį išverti padeda taipogi fitohormonai. Augaluose hormonų poveikis labiau priklauso nuo jų tarpusavio pasiskirstymo ir koncentracijos [24].

### 1.2.1 Auksinai

Auksinai vadinama viena iš fitohormonų grupių, kuri gali inicijuoti augalo ląstelių didėjimą, tįsimą, bei cheminiai junginiai, kurie augale sukelia panašius fiziologinius procesus kaip indolil-3-actio rūgštis (IAR). Tai – pirmieji mokslininkų atrasti augalų hormonai.

Dažniausiai IAR susidaro modifikuojant amino rūgštį triptofaną. Šis auksinas chemiškai labai panašus į pastarąją amino rūgštį. Šie cheminiai junginiai susidaro mažai diferencijuotose, meristeminiuose audiniuose, o iš jų parenchiminius ir apytakos audiniais transportuojami į kitus audinius [25].

Antžeminėje augalo dalyje auksinai gali judėti tik viena kryptimi – į šaknis, o požeminėje dalyje abejomis kryptimis. Paprastai šių cheminių junginių aptinkama labai nedaug, tačiau aktyviai augančiose srityse šis kiekis gali būti daug kartų didesnis. Augaluose auksinai sudaro kompleksinius junginius su baltymais, angliavandeniais ir kitais. Šie junginiai nėra fiziologiškai aktyvūs ir kaupiami kaip atsarga. Esant reikalui auksinai išskiriami iš junginių ir transportuojami į aktyviai augančias vietas. Auksinų poveikis tįstamajam augimui pasireiškia jiems susijungus su receptoriais ir aktyvavus protonų siurblių. Vandenilio jonai yra šalinami iš ląstelės, ją dengianti sienelė rūgštėja ir dėl to nutrūksta vandeniliniai ryšiai sujungiantys tarpusavyje celiuliozės fibriles, o aktyvuoti fermentai ardo ląstelės sienelę. Tirpios medžiagos, bei vanduo, dėl protonų siurblio sukulto elektrocheminio gradiento skirtumo, veržiasi į ląstelę. Vėliau ląstelės dėl į jos sienelės veikiančios turgoro slėgio, pailgėja, bei išsiplečia. Po kurio laiko IAR jungiasi su ląstelės branduolio DNR ir suaktyvina baltymų

biosintezės procesą. Manoma, kad senos ląstelės negali ilgėti dėl to, kad neturi auksino receptorių [23].

Ši hormonų grupė atlieka daug įvairių funkcijų augale, keletas pagrindinių: atsakingi už ląstelių tįsimą, jų dalijimąsi (kartu su citokiniais), vandens ir rėtinių indų formavimąsi, stimuliuoja šaknų formavimąsi, dalyvauja įvairių tropizmų reakcijose, nulemia viršūnės dominavimą, lėtina lapų senėjimą, stimuliuoja eteno sintezę, svarbūs žydėjimui, bei vaisių susidarymui [24].

Žemės ūkyje aktyviai naudojami įvairūs sintetiniai auksinai, kurie veikia panašiai kaip ir natūralūs. Dėl šios priežasties jie yra kaip priemonės gyvašakių įsišaknijimui, žydėjimo kontroliavimui, vaisių nokimui reguliuoti, vaisių užuomazgų kritimui mažinti, tačiau didesnė auksino koncentracija gali būti kaip herbicidas piktžolėms naikinti [26].

### **1.2.2 Citokiniai**

Tai – viena svarbiausių fitohormonų grupių. Citokininų pavadinimas kilęs nuo sąvokos citokinezė (ląstelės citoplazmos dalijimasis) [27].

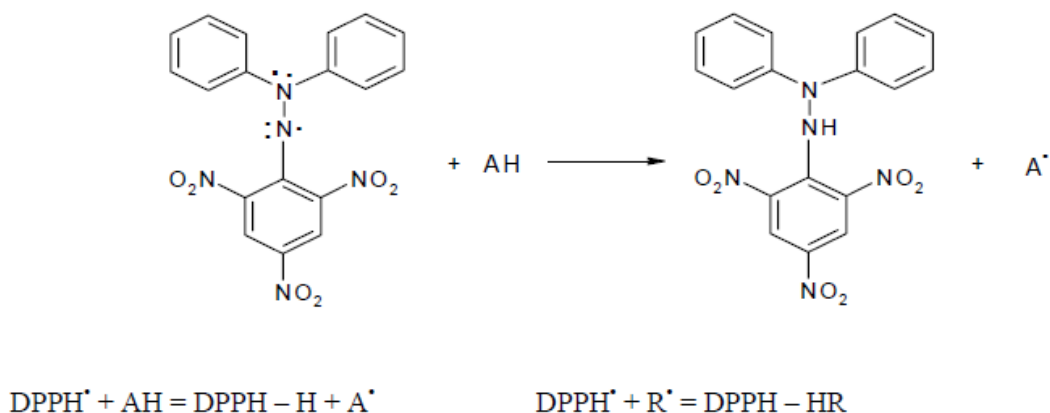
Citokiniai cirkuliuoja ir veikia visame augale. Jie sintetunami šaknyse, kaip sužinojome iš Skugo tyrimo, vandens apytakos indais transportuojami į kitus augalo organus. Šios grupės fitohormonai atsakingi už ląstelių dalijimąsi, miegančių pumpurų suaktyvinimą augimui, audinių senėjimo stabdymą. Svarbu pastebėti, jog citokininų veikla glaudžiai susijusi su kitais fitohormonais, pavyzdžiui, giberelinais, o ypač su auksiniais, kurių gausu ūglių viršūnėse. Citokininų grupės fitohormonų koncentracijos skirtumas audiniuose lyginant su auksinų gana nemažas. Todėl augalai žymiai jautriau reaguoja į citokininus ir pastarųjų kiekis augalo organizme mažesnis [24].

Tiriant citokininų ir auksinų koncentracijų santykių tarpusavio sąveiką buvo atlikta daug tyrimų ir tai puikiai atsispindėjo kaliaus (nediferencijuoto audinio) organogenezėje. Nustatyta, kad esant atitinkamam santykiui tiek vienos, tiek kitos fiziologiškai aktyvios medžiagos nesiformuoja nei šaknys, nei ūgliai, bet auga pats augalas (šiuo atveju kalius). Jei augalas gauna santykinai daugiau auksinų nei citokininų grupės fitohormonų, formuojasi šaknys. Sumažinus auksinų foną ir padidinus citokininų kiekį – formuojasi ūgliai. Kalius gaunantis tik citokininus po truputį pradeda nykti, o tik auksinus auga lėčiau [23].

Citokininų ir auksinų tarpusavio sąveika turi įtakos ne tik atskirų augalo dalių formavimuisi, bet ir žaizdų gyjimui. Abiejų fitohormonų grupių medžiagos labai reikalingos kaliaus indukcijai. Tad tai labai svarbu bonsai kultūroje, kai genint, žaizdų padaroma daug ir sąlyginai didelių. Kadangi, tai tampa potencialiai silpna augalo vieta kur gali įsimesti įvairių, dažniausiai grybinių, ligų sukėlėjų. Norima, kad medis jas kuo greičiau užtrauktų. Todėl labai svarbu tinkamai suvokti kaip priimti tam tikrus sprendimus genint. Svarbiausia turėti omenyje, jei stipriai išgenime medelio antžeminę dalį, tuo pačiu metu persodinant, neturėtume stipriai patrupinti šaknų. Pašalinus ūglių viršūnes, kuriose gausu auksinų, skatinsime ne tik šoninių (miegančių) pumpurų augimą, t.y. paties augalo atžėlimą, bet ir kaliaus susidarymą aplink žaizdą. Analogiškai tvarkant šaknyną, pašalinus dalį šaknų, kuriose sintetunami citokiniai, auksino fonas padidės ir skatins šaknyno vystymąsi, bei randino audinio susidarymą [28].

### 1.3 Oksidacinis stresas ir antioksidantai

Oksidacinis stresas – tai disbalansas tarp aktyviųjų deguonies formų susidarymo ir už jų neutralizavimą bei pašalinimą atsakingos antioksidacinės sistemos atsako [29].



#### 1.3 pav. DPPH<sup>•</sup> radikalo reakcija su antioksidantu

Antioksidantai kaip vitaminai C ir E yra pagrindinės gyvybos priemonės prieš reaktyviasias deguonies formas, tačiau didžiausią antioksidantų aktyvumą lemia vaisių bei daržovių sudedamosios dalys, tokios kaip fenolinės rūgštys ir flavonoidai, mažiau vitaminai C, E ar β-karotinai. Antioksidantai taip pat lėtina senėjimo procesus, padeda išvengti (sumažina) riziką sirgti lėtinėmis ligomis; išlaiko ląstelių struktūrą ir vientisumą [30,31] Dažniausiai antioksidantai grupuojami į 3 grupes:

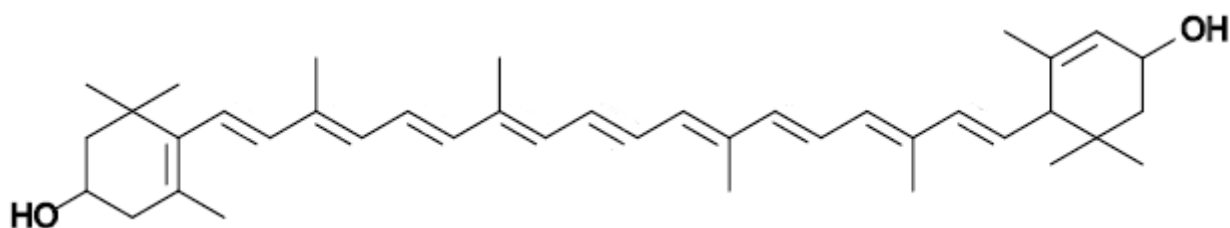
1. Antioksidantai, prijungiantys laisvuosius radikalus (karotinoidai, flavonoidai), nutraukiantys grandines reakcijas (nefermentiniai) – tai mažos molekulės, kurios gali priimti elektroną iš radikalo.
2. Fermentai antioksidantai, ardantys aktyviasias deguonies formas – antioksidaciniai fermentai, pvz. kaip superoksido dismutazė superoksidą paverčia vandenilio peroksidu, kurio suirimą katalizuoja katalazė, glutationo peroksidazė yra pagrindinė peroksido šalintoja.
3. Antioksidaciniai vitaminai (vitaminai C ir E), nutraukiantys grandines laisvųjų radikalų susidarymo reakcijas vandeninėje terpėje – (Vitaminas C, plazmoje esantys baltymai su tiolio grupe – albuminas, transferinas) arba lipidinės terpės antioksidantai, stabdantys laisvųjų radikalų susidarymą, šalinantys juos membranose, lipoproteinų dalelėse, taip apsaugodami lipidus nuo peroksidacijos (vitaminas E, redukuotas koenzimas Q10, flavonoidai, antocianinai) [32].

### 1.3 Liuteinas

Liuteinas - geltonos spalvos pigmentas, priklausantis karotenoidams [35]. Jo daugiausiai randama tamsiai žaliose lapinėse daržovėse ir kiaušinio trynyje. Liuteinas veikia kaip antioksidantas ir mėlyną šviesą sugeriantis pigmentas. Akyse filtruodamas ultravioletinius spindulius, liuteinas saugo lęšiuką ir tinklainę nuo pažeidimo [36]. Didžiausias liuteino kiekis yra kaupiamas akių dugno geltonosios dėmės dalyje, atsakingoje už centrinę regėjimą. Naujausi epidemiologiniai tyrimai, vertinantys liuteino, kaip antioksidanto, savybes nurodo jo teigiamą poveikį lėtinant aterosklerozės ir kai kurių



vėžinių pakitimų susidarymą. Liuteino organizmas pats negamina todėl labai svarbu jo pakankamai gauti su maistu.

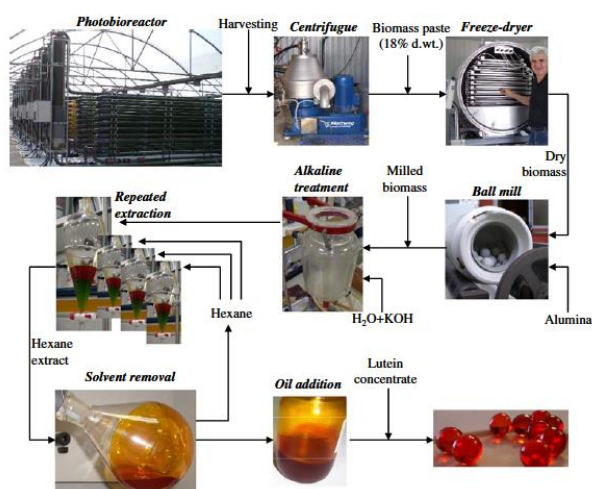


1.5 pav. Liuteinas

Liuteinas turi naudingų ir itin svarbių savybių rinkinį:

1. Šios medžiagos labai naudingos regos organams, ypač tinklui. Tai užkerta kelią jo sunaikinimui ir atsiskyrimui, o tai dažnai būna trumparegystė. Be to, liuteinas yra atsakingas už budrumą ir apsaugo nuo tam tikrų su amžiumi susijusių akių ligų (pvz., Kataraktos).
2. Liuteinas apsaugo širdies ir kraujagyslių sistemas nuo aterosklerozės, padeda išvengti širdies priepuolių ir insulto, taip pat sumažina cholesterolio kiekį kraujyje. Šios ligos dažnai sukelia dalinį ar visišką regėjimo praradimą. Gydant aterosklerozę ir kraujagyslių ligas, liuteinas vaidina pagalbinį vaidmenį, todėl pagrindinis vaistas turi būti pasirinktas raudonasis dobilas ir ženšenis [37]
3. Liuteino antioksidacinės savybės yra išreikštos efektyvia kovos su laisvųjų radikalų ir įvairių uždegiminių procesų organizme. Su žalingais laisvųjų radikalų poveikiais žaliosios arbatos ekstraktas taip pat gerai. Kai kurie tyrinėtojai susieti liuteino antioksidacines savybes su gebėjimu gydyti vėžį, tačiau tai nebuvo eksperimentiniu būdu patvirtinta. Norint pagerinti vėžiu sergančių pacientų būklę, geriau naudoti graviolą arba juodąją vėduoklę .

Liuteino nauda organizmui yra neįkainojama. Jis rūpinasi akių būkle, palaiko regėjimo aštrumą, padeda regos analizatoriams prisitaikyti prie staigių šviesos pokyčių. Liuteinas gali išlaikyti normalią cukraus koncentraciją kraujyje, taip pat apsaugo ląsteles nuo kenksmingo laisvųjų radikalų poveikio [38].



1.6 pav. Liuteino kapsulių gaminimo schema [35]

### 1.5 Kaliaus kultūra *in vitro*

Komerciniai augalų preparatai pasižymi nepastoviu bioaktyvių junginių kiekiu bei įvairumu, todėl tai gali sukelti abejonių dėl tokių produktų saugumo bei veiksmingumo. Junginių kiekis ekstraktuose stipriai priklauso nuo daugybės faktorių kaip derliaus nuėmimo laiko, kilmės vietos, biotinių ir abiotinių teršalų buvimo bei augalo genetikos. Bioaktyvių junginių kiekiui taip pat įtakos turi įvairūs aplinkos faktoriai kaip CO<sub>2</sub> koncentracija, temperatūra, vandens prieinamumas, azoto bei šviesos kiekiai.



1.7 pav. Suformuota kaliaus kultūra *in vitro*

*In vitro* kultūrų auginimo metodas yra alternatyvi gamybos strategija, siekiant užtikrinti pageidaujamą natūralių preparatų kiekį bei pastovumą. Šio metodo privalumai yra: 1) tai yra patvari ir ekologiška sistema, kuri leidžia išgauti sudėtingas chemines struktūras iš retų ir nykstančių augalų rūšių; 2) norimas produktas gali būti auginamas bet kurioje pasaulio vietoje; 3) galima užtikrinti aktyvių medžiagų kokybę ir kiekybę; 4) augimas nebepriklauso nuo geografinių bei ekologinių svyravimų; e) yra garantuojamas neužterštas produktas, kadangi augalo ląstelės nebuvo veikiamos mikroorganizmais, herbicidais, pesticidais ar fungicidais; 5) išvengiama augalo išnykimo pavojus; 6) augimo laikas yra sutrumpinamas nuo kelių metų iki kelių savaičių ar mėnesių [39].

Kalius, kuris daugiausiai formuojasi iš kamieninių ląstelių, turi neribotą augimo pajėgumą ir gali sintetinti tokius pačius junginius kaip ir pradinis augalas. Iš jo gautos ląstelių suspensijos iš pradžių yra auginamos mažais kiekiais, o vėliau yra perkeliama į bioreaktorius. Visuose proceso žingsniuose ląstelių kultūrų laikymo sąlygos bei aplinkos ir fizikiniai faktoriai turi būti optimizuojami, norint pasiekti aukštos kokybės bei efektyvią produkciją. To siekiant reikia tirti naujas terpes, hormonų kombinacijas bei anglies šaltinius.

Eksponentinėje augalų ląstelių kultūrų augimo stadijoje dauguma metabolitų yra gaminami labai mažais kiekiais arba visai negaminami, kadangi jų pirminių metabolitų pirmtakai yra reikalingi biomasės formavimui. Antrinių metabolitų gamybos suaktyvinimas yra efektyviausias stacionarioje augimo fazėje, todėl geriausia strategija būtų sukurti dviejų stadijų kultūrą, kada iš pradžių augalo ląstelės būtų laikomos terpėje optimizuotoje biomasės formavimui, o paskui perkeltos į terpę, kuri stimuliuotų antrinių metabolitų gamybą. Šios strategijos privalumas yra tas, kad tai leidžia pridėti fitohormonų bei biosintetinių pradinių medžiagų, kurios galėtų maksimizuoti išeigą.

Svarbių bioaktyvių molekulių gausinimas ir naujų junginių gavimas yra pagrindiniai dabartiniai biotechnologijos aspektai. Augalinių ląstelių kultūrų sistemų ir molekulinės biologijos vystymas leido atrasti daugybę būdų kaip pagerinti šių junginių produkciją [40].

## 2. Medžiagos ir tyrimų metodai

### 2.1 Terpių ruošimas

Šiame darbe pagrindinė augalų mitybinė terpė *in vitro* buvo *Murashige & Skoog* (MS). Augalų ląstelių mitybinė terpė MS ruošiama naudojant: makroelementus, mikroelementus, organinius priedus, geležies šaltį, anglies šaltinį.

2.1 lentelė. *Murashige & Skoog* (MS) maitinamosios terpės sudėtis

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

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

## 2.2 lentelė. MS terpės reagentų kiekis, paimamas iš pradinių tirpalų

Reagentai	Reagentų kiekis reikalingas 1 l terpės
Makrodruskos	50 ml
Mikrodruskos	5 ml
Fe - EDTA	5 ml
Sacharozė	30 g
Agaras	5 g
Organiniai priedai	5 ml

Fitohormonų pradinis tirpalas pagaminamas 0,1 mg/ml koncentracijos. Pirmiausia pasverta 10 mg augimo reguliatoriaus ir užpilta 2 – 5 ml tirpiklio, visiškai junginiui ištirpus įpiltas dvigubas kiekis distiliuoto vandens, išmaišius tirpalą pripilta vandens iki 100 ml. [33]

## 2.3 lentelė. Kaliaus kultūroms suformuoti MS terpėse naudoti fitohormonai ir jų koncentracijos

Augalas	MS terpėse naudoti fitohormonai ir jų koncentracija
Vaistinė medetka ( <i>Calendula officinalis</i> L.)	BAP 2,5 mg/l + NAR 0,5 mg/l
	IAR 0,1 mg/l + BAP 1 mg/l
	IAR 0,1 mg/l + TDZ 0,5 mg/l
Paprastoji kraujažolė ( <i>Achillea millefolium</i> L.)	BAP 2,4 mg/l + NAR 0,5 mg/l
	TDZ 0,75 mg/l
Dažinis dygminas ( <i>Carthamus tinctorius</i> L.)	TDZ 0,5 mg/l + NAR 0,2 mg/l
	BAP 1,8 mg/l + 2,4-D 0,3 mg/l + kazeinas 0,1%
	NAR 5 mg/l + BAP 0.25 mg/l

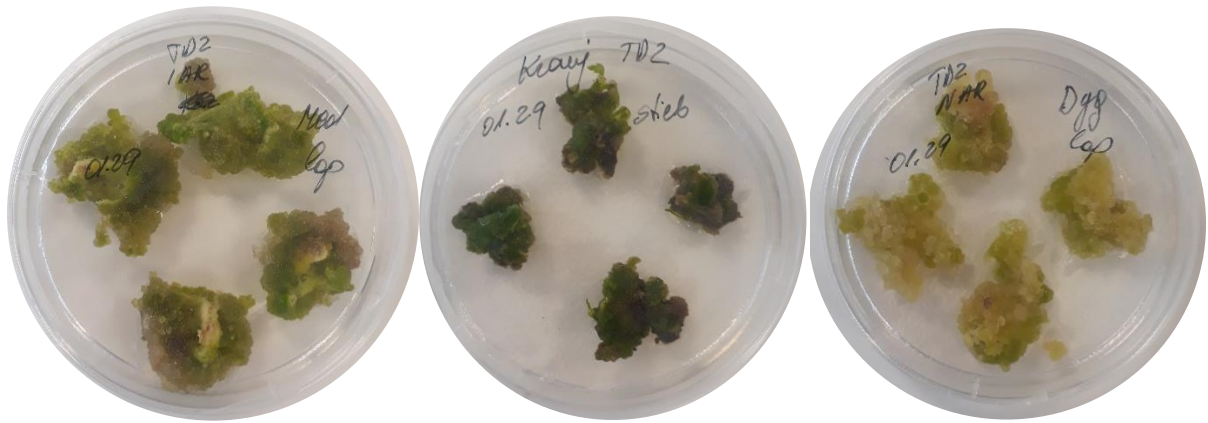
LB terpė, kuri naudojama antibakteriniam tyrimui sudaryta iš: natrio chlorido - 10 g/l, triptono - 10 g/l, mielių ekstrakto - 5 g/l, mikro agaras – 10 g/l. Užtikrinama jog pasiektas pH lygis yra 7,2.

### 2.2 Sėklų sterilizavimas ir kaliaus kultūros formavimas

Vaistinė medetkos sėklos prieš sterilizavimą išlukštenamos ir mirkomos 70 % etanoliu; 3 % NaClO tirpale 10 min. su 4 lašais Tween, perplaunamos 3 kartus distiliuotu vandeniu.

Kraujažolės ir dygmino sėklos sterilizuojamos 1 min. 70 % etanoliu; NaClO tirpale – 10 min. su 4 lašais Tween ir perplaunamos 3 kartus distiliuotu vandeniu.

Iš sėklų sudaiginti *in vitro* augalai išskirstyti į atskiras dalis (lapai, stiebai ir šaknys) ir persodinti į fitohormonais papildytą MS terpę. Taip suformuotos atskirų augalo dalių kaliaus kultūros *in vitro*.



**2.1 pav.** Suformuotos skirtingų augalo dalių kaliaus kultūros

### 2.3 Augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu

1 g susmulkintos augalinės žaliavos užpilama 10 ml metanolio ir homogenizuojama 10 min. Homogenatas centrifuguojamas 9000 aps/min 10 minučių ir supernatantas surenkamas.

Tiriamasis tirpalas ruošiamas į mėgintuvėlį įpilant 0,077 ml paruošto ekstrakto, 3 ml DPPH etaloninio tirpalo. Mėgintuvėlio turinys sumaišomas ir po 15 min laikymo tamsoje pamatuojamas tirpalo optinis tankis prie 515 nm bangos ilgio. Palyginamasis tirpalas ruošiamas į mėgintuvėlį įpilant 0,077 ml metanolio, 3 ml DPPH etaloninio tirpalo. Etaloninis DPPH tirpalas ruošiamas 0,0024 g DPPH radialo tirpinant metanolyje 100 ml talpos matavimo kolboje.

$$\% \text{ slopinimas} = [(A_B - A_A) / A_B] \cdot 100 \quad (1)$$

$A_B$  – palyginamojo tirpalo šviesos sugerties dydis;

$A_A$  – tiriamojo tirpalo šviesos sugerties dydis.

### 2.3 Redukcinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas augaluose

0,1 g sausos augalinės medžiagos ekstrahuojama metanolyje (5 ml) 45 °C 30 min. Ekstraktas centrifuguojamas ir naudojamas tyrimams. Į 1 ml skirtingų koncentracijų ekstraktų mėginius, supilama 1,25 ml 0,2 M fosfatinio buferio bei 1,25 ml  $K_3[Fe(CN)_6]$ . Sumaišoma ir inkubuojama 50 °C temperatūroje 20 min. Po to pridedama 1,25 ml 10 % trichloracto rūgšties ir sumaišoma. Centrifuguojama 10 min. Nucentrifuguoto tirpalo 1,25 ml sumaišoma su 1,25 ml distiliuotu vandeniu ir 0,25 ml 0,1 %  $FeCl_3$ . Mėginiai išmatuojami esant 700 nm bangos ilgiui. Didesnė šviesos sugertis reiškia didesnes redukcines savybes. [34]

### 2.4 Antioksidacinis aktyvumas vaistiniuose augaluose pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną

0,1 g išdžiovintos augalinės medžiagos ekstrahuojama metanolyje (5 ml) 45 °C, 30 min. Ekstraktas centrifuguojamas 10 min. ir naudojamas tyrimams.

Ruošiami šie reagentai: 300 mM acetato buferis (pH=3.6), 10 mmol TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinas) ištirpintas 40 mmol/l HCl,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  (20 mmol/l). FRAP reagentas ruošiamas su 25 ml 300 mM acetato buferio, 2,5 ml 10 mmol TPTZ ir 2,5 ml  $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$  (20 mmol/l). Mėginiai 100  $\mu$ l yra sumaišomi su 3 ml FRAP reagentu. Reakcijos mišinys matuojamas esant 593 nm bangos ilgiui. Kalibravimo kreivė ruošiamą  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$  (5; 10; 15; 20; 25  $\mu$ mol/l). Reikšmė apskaičiuojama pagal kalibravimo kreivę  $\mu$ mol/l Fe(II)/L. Į  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$  taip pat įpilama FRAP reagento.

## 2.5 Bendras fenolinių junginių įvertinimas Folino-Kiokalto metodu

0,05 g sausos, smulkintos augalinės medžiagos patalpinamos į mėgintuvėlį, užpilama 10 ml acetono (70 %) ir maišoma kratytuve 20 min kambario temperatūroje. Po to centrifuguojama 10 min 9000 aps. 4 °C. Supernatantas surenkamas ir laikomas ant ledo.

Paruošiami tirpalai kalibravimo kreivei sudaryti. Paimama 0; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100 µl standartinio tanino rūgšties tirpalai, vėliau įpilama distiliuoto vandens, kad kiekis mėgintuvėliuose būtų 500 µl. Į šį tirpalą pridedama 25 µl Folino-Kiokalto reagento ir 1,25 ml natrio karbonato tirpalo. Sumaišoma ir laikoma tamsoje, kambario temperatūroje. Po 40 min matuojama absorbcija prieš tuščią mėginį.

Bendram fenolinių junginių kiekio nustatymui paimama paruošto ekstrakto ir praskiedžiama vandeniu iki 500 µl. Pridedama į jį 250 µl Folino-Kiokalto reagento ir tada įpilama 1,25 ml natrio karbonato tirpalo. Sumaišoma ir matuojama absorbcija tirpalo, esant 725 nm po 40 min laikymo tamsoje. Apskaičiuojamas bendras fenolinių junginių kiekis pagal tanino rūgštį.

Bendras fenolinių junginių kiekis mg/100 mg apskaičiuojamas iš formulės:

$$X = \frac{a \cdot V \cdot 100}{n \cdot V_1} \quad (2)$$

a – tanino rūgšties koncentracija iš kalibravimo kreivės, mg;

V – pradinis ekstrakto tūris, ml;

V<sub>1</sub> – pradinis ekstrakto tūris, ml, paimtas praskiedimui;

n – augalinė masė, mg.

## 2.6 Karotinoidų įvertinimas

0,1 g vaistinės augalinės žaliavos susmulkinama trintuve. Į jį įpilama 10 ml 96% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH ir homogenizuojama ir filtruojama/centrifuguojama. Gauta ekstrakto tūris išmatuojamas cilindru. Išmatuojamas optinis takinis esant 662 nm ir jeigu jis yra nuo 0,1 iki 0,8 ekstrakto nereikia skiesti. Gautas filtratas matuojamas spektrometru esant 662 nm (chlorofilo *a*), 644 nm (chlorofilo *b*) ir 441 nm (karotinoidų) bangų ilgiams.

Pigmentų koncentracija apskaičiuojama pagal formules:

$$\text{Chlorofilo } a \text{ koncentracija (mg/l): } C_a = 9,784D_{662} - 0,99D_{644}; \quad (3)$$

$$\text{Chlorofilo } b \text{ koncentracija (mg/l): } C_b = 21,426D_{644} - 4,65D_{662}; \quad (4)$$

$$C_a + C_b = 5,134D_{662} + 20,436D_{644}; \quad (5)$$

$$\text{Karotinoidų koncentracija (mg/l) } C_{\text{karotinoidų}} = 4,695D_{441} - 0,268(C_a + C_b); \quad (6)$$

Pigmentų kiekis mg/100g apskaičiuojamas:

$$X = \frac{CVV_2 \cdot 100}{nV_1 \cdot 1000} \quad (7)$$

C – pigmentų koncentracija mg/l

V – pradinis ekstrakto tūris, ml;

V<sub>1</sub> – pradinis ekstrakto tūris, ml, paimtas praskiedimui;

V2 – praskiesto ekstrakto tūris, ml;

n – augalinė masė, g.

### 2.7 Flavonoidų kiekio įvertinimas

2 g susmulkintos augalinės žaliavos suberiama į apvaliadugnę kolbą, įpilama 20 ml acetono, 2 ml 28% HCl tirpalo ir virinama 30 min su grįžtamuju šaldytuvu. Atvėsęs hidrolizatas filtruojamas į 100 ml talpos matavimo kolbą. Nuosėdos gražinamos į kolbą, užpilamos 20 ml acetono ir 10 min virinama ant vandens vonios, po to filtruojama į tą pačią kolbą, acetonu papildoma iki brūkšnio. 20 ml ekstrakto praskiedžiama 20 ml vandens ir ekstrahuojama etilo acetate: 1 kartą – 15 ml ir 3 kartus po 10 ml. Sujungtos viršutinės organinės fazės 2 kartus praplaunamos po 40 ml vandens, filtruojama į 50 ml matavimo kolbą ir skiedžiama etilo acetate iki brūkšnio.

Tiriamąjį tirpalą paruošimui į 10 ml pagrindinio tirpalo įpilama 2 ml aliuminio chlorido (20 g/l) tirpalo ir papildoma acto rūgšties ir metanolio mišiniu (1:19) iki 25 ml.

Palyginamojo tirpalo paruošimui 10 ml pagrindinio tirpalo skiedžiama tuo pačiu acto rūgšties ir metanolio mišiniu iki 25 ml. Po 30 min matuojama tirpalo šviesos sugertis, kai bangos ilgis 426 nm, naudojant palyginamąjį tirpalą. Nustatytas flavonoidų kiekis (X, %) apskaičiuojamas hiperozidu pagal formulę:

$$X = \frac{A \cdot k}{m} \quad (8)$$

A – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis;

k – perskaičiavimo koeficientas hiperozidui (k=1.25);

m – augalinės žaliavos masė, g.

### 2.8 Fermento katalazės aktyvumo įvertinimas

100 mg augalinės žaliavos susmulkinama ir vykdoma ekstrakcija 0,05 M K/Na fosfatiniame buferyje (pH=7.8) 4 ml tūryje, turinčiame 1 mM ditiotritolio, 0,5 mM fenilmetilsulfonilfluorido, ištirpinti DMSO, ištirpinti 1-3 mg polivinilpirolidono. Mėginys maišomas kratytuve 10 min 25 °C. Tada centrifuguojamas 9000 aps/min 10 min ir dar kartą 400 µl supernatanto centrifuguojama Eppendorf tipo mėgintuvėliuose.

Baltymo nustatymui paimama 200 µl mėginio ir įpilama 2 ml Branfordo reagento bei išmatuojama šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje. Paruošiama baltymo kiekio kalibravimo kreivė pagal albuminą.

Į kitą mėgintuvėlį įpilama 100 µl mėginio, 3900 µl 0,005 M K/Na fosfatinio buferio. Prieš matavimą į reakcijos mišinį įpilama 0,1 M 0,2 ml vandenilio peroksido. Šviesos sugerties matavimo dinamika registruojama 3 minutes 240 nm bangos ilgyje (naudojamos kvarco kiuvetės). Matavimo rodmenys nuimami kas 2 sekundes.

Fermento katalazės aktyvumas vnt/mg apskaičiuojamas:

$$A = \frac{1000 \cdot \Delta \bar{E} \cdot V}{k \cdot m} \quad (9)$$

A – katalazės aktyvumas vnt/mg;

$\Delta \bar{E}$  – vidutinė šviesos sugerties reikšmė per 1 min;



V – bendras mišinio tūris, ml;

k – molinės ekstinkcijos koeficientas 32,57;

m – baltymo masė preparato tūryje, mg (Baltymo kiekis apskaičiuojamas pagal Bradfordo metodą).

## 2.9 Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas

0,1 g susmulkintos augalinės žaliavos užpilama 4 ml 0,066 M K/Na fosfatinio buferiu (pH=7,4), kuris sudarytas iš ditriotritolio (DTT), 0,5 mM fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF), ištirpinto DMSO, 1 – 3 mg polivinilpirolidono. 10 min. mėginys kratomas 25 °C temperatūros kratytuve ir centrifuguojamas 10 min, 9000 aps/min. ir supernatantas (400 µl) dar kartą centrifuguojamas Eppendorf tipo mėgintuvėliuose.

Baltymų nustatymui paimama 200 µl mėginio ir įpilama 2 ml Bradfordo reagento bei išmatuojama šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje. Paruošiama baltymų kiekio kalibravimo kreivė pagal albuminą [34].

Į kitą mėgintuvėlį įpilama 40 µl mėginio, 400 µl 40 mM Tris – HCl buferio (pH = 7.8), 200 µl 10 mM L – metionino; 200 µl 54 µM nitromėlynojo tetrazolio, 500 µl 0,025 % Tritono X – 100, 20 µl 3 µM riboflavino, 620 µl distiliuoto vandens. Taip pat paruošiamas kontrolinis mėginys be fermentinio preparato. Mėginys apšviečiamas liuminescencinėmis lempomis 30 min. Šviesos sugertis matuojama 560 nm bangos ilgyje.

Fermento SOD aktyvumas apskaičiuojamas:

$$A = \frac{\log\left(\frac{E_k}{E_t}\right)}{\log 2 \cdot m} \quad (10)$$

A – SOD aktyvumas vnt/mg;

Ek – kontrolinio mėginio šviesos sugertis;

Et - tiriamojo mėginio šviesos sugertis;

m – baltymo masė preparato tūryje, mg.

## 2.10 Askorbatperoksidazės įvertinimas

100 mg augalinės žaliavos susmulkinama kartu su 4 ml atšaldytu 0,1 M fosfatinio buferiu (pH=7), kuriame yra 1 mM ditriotritolio, 0,5 mM fenilmetilsulfonilfluorido, ištirpinto DMSO. Mėgintuvėliai 10 min maišomi 25 °C ir vėliau centrifuguojami 20 min, 9000 aps/min.

Reakcijos mišinys (6 ml) turi 50 mM fosfatinio buferio (pH=7), 0,5 mM askorbo rūgšties, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM vandenilio peroksido ir 0,2 ml fermentinio preparato. Reakcija prasideda pridėjus vandenilio peroksido. Šviesos sugertis matuojama 290 nm bangos ilgyje 3 min.

Askorbatperoksidazės aktyvumas nustatomas pagal formulę:

$$A = \frac{\Delta \bar{E}_{\text{min}} \cdot \left(\frac{V}{1000} + V_{\text{Buf.}} + V_{\text{peroks.}}\right)}{k \cdot m} \quad (11)$$

A – fermento aktyvumas, mmol/mg;

$\Delta\bar{E}_{\min}$  - vidutinė šviesos sugerties reikšmė per 1 min;

V – pavyzdžio tūris,  $\mu\text{l}$ ;

$V_{\text{Buf}}$  – buferio tūris, ml;

$V_{\text{peroks}}$  – vandenilio peroksido tūris, ml;

k – molinės ekstinkcijos koeficientas 2,8 nmol/cm;

m – baltymo masė preparato tūryje, mg (baltymo kiekis apskaičiuojamas pagal Bradfordą).

## 2.11 L-prolino įvertinimas

100 mg vaistinės augalinės medžiagos susmulkinama ir mėgintuvėlyje užpilama 4 ml distiliuoto vandens. Toliau mėgintuvėliai 3 kartus užverdami iki virimo temperatūros ir atšaldomi. Ekstraktas centrifuguojamas 10 min, 9000 aps./min. Gautas ekstraktas praskiedžiamas iki 6 ml ir naudojamas tyrimams.

Į naują mėgintuvėlį įpilama 1 ml ekstrakto, 1 ml acto rūgšties, 1 ml ninhidrininio reagento (1,25 g ninhidrino, 20 ml 6 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 30 ml acto rūgšties) ir kaitinama verdančio vandens vonelėje. Kontrolinis mėginys ruošiamas vietoje mėginio naudojant 1 ml distiliuoto vandens. Šviesos sugertis matuojama 520 nm bangos ilgyje.

Prolino kiekis apskaičiuojamas naudojantis kalibravimo kreive pagal formulę:

$$C_x = \frac{E \cdot k \cdot V_{\text{bendras}}}{V_{\text{paimta}} \cdot m} \quad (12)$$

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

E – tirpalo šviesos sugertis;

k – L-prolino kiekis, gautas pagal kalibravimo kreivę ( $\mu\text{mol}$ )

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

$V_{\text{paimta}}$  – paimto ekstrakto tūris, ml;

m – vaistinės augalinės žaliavos kiekis, g.

L-prolino kalibravimo kreivė ruošiamas atsveriant 0,0011 g L-prolino ir ištirpinama 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$  (1 mM). Ruošiama L-prolino kalibravimo kreivė 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 mM. Imami atitinkami L-prolino tūriai iš pradinio tirpalo ir praskiedžiami iki 1 ml su  $\text{H}_2\text{O}$ . Tada mėgintuvėliai papildomi 1 ml acto rūgštimi ir 1 ml ninhidrininiu tirpalu bei šildoma 1 val. verdančioje vandens vonelėje. Šviesos sugertis matuojama 520 nm bangos ilgyje ir braižoma kreivė. [34]

## 2.12 Malondialdehido (MDA) kiekio įvertinimas

100 mg augalinės žaliavos homogenizuojama su 1,5 ml 20 % trichloracto rūgštimi ir centrifuguojama 9000 aps/min, 10 min, 4 °C. 0,3 ml supernatanto sumaišoma su 1,2 ml 0,5 % tiobarbitūrine rūgštimi (ištirpinta 20 % trichloracto rūgštyje) ir inkubuojama 95 °C temperatūroje 30 min, atšaldoma ir centrifuguojama 15 min., 9000 aps/min. Šviesos sugertis matuojama 532, 600 nm bangos ilgiuose.

MDA kiekis apskaičiuojamas:

$$C_x = \frac{(E_{532} - E_{600}) \cdot V_0 \cdot 2}{k \cdot m_s \cdot V_a} \quad (13)$$

$C_x$  – MDA kiekis  $\mu\text{mol/g}$ ;

$E$  – tirpalo šviesos sugertis;

$V_0$  – ekstrakto tūris, ml;

$V_a$  – ekstrakto tūris analizei, ml;

$k$  – molinės ekstrakcijos koeficientas  $156 \text{ Mm}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ;

$M_s$  – bandinio masė, ekstrakcijai, g.

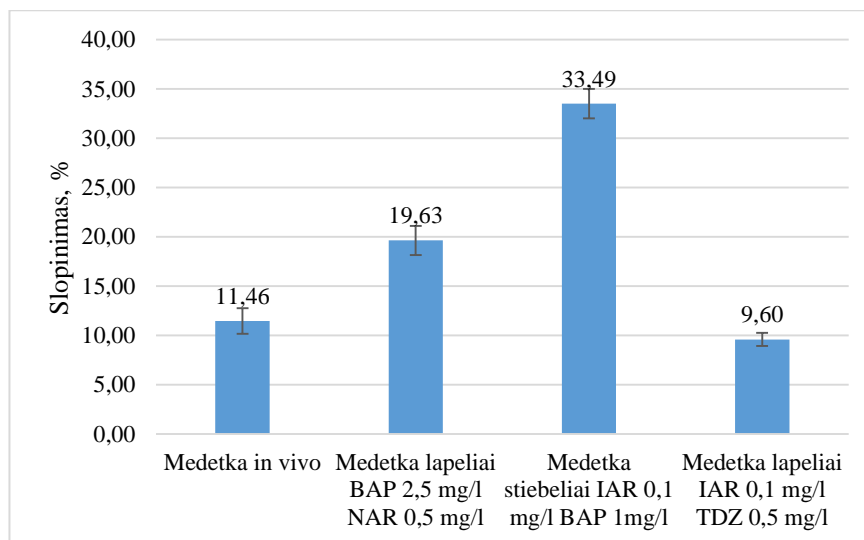
### **2.13 Augalinių ekstraktų antibakterinis įvertinimas *Rhizobium radiobacter*, *Xanthomonas campestris*, *E. coli*, *Bacillus subtilis* bakterijoms**

Petri lėkštelėje su LB terpe užpilama 50  $\mu\text{l}$  bakterijų suspensijos ant popierinių diskelių, kurie suvilgyti 25  $\mu\text{l}$  atitinkamu augalų ekstraktu. Petri lėkštelės sudedamos į termostatą 37 °C. Po vienos paros stebimas bakterijų augimas ir vaistinių augalų ekstraktų antibakterinį poveikį. [33]

### 3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

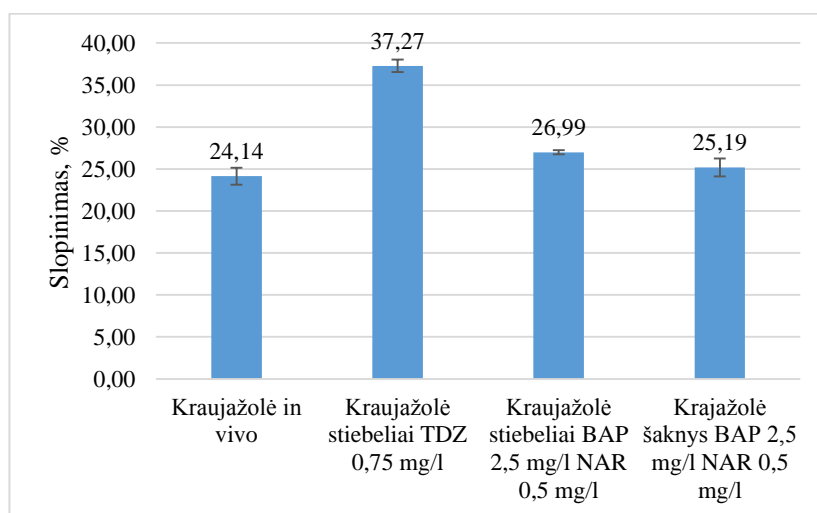
#### 4.1 Augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu

Iš rezultatų, pateiktų 3.1 pav., galima pastebėti, kad kaliaus kultūra iš medetkos stiebelių pasiekė 33,49 % slopinimą, kai auginta MS terpėje papildytoje fitohormonais IAR (0,1 mg/l) + BAP (1 mg/l). O *in vivo* medetkos ekstraktas pasižymėjo 11,46 %.



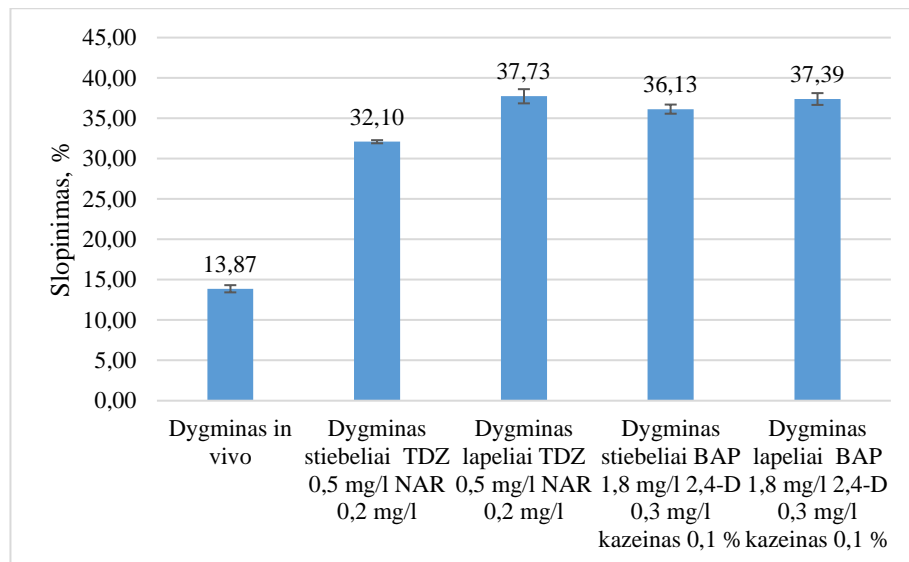
3.1. pav. Antioksidacinio aktyvumo DPPH metodu rezultatai tiriant medetką *in vivo* ir *in vitro*

Iš rezultatų gautų tiriant kraujažolę matome, jog antioksidacinis aktyvumas pagal DPPH metodą pasiektas didžiausias iš kraujažolės stiebelių kaliaus, kai terpė papildyta fitohormonu TDZ (0,75 mg/l).



3.2 pav. Antioksidacinio aktyvumo DPPH metodu rezultatai tiriant kraujažolę *in vivo* ir *in vitro*

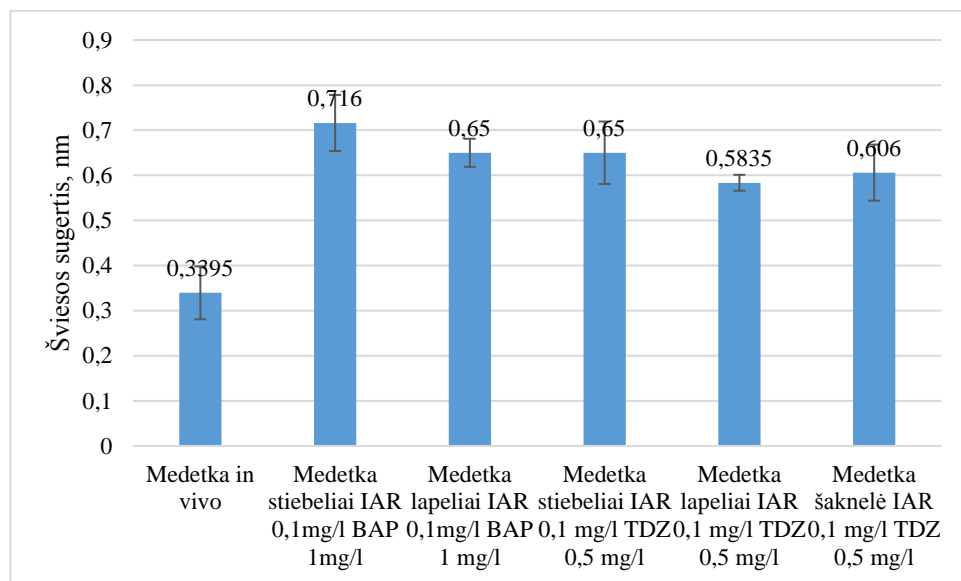
Iš 3.3 pav. visais atvejais, kada buvo naudoti fitohormonai pasiektas didesnis antioksidacinis aktyvumas, lyginant su dygmino ekstraktu *in vivo*.



**3.3 pav.** Antioksidacinio aktyvumo DPPH metodu rezultatai tiriant dygminą *in vivo* ir *in vitro*

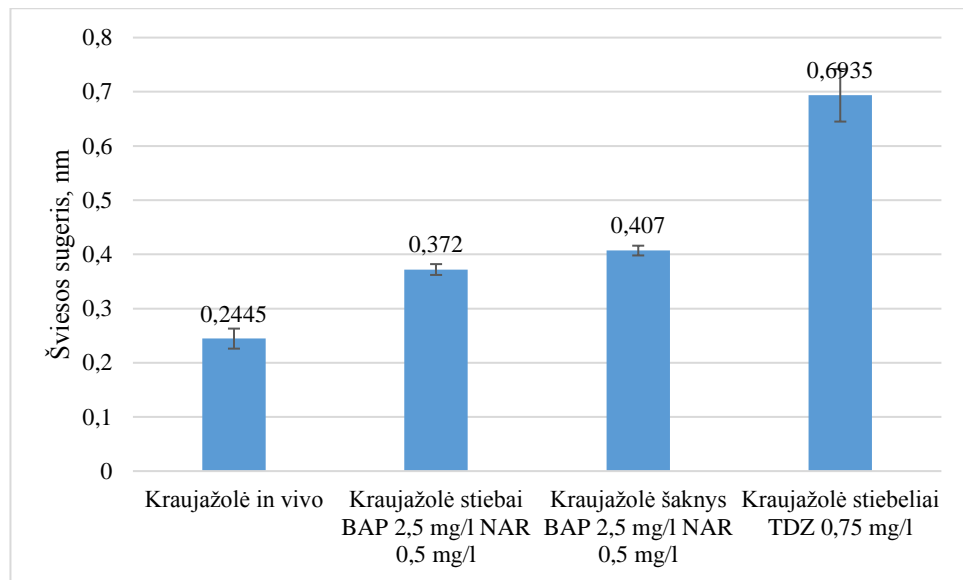
#### 4.2 Redukcinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas augaluose

Tiriant redukcines savybes, rezultatai sutampa su DPPH metodu. Medetkos stiebeliai, auginti MS terpėje, kuri buvo papildyta fitoformonais IAR (0,1 mg/l) + BAP (1 mg/l) parodė didžiausią rezultatą. Aktyvumas gautas intensyvesnis ir kitais atvejais, kai buvo naudoti fitohormonai, lyginant su medetka auginta *in vivo*.



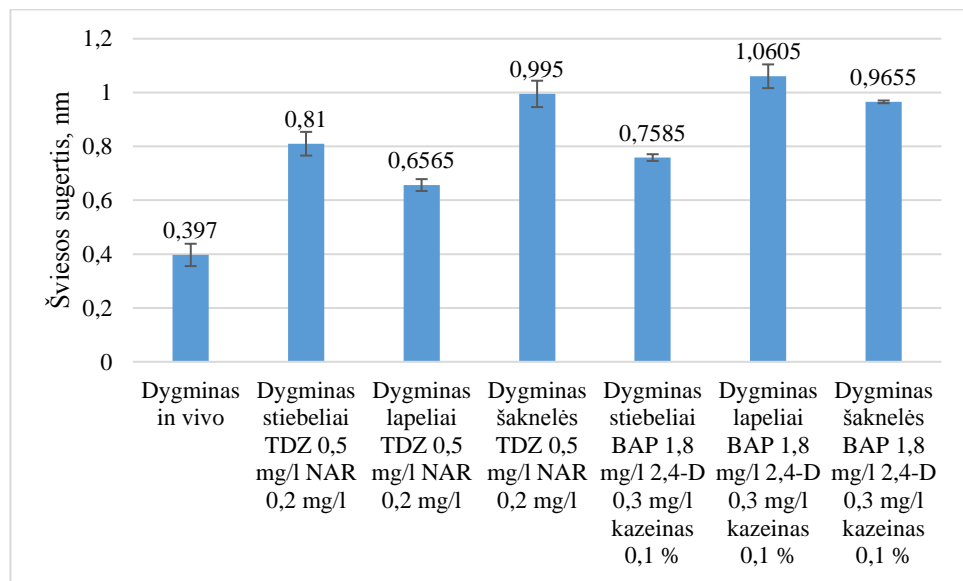
**3.4 pav.** Redukcinių (antioksidacinių) savybių rezultatai tiriant medetką *in vivo* ir *in vitro*

Kraujažolės tyrime, matome jog kraujažolės stiebelių kaliusas terpėje, kuri papildyta fitohormonu TDZ (0,75 mg/l), pasižymėjo didžiausiomis redukciniėmis savybėmis. Kitų fitohormonų variacija taip pat parodė didesnę rezultatą, lyginant su kraujažole auginta *in vivo* sąlygomis.



**3.5 pav.** Redukcinių (antioksidacinių) savybių rezultatai tiriant kraujažolę *in vivo* ir *in vitro*

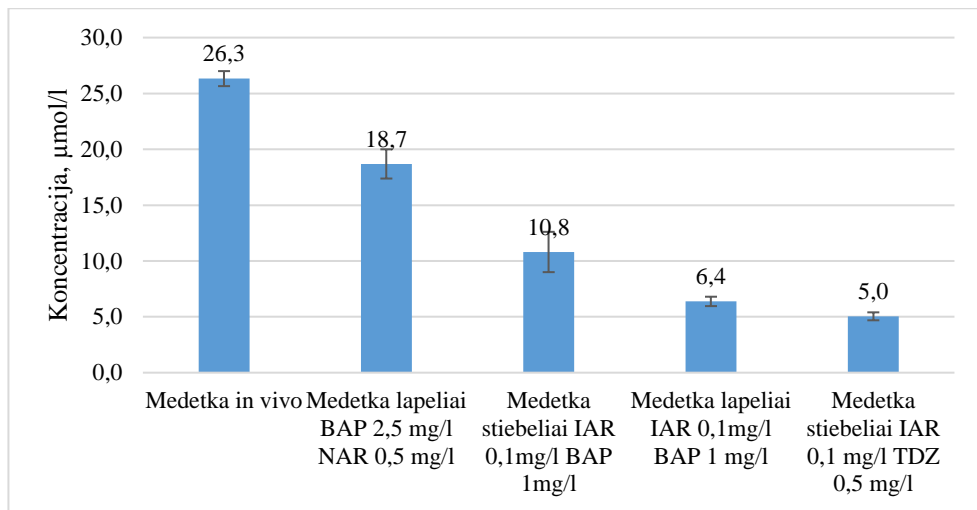
Tiriant dygmino ekstraktus matome, kad nėra vieno optimalaus varianto. Visos fitohormonų variacijos sukėlė didesnę redukcinių atsaką, lyginant su dygimu augintu *in vivo* sąlygomis.



**3.6 pav.** Redukcinių (antioksidacinių) savybių rezultatai tiriant dygminą *in vivo* ir *in vitro*

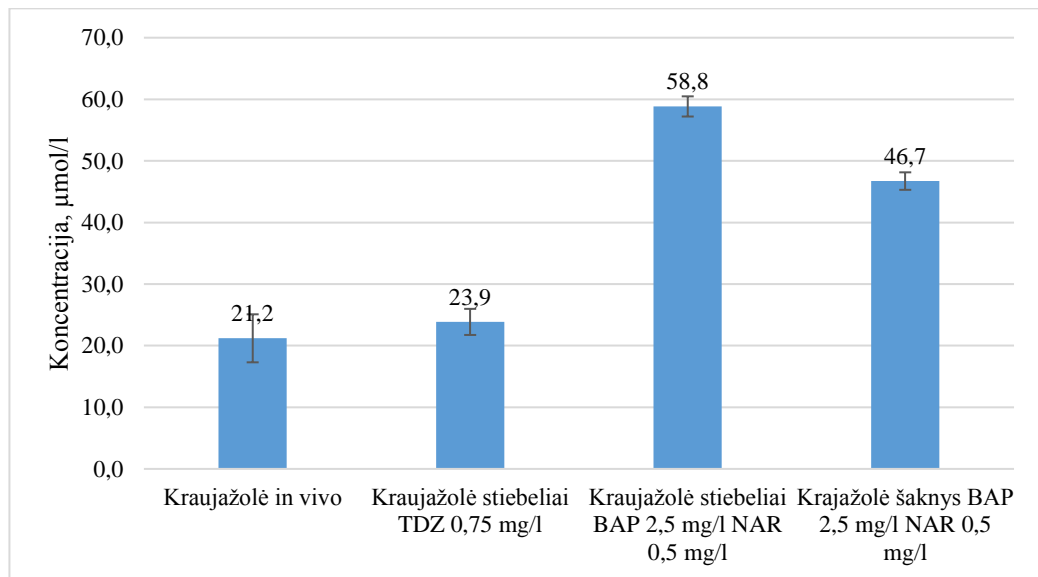
#### 4.3 Antioksidacinis aktyvumas vaistiniuose augaluose pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną

Pagal FRAP metodą gauti rezultatai nesutampa su prieš tai darytu antioksidacinių tyrimų rezultatais, kadangi šiuo atveju matome jog medetka auginta *in vivo* sąlygomis parodė intensyviausią antioksidacinį aktyvumą.



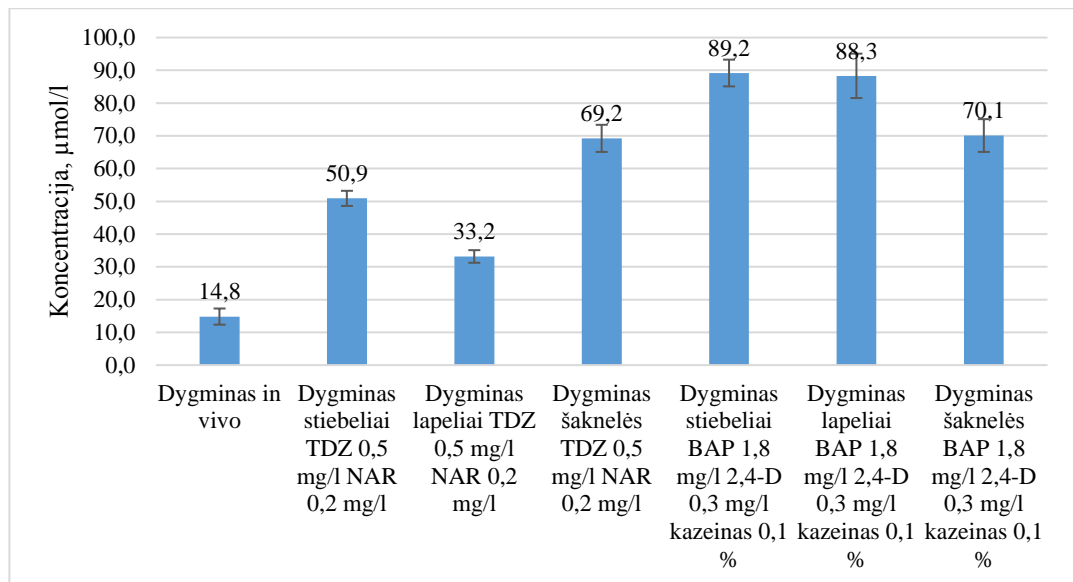
**3.7 pav.** Antioksidacinio aktyvumo pagal FRAP rezultatai tiriant medetką *in vivo* ir *in vitro*

Kraujažolėje pastebėtas didesnis antioksidacinis aktyvumas kraujažolės stiebelių kaliuse, kai MS terpė papildyta fitohormonais BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l).



**3.8 pav.** Antioksidacinio aktyvumo pagal FRAP rezultatai tiriant kraujažolę *in vivo* ir *in vitro*

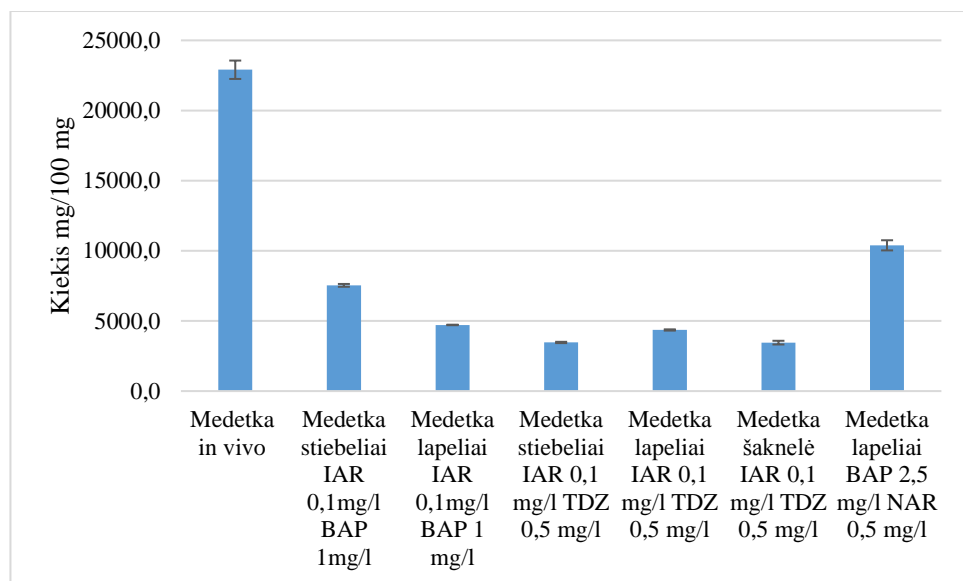
Pagal 3.9 pav. duomenis galima teigti, kad naudojant fitohormonus pasiektas intensyvesnis antioksidacinis aktyvumas. Didžiausia koncentracija stebima dygmino stiebelių ir lapelių kaliuse, kai naudoti fitohormonai BAP (1,8 mg/l) + 2,4 – D (0,3 mg/l) + kazeinas 0,1 %.



**3.9 pav.** Antioksidacinio aktyvumo pagal FRAP rezultatai tiriant dygminą *in vivo* ir *in vitro*

#### 4.4 Bendras fenolinių junginių įvertinimas Folino-Kiokalto metodu

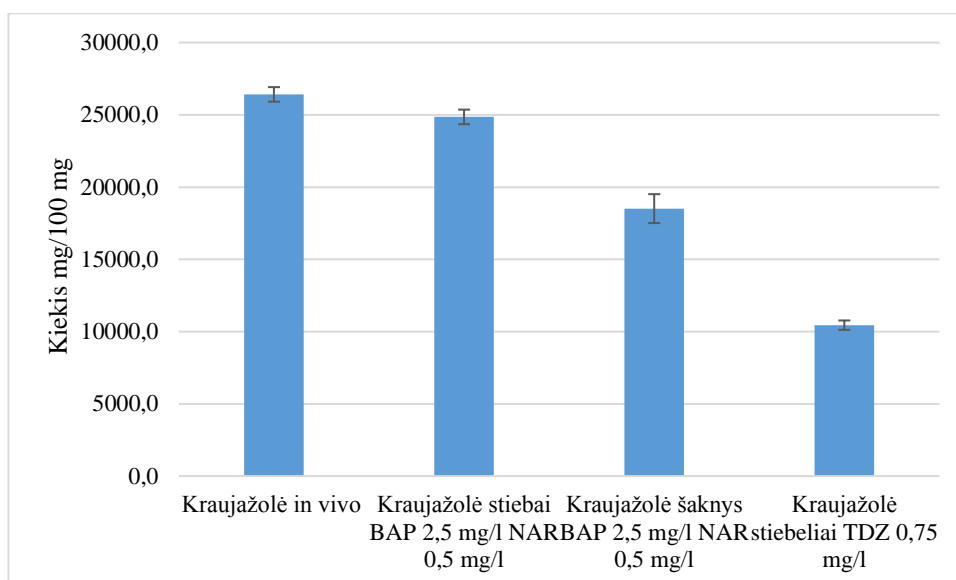
Šio tyrimo metu gauti rezultatai rodo, jog didžiausias fenolių kiekis nustatytas medetkoje augintoje *in vivo* sąlygomis.



**3.10 pav.** Fenolinių junginių įvertinimas Folino-Kiokalto metodu tiriant medetką *in vivo* ir *in vitro*

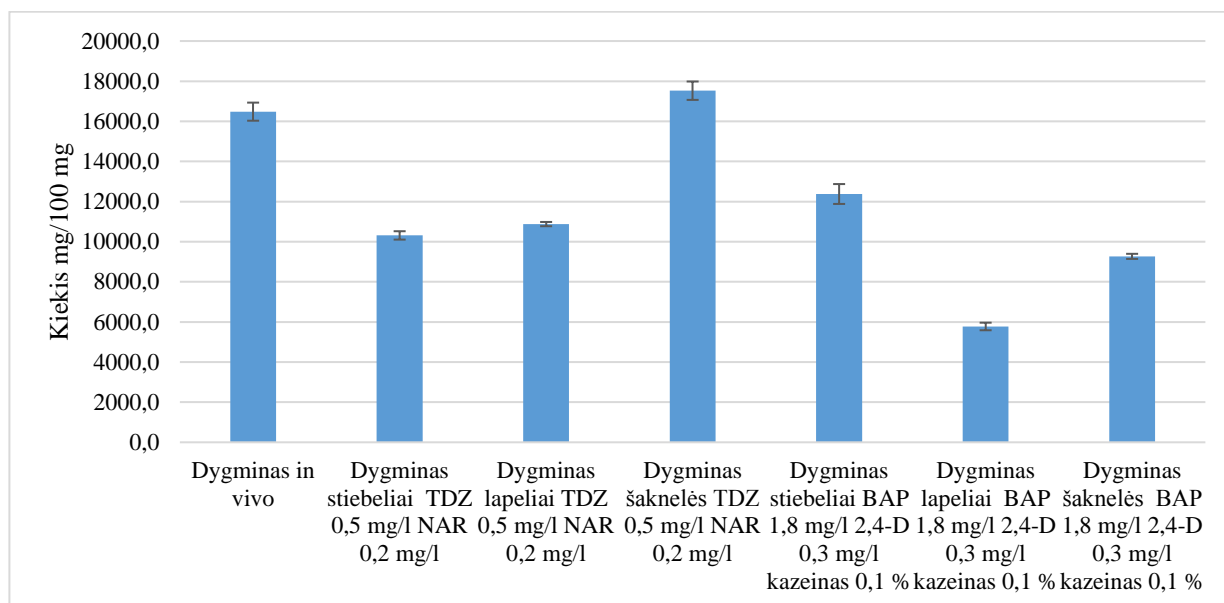
Fenolių junginių kiekis gautas panašus tiek *in vivo* sąlygomis, tiek auginant *in vitro* kraujažolių stiebus su fitohormonais BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l).





**3.11 pav.** Fenolinių junginių įvertinimas Folino-Kiokalto metodu tiriant kraujažolę *in vivo* ir *in vitro*

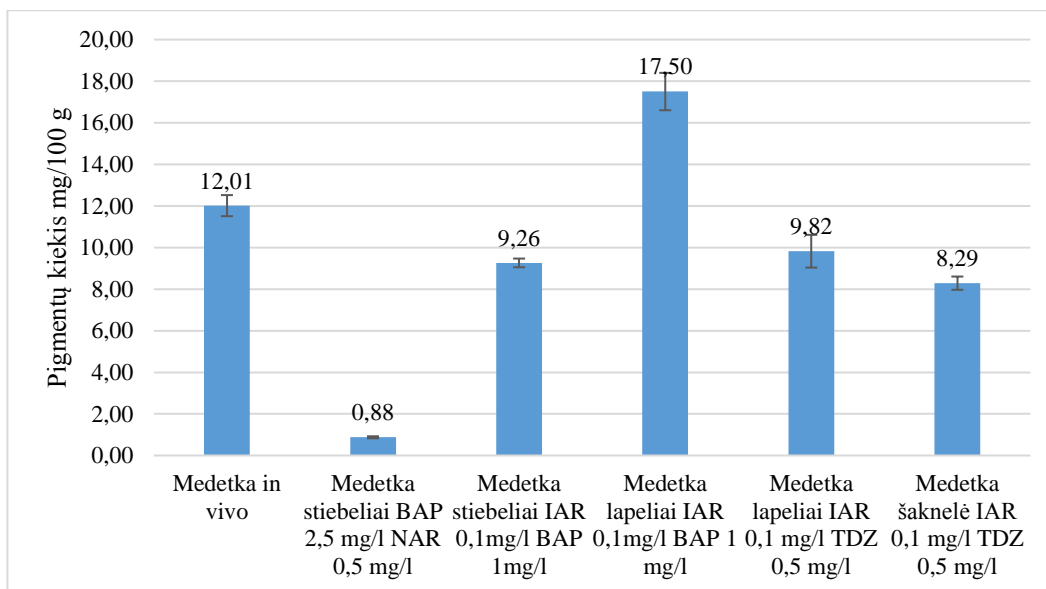
Tiriant dygmino ekstraktus didžiausias fenolinių junginių kiekis nustatytas dygmino šaknelių kaliuse augintose *in vitro*, kai naudoti fitohormonai TDZ (0,5 mg/l) + NAR (0,2 mg/l). Panašus rezultatas gautas ir dygmine *in vivo*.



**3.12 pav.** Fenolinių junginių nustatymo Folino-Kiokalto metodu rezultatai tiriant dygminą *in vivo* ir *in vitro*

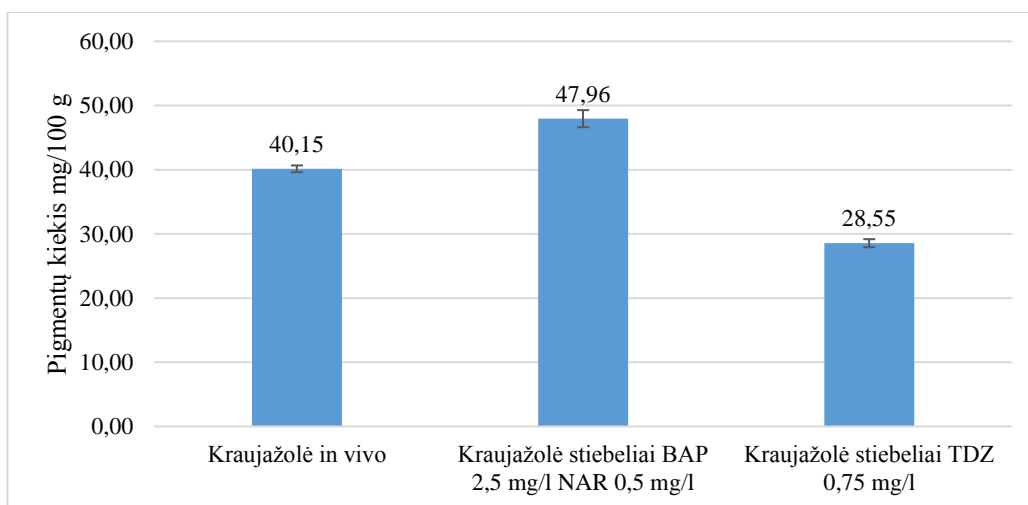
#### 4.5 Karotinoidų įvertinimas

Atlikus eksperimentus ir skaičiavimus iš matomų rezultatų galime teigti, jog didžiausias pigmentų kiekis nustatytas *in vitro* augintuose medetkos lapeliuose, kurių mitybinė terpė buvo papildyta IAR 0,1 mg/ + BAP 1 mg/l fitohormonais. Kiek mažiau pigmentų nustatyta kitose augalo dalyse.



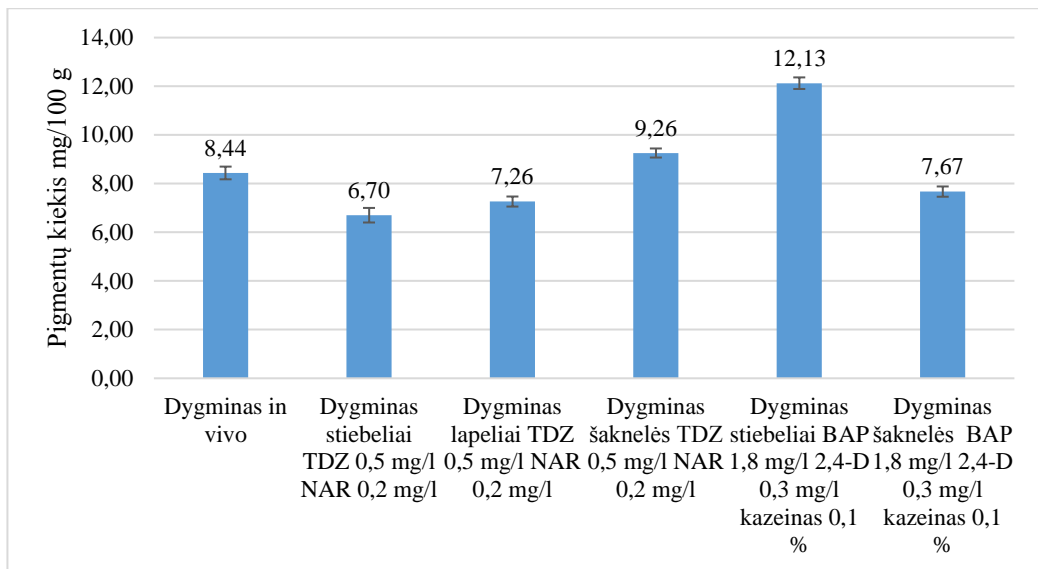
**3.13 pav.** Pigmentų kiekis tiriant medetką *in vivo* ir *in vitro*

Analizuojant rezultatus gautus tiriant kraujažolės ekstraktus matome jog didžiausias pigmentų kiekis yra kraujažolės stiebelius auginant *in vitro*, kai naudojami fitohormonai BAP 2,5 mg/l + NAR 0,5 mg/l. Kiek mažesnis kiekis gautas naudojant fitohormoną TDZ 0,75 mg/l. Jis nėra optimalus, nes kraujažole auginant *in vivo* gaunamas didesnis kiekis.



**3.14 pav.** Pigmentų kiekis tiriant kraujažolę *in vivo* ir *in vitro*

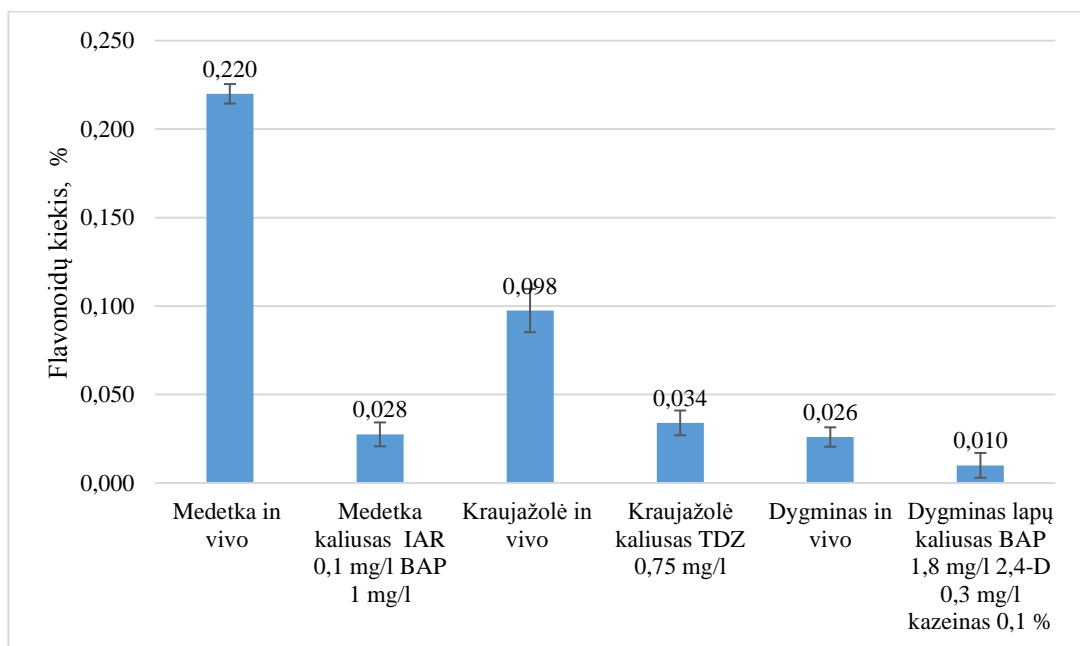
Analizuojant dygmino ekstraktų pigmentų kiekius matome, jog didžiausias kiekis išgautas iš dygmino stiebelių augintų *in vitro* sąlygomis, su fitohormonais BAP 1,8 mg/l + 2,4 – D 0,3 mg/l + kazeinas 0,1 %. Su kitais fitohormonų variantais išgautas pigmentų kiekis mažesnis lyginant su dygmino, augusio *in vivo* sąlygomis, ekstraktu.



3.15 pav. Pigmentų kiekis tiriant dygminą *in vivo* ir *in vitro*

#### 4.6 Flavonoidų kiekio nustatymas

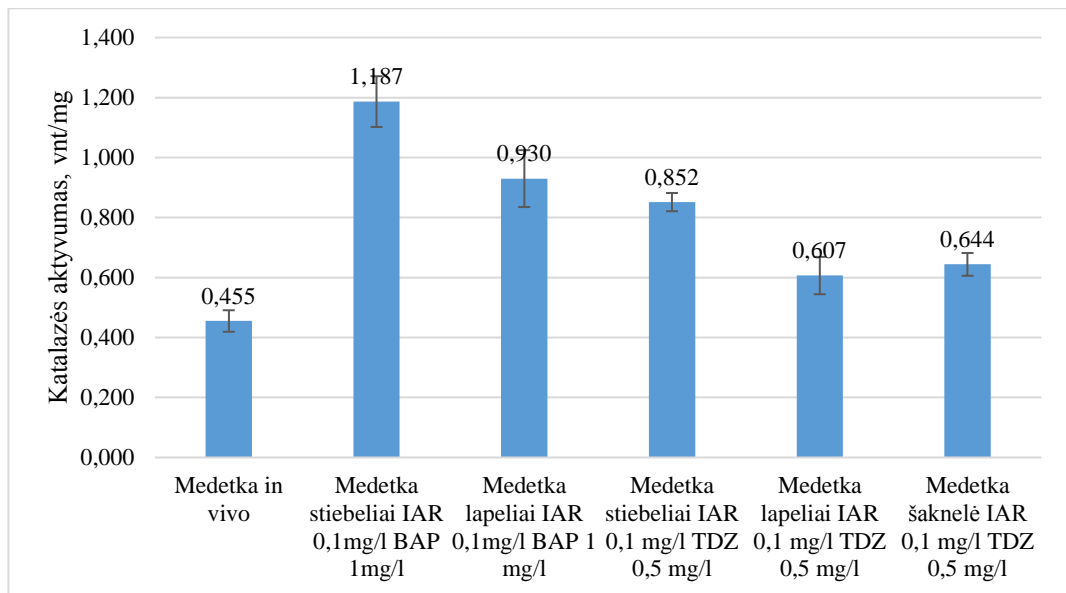
Atlikus visų tiriamųjų medžiagų flavonoidų nustatymą iš gautų rezultatų galime teigti, jog didžiausias flavonoidų kiekis yra medetkoje augintoje *in vivo* sąlygomis. Taip pat didesnė koncentracija nustatyta kraujazolėje augintoje *in vivo* sąlygomis. Kiek mažiau flavonoidų buvo nustatyta dygmine *in vivo* augalinėje žaliavoje, kuri buvo išauginta *in vitro* sąlygomis kartu su skirtingais fitohormonų variantais.



3.16 pav. Flavonoidų kiekio įvertinimo rezultatai *in vivo* ir *in vitro*

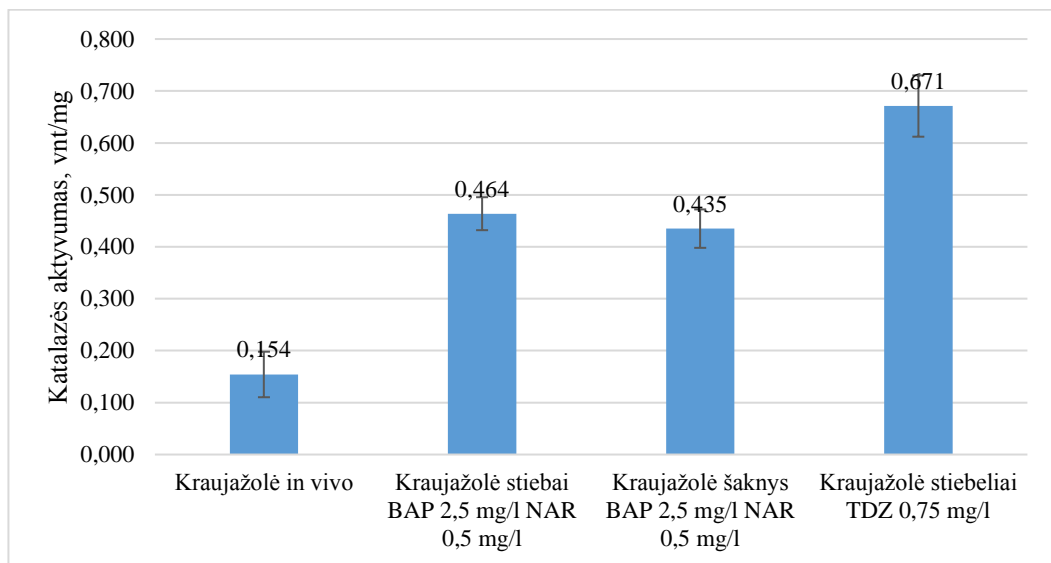
#### 4.7 Fermento katalazės aktyvumo nustatymas

Analizuojant katalazės aktyvumo rezultatus medetkoje, galima teigti jog didžiausias aktyvumas pasiektas medetkos stiebelių kaliuse, kurie auginti *in vitro*, naudojant fitohormonus: IAR 0,1 mg/l + BAP 1 mg/l. Su kitais fitohormonų variantais taip pat pasiektas didesnis katalazės aktyvumas, nei jų nenaudojant.



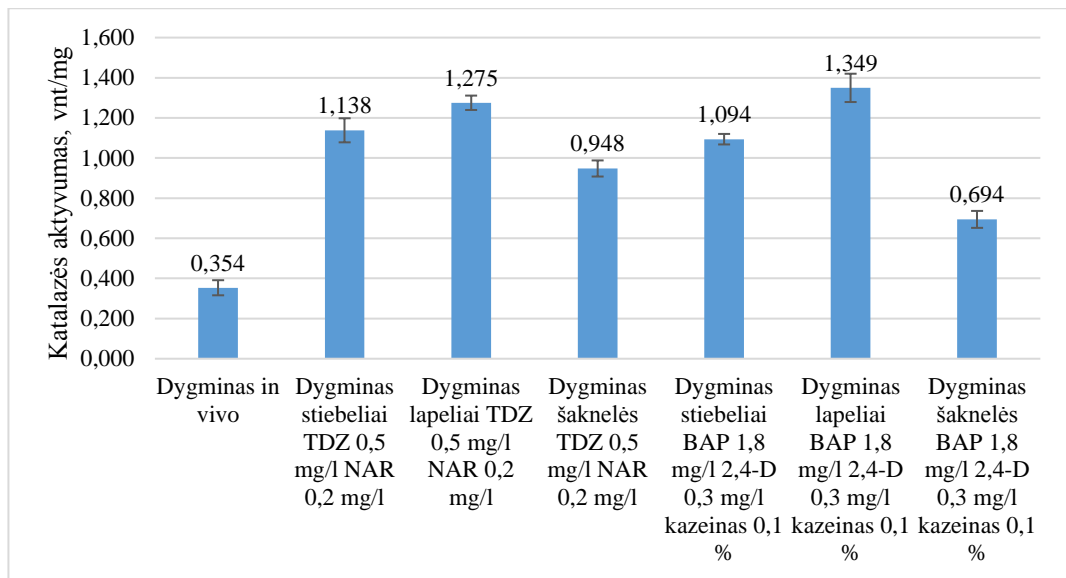
**3.17 pav.** Fermento katalazės aktyvumo rezultatai tiriant medetką *in vivo* ir *in vitro*

Kaip matome 3.18 pav. didžiausias katalazės aktyvumas pasiektas kraujažolės stiebelių kaliuse, kurie auginti *in vitro* su fitohormonu TDZ 0,75 mg/l. Naudojant kitą fitohormonų variantą aktyvumas taip pat pasiektas didesnis, nei kraujažolėje, kuri auginta *in vitro*, be papildomų fitohormonų.



**3.18 pav.** Fermento katalazės aktyvumo rezultatai tiriant kraujažolę *in vivo* ir *in vitro*

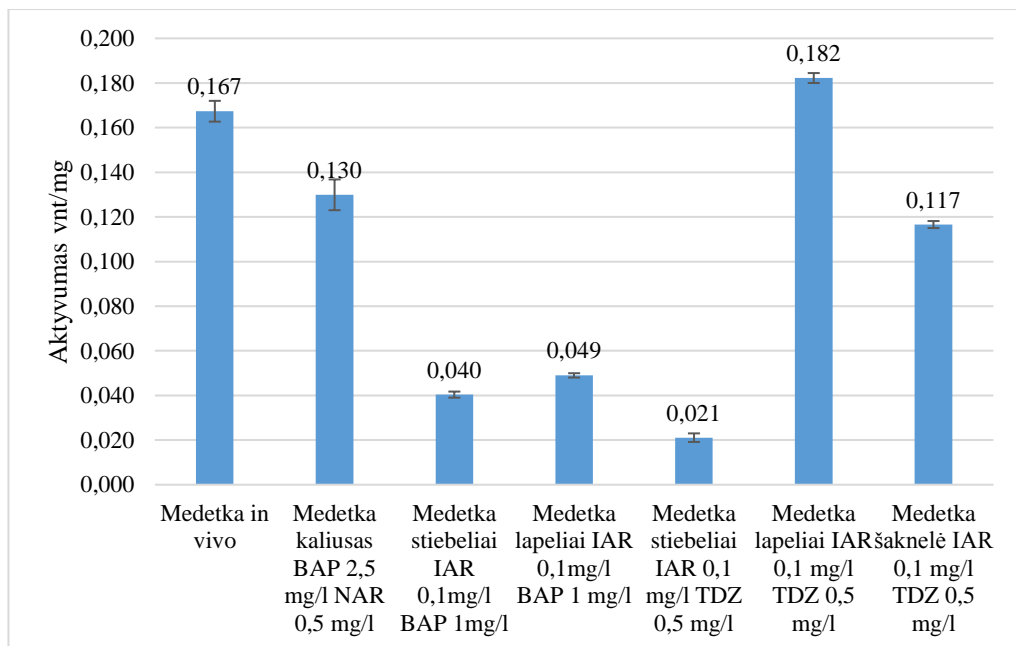
Intensyviausias katalazės aktyvumas tiriant dygminą pasiektas, kai buvo auginama *in vitro* sąlygomis dygmino lapelių kalius su fitohormonais BAP 1,8 mg/l + 2,4 – D 0,3 mg/l + kazeinas 0,1 %. Naudojant kitus fitohormonų variantus, katalazės aktyvumas taip pat pasiektas didesnis, nei tiesiog auginant dygminą *in vivo* sąlygomis.



3.19 pav. Fermento katalazės aktyvumo rezultatai tiriant dygminą *in vivo* ir *in vitro*

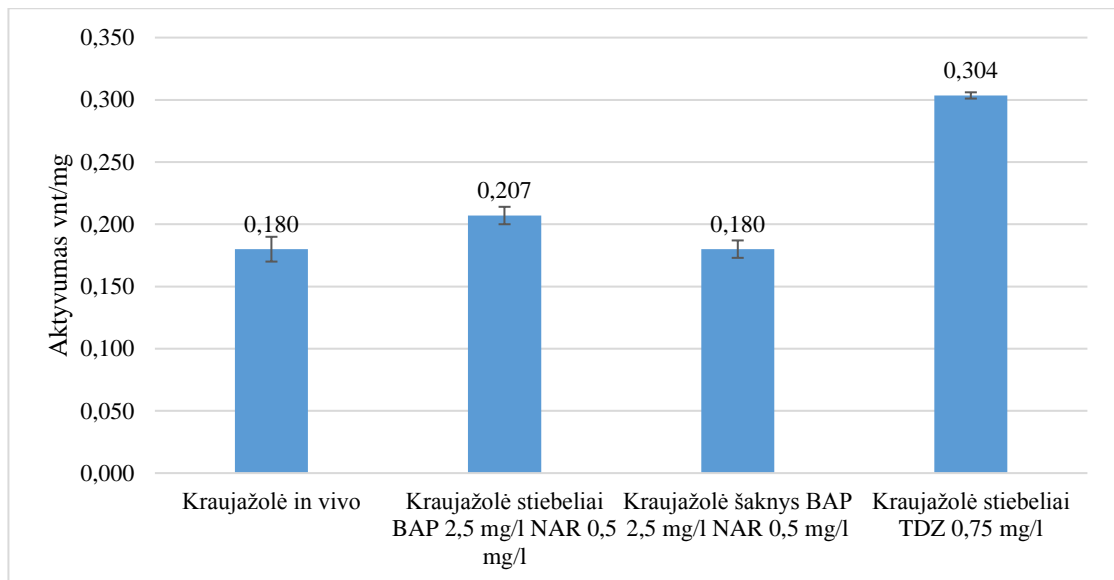
#### 4.8 Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas

Tiriant superoksido dismutazės aktyvumą medetkos ekstraktuose, matome jog nežymiai didesnis aktyvumas pasiektas medetkos lapeliuose, kurie auginti terpėje papildytoje IAR 0,1 mg/1 + TDZ 0,5 mg/1 fitohormonais. Tačiau tai nėra optimalus variantas, kadangi panašus aktyvumas gaunamas ir medetkoje, kuri auginta *in vivo* sąlygomis. Rezultatai su kitais fitohormonais dar mažesni nei jų nenaudojant.



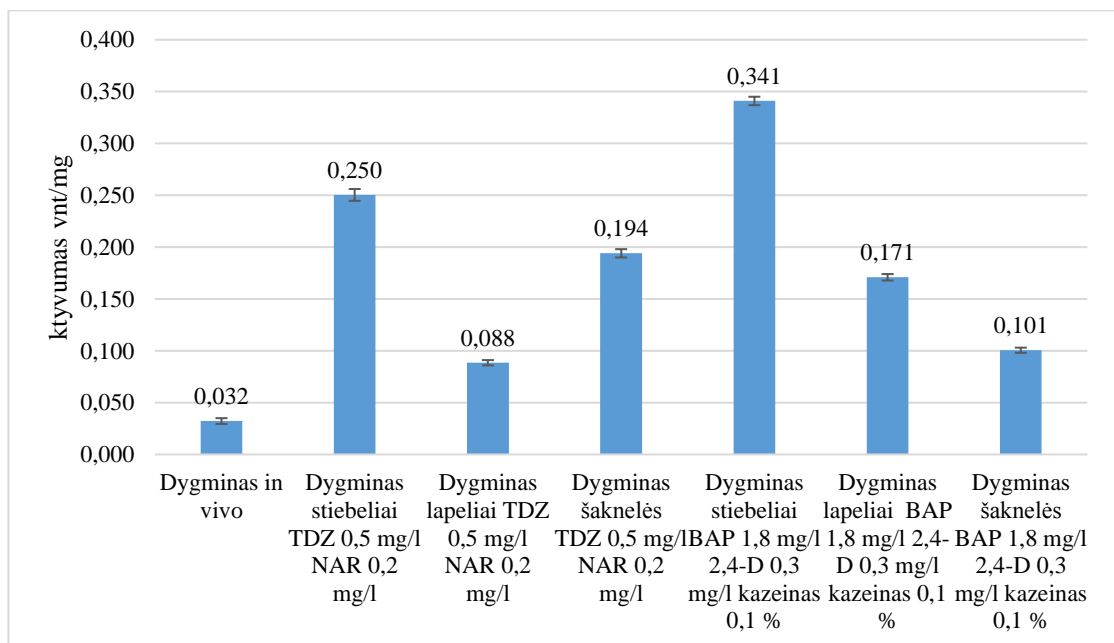
3.20 pav. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimo rezultatai tiriant medetką *in vivo* ir *in vitro*

Iš duomenų, kurie gauti tiriant kraujažolę, matome jog superoksido dismutazės aktyvumas gaunamas didesnis kraujažolės stiebeliuose, kurie auginti *in vitro* papildomai naudojant TDZ 0,75 mg/1 fitohomoną. Su kitais fitohormonų variantas taip pat stebimas superoksido dismutazės aktyvumo padidėjimas lyginant su kraujažole auginta *in vivo*.



**3.21 pav.** Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimo rezultatai tiriant kraujažolę *in vivo* ir *in vitro*

Geriausias rezultatas pasiektas tiriant dygmino stiebelių ekstraktus yra, kai auginant *in vitro* papildomai naudoti fitofomonų variantai: TDZ 0,5 mg/l + NAR 0,2 mg/l ir BAP 1,8 mg/l + 2,4 – D 0,3 mg/l + kazeinas 0,1 %. Kitose augalo dalyse (lapeliuose ir šaknelėse) stebėtas kiek mažesnis fermento superoksido dismutazės aktyvumas. Tačiau lyginant su dygminu *in vivo*, rezultatas vis tiek pasiektas didesnis, kai naudoti fitohormonai.

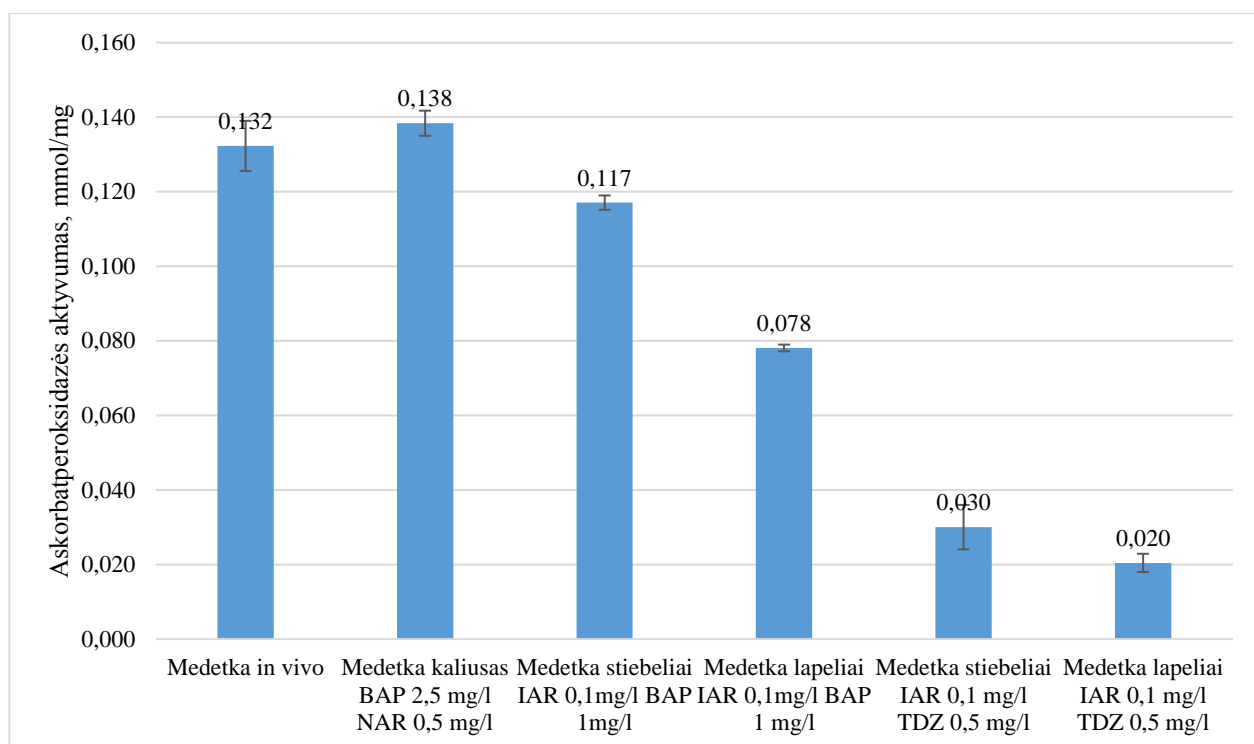


**3.22 pav.** Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimo rezultatai tiriant dygminą *in vivo* ir *in vitro*

#### 4.9 Askorbatperoksidazės įvertinimas

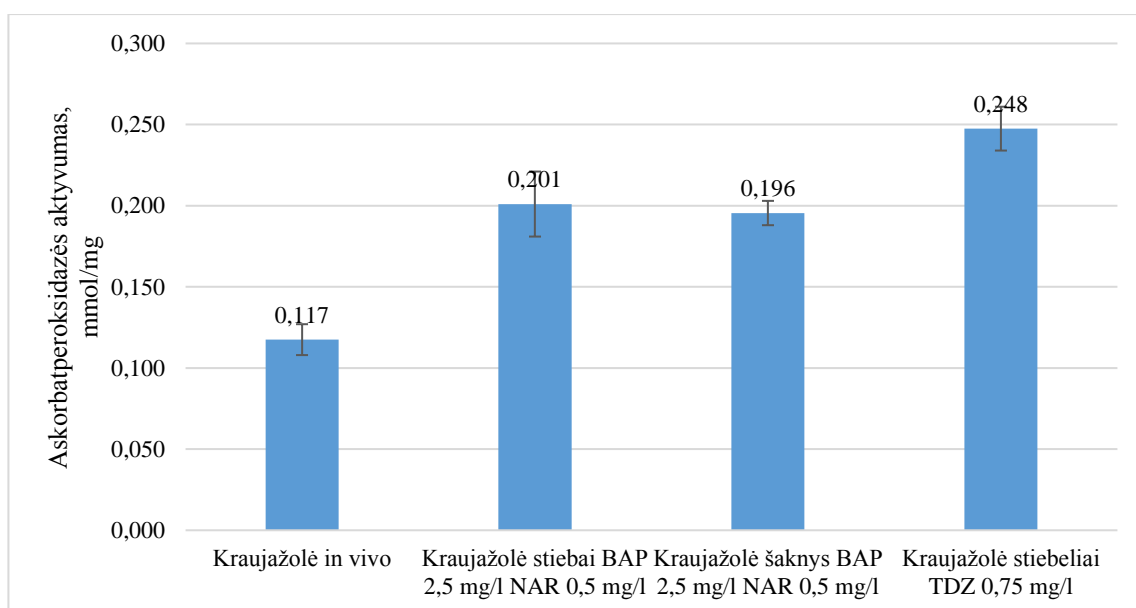
Iš gautų rezultatų tiriant medetkos ekstraktus, didžiausias askorbatperoksidazės aktyvumas pastebėtas, *in vitro* auginame medetkos kaliuse, kai naudoti fitohormonai BAP 2,5 mg/l + NAR 0,5 mg/l. Nors

tai didžiausias rezultatas, tačiau panašus aktyvumas nustatytas ir medetkoje augintoje *in vivo*. Su kitais fitohormonais rezultatas kaip matome 3.23 pav., yra mažesnis nei medetkoje augintoje *in vivo*.



**3.23 pav.** Askorbatperoksidazės aktyvumo rezultatai tiriant medetką *in vivo* ir *in vitro*

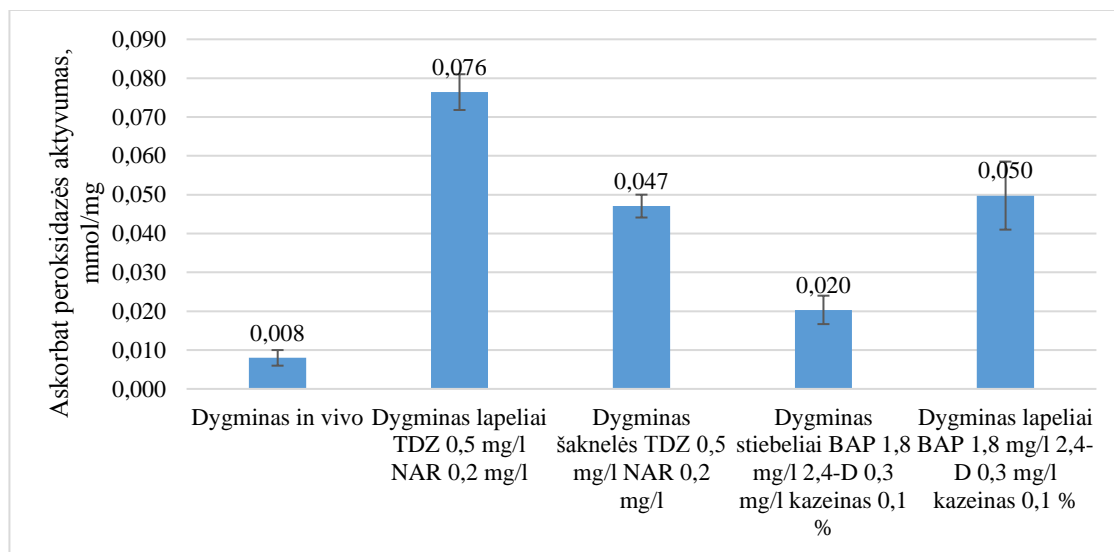
Tiriant kraujažolės askorbatperoksidazės aktyvumą, pastebėta jog didžiausias rezultatas pasiektas, kai medetka auginta *in vitro* sąlygomis, kai naudotas TDZ 0,75 mg/l fitohormonas. Šiuo atveju visi naudoti fitohormonai padidino askorbatperoksidazės aktyvumą lyginant su kraujažole, kuri buvo auginta *in vivo* sąlygomis.



**3.24 pav.** Askorbatperoksidazės aktyvumo rezultatai tiriant kraujažolę *in vivo* ir *in vitro*

Didžiulis askorbatperoksidazės aktyvumo padidėjimas taip pat stebimas ir dygmino lapeliuose, kurie auginti *in vitro* sąlygomis kartu su fitohormonais TDZ 0,5 mg/l + NAR 0,2 mg/l. Naudojant kitus

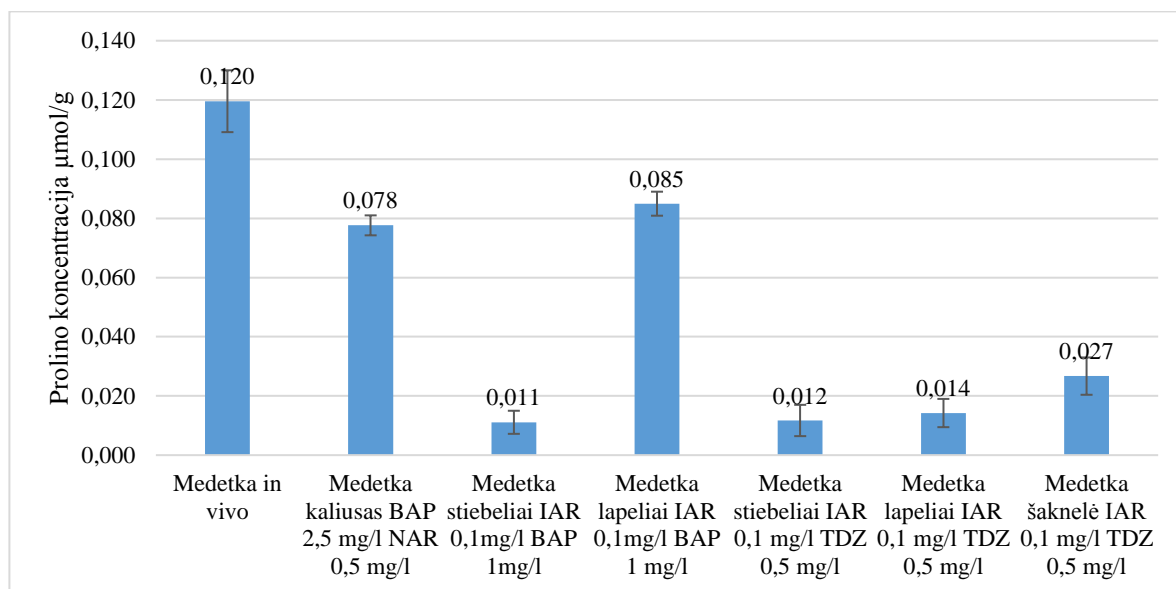
fitohormonu variantus, aktyvumas taip pat buvo pasiektas didesnis, nei lyginant su dygiminu, kuris augintas *in vivo* sąlygomis.



**3.25 pav.** Askorbatperoksidazės aktyvumo rezultatai tiriant dygminą *in vivo* ir *in vitro*

### 3.10 L-prolino įvertinimas

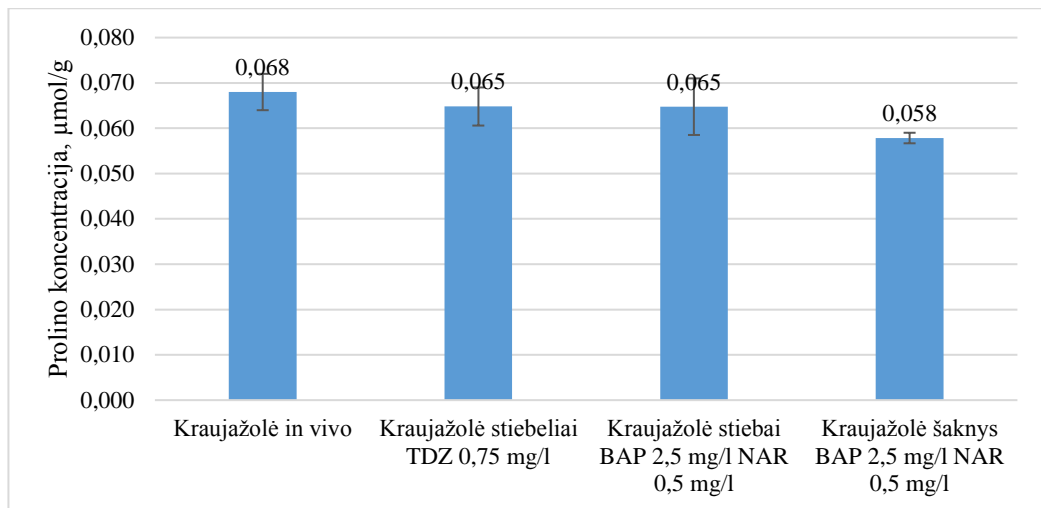
Atlikus eksperimentus, iš gautų duomenų tiriant medetką (3.26 pav.), galime teigti jog didžiausia L-prolino koncentracija nustatyta, kai augalas augintas *in vivo* sąlygomis. Mažiausiai tinkami fitohomoni buvo IAR 0,1 mg/l + BAP 1 mg/l ir IAR 0,1 mg/l + TDZ 0,5 mg/l siekiant didesnės L-prolino koncentracijos.



**3.26 pav.** Prolino koncentracijos rezultatai tiriant medetką *in vivo* ir *in vitro*

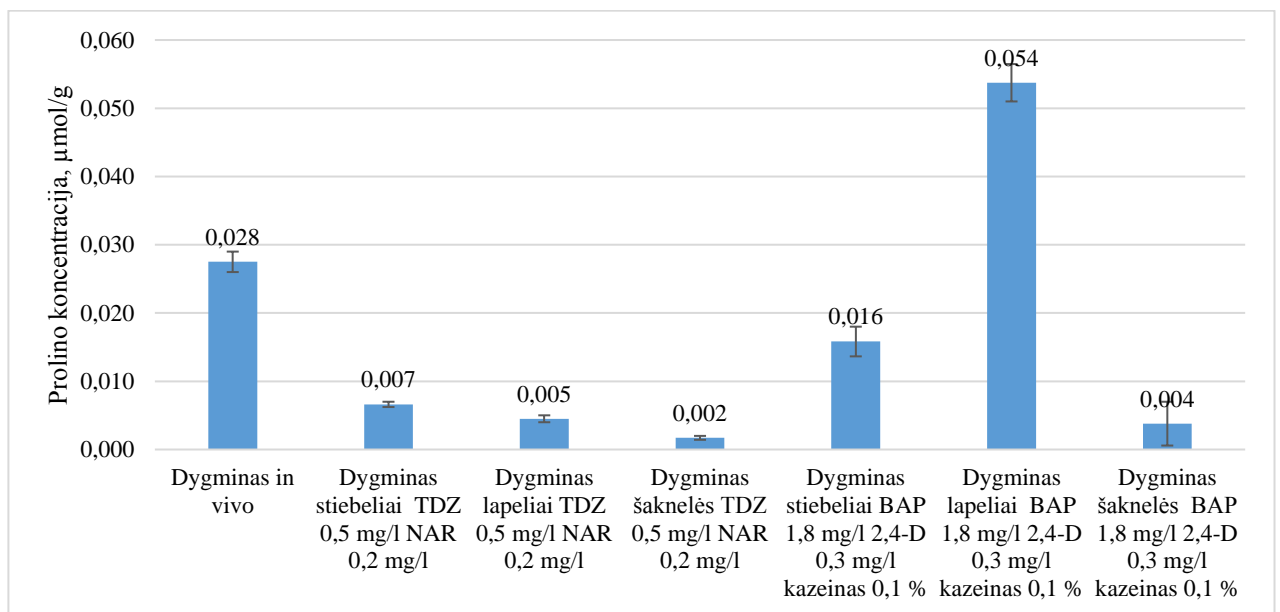
Iš rezultatų gautų tiriant kraujazolę matome jog fitohormoni taip pat turėjo mažai įtakos L-prolino koncentracijai. Lyginant su dygimu augintu *in vivo*, kitose *in vitro* augintose terpėse L-prolino kiekis siek tiek mažesnis.





**3.27 pav.** Prolino koncentracijos rezultatai tiriant kraujažolę *in vivo* ir *in vitro*

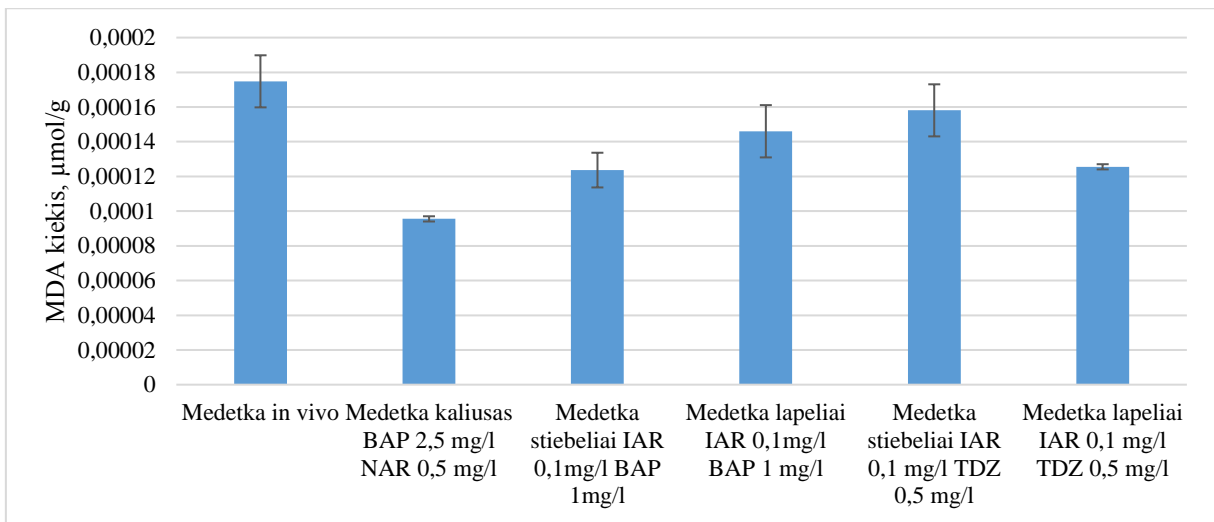
Dygmino atveju rezultatas kitoks (3.28 pav.), terpė papildyta fitohormonais BAP 1,8 mg/l + 2,4 – D 0,3 mg/l + kazeinas 0,1 %, parodė didžiausią rezultatą, kai auginti dygimo lapeliai. Mažiausia L-prolino koncentracija užfiksuota, kai buvo naudojami fitohormonai TDZ 0,5 mg/l + NAR 0,2 mg/l.



**3.28 pav.** Prolino koncentracijos rezultatai tiriant dygminą *in vivo* ir *in vitro*

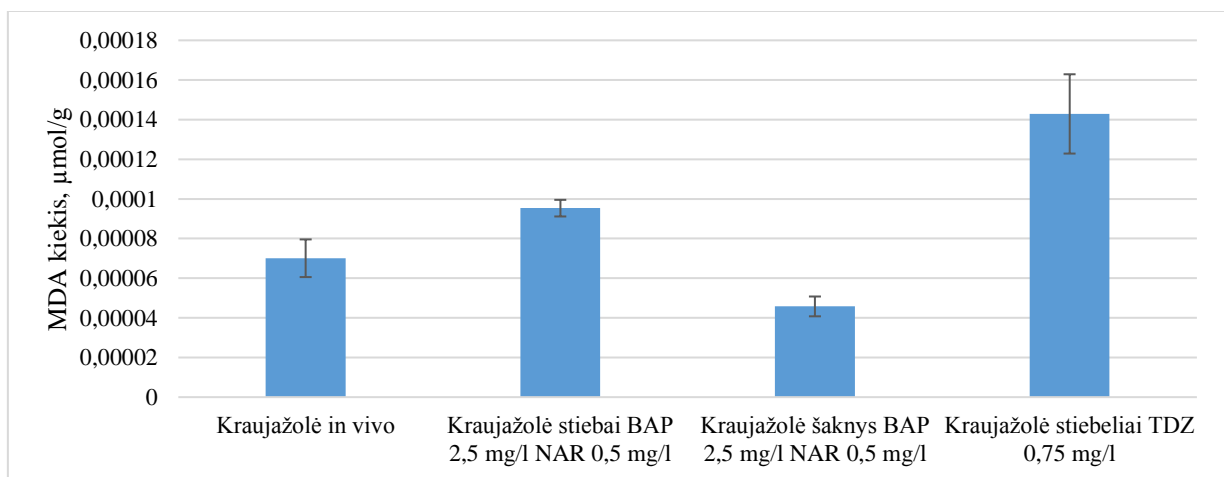
### 3.11 Malondialdehido (MDA) kiekio įvertinimas

Iš gautų rezultatų, tiriant medetkos ekstraktus matome, jog visgi didžiausias MDA kiekis yra medetkos, kuri auginta *in vivo* sąlygomis. Pasitelkus fitohormonus geresnis variantas siekiant gauti didesnę MDA kiekį, yra išgaunant iš medetkos stiebelių, kurių terpė augimo terpė papildyta IAR 0,1 mg/l + TDZ 0,5 mg/l fitohormonas, lyginant su kitais variantais.



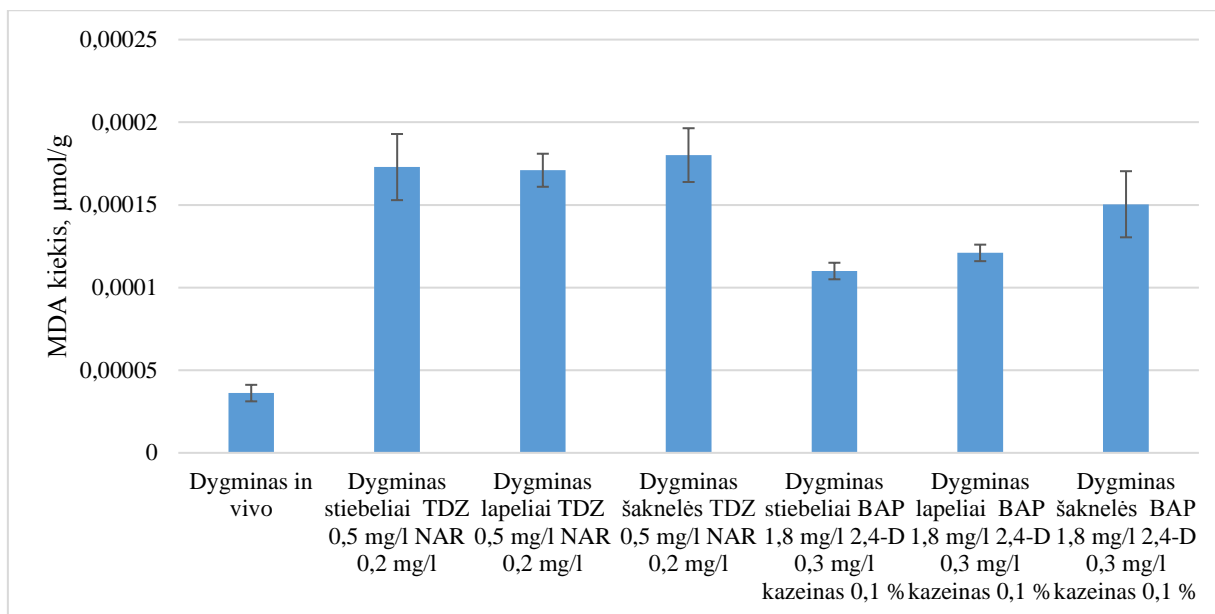
**3.29 pav.** Malondialaldehido kiekio rezultatai tiriant medetką *in vivo* ir *in vitro*

Tiriant kraujazolę, 3.30 pav. visgi didžiausias MDA kiekis pasiektas auginant kraujazolės stiebelius, kurių mitybinė terpė papildyta fitohormonu TDZ 0,75 mg/l. Mažiausias kiekis MDA nustatytas kraujazolėje augintoje *in vivo* sąlygomis. Už augintą *in vivo* sąlygomis šiek tiek didesnis rezultatas taip pat gautas naudojant fitohormonus BAP 2,5 mg/l + NAR 0,5 mg/l.



**3.30 pav.** Malondialaldehido kiekio rezultatai tiriant kraujazolę *in vivo* ir *in vitro*

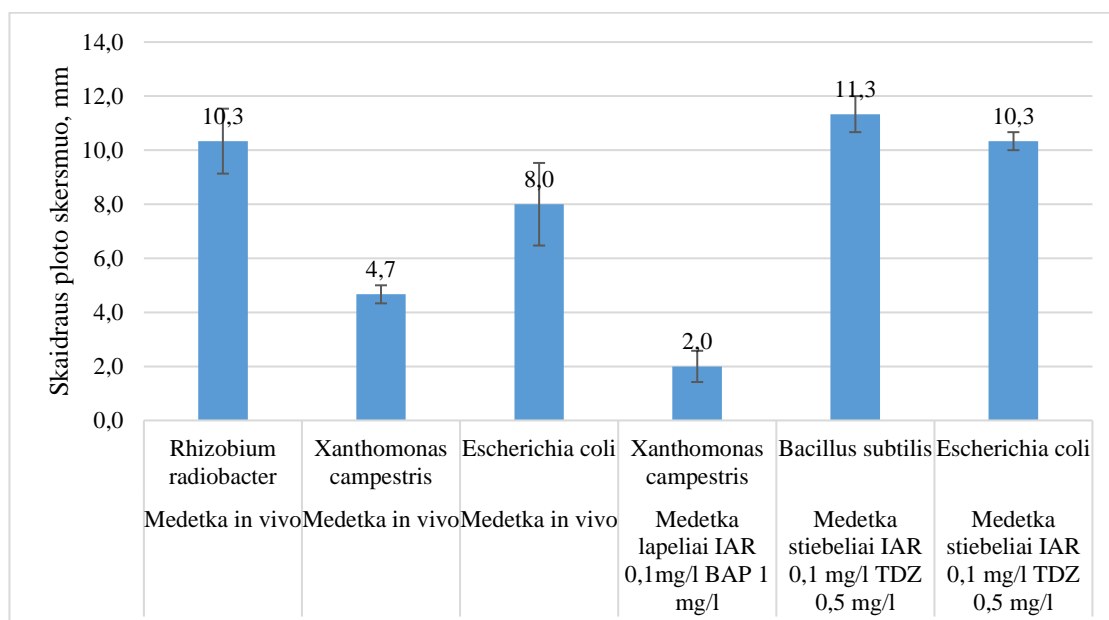
Kaip matome iš rezultatų gautų tiriant dygminą, galima teigti jog tinkamiausi fitohormonai siekiant didesnio MDA kiekio yra TDZ 0,5 mg/ + NAR 0,2 mg/l. Šiuo atveju visos augalo dalyse pasiektas didelis MDA kiekis, lyginant su rezultatu gautu iš dygmino auginto *in vivo* sąlygomis. Taip pat didesnis MDA kiekis, lyginant su *in vivo*, gautas naudojant fitohormonus BAP 1,8 mg/l + 2,4 – D 0,3 mg/l + kazeinas 0,1 %.



3.31 pav. Malondialdehido kiekio rezultatai tiriant dygminą *in vivo* ir *in vitro*

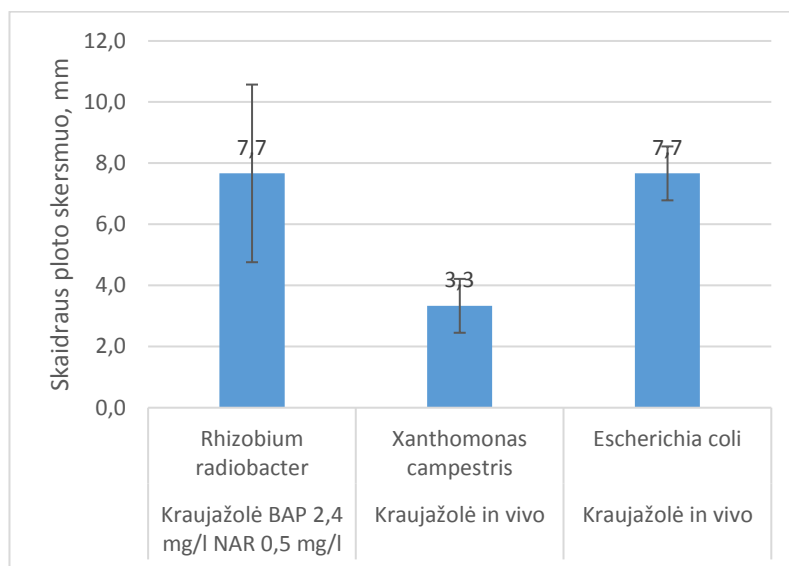
### 3.12 Augalinių ekstraktų antibakterinis įvertinimas *Rhizobium radiobacter*, *Xanthomonas campestris*, *E.Coli*, *Bacillus Subtilis* bakterijoms

Atliekant antibakterinį augalinių ekstraktų tyrimą buvo matuojamas skaidrus plotas standžioje terpėje aplink augalinio ekstrakto lašą po 24 valandų inkubacijos. Didžiausias antibakterinis aktyvumas tiriant medetkos ekstraktus buvo pastebėtas medetkos stiebeliuose su fitohormonais IAR 0,1 mg/l + TDZ 0,5 mg/l prieš *Bacillus subtilis* bakterijas. Taip pat didelis atparumas pastebėtas *in vivo* medetkos ekstraktoje prieš *Rhizobium radiobacter*. Mažiausias atparumas pastebėtas prieš *Xanthomonas campestris* su medetkos lapelių ekstraktu, kai naudoti fitohormonai IAR 0,1 mg/l + BAP 1 mg/l.



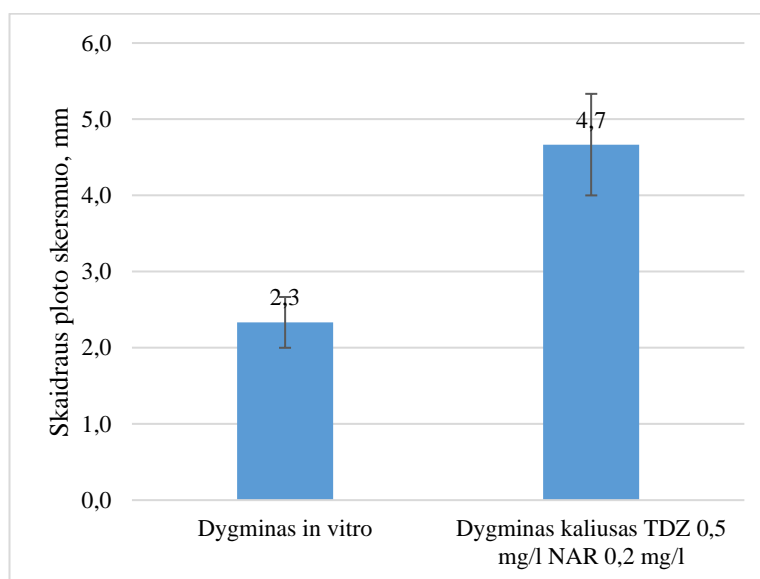
3.32 pav. Augalinių ekstraktų antibakterinio įvertinimo, *Rhizobium radiobacter*, *Xanthomonas campestris*, *E.coli*, *Bacillus subtilis*, bakterijoms rezultatai tiriant medetką *in vivo* ir *in vitro*

Kraujažolės ekstraktų geriausias antibakterinis atsparumas pastebėtas prieš *Rhizobium radiobacter* ir *E. coli*. Kiek didesnės antibakterinės savybės pastebėtos kraujažolėje augintoje *in vitro* sąlygomis su BAP 2,4 + NAR 0,5 mg/l.



**3.33 pav.** Augalinių ekstraktų antibakterinio įvertinimo su *Rhizobium radiobacter*, *Xanthomonas campestris*, *E. coli*, bakterijoms rezultatai, tiriant kraujažolę *in vivo* ir *in vitro*

Kaip galime matyti 3.34 pav., tiriant dygmino antibakterinį atsparumą didesnis rezultatas pasiektas, kai dygminas augintas *in vitro* sąlygomis ir naudoti fitohormonai TDZ 0,5 mg/l + NAR 0,2 mg/l, lyginant su dygimu *in vivo*. Naudojant kitas bakterijų kultūras, teigiamo rezultato nebuvo - skaidrus plotas aplink augalinių ekstraktų užlašintas vietas, nesusidarė.



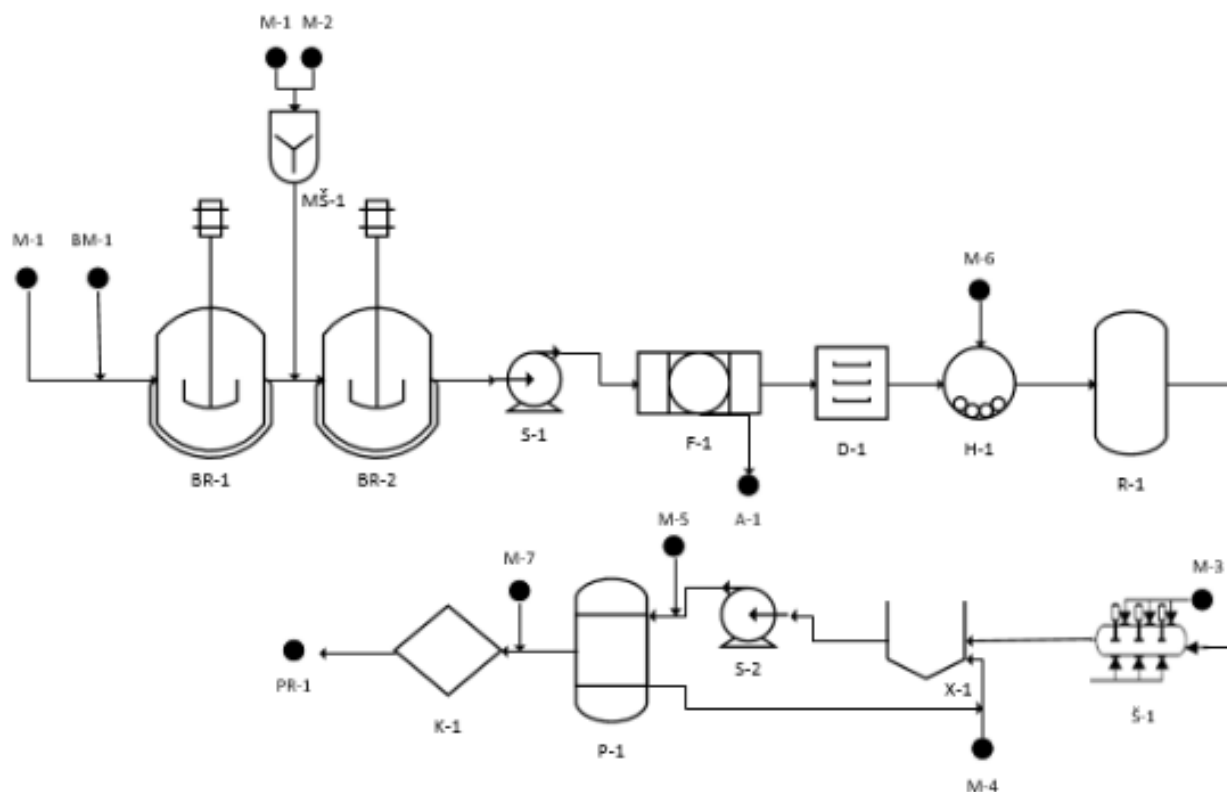
**3.34 pav.** Augalinių ekstraktų antibakterinio įvertinimo *Xanthomonas campestris* bakterijoms rezultatai tiriant dygminą *in vivo* ir *in vitro*

#### 4. Rekomendacijų dalis

Karotenoido liuteino išskyrimas iš medetkos (*Calendula officinalis* L.) lapelių kaliaus kultūros augintos *in vitro*, kai MS terpėje su fitohormonais IAR 0,1 mg/l + BAP 1 mg/l.

Biomasės auginimas vysta dviem etapais: pirmiausia medetkos sėklos yra pasodinamos bioreaktoriuje BR-1 su maitinamąja MS terpe. Tada *in vitro* sudygusios sėklos perkeliama į antrąjį bioreaktorių BR-2, kurio maitinamoji terpė yra praturtinta fitohormonais, sumaišoma ir leidžiama į bioreaktorių BR-2.

Užaugintos medetkos lapelių kaliaus kultūros su išcentrinu siurbliu S-1, perleidžiamos per filtrą F-1. Pašalinamos atliekos A-1 ir džiovinamos kameroje D-1. Sausa biomasė yra susmulkinama homogenizatoriuje H-1 ir talpinama rezervuare R-1. Sukaupus pakankamai medžiagos, susmulkintos medetkos kaliaus kultūros yra perkeliama į maišytuvą Š-1, kur atliekamas šarminis apdorojimas su H<sub>2</sub>O + KOH. Atliekamas pakartotinis išskyrimas su heksanu X-1. Siurbliu pašalinamas tirpiklio likutis S-2. Formuojamos kapsulės K-1. Gaunamas produktas PR-1 [35].



4.1 pav. Liuteino išskyrimo technologinė schema

4.1 lentelė. Technologinės schemos medžiagų žymėjimas ir pavadinimai

Medžiagos žymėjimas	Medžiagos pavadinimas
BM-1	Biomasė
M-1	MS terpė
M-2	Atitinkamų fitohormonų kombinacija

M-3	H <sub>2</sub> O + KOH
M-4	Heksanas
M-5	Aliejus
M-6	Aliuminis
M-7	Liuteino koncentratas
A-1	Atliekos
PR-1	Produktas

**4.2 lentelė.** Technologinės schemos prietaisų žymėjimas ir pavadinimai

<b>Prietaiso žymėjimas</b>	<b>Prietaiso pavadinimas</b>
BR-1 – BR-2	Bioreaktoriai
MŠ-1	Maišyklė
S-1 – S-2	Išcentrinis siurblys
F-1	Filtras
D-1	Džiovinimo kamera
M-1	Rutulinio malūno homogenizatorius
R-1	Rezervuaras
Š-1	Šarminio apdorojimo talpa
P-1	Solvento pašalinimo talpa
K-1	Kapsulių formavimo aparatas

## Išvados

1. Intensyviausias antioksidacinis aktyvumas įvertintas medetkos stiebelių kaliaus kultūroje *in vitro*, kuomet MS terpė buvo praturtinta fitohomonų mišiniu IAR (0,1 mg/l) + BAP (1 mg/l). Kraujažolei optimaliausias variantas yra TDZ (0,75 mg/l), išgaunant iš *in vitro* augintų kraujažolės stiebelių kaliaus. Dygmine intensyviausiu antioksidacinis aktyvumas nustatytas *in vivo* ekstraktoje.
2. Naudojant fitohormonus kaliaus kultūroms auginti: medetkai IAR (0,1 mg/l) + BAP (1 mg/l); kraujažolei (0,75 mg/l); dygminui BAP (1,8 mg/l) + 2,4-D 0,3 mg/l + kazeinas 0,1 %, pasiektos optimalios sąlygos fermento katalazės aktyvumui gauti.
3. Intensyviausias antibakterinis atsparumas nustatytas medetkos stiebeliuose augintuose MS terpėje papildytoje fitohormonais IAR (0,1 mg/l) + TDZ (0,5 mg/l) prieš *Bacillus subtilis* bakterijas; kraujažolės *in vitro* ekstraktas prieš *Rhizobium radiobacter* bakterijas, kai naudoti fitohormonai - BAP (2,4 mg/l) + NAR (0,5 mg/l); dygmino *in vitro* ekstraktas prieš bakteriją *Xanthomonas campestris*, kai naudoti fitohormonai - TDZ (0,5 mg/l) + NAR (0,2 mg/l).
4. Pasiūlyta liuteino išskyrimo technologinė schema, kuria remiantis rekomenduojama išskirti liuteiną iš *in vitro* medetkos lapelių kaliaus kultūros, kuri auginta MS terpėje su fitohormonais IAR 0,1 mg/l + BAP 1 mg/l.

## Literatūros sąrašas

1. RAGAŽINSKIENĖ ONA, RIMKIENĖ SILVIJA, SASNAUSKAS VALDAS. „Vaistinių augalų enciklopedija”, Kaunas: Lututė, 2005. ISBN 9955-575-73-5
2. O. GIVOL, R. KORNHABER, D. VISENTIN, M. CLEARY, J. HAIK, AND M. HARATS, “A systematic review of *Calendula officinalis* extract for wound healing,” *Wound Repair Regen.*, p. wr.12737, 2019.
3. K. OBELEVIČIUS, S. PETKEVIČIŪTĖ, E. ŠEINAUSKIENĖ. „Prieskoninių augalų ir jų vartojimo žinynas” Kaunas: Lututė, 2011. ISBN 978-9955-37-127-4
4. C. NICOLAUS, S. JUNGHANNS, A. HARTMANN, R. MURILLO, M. GANZERA, AND I. MERFORT, “In vitro studies to evaluate the wound healing properties of *Calendula officinalis* extracts,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 196, no. November 2016, pp. 94–103, 2017.
5. D. K. GUPTA, J. M. PALMA, AND F. J. CORPAS, *Antioxidants and Antioxidant Enzymes*. 2018.
6. A. M. ALNUQAYDAN, C. E. LENEHAN, R. R. HUGHES, AND B. J. SANDERSON, “Extracts from *Calendula officinalis* Offer in Vitro Protection Against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Induced Oxidative Stress Cell Killing of Human Skin Cells,” *Phyther. Res.*, vol. 29, no. 1, pp. 120–124, 2015.
7. P. C. BRAGA, “Antioxidant activity of *calendula officinalis* extract: Inhibitory effects on chemiluminescence of human neutrophil bursts and electron paramagnetic resonance spectroscopy,” *Pharmacology*, vol. 83, no. 6, pp. 348–355, 2009.
8. C. P. VICTÓRIO, C. L. S. LAGE, AND A. SATO, “Tissue culture techniques in the proliferation of shoots and roots of *Calendula officinalis*,” *Rev. Cienc. Agron.*, vol. 43, no. 3, pp. 539–545, 2012.
9. D. CRUCERIU, O. BALACESCU, AND E. RAKOSY, “*Calendula officinalis*: Potential Roles in Cancer Treatment and Palliative Care,” *Integr. Cancer Ther.*, vol. 17, no. 4, pp. 1068–1078, 2018.
10. L.-L. ZHANG ET AL., “Phytochemistry and Pharmacology of *Carthamus tinctorius* L.,” *Am. J. Chin. Med.*, vol. 44, no. 02, pp. 197–226, 2016.
11. AYOABI F, SHAMSIZADEH A, FATEMI I, VAKILIAN AR, ALLAHTAVAKOLI M, HASSANSHAHI GHH, MOGHADAM-AHMADI A. Bio-effectiveness of the main flavonoids of *Achillea millefolium* in the pathophysiology of neurodegenerative disorders- a review. *Iran J Basic Med Sci* 2017; 20:604-612. doi: 10.22038/IJBMS.2017.8827
12. E. DELSHAD, M. YOUSEFI, P. SASANNEZHAD, H. RAKHSHANDEH, AND Z. AYATI, “Medical uses of *Carthamus tinctorius* L. (Safflower): a comprehensive review from Traditional Medicine to Modern Medicine,” *Electron. Physician*, vol. 10, no. 4, pp. 6672–6681, 2018.
13. J. ASGARPAHAH AND N. KAZEMIVASH, “Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *carthamus tinctorius* L.,” *Chin. J. Integr. Med.*, vol. 19, no. 2, pp. 153–159, 2013.
14. X. ZHOU, L. TANG, Y. XU, G. ZHOU, AND Z. WANG, “Towards a better understanding of medicinal uses of *Carthamus tinctorius* L. in traditional Chinese



- medicine: A phytochemical and pharmacological review,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 151, no. 1, pp. 27–43, 2014.
15. L. JIA-XI ET AL., “Application of multiple chemical and biological approaches for quality assessment of *Carthamus tinctorius* L. (safflower) by determining both the primary and secondary metabolites,” *Phytomedicine*, vol. 58, p. 152826, 2019.
  16. I. C. A. ALVARENGA, S. T. SILVA, S. K. V. BERTOLUCCI, J. E. B. P. PINTO, AND F. V. PACHECO, “Application of Thidiazuron (TDZ) for in vitro multiplication of yarrow (*Achillea millefolium* L.) and profile of volatile compounds,” *Aust. J. Crop Sci.*, vol. 9, no. 10, pp. 948–953, 2015
  17. LAKSHMI T, GEETHA R.V, ANITHA ROY & ARAVIND KUMAR, Yarrow (*Acgillea Millenfolium* Linn.) herbal medicinal plant with broad therapeutic use – review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2011
  18. S. I. ALI, B. GOPALAKRISHNAN, AND V. VENKATESALU, “Pharmacognosy, Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Achillea millefolium* L.: A Review,” *Phyther. Res.*, vol. 31, no. 8, pp. 1140–1161, 2017.
  19. B. BENEDEK AND B. KOPP, “*Achillea millefolium* L. s.l. revisited: Recent findings confirm the traditional use,” *Wiener Medizinische Wochenschrift*, vol. 157, no. 13–14, pp. 312–314, 2007.
  20. M. F. MEDELLÍN-LUNA, J. E. CASTAÑEDA-DELGADO, V. Y. MARTÍNEZ-BALDERAS, AND A. R. CERVANTES-VILLAGRANA, “Medicinal Plant Extracts and Their Use As Wound Closure Inducing Agents,” *J. Med. Food*, vol. 00, no. 0, p. jmf.2018.0145, 2019.
  21. M. AKRAM, “Minireview on *Achillea millefolium* Linn,” *J. Membr. Biol.*, vol. 246, no. 9, pp. 661–663, 2013.
  22. L. C. BECKER ET AL., “Safety Assessment of *Achillea millefolium* as Used in Cosmetics,” *Int. J. Toxicol.*, vol. 35, no. 3\_suppl, pp. 5S-15S, 2016.
  23. P. I. DOBREV, K. HOYEROVÁ, AND J. PETRÁŠEK, “Auxins and Cytokinins in Plant Biology,” vol. 1569, pp. 31–39, 2017.
  24. J. PETRASEK ET AL., “Auxins and Cytokinins in Plant Development 2018,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 4, pp. 1–8, 2019.
  25. M. QUINT AND W. M. GRAY, “Auxin signaling,” *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 9, no. 5, pp. 448–453, 2006.
  26. M. QUARESHY, J. PRUSINSKA, J. LI, AND R. NAPIER, “A cheminformatics review of auxins as herbicides,” *J. Exp. Bot.*, vol. 69, no. 2, pp. 265–275, 2018.
  27. L. PLIHALOVA, H. VYLICILOVA, K. DOLEZAL, L. ZAHAJSKA, M. ZATLOUKAL, AND M. STRNAD, “ChemInform Abstract: Synthesis of Aromatic Cytokinins for Plant Biotechnology,” *ChemInform*, vol. 47, no. 35, 2016.
  28. P. GAMAS, M. BRAULT, M. F. JARDINAUD, AND F. FRUGIER, “Cytokinins in Symbiotic Nodulation: When, Where, What For?” *Trends Plant Sci.*, vol. 22, no. 9, pp. 792–802, 2017.
  29. G. NOCTOR, C. LELARGE-TROUVERIE, AND A. MHAMDI, “The metabolomics of oxidative stress,” *Phytochemistry*, vol. 112, no. 1, pp. 33–53, 2015.
  30. M. J. VALLEJO, L. SALAZAR, AND M. GRIJALVA, “Oxidative Stress Modulation and ROS-Mediated Toxicity in Cancer: A Review on In Vitro Models for Plant-Derived Compounds,” *Oxid. Med. Cell. Longev*, vol. 2017, pp. 1–9, 2017.

31. H. LUO, H. H. CHIANG, M. LOUW, A. SUSANTO, AND D. CHEN, “Nutrient Sensing and the Oxidative Stress Response,” *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 28, no. 6, pp. 449–460, 2017.
32. GUPTA, DHARMENDRA K., JOSE M. PALMA, AND FRANCISCO J. CORPAS.. *Antioxidants and Antioxidant Enzymes*. Springer. 2018
33. NEELIMA GARG, K.L. GERG, K.G. MUKERJI. 2010. *Laboratory Manual of Food Microbiology*. ISBN 978-93-80578-01-9
34. C.C. GIRI, ARCHANA GIRI. 2007. *Plant Biotechnology Practical Manual*. ISBN 81-89866-14-1
35. JOSÉ M. FERNÁNDEZ-SEVILLA & F. G. ACIÉN FERNÁNDEZ & E. MOLINA GRIMA. *Biotechnological production of lutein and its applications*. Springer *Appl Microbiol Biotechnol* (2010) 86:27–40
36. JOHNSON, ELIZABETH J. 2014. “Role of Lutein and Zeaxanthin in Visual and Cognitive Function throughout the Lifespan.” *Nutrition Reviews* 72 (9): 605–12. <https://doi.org/10.1111/nure.12133>.
37. MARES, JULIE. 2016. “Lutein and Zeaxanthin Isomers in Eye Health and Disease.” *Annual Review of Nutrition* 36 (1): 571–602. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071715-051110>.
38. EISENHAUER, BRONWYN, SHARON NATOLI, GERALD LIEW, AND VICTORIA M. FLOOD. 2017. “Lutein and Zeaxanthin — Food Sources, Bioavailability and Dietary Variety in Age-related Macular Degeneration Protection.” *Nutrients* 9 (2).
39. VICTÓRIO, CRISTIANE PIMENTEL, CELSO LUIZ SALGUEIRO LAGE, AND ALICE SATO. 2012. “Tissue Culture Techniques in the Proliferation of Shoots and Roots of *Calendula Officinalis*.” *Revista Ciencia Agronomica* 43 (3): 539–45.
40. ALVARENGA, IVAN CALDEIRA ALMEIDA, SÂMIA TORRES SILVA, SUZAN KELLY VILELA BERTOLUCCI, JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO, AND FERNANDA VENTORIM PACHECO. 2015. “Application of Thidiazuron (TDZ) for in Vitro Multiplication of Yarrow (*Achillea Millefolium* L.) and Profile of Volatile Compounds.” *Australian Journal of Crop Science* 9 (10): 948–53.