



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Augimo fitohormonų ir salicilo rūgšties įtaka jonažolės (lot.
Hypericum perforatum L.) kaliaus kultūrų *in vitro*
susiformavimui ir biologiniam aktyvumui**

Baigiamasis magistro projektas

Karolina Milašauskaitė

Projekto autorė

Doc. dr. Iona Jonuškienė

Vadovė

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Augimo fitohormonų ir salicilo rūgšties įtaka jonažolės (lot.
Hypericum perforatum L.) kaliaus kultūrų *in vitro*
susiformavimui ir biologiniam aktyvumui**

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Karolina Milašauskaitė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Doc. dr. Kristina Kantminienė

Recenzentė

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Karolina Milašauskaitė

Augimo fitohormonų ir salicilo rūgšties įtaka jonažolės (lot. *Hypericum perforatum* L.) kaliaus kultūrų *in vitro* susiformavimui ir biologiniam aktyvumui

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Karolinos Milašauskaitės, baigiamasis projektas tema „Augimo fitohormonų ir salicilo rūgšties įtaka jonažolės (lot. *Hypericum perforatum* L.) kaliaus kultūrų *in vitro* susiformavimui ir biologiniam aktyvumui“ 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 Milašauskaitė

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Milašauskaitė, Karolina. Augimo fitohormonų ir salicilo rūgšties įtaka jonažolės (lot. *Hypericum perforatum* L.) kaliaus kultūrų *in vitro* susiformavimui ir biologiniam aktyvumui. 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: jonažolė (*Hypericum perforatum* L.), *in vitro*, kaliaus kultūros, elicitoriai, salicilo rūgštis, bioaktyvumas.

Kaunas, 2020. 55 p.

Santrauka

Šio baigiamojo projekto tyrimų objektas – paprastosios jonažolės (*Hypericum perforatum* L.) kaliaus kultūros *in vitro* ir jonažolė *in vivo*.

Jonažolė yra vienas iš populiariausių vaistinių augalų, naudojamų visame pasaulyje. Šis augalas aktualus savo išskirtinai dideliu bioaktyvumu ir gydomosiomis antidepresinėmis savybėmis. Sparčiai auganti farmacijos pramonė skatina mokslinius tyrimus, siekiant gauti kokybišką, vienodu fitocheminiu profiliu pasižyminčią augalinę žaliavą. Todėl ieškoma būdų, kaip užauginti jonažolės kaliaus kultūras *in vitro*, kurios savo bioaktyvumu būtų pranašesnės už jonažolę *in vivo*.

Baigiamojo projekto rezultatai – ištirta jonažolė *in vitro*, užauginta su skirtingais augimo fitohormonais ir skirtingomis elicitoriaus – salicilo rūgšties koncentracijomis, bei jonažolė *in vivo*. Atlikti antioksidaciniai tyrimai, ištirtas antioksidacinių fermentų aktyvumas, nustatyta malondialdehido koncentracija bei biologiškai aktyvių junginių – karotinoidų, fenolinių junginių ir *L*-prolino koncentracijos.

Projekto metu gautos išvados, kad didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo jonažolės kaliaus kultūros *in vitro*, užaugintos MS terpėje su augimo fitohormonais 2,4-D (0,1 mg/l) ir BAP (0,5 mg/l) bei jonažolės šaknų kaliaus kultūros, kultivuotos su 1 mM salicilo rūgštimi. Didžiausiu antioksidacinio fermento superoksido dismutazės aktyvumu (8,67 vnt/mg) pasižymėjo jonažolės kaliaus kultūros *in vitro*, augintos su BAP (2,5 mg/l) ir NAR (0,5 mg/l) augimo fitohormonais, o didžiausiu katalazės aktyvumu (5,68 vnt/mg) pasižymėjo jonažolės lapų kaliaus kultūros *in vitro*, augintos su 2,5 mM salicilo rūgštimi. Rasta, kad didžiausia (19,23 mg/100g) karotinoidų koncentracija, lyginant su salicilo rūgštimi augintas jonažolių kaliaus kultūras *in vitro*, pasižymėjo jonažolės šaknų kaliaus kultūros, augintos su 5 mM salicilo rūgštimi. Rasta, kad didžiausia fenolinių junginių koncentracija (6,13 mg/100g) buvo jonažolės kaliaus kultūrose *in vivo*. Nustatyta, kad didžiausia *L*-prolino koncentracija (5,97 μmol/g) buvo jonažolės kaliaus kultūrose *in vitro*, augintose su TDZ (0,05 mg/l) ir NAR (0,2 mg/l) augimo fitohormonais, o salicilo rūgštis geriausiai paveikė *L*-prolino susiformavimui turėjo jonažolės lapų kaliaus kultūroms *in vitro*, kurių maitinamosiose terpėse buvo 2,5 mM salicilo rūgšties (8,53 μmol/g).

Milašauskaitė, Karolina. The Influence of Growth Phytohormones and Salicylic acid on *Hypericum perforatum* Callus Cultures Formation *in Vitro* and Biological Activity. Master's Final Degree Project / supervisor assoc. prof. dr. Ilona Jonuškienė; The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

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

Keywords: *Hypericum perforatum*, *in vitro*, callus cultures, elicitors, salicylic acid, bioactivity.

Kaunas, 2020. 55 p.

Summary

The object of research of this final project was St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) callus cultures *in vitro* and St. John's wort *in vivo*.

St. John's wort is one of the most popular medicinal plants used around the world. This plant is relevant for its exceptionally high bioactivity and therapeutic antidepressant properties. The fast-growing pharmaceutical industry is promoting science research to obtain higher quality raw plant material which could have the same phytochemical profile. Therefore, ways are being sought to grow bioactive-enriched St. John's wort callus cultures *in vitro* which would be superior to St. John's wort callus cultures *in vivo* in their bioactivity.

The results of the final project – the research of St. John's wort *in vitro* which was grown with different phytohormones and different concentrations of elicitor – salicylic acid and St. John's wort *in vivo* were made. The results of antioxidant activity, activity of antioxidant enzymes were evaluated as well as the amount of malondialdehyde and the amounts of biologically active compounds - carotenoids, phenolic compounds and *L*-proline were determined.

The conclusions obtained during the final project showed that St. John's wort callus cultures *in vitro* which were grown in MS medium with growth phytohormones 2,4-D (0.1 mg/l) and BAP (0.5 mg/l) as well as St. John's wort root callus cultures which were cultivated with 1 mM salicylic acid had the highest antioxidant activity. The greatest activity of antioxidant enzyme superoxide dismutase (8.67 unit/mg) showed St. John's wort callus cultures *in vitro* which were grown with growth phytohormones BAP (2.5 mg/l) and NAA (0.5 mg/l) and the greatest activity of catalase (5.68 unit/mg) was found in St. John's leaves callus cultures *in vitro*, which were grown with 2.5 mM salicylic acid. It was found that the highest amount of carotenoids (19.23 mg/100g) compared to St. John's wort callus cultures *in vitro* that were grown with salicylic acid, was in the St. John's wort root callus cultures which were grown with 5 mM salicylic acid. It was found that the highest amount of phenolic compounds (6.13 mg/100g) were in St. John's wort callus cultures *in vivo*. The highest *L*-proline content (5.97 μmol/g) was found to be *in vitro* callus cultures of St. John's wort grown with TDZ (0.05 mg/l) and NAR (0.2 mg/l) and salicylic acid showed the best influence on *L*-proline formation of St. John's wort leaves callus cultures *in vitro* (8.53 μmol/g) which medium contained 2.5 mM of salicylic acid.

Turinys

Santrumpų ir terminų sąrašas	8
Įvadas.....	9
1. Literatūros apžvalga	10
1.1. Jonažolės (lot. <i>Hypericum perforatum</i> L.) apibūdinimas	10
1.1.1. Antidepresantinis jonažolės poveikis	10
1.1.2. Jonažolės panaudojimas	11
1.2. Antriniai metabolitai.....	11
1.2.1. Hiperforinas	11
1.2.2. Kvercetas	12
1.3. Elicitavimas	13
1.3.1. Elicitoriai	13
1.3.2. Elicitavimo mechanizmas.....	15
1.4. Kaliaus kultūros.....	16
1.4.1. Kaliaus kultūrų formavimas	16
1.4.2. Kaliaus kultūrų auginimo terpės.....	17
1.5. Farmacija	17
1.6. Pramoninė gamyba	18
1.7. Literatūros apžvalgos apibendrinimas	19
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	20
2.1. Tiriami medžiaga.....	20
2.2. Reagentai	20
2.3. Aparatūra	20
2.4. Jonažolės (<i>Hypericum perforatum</i> L.) sėklų paruošimas	20
2.5. Maitinamųjų terpių paruošimas	20
2.5.1. Augimo fitohormonų tirpalų paruošimas	22
2.6. Jonažolės (<i>Hypericum perforatum</i> L.) kaliaus kultūrų formavimas.....	22
2.7. Jonažolės (<i>Hypericum perforatum</i> L.) antioksidacinio aktyvumo įvertinimas	22
2.7.1. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal FRAP metodą	22
2.7.2. Reducinių savybių įvertinimas	23
2.7.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal DPPH metodą.....	23
2.8. Antioksidacinių fermentų aktyvumo įvertinimas	24
2.8.1. Katalazės aktyvumo įvertinimas.....	24
2.8.2. Fermento superoksido dismutazės (SOD) aktyvumo įvertinimas	24
2.9. Metodai, charakterizuojantys oksidacinį stresą augaluose	25
2.9.1. Malondialdehido (MDA) koncentracijos nustatymas.....	25
2.10. Biologiškai aktyvių junginių koncentracijos nustatymas	25
2.10.1. Karotinoidų koncentracijos nustatymas	25
2.10.2. Bendros fenolinių junginių koncentracijos nustatymas Folino–Kiokalto metodu	26
2.10.3. L-Prolino koncentracijos nustatymas	27
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	29
3.1. Jonažolės (<i>Hypericum perforatum</i> L.) daigumo ir kaliaus genezės įvertinimas	29
3.2. Jonažolės (<i>Hypericum perforatum</i> L.) antioksidacinio aktyvumo įvertinimas	31
3.2.1. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal FRAP metodą	31
3.2.2. Reducinių savybių įvertinimas	33

3.2.3	Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal DPPH metodą.....	35
3.3	Antioksidantinių fermentų aktyvumo įvertinimas.....	37
3.3.1	Katalazės aktyvumo įvertinimas.....	37
3.3.2	Fermento superoksido dismutazės (SOD) aktyvumo įvertinimas.....	39
3.4	Metodai, charakterizuojantys oksidacinį stresą augaluose.....	41
3.4.1	Malondialdehido (MDA) koncentracijos nustatymas.....	41
3.5	Biologiškai aktyvių junginių koncentracijos nustatymas.....	43
3.5.1	Karotinoidų koncentracijos nustatymas.....	43
3.5.2	Bendros fenolinių junginių koncentracijos nustatymas Folino-Kiokalto metodu.....	44
3.5.3	L-Prolino koncentracijos nustatymas.....	46
4.	Rekomendacijų dalis.....	49
	Išvados.....	52
	Literatūros sąrašas.....	53

Santrumpų ir terminų sąrašas

Santrumpos:

½MS – pusinis MS terpės reagentų kiekis;

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

BAP – 6-benzilaminopurinas;

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo radikalas;

FRAP – geležies redukcijos antioksidantinė galia;

IAR – 3-indolilacto rūgštis;

In vitro – (*lot.* – stikle) procesai ir tyrimai, vykdomi dirbtinėje aplinkoje;

In vivo – bandymas, atliekamas gyvojoje sistemoje;

Kinet. – kinetinas (6-furfurilaminopurinas);

MDA – malondialdehidas;

MS – *Murashige* ir *Skoog* maitinamoji terpė;

NADPH – redukuotas nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas;

NAR – 1-naftilacto rūgštis;

ROS – reaktyvios deguonies formos;

SA – salicilo rūgštis;

TDZ – tidiazuronas (1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il-urėja));

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazinas.

Įvadas

Pagrindinė baigiamajame projekte nagrinėjama problema yra jonažolės (*Hypericum perforatum* L.) *in vivo* fitocheminio profilio nevientisumas. Šiuo metu yra ieškoma būdų, kaip biotechnologiniais metodais užauginti jonažolės kaliaus kultūras *in vitro* ir gauti vienodą jų fitocheminį profilį. Ši tema aktuali, nes didėjanti farmacijos pramonė ieško būdų, kaip išskirti vaistams naudojamus antrinius metabolitus ir optimizuoti jų gamybą. Naujausi tyrimai praneša apie antrinių metabolitų sintezę augalų *in vitro* sistemose, naudojant augimo fitohormonus ir elicitorius. Baigiamajame projekte nagrinėjama augimo fitohormonų ir elicitoriaus – salicilo rūgšties įtaka jonažolės kaliaus kultūrų formavimuisi ir biologiniam aktyvumui.

Tyrimo tikslas – ištirti jonažolės (*Hypericum perforatum* L.) kaliaus kultūrų *in vitro* susiformavimą ir įvertinti jonažolės *in vitro* bei *in vivo* bioaktyvumą, naudojant skirtingus augimo fitohormonų derinius ir skirtingas salicilo rūgšties koncentracijas.

Tyrimo uždaviniai:

1. paruošti maitinamąsias terpes ir steriliomis sąlygomis užauginti jonažolę *in vitro* bei suformuoti jonažolės kaliaus kultūras;
2. įvertinti antioksidacinį aktyvumą pagal FRAP, redukcinių savybių ir DPPH metodus jonažolėje *in vivo* ir jonažolės kaliaus kultūrose *in vitro*;
3. įvertinti antioksidacinių fermentų aktyvumą ir malondialdehido koncentraciją jonažolėje *in vivo* ir jonažolės kaliaus kultūrose *in vitro*;
4. nustatyti karotinoidų koncentraciją jonažolėje *in vivo* ir jonažolės kaliaus kultūrose *in vitro*;
5. nustatyti bendrą fenolinių junginių ir *L*-prolino koncentraciją jonažolėje *in vivo* ir jonažolės kaliaus kultūrose *in vitro*;
6. pateikti siūlomą hiperforino gavimo iš jonažolės kaliaus kultūrų aparatūrinę schemą.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Jonažolės (lot. *Hypericum perforatum* L.) apibūdinimas

Paprastoji jonažolė (lot. *Hypericum perforatum* L.) yra daugiametis žolinis *Hypericeae* šeimos augalas, plačiai paplitęs vidutinio klimato regionuose (žr. 1.1 pav.). Tai yra intensyviausiai tiriamas vaistinis augalas dėl jame esančių biologiškai aktyvių junginių. Jonažolės ekstraktuose yra daug naftodiantronų, acilflorogliucinolių, flavonoidų ir ksantonų. Šios bioaktyvios medžiagos turi įvairių farmakologinių požymių, siejamų su priešuždegiminiu, hepatoprotekcinu, antivirusiniu, antimikrobinu, antioksidaciniu poveikiu ir žaizdų gydymu. Naujausias susidomėjimas *H. perforatum* L. buvo sutelktas į jos neuroprotektinį poveikį ir simptominių, nuo lengvos iki vidutinio sunkumo formos, depresijos gydymą. Augalų ląstelių, audinių ir organų kultūrų technologijos pastaruoju metu yra prioritetas ir alternatyva prieš visos augalo sistemos panaudojimą natūraliems produktams gaminti. *In vitro* metodų, skirtų *Hypericum perforatum* L. kultivavimui su standartizuotomis bioaktyvių junginių koncentracijomis, sukūrimas būtų naudingas komerciniams ir mokslinių tyrimų tikslams [1].



1.1 pav. Paprastoji jonažolė (*Hypericum perforatum* L.) [2]

1.1.1. Antidepresantinis jonažolės poveikis

Hypericum perforatum L. ekstraktai, užpilai ir nuovirai nuo seno buvo naudojami įvairiems negalavimams gydyti. Šiuo metu geriausiai žinoma ir plačiausiai ištirta paprastosios jonažolės savybė yra lengvos ar vidutinio sunkumo depresijos gydymas, t.y. depresinių sutrikimų, nerimo ir nervinio susijaudinimo gydymas [3]. Šios vaistinės savybės yra susijusios su ekstrakto esančių antrinių metabolitų, ypač hipericinu, hiperforinu (kurie blokuoja sinapsinių membranų neurotransmiterių pasisavinimą), flavonoidų, ksantonų ir kitų vertingų junginių, sudėtimi [4]. Daugybė klinikinių tyrimų ir metaanalizių parodė, kad jonažolės ekstraktai yra veiksmingesni už placebą ūminiam depresijos sutrikimui gydyti ir panašiai veiksmingi kaip standartiniai antidepresantai [5], tokie kaip: fluoksetinas (Prozac), sertralinas (Zoloft) [4]. Be to, jų toleravimas yra daug geresnis, o tai yra svarbus veiksnys gydant lengvą ar vidutinio sunkumo depresiją, nes pacientai vengia neigiamo psichoaktyviųjų vaistų poveikio. *Hypericum perforatum* L. ekstraktų veiksmingumas ir toleravimas buvo patvirtintas Europos vaistų agentūros, Augalinių vaistų komiteto monografijoje [6].

1.1.2. Jonažolės panaudojimas

Hypericum perforatum L. kaliaus kultūros gali būti naudojamos gaminti antrinius metabolitus farmacijos, kosmetikos, maisto pramonėms [7]. Paprastoji jonažolė naudojama įvairiems fitofarmaciniams vaistams gaminti, kurių didžioji dalis naudojami depresijai gydyti [3]. Vietinio pritaikymo preparatai naudojami odos priežiūrai ir odos ligoms, tokioms kaip neurodermatitas, gydyti. Šviežios augalinės medžiagos, t.y. žydinčios išorinės *Hypericum perforatum* L. dalys, dažniausiai naudojamos aliejiniams preparatams gaminti. *Hyperici oleum*, kuriame gausu hipericino, yra naudojamas gydyti odos pažeidimus ir nudegimus. Gydant tepalu, kuriame gausu hiperforino, pagerėja raginio sluoksnio drėgmė, odos paviršiaus sausumas, odos lipidai ir subjektyvūs odos parametrai, rodantys stabilumą ir odos barjero pagerėjimą. Be veiksmingumo gydant neurologinius sutrikimus, tyrimai rodo, kad šis augalas gali būti naudingas gydant vėžį, su uždegimu susijusiems sutrikimams, bakterinėms, virusinėms [4], širdies ir kraujagyslių ligoms gydyti [7].

1.2. Antriniai metabolitai

Fitocheminis *Hypericum perforatum* L. apibūdinimas atskleidžia įvairių klasių junginių buvimą, įskaitant naftodiantronus (hipericiną ir pseudohypericiną), prenilintus acilflorogliucinolius (hiperforiną ir adhiperforiną), flavonoidus (kvercetiną, hiperosidą, rutiną, katechiną ir izokvercitriną), biflavonus (amentoflavoną, biapigeniną), fenolinius junginius (chlorogeninę rūgštį, tanino rūgštį ir kofeino rūgštį), ksantonus (1,3,6,7-tetrahidroksikantantoną) ir eterinius aliejus, kuriuose gausu sesviterpenų [4].

Gerai žinoma, kad antrinis metabolitų susidarymas jonažolėje priklauso nuo kultūros tipo, vystymosi etapų ir *in vitro* kultūrų ląstelių diferenciacijos. Flavonoidai, naftodiantroni ir acilflorogliucinoliai dažniausiai aptinkami *Hypericum perforatum* L. regeneruotų ūglių lapuose. Ksantonai identifikuojami kaip pagrindiniai metabolitai šaknų kultūrose, taip pat nediferencijuotose kultūrose (ląstelių suspensijose, kaliaus kultūrose) [1].

Augalų kultūrose antrinių metabolitų biosintezė paprastai yra nedidelė, todėl siekiama ją padidinti komerciniais tikslais [8]. Daugumos antrinių metabolitų biosintezę sudaro kelių fermentų daugiapakopės reakcijos. Bet kuris fermentinių biosintezės grandinių reakcijų etapas gali būti stimuliuojamas, norint gauti pagausintą tikslinį produktą, todėl dažniausiai į terpę pridedama prekursorių molekulių [7]. Pastaraisiais metais literatūroje buvo sukaupta nemažai duomenų apie manipuliavimą *Hypericum perforatum* L. antriniu metabolizmu, naudojant elicitavimą [4].

Be antrinių metabolitų, vis svarbesni tampa terapiniai antikūnai ir kiti rekombinantiniai baltymai [9]. Juos galima gaminti ne tik mikroorganizmuose (pavyzdžiui, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ir *Saccharomyces cerevisiae*) ar žinduolių ląstelių kultūrose (kiniško žiurkėno kiaušidėse ar kūdikio žiurkėno inksto ląstelėse), bet taip pat augalų kaliaus kultūrose ir augalų suspensijos ląstelių kultūrose. Pastarieji, palyginti su kitomis gamybos sistemomis, pasižymi ekonomišku, didelio masto gamyba ir saugumu [7].

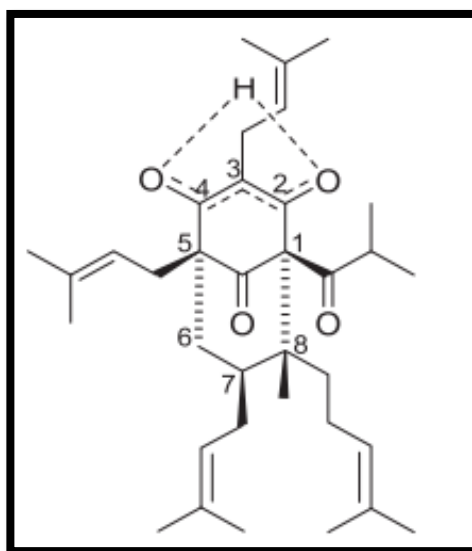
1.2.1. Hiperforinas

Hiperforinas yra prenilintas florogliucinolio darinys, priklausantis policiklinei, policenilintai acilflorogliucinolių šeimai. Jo struktūrinė formulė pavaizduota 1.2 pav [3]. Žinoma, kad augaluose

hiperforinas pasireiškia tamsiais purpuriniais pigmentais – mazgeliais, kurie išsivysto ne visuose augaluose. Juos gamina tik kai kurie *Hypericum* genties augalai, ypač *Hypericum perforatum* L. [10].

Nuo hiperforino išskyrimo aštuntajame dešimtmetyje, jis tapo pagrindiniu *Hypericum perforatum* L. fitocheminiu komponentu. Jonažolės preparatai užima svarbią vietą rinkoje, o hiperforinas yra vertinga sudedamoji dalis, pasižyminti sudėtinga chemine struktūra ir dideliu farmakologiniu potencialu [11]. Hiperforino cheminė sintezė yra sudėtinga, o išeiga nedidelė, todėl iki šiol, natūraliai *Hypericum perforatum* L. pasigaminantis hiperforinas tebelieka vienintelis šios fitocheminės medžiagos šaltinis farmacijai [12]. Jis turi plataus diapazono neurotransmiterių reabsorbcijos inhibitorius, tačiau yra labilus ir sunkiai sintetinamas. Paprastosios jonažolės ekstrakto antibakterinis poveikis pirmą kartą pastebėtas 1959 m. ir buvo priskirtas hiperforinui. Be antibakterinių savybių hiperforinas taip pat pasižymi priešuždegiminiu poveikiu, veikdamas kaip pagrindinis eikozanoidų apykaitos fermentų, t.y. ciklooksigenazės ir 5-lipoksigenazės, inhibitorius [13]. Todėl *Hypericum perforatum* L. preparatai naudojami vietiniam užkrėstų žaizdų gydymui, taip pat uždegiminei ir atopinei odai gydyti [3].

Ieškoma būdų, kaip optimizuoti hiperforino gamybą *in vitro* sistemose, kadangi jo kiekis natūraliai augančiuose augaluose yra labai nedidelis. Šios sistemos gali vykdyti naują masinio dauginimo technologiją, išlaikant genotipinį stabilumą [3]. Pastaruoju metu yra siūlomos auksino inicijuotos, jonažolės šaknų kaliaus kultūros, kaip unikalios *in vitro* hiperforino susidarymo sistemos [14]. Jose aptikti kai kurie hiperforino analogai, seko- ir adsekohiperforinai, kuriuose trūksta 8 prenilo šoninės grandinės. Šių analogų nėra jonažolėje *in vivo*, todėl šis atradimas turi ateities perspektyvų atrandant nepanaudotą hiperforino darinių farmakologinį aktyvumą ir padidinant išeigą. Dabartiniuose tyrimuose pagrindinis dėmesys skiriamas šaknų kaliaus kultūrų elicitavimui, prekursorių naudojimui ir įvairių auginimo terpių išbandymui, siekiant padidinti šio bioaktyvaus junginio gamybą [3].



1.2 pav. Hiperforino struktūrinė formulė [3]

1.2.2. Kvercetas

Kvercetas (3, 3', 4', 5, 7-pentahidroksiflavonas) yra augalinis junginys, priklausantis flavonoidų šeimai, plačiai paplitęs žmogaus dienos maisto racione. Ankstesniais *in vivo* ir *in vitro* tyrimais nustatyta, kad kvercetas turi nemažai farmakologinio potencialo. Tai natūralus produktas žmogaus

mitybos racione, jo gausu glikozido pavidalu įvairiuose augaluose, vaisiuose ir daržovėse. Jis taip pat buvo dedamas į funkcinius maisto produktus kaip komercinis maisto papildas. Atitinkama kvercetino dozė turi priešūždegiminį, antioksidacinį ir priešnavikinį poveikį. Priešnavikinis poveikis pasireiškia ląstelių ciklo progresavimo pakeitimu, ląstelių dauginimosi slopinimu, apoptozės skatinimu, angiogenezės slopinimu ir metastazių progresavimu. Palyginti su kvercetinu, geriau absorbuojama konjuguota kvercetino glikozido forma. Kvercetinas gali būti metabolizuojamas į gliukuronifikuotus, metiliuotus ir sulfatinius darinius, kurie taip pat atlieka svarbias biologines funkcijas, pasižymi didesniu antioksidaciniu pajėgumu, neuroprotekciniais efektais ir stipriu priešvėžiniu aktyvumu. Atlikus klinikinius kvercetino tyrimus, nepastebėtas joks toksiškas ar šalutinis poveikis žmonėms [15].

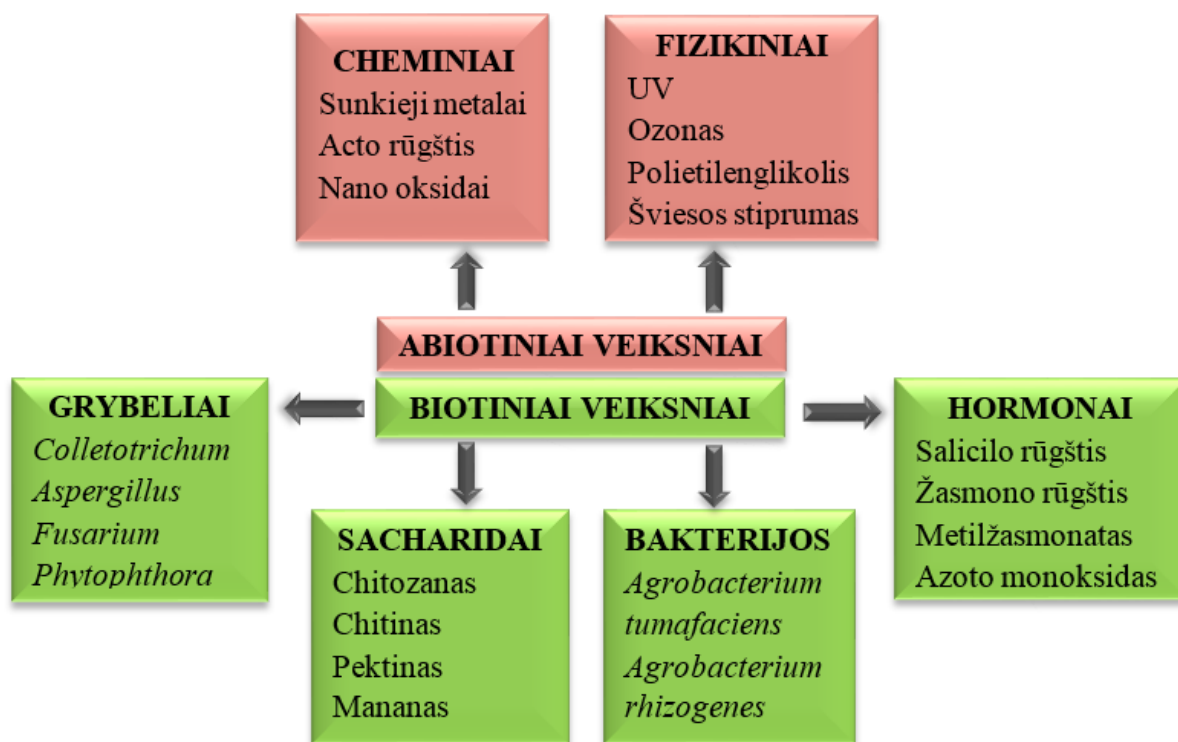
1.3. Elicitavimas

Elicitavimas yra viena iš pirmaujančių biotechnologinių priemonių, skirtų pagerinti antrinių metabolitų išėigą augalų *in vitro* sistemose [6]. Elicitavimas – tai augalų gynybinis mechanizmas, kuris apgina augalą nuo aplinkoje esančių grėsmių, tokių kaip patogenų, žolėdžių, sausros, druskingumo, UV spindulių poveikio [4]. Augalai yra plastiški organizmai, kurie prisitaiko prie abiotinio ir biotinio streso [7]. Tokius pavojaus signalus jie suvokia per savo receptorius ir jutiklius, suaktyvindami gynybines reakcijas šiems stresams neutralizuoti [4]. Augalai atpažįsta iš patogeno kilusius elicitorius per receptorius, sujungtus su plazmos membrana, ir kaip gynybinis atsakas aktyvuoja mažos molekulinės masės antimikrobinių junginių gamybą. Šie fitoaleksinai yra susintetinami ir kaupiami augaluose tik po sąlyčio su patogeniniais mikrobais. Vidinį tarpininkavimą tarp antrinių metabolitų sintezės ir išorinių streso signalų sukuria metilzasmonatas, salicilo rūgštis ir jų dariniai [16]. Šių elicitorių molekulės stimuliuoja gynybą ir streso sukeltus atsakus augaluose. Jie gali būti išgaunami iš pačių patogenų (egzogeninių elicitorių: chitino, chitozano ir gliukano) arba, kuriuos išskiria augalai, veikiami patogeno (endogeniniai elicitoriai: pektinas, pektino rūgštis, celiuliozė ir kiti polisacharidai). Priešingai nei šie biotiniai elicitoriai, taip pat yra abiotinių elicitorių, kurie veikia kaip fiziniai agentai (šaltis, karštis, UV spinduliai ir osmosinis slėgis) ir cheminės medžiagos (etilenas, grybeliai, antibiotikai, druskos ir sunkieji metalai). Elicitoriai reguliuoja genų ekspresiją reaguodami į cheminius ir fiziologinius dirgiklius. Jie taip pat reguliuoja fermentų sintezę ir kartu skatina daugybės antrinių metabolitų, tokių kaip flavonoidų, alkaloidų, terpenoidų, tioninų, fenilpropanoidų ir polipeptidų susidarymą [7]. Be jų augalų gynybinės reakcijos vaidmens, šie junginiai pasižymi svarbiomis farmakologinėmis savybėmis. Augalų gebėjimas kovoti su biotiniais ir abiotiniais stresais taikant antrinį metabolizmą yra pagrindinė elicitavimo dogma [4].

1.3.1. Elicitoriai

Elicitorius gali būti aplinkos veiksnys arba signalo molekulė, kuri aktyvuoja signalo perdavimo kaskadą, kuri biotechnologiniu požiūriu tarpininkauja genų, susijusių su antrinių metabolitų biosinteze, raiška. Elicitoriai daugiausia skirstomi į tris kategorijas pagal jų kilmę: biologinius, cheminius ir fizikinius. Biologiniai elicitoriai daugiausia yra mikroorganizmų ląstelių sienelių komponentai (chitinas, chitozanas ir gliukanai) ir angliavandeniai, tokie kaip poli- ir oligosacharidai, gaunami iš augalų ląstelių sienelių (pektinas, pektino rūgštis ir celiuliozė) [4]. Poli- ir oligosacharidai yra labiausiai iširtos signalinės molekulės, sukeliančios elicitavimo būdus, nes šie junginiai gali veiksmingai sukelti į patogeno invaziją panašias augalų gynybines reakcijas. Po elicitavimo visame augale sistemingai inicijuojami metaboliniai pokyčiai, siekiant suaktyvinti įgimtą augalo imuninę sistemą ir taip pat paruošti augalą streso sukeltoms problemoms [17]. Be to, augalų apsaugos

suaktyvinimo junginiai, tokie kaip salicilo rūgštis, žasmonato rūgštis, metilžasmonatas [18] ir azoto oksidas, kurie tarpininkauja gynybos reakcijose taip pat gali būti elicitoriais [19]. Neorganiniai agentai – sunkieji metalai, metalų jonai ir metalų oksidai, gali būti cheminiais augalų metabolizmo elicitoriais. Fizikiniai elicitoriai – UV spinduliuotė, ozonas, osmosinis ir vandens stresas taip pat skatina fermentinį aktyvumą ir antrinį metabolizmą [4]. Kadangi farmakologiškai naudingi antriniai metabolitai paprastai kaupiasi išoriniuose augalo organuose ir dalyvauja gynybos reakcijose į patogeno išpuolius, didesnis dėmesys skiriamas biotiniam elicitavimui [6]. Kultūros tipas, labiau nei elicitoriaus tipas, apibūdina elicitavimu sukeltus junginius *Hypericum perforatum* L. Hipericinai yra dažniausiai elicitorių sužadinti junginiai daigų ir ūglių kultūrose. Ląstelių suspensijos, kaliaus ir šaknų kultūros daugiausia suformuoja flavonoidus ir ksantonus [4]. Be kultūros tipo, dar keli kiti veiksniai turi įtakos elicitavimo sėkmei, įskaitant elicitoriaus tipą, koncentraciją, inkubacijos sąlygas ir elicitoriaus veikimo trukmę [5]. Įvairūs biotiniai ir abiotiniai elicitoriai, išbandyti siekiant manipuluoti *Hypericum perforatum* L. antriniu metabolizmu, yra suskirstyti paveiksle (žr. 1.3 pav.) [4].



1.3 pav. Biotinės ir abiotinės kilmės elicitoriai, skirti reguliuoti *Hypericum perforatum* L. antrinį metabolizmą [4]

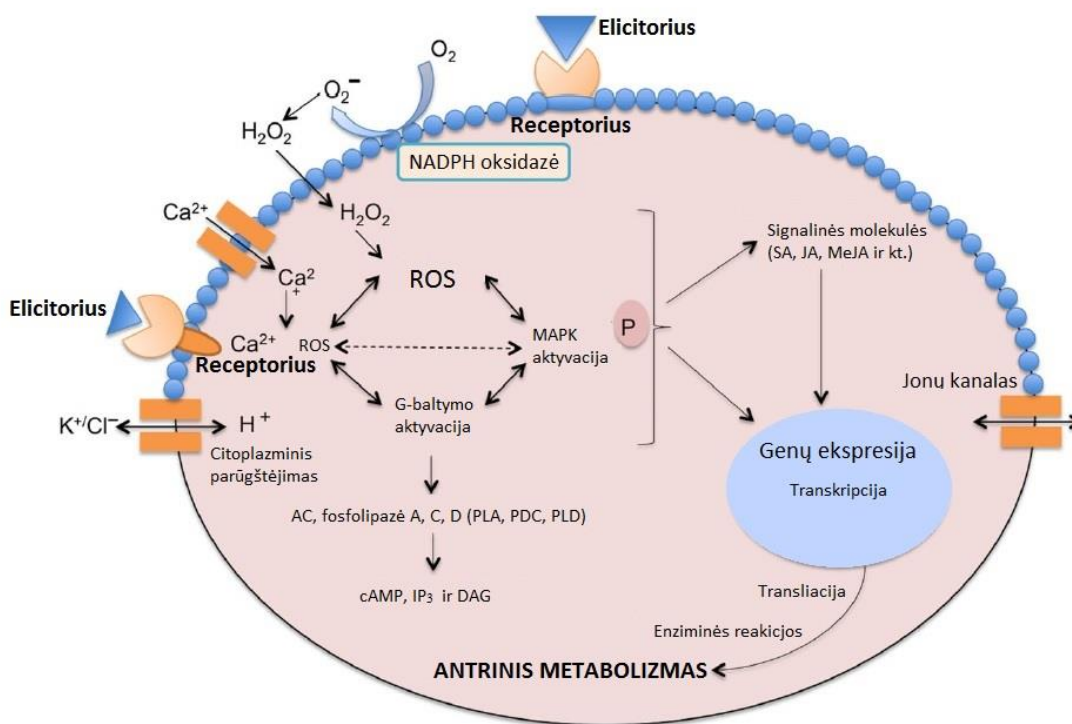
Elicitorių panaudojimas pavaizduotas 1.4 paveiksle. Jie naudojami augalų gynybinių sistemų, antrinių metabolitų enzimologijos ir reguliavimo tyrimams, taip pat tikslių medžiagų išėigai padidinti.



1.4 pav. Elicitorių panaudojimas

1.3.2. Elicitavimo mechanizmas

Elicitavimo mechanizmas yra labai sudėtingas dėl vykstančių biocheminių procesų gausos. Visi šie mechanizmo procesai skiriasi atsižvelgiant į elicitorių kilmę, specifiką, koncentraciją, augalų augimo ciklo stadiją, maistinių medžiagų įsisavinimą ir fizikocheminę sąveikos aplinką. Sudėtinga pasiūlyti universalų elicitavimo mechanizmo modelį, tačiau kalcio jonų srautas, reaktyviųjų deguonies formų (ROS) inaktyvinimas ir mitogenų suaktyvintos baltymų kinazės (MAPK) fosforilinimas yra pradiniai mechanizmai, kuriuos sukelia didžioji dalis elicitorių ir augalo ląstelių sąveikų (žr. 1.5 pav.). Vėlesnių procesų, tokių kaip transkripcijos veiksnių, sukeliančių augalų antrinį metabolizmą, aktyvavimas yra patvirtinti moksliniuose tyrimuose. Pradinis augalo atsakas į elicitorius yra jonų mainai, pavyzdžiui, K^+/Cl^- jonų ištekėjimai ir Ca^{2+}/H^+ jonų įtekėjimai. Ca^{2+} jonų įtekėjimas yra laikomas svarbiausiu procesu dėl jo įvairaus įsitraukimo į fiziologinius ir ląstelinius procesus. ROS generavimas yra dar vienas svarbus reiškinys augalų gynybiniame atsake, kaip ir NADPH oksidazės bei kitų oksidazių poveikis augalų ląstelėse [4].



1.5 pav. Molekulinis elicitavimo mechanizmas [4].

Kadangi antrinių metabolitų elicitavimo potencialas skiriasi pagal kultūrų tipus, elicitorius, veikimo sąlygas ir kitus parametrus, būtina atlikti papildomus tyrimus, siekiant optimizuoti geriausius metodus. Reikia suprasti medžiagų apykaitos būdus, kurie lemia specifinių antrinių metabolitų susidarymą. Išskyrus flavonoidinį būdą, sudėtingi biosintetiniai būdai, ypač išplėtoti *Hypericum spp.*, nėra iki galo suprasti. Informacijos apie dalyvaujančius fermentus ir genus bei apie transkripcijos veiksnius ir pagrindinius jungiklius, kontroliuojančius šiuos būdus, trūkumas, yra pagrindinė kliūtis efektyviam *Hypericum perforatum* L. elicitavimui. Tikimasi, kad lyginamieji transkriptominiai, metabolominiai ir proteominiai tyrimai, atlikti tiek su kontrolinėmis, tiek su elicitoriais paveiktomis kaliaus kultūromis, leis geriau suprasti elicitavimo mechanizmą [4].

1.4. Kaliaus kultūros

Augalų kaliaus kultūros pirmą kartą buvo sukurtos Gotliebo Haberlandto (1854–1945), XX a. pradžioje. Ketvirtajame ir septintajame dešimtmečiuose, dėl techninės pažangos, buvo toliau tobulinami augalų audinių auginimo metodai, siekiant ištirti ląstelių elgseną: citologiją, mitybą, metabolizmą, morfogenezę, embriogenezę ir patologiją. Nuo septintojo dešimtmečio pradėta domėtis antrinių metabolitų biosinteze. Atsiradus genais pagrįstiems technologiniams metodams, buvo sukurtos naujos kaliaus kultūrų ir kitų augalų audinių taikymo technologijos.

Kaliaus kultūros gali būti embriogeninės arba neembriogeninės. Embriogeninėse kaliaus kultūrose yra diferencijuotos embriogeninės ląstelės, kurios regeneruoja ištikus augalus. Neembriogeninėse kaliaus kultūrose yra homogeninių, diferencijuotų ląstelių, kurios naudojamos antriniam metabolitams gaminti. Kaliaus kultūros skirstomos į kultūras, kurios auga kompaktiška forma ir kultūras, kurios yra purios. Naujausioje koncepcijoje teigiama, kad augalų ląstelės nediferencijuoja iš naujo ir kaliaus susiformuoja iš jau egzistuojančių kamieninių ląstelių.

Pagrindiniai ląstelių kultūrų sistemų privalumai, lyginant su įprastu, natūraliu augalų auginimu, yra:

- pasirinktas augalų kaliaus kultūras galima suformuoti nepriklausomai nuo išorinių veiksnių (dirvožemio sudėtis ar klimato);
- kultivuojamos ląstelės neužsikrečia mikroorganizmais, vabzdžiais ir kenkėjais;
- bet kurio augalo ląstelės – net retų ar nykstančių rūšių, gali būti auginamos ir iš jų gaunami antriniai metabolitai;
- antrinių metabolitų gamybos reguliavimas bioreaktoriuose sumažina sąnaudas ir pagerina produktyvumą [7].

1.4.1. Kaliaus kultūrų formavimas

Augalų audinių kultūrų formavimas yra pagrindinis metodas, taikomas mokslo ir komercinėms reikmėms. Šios kaliaus ląstelės gali būti kultivuojamos *in vitro* ir pritaikomos biotechnologiškai. Kaliaus kultūroms auginti gali būti naudojama beveik bet kuri augalo dalis [20]. Iš augalų audinių paimti eksplantai lėtai auga *in vitro* į ląstelių masę, kuri būna nuo amorfinės, bespalvės ir žalsvos iki šviesiai rudos spalvos. Ši ląstelių masė auga tik tada, kai ji gauta steriliomis sąlygomis, išvengiant mikrobinės infekcijos ir auginta ant kieto gelio terpės, papildytos augimo fitohormonais [21]. Reguliariai perkelti ląsteles iš senos terpės į šviežią, kaliaus kultūras galima laikyti *in vitro* neribotą laiką. Diferencijuotos augalų ląstelės ir kultivuojamos augalų kaliaus kultūrų ląstelės labai skiriasi. Augalų kaliaus kultūrų ląstelės yra panašios į nediferencijuotas meristemines ląsteles [22]. Kaliaus kultūros vystosi ne iš pavienių atskirų ląstelių, bet iš nevienalyčių struktūrinių audinių. Kaliaus

kultūrų palaikymo laboratorinės sąlygos įvairioms rūšims yra skirtingos, todėl jos turi būti optimizuotos kiekvienu atskiru atveju. Išoriniai veiksniai, tokie kaip šviesa, temperatūra, terpės pH ir kultūrų aeracija, turi įtakos antrinių metabolitų biosintetinimui [7]. Kaliaus kultūros gali diferencijuoti į išstisus augalus, jei parenkama tinkama auginimo terpė. Nors kai kurioms kaliaus kultūroms reikia tamsos, kitos kaliaus kultūros auga tam tikromis dienos ir nakties sąlygomis (pavyzdžiui, 16 val. šviesa, 8 val. tamsa). Kaliaus kultūros paprastai auga 25 ± 2 °C temperatūroje, nors yra atliktų tyrimų, kad *Hypericum perforatum* L. yra atsparus šalčiui augalas ir, kad žema (15 °C) temperatūra skatina kaliaus kultūrų augimą, hiperforino biosintezę ir su juo susijusią genų ekspresiją, taip pat pagrindinių bioaktyviųjų junginių (flavonoidų ir fenolinių medžiagų) kaupimąsi *Hypericum perforatum* L. daiguose [22].

1.4.2. Kaliaus kultūrų auginimo terpės

Tipiškos, dažnai naudojamos maitinamosios kaliaus kultūrų auginimo terpės yra *Murashige* ir *Skoog* (MS) terpė, *White's* terpė ir sumedėjusių augalų terpė. Daugeliu atvejų į terpę reikia pridėti specifinių augimo fitohormonų kaliaus augimui stimuliuoti. Antrinių metabolitų gamybai optimizuoti, pageidautina, kad būtų naudojamos dvi terpės: viena terpė ląstelių auginimui, kita – antrinių metabolitų susidarymui. Paprastai kaliaus kultūros auginamos kietoje agarų terpėje, papildytoje specifinėmis maistinėmis medžiagomis, druskomis, vitaminais ir elementais (pavyzdžiui, azotu, fosforu ir kaliu). Apskritai, didelė amonio jonų koncentracija slopina antrinių metabolitų susidarymą, o mažinant amonio azoto kiekį, antrinių metabolitų susidarymas padidėja [7]. Neorganinis fosfatas yra būtinas fotosintezei ir glikolizei. Didelis fosfatų kiekis skatina ląstelių augimą ir pirminį metabolizmą, o maža fosfatų koncentracija skatina antrinių metabolitų susidarymą. Daug antrinių metabolitų susidaro dėl fosforilintų tarpinių produktų, kurie vėliau išskiria fosfatą, kurių pavyzdžiais gali būti fenilpropanoidai ir terpenoidai [23].

1.5. Farmacija

Daugybė farmakologinių ir klinikinių tyrimų parodė, kad paprastosios jonažolės ekstraktai pasižymi įvairiomis farmakologinėmis savybėmis, įskaitant antidepresinį, priešuždegiminį, antivirusinį, priešvėžinį ir antibakterinį poveikį, todėl šiuo metu *Hypericum perforatum* L. yra vienas populiariausių augalinių vaistų visame pasaulyje. Dėl savo žinomų farmakologinių savybių ši rūšis yra įtraukta į Europos ir JAV farmakopėjas. Siekiant gauti kokybišką biomasę bei patenkinti vis didėjančius farmacijos pramonės poreikius, jonažolė yra auginama daugelyje šalių [4]. Svarbus iššūkis farmacijos pramonei yra vienodos fitocheminės *Hypericum perforatum* L. preparatų sudėties, efektyvumo ir saugumo užtikrinimas [1]. Augalai, augantys *in vivo* sąlygomis, paprastai yra veikiami biotinių ir abiotinių veiksnių, kurie gali paveikti fitocheminę sudėtį [4]. Taip pat, antrinių metabolitų kokybinius ir kiekybinius svyravimus lemia ekologiniai, aplinkos, fiziologiniai ir genetiniai veiksniai, taip pat užterštumas vabzdžiais ir patogenais [1]. Pavyzdžiui, *Hypericum perforatum* L. augalai, gauti iš skirtingų geografinių regionų, sezonų, dirvožemio sąlygų, ženkliai skiriasi savo fitocheminiu profilu [24]. Kadangi jonažolės ekstraktų farmakologinį potencialą daugiausia lemia jos fitocheminė sudėtis ir svarbių junginių santykis, tokie pokyčiai gali paveikti ekstraktų gydymo efektyvumą. Jonažolės *in vitro* kaliaus kultūros, auginamos kontroliuojamomis sąlygomis, gali išspręsti šias problemas ir tapti patrauklia alternatyva auginimui lauke [4]. Be to, medicininiais tikslais kultivuojamiems *Hypericum perforatum* L. augalams subręsti reikia maždaug 2 metų ir auginimo optimizavimo, o tai reikalauja daug laiko ir didelių kaštų [1]. Nors daugelyje tyrimų buvo pranešta apie manipuliavimą paprastosios jonažolės antriniu metabolizmu eicitavimo būdu, labai nedaug

autorių iš tikrųjų išbandė paveiktų junginių ir ekstraktų, iš apdorotų ląstelių, farmakologines savybes [4]. *Hypericum perforatum* L. ekstraktai tiekiami kapsulėmis, tabletėmis ir dengtomis tabletėmis [3]. Komercinių jonažolės preparatų efektyvumas grindžiamas viso metabolitų mišinio sinergetiškumu, o ne vieneto sudėtimi [1]. Įprasta paros dozė yra nuo 500 iki 1200 (mg) sauso ekstrakto. Daugelyje šalių *Hypericum perforatum* L. produktai yra parduodami kaip maisto papildai, kuriems, kaip sintetiniams vaistams, netaikomas griežtas patikrinimas dėl saugumo ir veiksmingumo [25]. Europos bendrijoje jie yra tiek maisto papildai, tiek vaistai. Be produkcijos efektyvumo ir tvarumo, turi būti įrodytas efektyvumas, saugumas ir kokybė. Raudonajame sąrašė, Vokietijoje, licencijuotų vaistų sąrašė, yra maždaug 40 *Hypericum perforatum* L. preparatų [3].

1.6. Pramoninė gamyba

Augantis *Hypericum perforatum* L. vaistų vartotojų skaičius nuolat didina pasaulinės rinkos žaliavų paklausą. Aukštos kokybės augalinės medžiagos gamybai dideliais kiekiais neigiamą įtaką daro nekontroliuojami veiksniai, tokie kaip klimato svyravimai, kintančios dirvožemio savybės, augalų ligos ir genotipiniai pokyčiai. Procesai po derliaus nuėmimo – džiovinimas, sandėliavimas ir ekstrahavimas taip pat turi neigiamos įtakos aukštos kokybės augalinės medžiagos gavimui [26]. Pavyzdžiui, ištirta, kad hiperforino ir hipericino kiekiui neigiamos įtakos turi šviesos intensyvumo ir temperatūros sumažėjimas. Užteršimo rizika taip pat yra didelis iššūkis. Yra praktikos, kad *Hypericum perforatum* L. preparatai buvo užteršti kepenims toksiškais pirolizidino alkaloidais, dėl netyčinio, kartu augančių piktžolių derliaus, todėl vaistų partija buvo prarasta [3].

Dabar ypač aktualus sukauptų žinių ir *in vitro* tyrimų perkėlimas į didesnę gamybą. Natūralius produktus sunku susintetinti, todėl mokslininkai ieško galimybių tvariai ir ekonomiškai biomasės gamybai ir perdirbimui biofermentatoriuose dideliais kiekiais, o tai būtų patraukli fitochemikalų gamyba komerciniais tikslais [27]. Surenkama vis daugiau informacijos apie pageidaujamų natūralių produktų biosintetinius būdus, kurie dar labiau skatina bioinžinerijos ir biotechnologijos metodų plėtrą, vaistinių augalų kaliaus kultūrų srityje [28].

Šaknų kultūros yra patrauklios auginimo sistemos plačiam fitocheminiam profiliui gauti, taip pat jos yra lengvai valdomos biomasės didinimui bioreaktoriuose. Paprastosios jonažolės kaliaus kultūros, suformtos iš šaknų eksplantų, gali būti naudojamos tiek ksantonams, tiek hipericinui gaminti [29]. Šaknyse nėra chlorofilo, kurio paprastai yra ūglių kultūrose ir kuris trukdo gryninimo procesams, pavyzdžiui, ekstrahavimui. Iš kitos pusės, šaknys yra biologinės sistemos, jautrios hidromechaninei šlyties įtampai, todėl tinkamo bioreaktoriaus pasirinkimas yra iššūkis [3]. Antriniams metabolitams išskirti ir išgryninti naudojami cheminiai paruošiamieji metodai yra vienodi, tiek augalų ląstelių kultūroms, tiek natūraliai augantiems augalams. Jei susidarę produktai patenka į auginimo terpę, juos atskirti yra paprasta, o jei jie laikomi vakuolėse, reikia suardyti augalų ląstelių membranas ir tonoplastus (pavyzdžiui, permeabilizuojančiomis medžiagomis, tokiomis kaip dimetilsulfoksidas). Optimizuojant norimų gauti fitochemikalų gamybą, reikia padidinti jų išeigą ir kuo labiau sumažinti nepageidaujamų šalutinių produktų kiekį [7]. Augimo sąlygas galima optimizuoti keičiant kultivavimo terpės sudėtį, elicitorių ir augimo fitohormonų koncentracijas bei santykius, taip pat maitinimas prekursoriais gali padidinti aktyvių farmokologinių ingredientų kaupimąsi šaknų kultūrose. Neseniai atliktas mokslininkų bandomasis kultivavimas 500 litrų bioreaktoriuje, kuriame buvo išauginta *Hypericum perforatum* L. šaknų kultūros biomasė, skirta hipericinui gaminti [3].

Nepaisant naujos galimybės skatinti įvairių rūšių bioaktyvių junginių susidarymą paprastosios jonažolės ląstelių ir audinių kultūrose elicitacijos būdu, pramoninis elicitavimas ir panaudojimas dar yra pradinėje stadijoje. Susirūpinimą kelia didelių aseptinės biomasės kiekių gamyba. Tinkamų kultivavimo bioreaktorių pasirinkimas ir elicitavimo priemonių optimizavimas yra pagrindinės tolimesnės inovacijos [3].

1.7. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Galima tikėtis, kad ateityje biologiškai inžinerinių augalų paklausa padidės [7]. Šiuo metu svarbiausi *Hypericum perforatum* L. biotechnologijos aspektai yra svarbių bioaktyvių molekulių koncentracijos padidėjimas ir naujų junginių gamyba [4]. Augalo ląstelių kultūros sistemų ir molekulinės biologijos plėtra siūlo daugybę būdų pagerinti bioaktyvių junginių gamybą. Siūlomi būdai yra: ląstelių linijų atranka, ląstelių imobilizacija, permeabilizavimas, prekursorių, augimo fitohormonų naudojimas, produktų sekrecija, biotransformacija, metabolinė inžinerija, bioreaktorių inžinerija, sintetinė biologija ir elicitavimas. Augimo fitohormonų naudojimas ir elicitavimas yra viena iš strategijų, skirtų padidinti antrinių metabolitų gamybą. Tokiose augalų rūšyse, kaip *Hypericum perforatum* L., metabolizmo inžinerijos ir sintetinės biologijos įrankiai vis dar sudėtingai pritaikomi, dėl veiksmingų transformacijos metodų ir genetinės informacijos apie biosintetinius būdus trūkumo. Taigi, paprastosios jonažolės tyrimuose, labai svarbi bioaktyvių junginių gamyba, naudojant augimo fitohormonus ir elicitavimą *in vitro* kaliaus kultūrų sistemose [4].

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Tiriamoji medžiaga

Baigiamojo tiriamojo projekto metu tirta paprastoji jonažolė (*Hypericum perforatum* L.) *in vitro* bei *in vivo*.

2.2. Reagentai

Baigiamojo tiriamojo projekto metu naudoti reagentai: metanolis (CH₃OH), FRAP reagentas, acetato buferis, TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinas), FeCl₃·6H₂O, FeSO₄·7H₂O, natrio fosfatinis buferis, K₃[Fe(CN)₆], trichloracto rūgštis, FeCl₃, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas), K/Na fosfatinis buferis, ditiotritolis (DTT), PMSF (fenilmetilsufonilfluoridas), vandenilio peroksidas (H₂O₂), DMSO, polivinilpirolidonas, Tris-HCl buferis, L-metioninas, nitromėlynasis tetrazolis, Tritonas X-100, riboflavinai, tiobarbitūrinė rūgštis, etanolis (C₂H₅OH), acetonas, Folino-Kiokalto reagentas, natrio karbonatas (Na₂CO₃), tanino rūgštis, ledinė acto rūgštis, ninhidrinai, H₃PO₄, L-prolinai, albuminai, Bradfordo reagentas.

2.3. Aparatūra

Baigiamojo tiriamojo projekto metu naudota aparatūra:

- pH-metras „Winlab“;
- autoklavas „Certoclav“;
- laminaras „Telstar BV-100“;
- termostatas „Binder“;
- termostatuojamas kratytuvas „Biosan ES-20“;
- termostatuojama vandens vonelė „Biosan“;
- centrifuga „Universal 320 R“;
- spektrofotometras „Shimadzu UV-1280“.

2.4. Jonažolės (*Hypericum perforatum* L.) sėklų paruošimas

Jonažolės (*Hypericum perforatum* L.) sėklos sterilintos 70 % C₂H₅OH tirpale, 5 sek. Po to jos perkeltos į 1,5 % NaClO tirpalą ir ten laikytos 20 min. Vėliau sėklos 3 kartus plautos steriliu dejonizuotu vandeniu. Visi šie veiksmai atlikti laminare, kuriame UV spinduliuote sterilinta darbo vieta, taip pat atlikta papildoma paviršių dezinfekcija 70 % C₂H₅OH tirpalu.

2.5. Maitinamųjų terpių paruošimas

Jonažolės (*Hypericum perforatum* L.) sėklų daiginimui ir kaliaus kultūrų formavimui pasirinkta labiausiai paplitusi augalų auginimo terpė, naudojama laboratorijose eksperimentams su augalų ląstelių kultūromis – *Murashige* ir *Skoog* (MS). Šioje maitinamojoje terpėje gausu nitratų, kalio ir amonio jonų. Išsami šios terpės sudėtis pavaizduota 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Murashige ir Skoog terpės sudėtis

Reagentai	Koncentracija tirpale, mg/l	Koncentracija terpėje, mg/l
Makroelementai		
NH ₄ NO ₃	33000	1650
KNO ₃	38000	1900

2.1 lentelės tęsinys

CaCl ₂ ·2H ₂ O	8800	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7400	370
KH ₂ PO ₄	3400	170
Mikroelementai		
KJ	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		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5560	27,8
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	7460	37,3
Organiniai priedai		
Mioinozitolis	20000	100
Nikotino rūgštis	100	0,5
Piridoksinas-HCl	100	0,5
Tiaminas-HCl	100	0,5
Glicinas	400	2
Sacharozė		30000
Agaras		5

Ruošiant skirtingas terpes įvairioms kaliaus kultūroms suformuoti, į tuščias talpas supilti makro ir mikroelementai, geležies šaltinis, organiniai priedai, skirtingi fitohormonai, salicilo rūgštis ir suberta sacharozė. Tyrimams naudotų fitohormonų sąrašas išvardintas 2.2 lentelėje. Visi šie terpių elementai ištirpinti vandenyje ir naudojant „Winlab“ pH-metrą išmatuotas terpių pH, kuris augalų kultūroms turi būti lygus 5,7. Prireikus, terpių rūgštingumas ir šarmingumas atitinkamai keičiamas naudojant 0,1 N NaOH ir 0,01 N H₂SO₄ tirpalus. Atlikus šiuos žingsnius – į terpes subertas ir gerai ištirpintas agaras.

2.2 lentelė. Fitohormonai, naudoti skirtingoms MS terpėms

Rūšis	Cheminis pavadinimas	Sutrumpinimas
Auksinas	3-indolilacto rūgštis	IAR
Auksinas	3-indolilbutano rūgštis	IBR
Auksinas	1-naftilacto rūgštis	NAR
Auksinas	2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis	2,4-D
Citokininas ^a	6-benzilaminopurinas	BAP
Citokininas ^a	6-furfurilaminopurinas	Kinetinas
Citokininas ^b	1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il-urėja)	Tidiazuronas (TDZ)
Elicitorius	Salicilo rūgštis	SA

^a – sintetinis analogas

^b – natūralus citokininas

Paruoštos maitinamosios terpės autoklavuotos „Certoclav“ autoklave, 120 °C temperatūroje, esant 0,75–1 atm slėgiui 15 min ir išpilstytos į *Petri* lėkšteles laminare, steriliomis sąlygomis ir paliktos sustingti. Reagentų kiekiai, reikalingi 300 ml MS terpės (12 *Petri* lėkštelių) paruošimui, išvardinti 2.3 lentelėje.

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

Reagentai	Reagentų kiekis 300 ml terpei paruošti
Makro druskos	15 ml
Mikro druskos	1,5 ml
Fe-EDTA	1,5 ml
Sacharozė	9 g
Agaras	1,5 g
Organiniai priedai	1,5 ml

2.5.1. Augimo fitohormonų tirpalų paruošimas

Ruoštas pradinis augimo fitohormono tirpalas 0,1 (mg/ml). 10 mg augimo fitohormono buvo suberta į matavimo kolbą ir ištirpinta 10 ml distiliuoto vandens. Ištirpus milteliams, tirpalas praskiestas iki 100 ml. Paimtas tirpalo tūris apskaičiuotas pagal 2.1 formulę:

$$X = C_1 \cdot V \cdot C_2 \quad (2.1)$$

Čia X – reikalingas paimti tirpalo tūris iš pradinio tirpalo, ml;

C₁ – norima gauti galutinė tirpalo koncentracija, mg/l;

V – praskiedimo tūris, l;

C₂ – pradinio tirpalo koncentracija, mg/ml.

2.6. Jonažolės (*Hypericum perforatum* L.) kaliaus kultūrų formavimas

Jonažolės kaliaus kultūros pradėtos formuoti atvėsus bei sustingus mitybinei terpei. Sterilios jonažolės sėklos buvo pasėtos į *Petri* lėkšteles, laminare, dezinfekavus darbo vietą ir naudojant sterilų pincetą bei spiritinę lempuotę, aseptinėms sąlygoms palaikyti. MS terpėje užaugus jonažolės daigams, jie steriliu skalpeliu buvo suskaityti į šaknų, stiebų ir lapų eksplantus, kurie buvo perkelti į MS terpes, papildytas skirtingais augimo fitohormonais bei elicitoriais, varijuojant jų deriniais ir koncentracijomis. Sėkmingam kaliaus kultūrų formavimuisi taip pat svarbi šviesa ir temperatūra. *Petri* lėkštelės buvo laikomos kambario temperatūroje (20–22 °C), išlaikant 24 valandų fotoperiodą. Jonažolės eksplantai kas tris savaites perkelti į šviežią terpę. Susiformavus kaliaus kultūroms, jos buvo džiovintos, smulkintos ir naudotos tyrimams.

2.7. Jonažolės (*Hypericum perforatum* L.) antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

2.7.1. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal FRAP metodą

Antioksidacinio aktyvumo įvertinimo metodas paremtas bespalvio Fe³⁺-TPTZ junginio perėjimu į mėlyną Fe²⁺-TPTZ.

Ekstrakto paruošimas: 0,1 g augalinės žaliavos ekstrahuota 5 ml CH₃OH ir inkubuota vandens vonelėje (45 °C), 30 min. Tada atliktas ekstrakto centrifugavimas 9000 aps/min greičiu, 10 min, palaikant 4 °C temperatūrą.

Tiriamąjį mėginį paruošimas: mėginiai (20 μl jonažolės ekstrakto ir 80 μl CH₃OH) sumaišyti su 3 ml FRAP reagentu, kuris ruoštas iš 25 ml 300 mM acetato buferio, 2,5 ml 10 mM TPTZ ir 20 mM 2,5 ml FeCl₃·6H₂O. Gautas reakcijos mišinys matuotas spektrofotometru, 593 nm bangoje.

Kalibracinės kreivės paruošimas: skirtingų koncentracijų (5, 10, 15, 20, 25 µmol/l) FeSO₄·7H₂O tirpalai sumaišyti su 3 ml FRAP reagentu ir praskiesti vandeniu iki 10 ml. Tirpalų matavimai atlikti spektrofotometru, 593 nm bangoje.

Brėžiamas šviesos sugerties priklausomybės nuo Fe (II) koncentracijos grafikas ir išvesta tiesinė lygtis, pagal kurią apskaičiuota Fe (II) koncentracija (µmol/l). Kuo didesnė Fe (II) koncentracija, tuo didesnės antioksidacinės savybės [30].

2.7.2. Redukcinių savybių įvertinimas

Ekstrakto paruošimas: 0,1 g augalinės žaliavos ekstrahuota 5 ml CH₃OH ir inkubuota vandens vonelėje (45 °C), 30 min. Gautas ekstraktas centrifuguotas 9000 aps/min greičiu, 10 min, palaikant 4 °C temperatūrą.

Tiriamąjį mėginį paruošimas: į 0,5 ml, 0,0025 g/ml koncentracijos ekstraktų mėginius supilta 1,25 ml 0,2 M natrio fosfatinio buferio ir 1,25 ml 1 % K₃[Fe(CN)₆]. Tada mėginiai sumaišyti ir inkubuoti 50 °C temperatūroje, 20 min. Po to pridėta 1,25 ml 10 % trichloracto rūgšties, sumaišyta ir centrifuguota 9000 aps/min greičiu, 10 min, 4 °C. 1,25 ml nucentrifuguoto tirpalo sumaišyta su 1,25 ml distiliuoto vandens ir 0,25 ml 0,1 % FeCl₃. Šviesos sugerties matavimai atlikti spektrofotometru, 700 nm bangoje. Didesnė šviesos sugertis reiškia didesnes redukcines savybes [31].

2.7.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal DPPH metodą

Antioksidacinio aktyvumo įvertinimo metodas paremtas spalvine reakcija, kurios metu antioksidantas atiduoda vandenilio atomą ir violetinės spalvos DPPH radikalas virsta į redukuotą DPPH formą, violetinė spalva išblunka.

Ekstrakto paruošimas: 0,2 g augalinės žaliavos užpilta 2 ml CH₃OH ir homogenizuota 10 min. Gautas ekstraktas centrifuguotas 9000 aps/min greičiu, 10 min, 4 °C.

Tiriamąjį mėginį paruošimas: 77 µl nucentrifuguoto ekstrakto sumaišyta su 3 ml DPPH etaloninio tirpalo, kuris buvo ruoštas ištirpinant 0,0024 g DPPH radikalo 100 ml talpos matavimo kolboje, metanolyje.

Palyginamojo mėginio paruošimas: 77 µl CH₃OH sumaišoma su 3 ml DPPH etaloninio tirpalo.

Tirpalai laikomi tamsoje, 15 min. Praėjus nustatytam laikui, spektrofotometru atlikti tirpalų šviesos sugerties matavimai 515 nm bangoje.

Antioksidacinis aktyvumas įvertintas pagal 2.2 formulę, išmatavus ir apskaičiavus kiek procentų stabilus DPPH radikalo neutralizavo augalinėje medžiagoje esantys fenoliniai junginiai:

$$\text{Slopinimas (\%)} = \frac{A_b - A_a}{A_b} \cdot 100 \quad (2.2)$$

Čia A_a – išmatuota tiriamojo tirpalo šviesos sugertis;

A_b – išmatuota palyginamojo tirpalo šviesos sugertis [32].

2.8. Antioksidacinių fermentų aktyvumo įvertinimas

2.8.1. Katalazės aktyvumo įvertinimas

Ekstrakto paruošimas: 0,1 g augalinės žaliavos užpilta 4 ml 0,05 M K/Na fosfatinio buferio, turinčio 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, ištirpinto DMSO ir 1–3 mg polivinilpirolidono. Gautas ekstraktas centrifuguotas 9000 aps/min greičiu, 10 min, palaikant 4 °C temperatūrą. Centrifugavimas buvo kartojamas *Eppendorf* tipo mėgintuvėlyje.

Tiriamąjį mėginį paruošimas: prieš matavimą spektrofotometru į reakcijos mišinį įpilta 0,1 M 0,2 ml H₂O₂. Šviesos sugerties dinamika registruota 3 min, 240 nm bangoje, rodmenys nuimti kas 2 s.

Kalibracinės kreivės paruošimas: 25 mg albumino ištirpinta 25 ml vandens. 2.4 lentelėje pavaizduoti imti žinomo tūrio (ml) pradinio tirpalo mėginiai ir skiesti distiliuotu vandeniu iki 10 ml žymos. Į pirmą mėgintuvėlį įpilta 0,2 ml distiliuoto vandens, o į 2–9 mėgintuvėlius po 0,2 ml skiesto albumino tirpalo. Į visus mėgintuvėlius įpilta 2 ml Bradfordo reagento. Mėginiai sumaišyti ir spektrofotometru matuota jų šviesos sugertis 595 nm bangoje. Braižyta kalibravimo kreivė, gauta tiesinė lygtis, pagal kurią apskaičiuota baltymo masė ekstrakto tūryje.

2.4 lentelė. Albumino kalibravimo kreivės sudarymas

Eil. Nr.	Albumino pradinio tirpalo tūris, ml	Iki 10 ml skiesto tirpalo koncentracija, mg/ml
1	0,2	0,02
2	0,4	0,04
3	0,6	0,06
4	0,8	0,08
5	1,0	0,1
6	1,2	0,12
7	1,4	0,14
8	1,6	0,16
9	1,8	0,18

Baltymų nustatymas: baltymų koncentracija nustatyta Bradfordo metodu. Paimta 200 µl ekstrakto ir sumaišyta su 2 ml Bradfordo reagento, šviesos sugertis matuota 595 nm bangoje. Metodas pagrįstas specifine baltymų sąveika su Kumasi briliantiniu mėliu ir susidariusio komplekso koncentracijos matavimu spektrofotometriškai (595 nm bangoje).

Fermento katalazės aktyvumas apskaičiuotas pagal 2.3 formulę:

$$A = \frac{1000 \cdot \Delta \bar{E} \cdot V}{k \cdot m} \quad (2.3)$$

Čia 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, apskaičiuota pagal kalibravimo kreivę, mg [33].

2.8.2. Fermento superoksido dismutazės (SOD) aktyvumo įvertinimas

Ekstrakto paruošimas: 0,1 g augalinės žaliavos užpilta 4 ml 0,066 M K/Na fosfatinio buferio, turinčio 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, ištirpinto DMSO ir 1–3 mg polivinilpirolidono. Mėginys

centrifuguotas 9000 aps/min greičiu, 10 min, 4 °C temperatūroje. Supernatantas pakartotinai centrifuguotas *Eppendorf* tipo mėgintuvėliuose.

Baltymų nustatymas: 200 μl ekstrakto sumaišyta su 2 ml Bradfordo reagento. Šviesos sugertis išmatuota 595 nm bangoje. Gauta baltymų kiekio kalibravimo kreivė pagal albuminą (žr. 2.5.1. *Katalazės aktyvumo nustatymas*), pagal kurią apskaičiuota baltymo masė ekstrakto tūryje.

Tiriamąjį mėginį paruošimas: 40 μl paruošto ekstrakto sumaišyta su 400 μl 200 mM Tris-HCl buferiu, 200 μl 10 mM L-metioninu, 200 μl 540 μM nitromėlynuoju tetrazoliu, 500 μl 0,1 % Tritonu X-100, 20 μl 300 μM riboflavinu ir 620 μl distiliuoto vandens. Kontrolinis mėginys ruoštas taip pat kaip buvo ruoštas tiriamasis mėginys, tik be ekstrakto.

Visi mėginiai apšviesti liuminescencinėmis lempomis 30 min ir atlikti spektrofotometriniai matavimai 560 nm bangoje. Fermento SOD aktyvumas apskaičiuotas pagal 2.4 formulę:

$$A = \frac{\log\left(\frac{E_K}{E_T}\right)}{\log 2 \cdot m} \quad (2.4)$$

Čia A – SOD aktyvumas, vnt/mg;

E_K – kontrolinio mėginio šviesos sugertis;

E_T – tiriamojo mėginio šviesos sugertis;

m – baltymo masė preparato tūryje, mg [34].

2.9. Metodai, charakterizuojantys oksidacinį stresą augaluose

2.9.1. Malondialdehido (MDA) koncentracijos nustatymas

Ektrakto paruošimas: 0,1 g augalinės žaliavos užpilta 1,5 ml 20 % trichloracto rūgštimi. Ekstraktas centrifuguotas 9000 aps/min greičiu, 10 min, 4 °C.

Tiriamąjį mėginį paruošimas: 0,3 ml supernatanto sumaišyta su 1,2 ml 0,5 % tiobarbitūrine rūgštimi, kuri ištirpinta 20 % trichloracto rūgštyje, ir inkubuota 95 °C temperatūroje 30 min, atšaldyta ir centrifuguota 15 min, 9000 aps/min, 4 °C. Šviesos sugertis išmatuota spektrofotometru, 532 nm ir 600 nm bangose. MDA koncentracija apskaičiuota pagal 2.5 formulę:

$$C_x = \frac{(E_{532} - E_{600}) \cdot V_e \cdot 2}{k \cdot m_s \cdot V_a} \quad (2.5)$$

Čia C_x – MDA koncentracija, μmol/g;

E – tirpalo šviesos sugertis;

V_e – ekstrakto tūris, ml;

V_a – ekstrakto tūris analizei, ml;

k – molinės ekstinkcijos koeficientas – 156 mM⁻¹·cm⁻¹;

m_s – bandinio masė ekstrakcijai, g [35].

2.10. Biologiškai aktyvių junginių koncentracijos nustatymas

2.10.1. Karotinoidų koncentracijos nustatymas

Ektrakto paruošimas: 0,1 g augalinės žaliavos užpilta 10 ml 96% C₂H₅OH.

Tiriamąjį mėginį paruošimas: ekstraktas filtruotas naudojant cilindą, piltuvėlį ir filtrinį popierių. Nufiltruoto ekstrakto tūris išmatuotas cilindru ir, jei reikia, praskiestas 96% C₂H₅OH tol, kol tirpalų optinis tankis buvo intervale nuo 0,1 A iki 0,8 A. Filtratų matavimai atlikti spektrofotometru, 662 nm (chlorofilo *a*), 644 nm (chlorofilo *b*) ir 441 nm (karotinoidų) bangose. Pigmentų koncentracija apskaičiuota pagal (2.6), (2.7), (2.8) formules, karotinoidų koncentracija pagal (2.9) formulę, o bendras pigmentų kiekis mg/100g buvo apskaičiuotas pagal (2.10) formulę:

$$\text{Chlorofilo a koncentracija (mg/l): } C_a = 9,784 D_{662} - 0,99D_{644} \quad (2.6)$$

$$\text{Chlorofilo b koncentracija (mg/l): } C_b = 21,426D_{644} - 4,65D_{662} \quad (2.7)$$

$$C_a + C_b = 5,134D_{662} + 20,436D_{644} \quad (2.8)$$

$$C_{\text{karotinoidai}} = 4,695D_{441} - 0,268 (C_a + C_b) \quad (2.9)$$

$$\text{Pigmentų koncentracija (mg/100g): } X = \frac{C \cdot V \cdot V_2 \cdot 100}{n \cdot V_1 \cdot 1000} \quad (2.10)$$

Čia *C* – pigmentų koncentracija, mg/l;

X – pigmentų koncentracija, mg/100g;

V – pradinis ekstrakto tūris, ml;

*V*₁ – pradinis ekstrakto tūris, paimtas praskiedimui, ml;

*V*₂ – praskiesto ekstrakto tūris, ml;

n – augalinė masė, g [36].

2.10.2. Bendros fenolinių junginių koncentracijos nustatymas Folino–Kiokalto metodu

Ekstrakto paruošimas: 0,05 g augalinės žaliavos užpilta 10 ml 70 % acetono, maišyta termostatuojamame kratytuve 20 min, kambario temperatūroje ir centrifuguota 9000 aps/min greičiu, 10 min, 4 °C.

Kalibravimo kreivės paruošimas: 0,0; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100 μl standartinio tanino rūgšties tirpalo (25 mg tanino rūgšties ištirpinta 25 ml distiliuoto vandens ir praskiesta 1:10 distiliuotu vandeniu) praskiesta vandeniu iki 500 μl žymos. Į visus mėgintuvėlius įpilta 250 μl 1 N Folino-Kiokalto reagento (komercinis 2 N reagentas santykiu 1:1 praskiestas su distiliuotu vandeniu, perpiltas į tamsų indą ir laikytas šaldytuve) ir 1,25 ml 20 % Na₂CO₃ tirpalo. Visi mėgintuvėliai sumaišyti ir inkubuoti kambario temperatūroje 40 min, praėjus nustatytam laikui matuota absorbcija prieš tuščią mėginį.

Tiriamąjį mėginį paruošimas: 0,025 ml ekstrakto praskiesta vandeniu iki 500 μl ir pridėta 250 μl Folino-Kiokalto reagento bei 1,25 ml 20 % Na₂CO₃ tirpalo. Mėginys 40 min laikytas tamsoje, kambario temperatūroje, po to atlikti šviesos sugerties matavimai spektrofotometru, 725 nm bangoje. Bendra fenolinių junginių koncentracija (*X*) mg/100mg apskaičiuota pagal (2.11) formulę:

$$X = \frac{a \cdot V \cdot 100}{n \cdot V_1} \quad (2.11)$$

Čia *a* – tanino rūgšties koncentracija iš kalibravimo kreivės, mg/ml;

V – pradinis ekstrakto tūris, ml;

*V*₁ – pradinis ekstrakto tūris, paimtas praskiedimui, ml;

n – augalinė masė, mg [37].

2.10.3. *L*-Prolino koncentracijos nustatymas

Ekstrakto paruošimas: 0,01 g išdžiovintos ir susmulkintos augalinės žaliavos užpilta 4 ml distiliuotu vandeniu. Mėgintuvėlis su augaline žaliava kaitintas 3 min iki virimo temperatūros ir iškart atšaldytas, ši procedūra kartota dar 2 kartus. Ekstraktas centrifuguotas 10 min, 9000 aps/min greičiu, 4 °C. Gautas ekstraktas praskiestas distiliuotu vandeniu iki 6 ml.

Kalibracinės kreivės paruošimas: 0,0011 g *L*-proline ištirpinta 10 ml distiliuoto vandens. Imti 0,025; 0,050; 0,075; 0,1; 0,125; 0,15; 0,175 ml *L*-proline tirpalai ir skiesti iki 1 ml distiliuotu vandeniu. Į kiekvieną mėgintuvėlį papildomai įpilta po 1 ml acto rūgšties ir 1 ml ninhidridinio reagento. Ninhidrido reagentas ruoštas sumaišius 1,25 g ninhidrino, 20 ml 6 M H₃PO₄ ir 30 ml acto rūgšties. Mėgintuvėliai kaitinti 1 val. verdančioje vandens vonelėje ir atšaldyti. Šviesos sugertis matuota 520 nm bangoje.

Tiriamąjį ir kontrolinį mėginių paruošimas: į mėgintuvėlį įpilta 1 ml ekstrakto, 1 ml acto rūgšties, 1 ml ninhidrininio reagento ir mėgintuvėlis kaitintas vandens vonelėje 1 val. Kontrolinis mėginys ruoštas taip pat kaip tiriamasis, tik vietoje 1 ml ekstrakto įpilama 1 ml distiliuoto vandens.

Šviesos sugerties matavimai atlikti 520 nm bangoje. *L*-proline koncentracija apskaičiuota naudojant proline kalibravimo kreivę, pagal 2.12 formulę:

$$C_X = \frac{E \cdot k \cdot V_{\text{bendras}}}{V_{\text{paimta}} \cdot m} \quad (2.12)$$

Čia C_X – *L*-proline koncentracija, μmol/g;

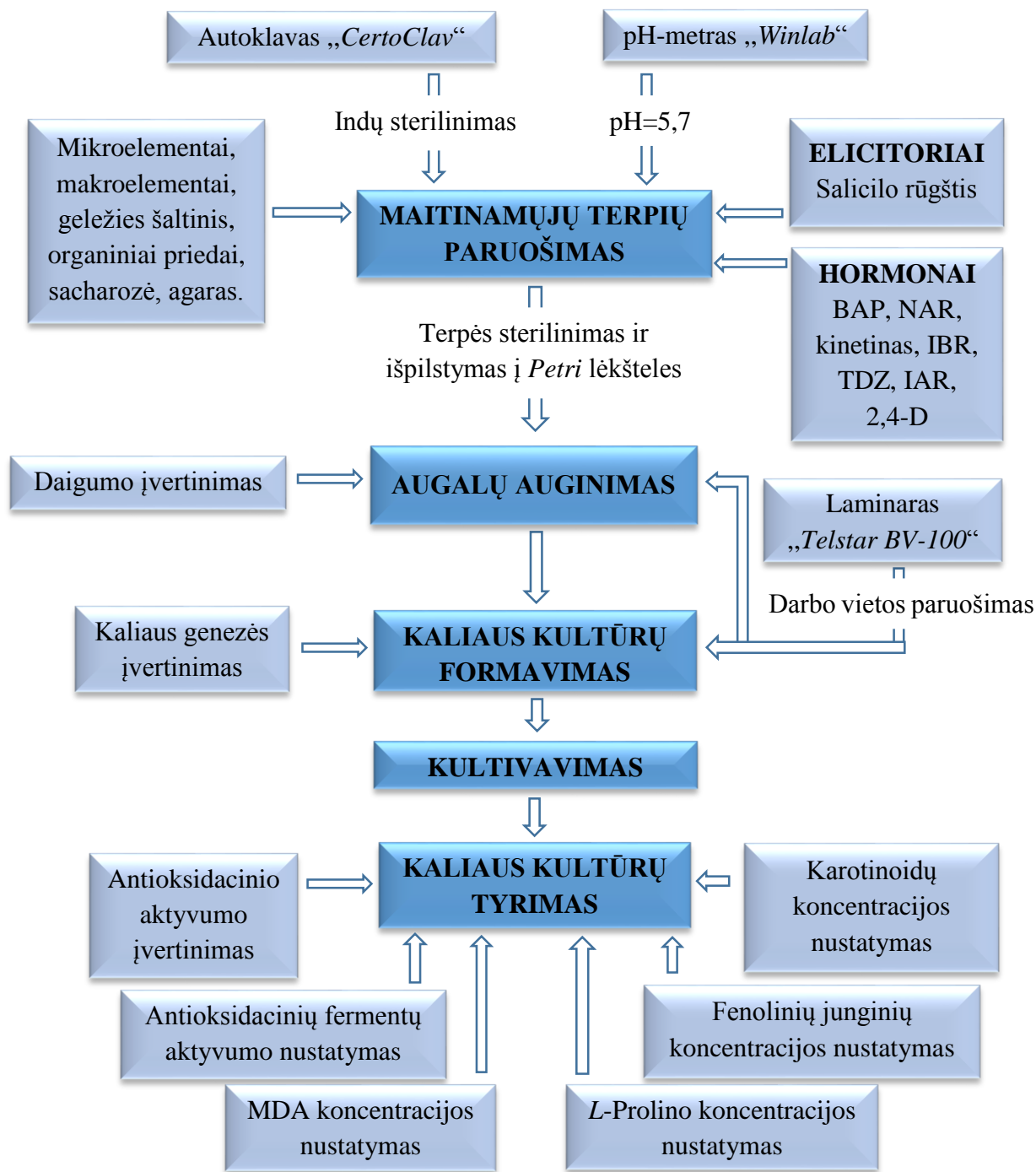
E – tirpalo šviesos sugertis;

k – *L*-proline kiekis, gautas pagal kalibravimo kreivę, μmol;

V_{bendras} – bendras ekstrakto tūris, ml;

V_{paimta} – paimto ekstrakto tūris, ml;

m – vaistinės augalinės žaliavos kiekis, g [48].



2.1 pav. Baigiamojo projekto tyrimų vykdymo schema

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Šio baigiamojo projekto metu suformuotos jonažolės (*Hypericum perforatum* L.) kaliaus kultūros maitinamosiose terpėse *in vitro*, papildytose skirtingais augimo fitohormonais ir skirtingomis elicitoriais, salicilo rūgšties, koncentracijomis (žr. 3.1 lentelė). Visi baigiamajame projekte pateikti tyrimų rezultatai buvo gauti Kauno technologijos universiteto, Cheminės technologijos fakulteto, Organinės chemijos katedros, Biotechnologijos laboratorijoje.

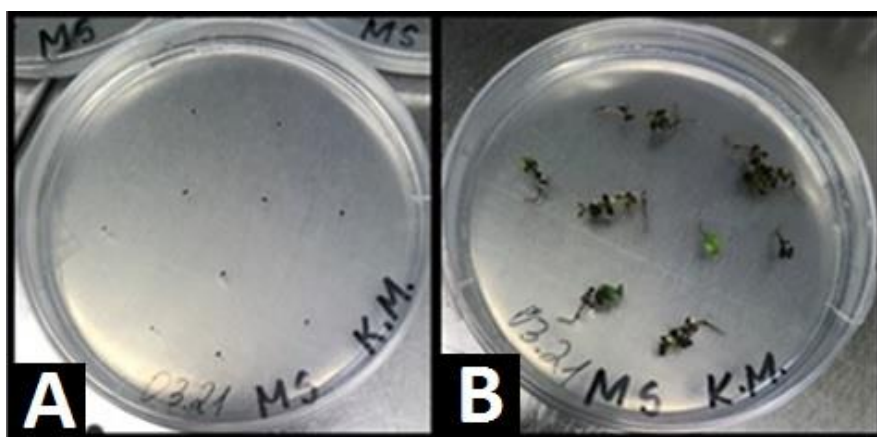
3.1 lentelė. Baigiamojo projekto metu užaugintos jonažolės

Augalas	Aplinka	Terpė	Fitohormonai	Elicitoriai
Jonažolė	<i>In vivo</i>	Gamta	Natūraliai augale esantys	Natūraliai augale esantys
Jonažolė	<i>In vitro</i>	MS skysta	BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l)	-
Jonažolė	<i>In vitro</i>	MS	BAP (0,5 mg/l)	-
Jonažolė	<i>In vitro</i>	½MS	kinet. (0,1 mg/l) + IBR (1 mg/l)	-
Jonažolė	<i>In vitro</i>	MS	TDZ (1,25 mg/l) + IAR (0,5 mg/l)	-
Jonažolė	<i>In vitro</i>	MS	TDZ (0,05 mg/l) + NAR (0,2 mg/l)	-
Jonažolė	<i>In vitro</i>	MS	IAR (1 mg/l)	-
Jonažolė	<i>In vitro</i>	MS	2,4-D (1 mg/l) + BAP (1 mg/l)	-
Jonažolė	<i>In vitro</i>	MS	2,4-D (0,1 mg/l) + BAP (0,5 mg/l)	-
Jonažolė	<i>In vitro</i>	MS	2,4-D (0,9 µM) + kinet. (0,11 µM)	-
Jonažolė	<i>In vitro</i>	MS	BAP (0,5 mg/l)	SA (1 mM)
Jonažolė	<i>In vitro</i>	MS	BAP (0,5 mg/l)	SA (2,5 mM)
Jonažolė	<i>In vitro</i>	MS	BAP (0,5 mg/l)	SA (5 mM)

Baigiamojo projekto metu buvo įvertinta augimo fitohormonų ir elicitorių įtaka jonažolės (*Hypericum perforatum* L.) kaliaus kultūrų formavimuisi *in vitro* ir biologiniam aktyvumui. Laboratorijoje suformuotos kaliaus kultūros buvo sudžiovintos ir susmulkintos. Atlikti įvairūs tyrimai jonažolės kaliaus kultūrų biologiniam aktyvumui nustatyti: antioksidaciniai tyrimai atlikti naudojant FRAP, DPPH metodus, taip pat įvertintos augalų redukcinės savybės. Oksidacinis jonažolės stresas buvo ištirtas MDA koncentracijos nustatymu. Vėliau buvo įvertinti antioksidacinių fermentų: katalazės ir superoksido dismutazės aktyvumai. Taip pat nustatyti biologiškai aktyvūs junginiai, esantys jonažolėje (*Hypericum perforatum* L.): karotinoidai, fenoliniai junginiai ir L-prolinas.

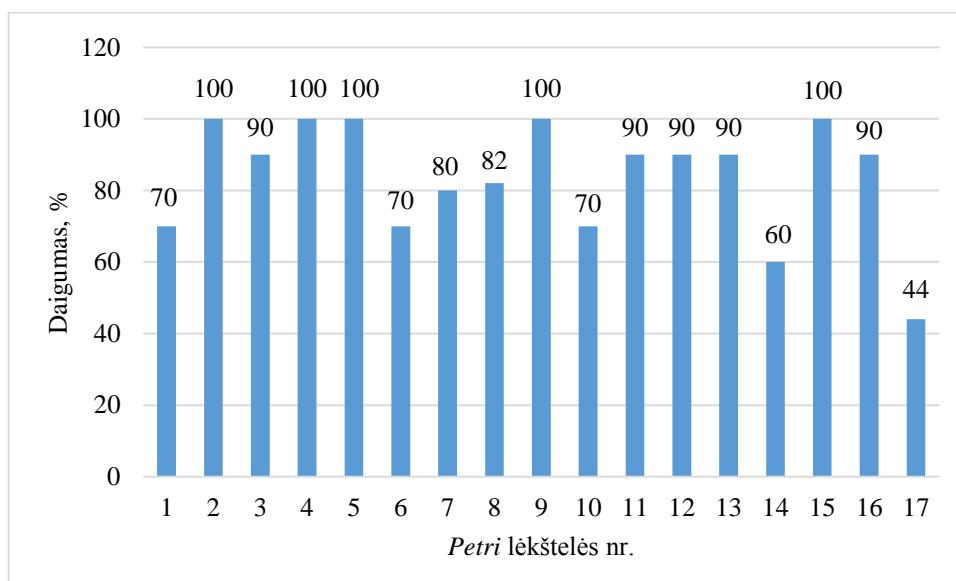
3.1. Jonažolės (*Hypericum perforatum* L.) daigumo ir kaliaus genezės įvertinimas

Jonažolės (*Hypericum perforatum* L.) sėklos pasėtos į sterilią MS terpę. Jonažolės sėklos pasėtos į 17 Petri lėkštelių, kiekvienoje lėkštelėje pasėta po 10 sėklų ir stebėtas jų augimas (žr. 3.1 pav.).



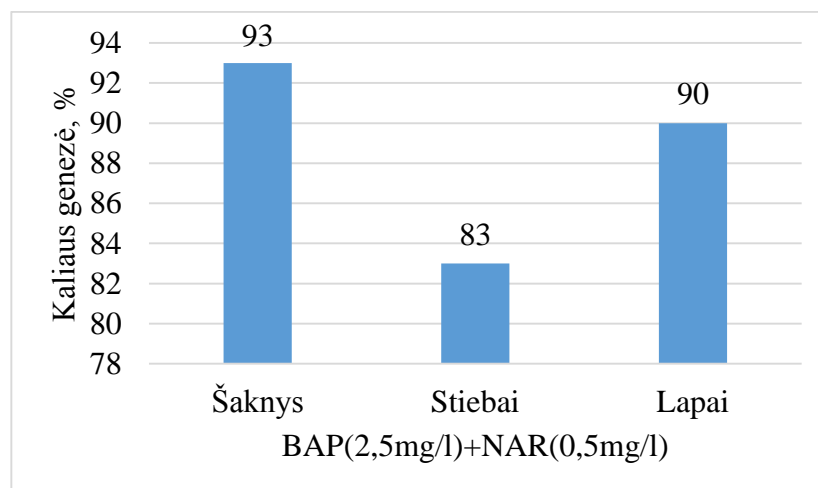
3.1 pav. A – jonažolės sterilios sėklos MS terpėje; B – jonažolės daigai po 3 savaičių

Po 3 savaičių buvo atliktas sėklų daigumo įvertinimas kiekvienoje *Petri* lėkštelėje (žr. 3.2 pav.). Apskaičiuotas bendras sėklų daigumas – 84 %.



3.2 pav. Jonažolės sėklų daigumas (%) *Petri* lėkštelėse

Užauginti jonažolės (*Hypericum perforatum* L.) daigai buvo suskaidyti į eksplantus: šaknis, stiebus ir lapus, kurie buvo perkelti į terpę, papildytą BAP (2,5 mg/l) ir NAR (0,5 mg/l) augimo fitohormonais. Po 3 savaičių buvo stebėta kaliaus genezė. Pagal gautus rezultatus (žr. 3.3 pav.) galima teigti, kad geriausiai jonažolės kaliaus kultūras suformavo šaknis, jų kaliaus genezė siekė 93 %, bei lapai – 90 %. Mažiausiai kaliaus kultūrų susiformavo iš jonažolės stiebų eksplantų (83 %).

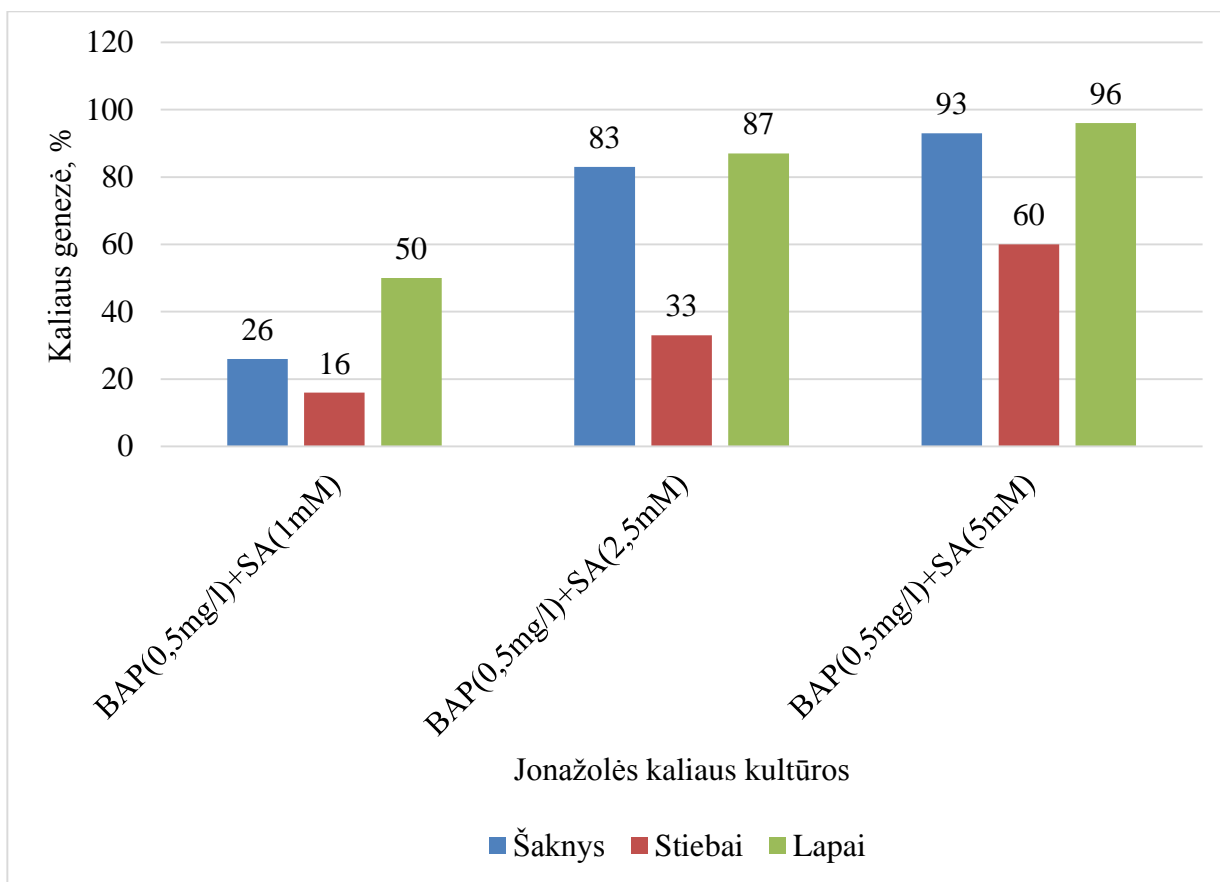


3.3 pav. Kaliaus genezė (%) praėjus 3 savaitėms

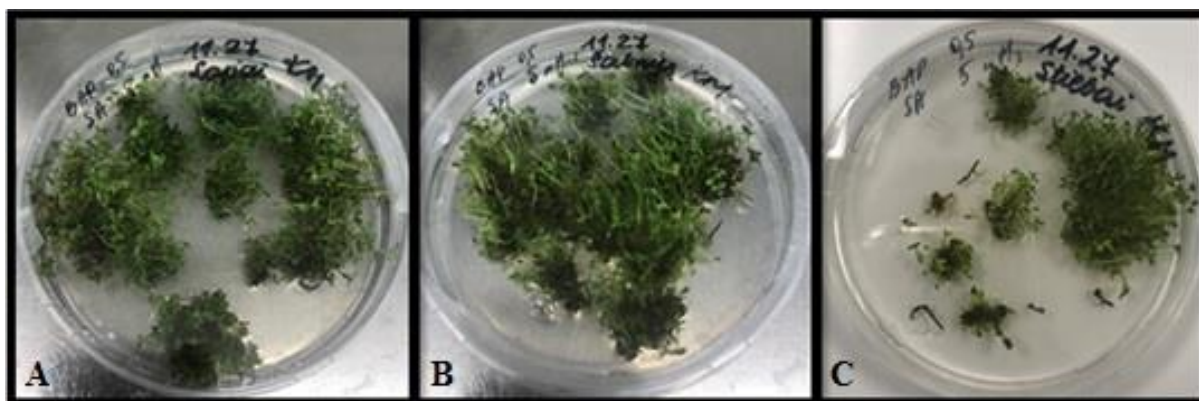
Užaugusios jonažolės kaliaus kultūros *in vitro* buvo perkeltos į terpes, papildytas skirtingais augimo fitohormonais bei skirtingomis jų koncentracijomis. Vėliau tirtos bioaktyvios medžiagos, esančios šiose kaliaus kultūrose ir lyginamos jų koncentracijos.

Taip pat tirta elicitoriaus, salicilo rūgšties, įtaka jonažolės kaliaus kultūrų susidarymui. Jonažolės daigai buvo suskaidyti į eksplantus – šaknis, stiebus ir lapus, kurie buvo patalpinti į terpes, su skirtingomis salicilo rūgšties koncentracijomis. Geriausiai kaliaus kultūras suformavo (žr. 3.4 pav.) jonažolė, kultivuota su didžiausia salicilo rūgšties koncentracija (5 mM), jos lapų genezė siekė 96 %, o šaknų – 93 %.

šaknų – 93 %, o stiebų – 60 %. Mažiausiai kaliaus kultūrų suformavo jonažolė, kultivuota su BAP (0,5 mg/l) ir SA (1 mM), šaknų kaliaus genezė siekė tik 26 %, stiebų – 16 %, o lapų – 50 %. Apibendrinus galima teigti, kad didinant salicilo rūgšties koncentraciją maitinamojoje terpėje, didėja kaliaus genezės susidarymas (žr. 3.5 pav.).



3.4 pav. Kaliaus genezė (%), naudojant skirtingas salicilo rūgšties (SA) koncentracijas



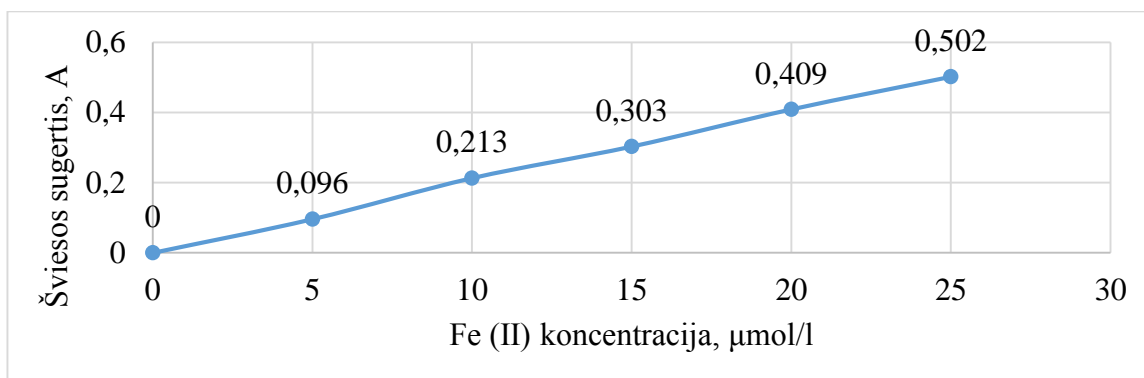
3.5 pav. Susiformavusios jonažolės kaliaus kultūros naudojant BAP (0,5 mg/l) ir SA (5 mM).
A – lapų kaliaus kultūros, B – šaknų kaliaus kultūros, C – stiebų kaliaus kultūros

3.2 Jonažolės (*Hypericum perforatum* L.) antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

3.2.1 Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal FRAP metodą

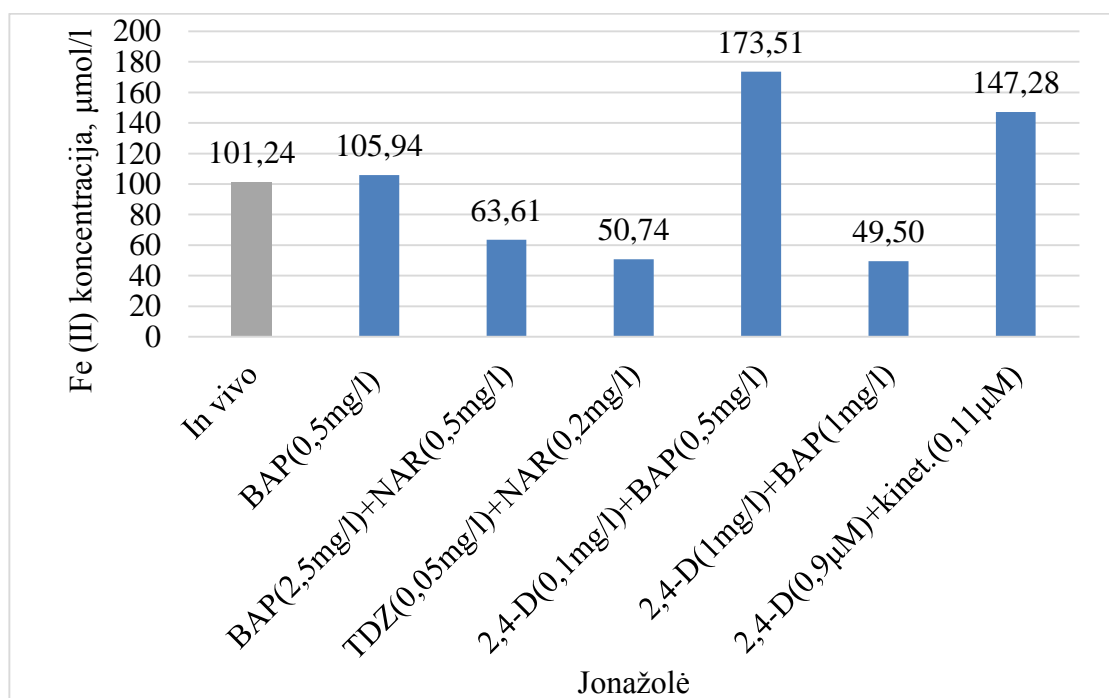
Pirmasis antioksidacinio aktyvumo įvertinimas buvo atliktas pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6,-tripiridil-s-triaziną (TPTZ). Šios antioksidacinės reakcijos metu bespalvis Fe^{3+} -TPTZ junginys

redukuojasi į mėlyną Fe^{2+} -TPTZ junginį. Buvo suformuota kalibracinė kreivė (žr. 3.6 pav.), iš kurios išvesta tiesinė lygtis ($y = 0,0202x + 0,001$), pagal kurią buvo apskaičiuota galutinė Fe (II) koncentracija ($\mu\text{mol/l}$), kuri parodė antioksidacinių savybių intensyvumą tiriamuosiuose ekstraktuose.



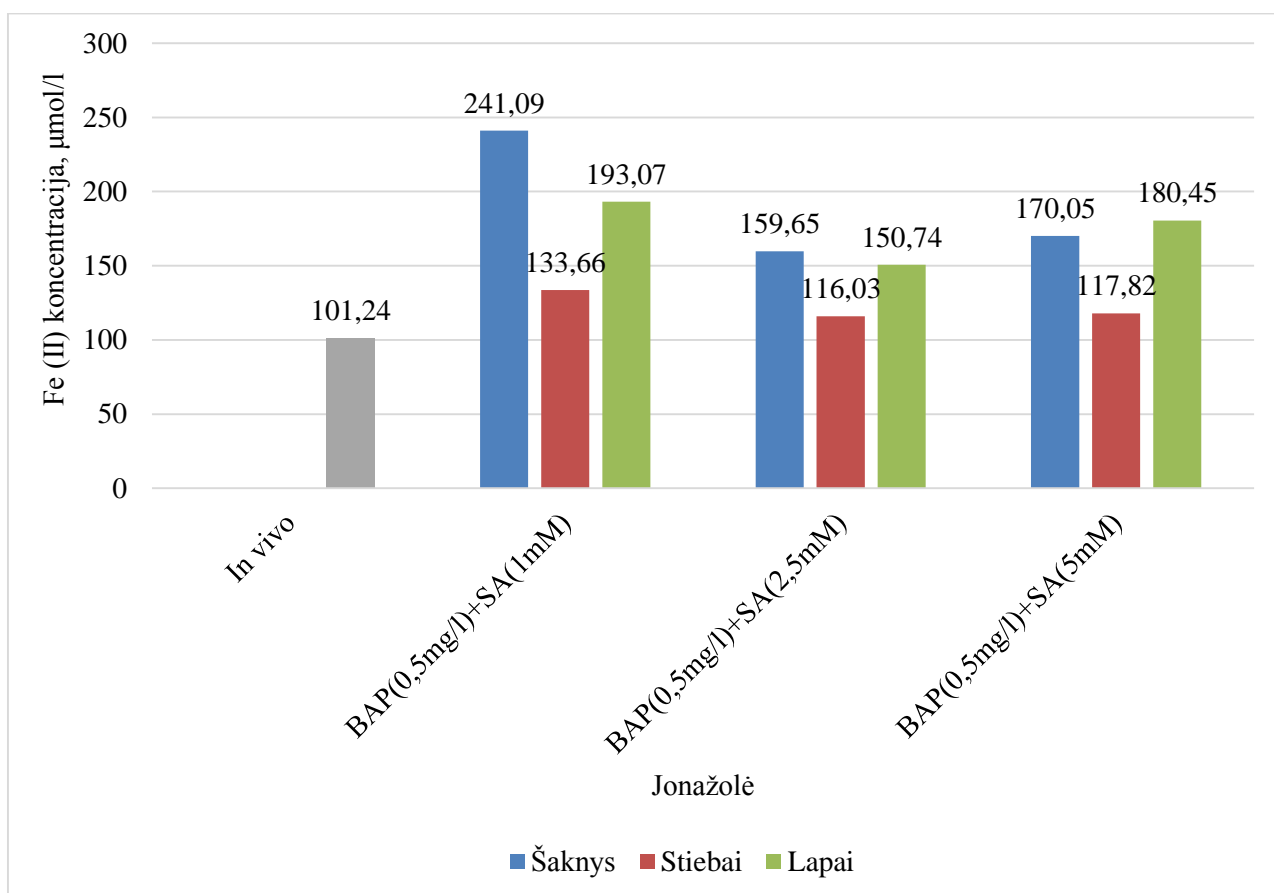
3.6 pav. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($\mu\text{mol/l}$) kalibracinė kreivė

Augimo fitohormonų įtaka jonažolės (*Hypericum perforatum* L.) antioksidacinėms savybėms, pagal FRAP metodą, pavaizduota 3.7 pav. Visi rezultatai buvo lyginami su jonažole *in vivo*, kurios Fe (II) jonų koncentracija buvo 101,24 ($\mu\text{mol/l}$). Iš pateiktų tyrimo rezultatų matyti, kad geriausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo jonažolė, užauginta su 2,4-D (0,1 mg/l) ir BAP (0,5 mg/l) augimo fitohormonais, bei jonažolė, užauginta su 2,4-D (0,9 μM) ir kinetinu (0,11 μM), jų Fe (II) jonų koncentracijos atitinkamai buvo 173,51 ($\mu\text{mol/l}$) ir 147,28 ($\mu\text{mol/l}$). Panašiu į jonažolės *in vivo* antioksidacinio aktyvumu pasižymėjo jonažolė, kultivuota su augimo fitohormonu BAP (0,5 mg/l), kurios antioksidacinis aktyvumas lygus 105,94 ($\mu\text{mol/l}$). Tuo tarpu silpniausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo jonažolė, kultivuota su 2,4-D (1 mg/l) ir BAP (1 mg/l), bei jonažolė, kultivuota su TDZ (0,05 mg/l) ir NAR (0,2 mg/l), jų vertės atitinkamai buvo 49,50 ($\mu\text{mol/l}$) ir 50,74 ($\mu\text{mol/l}$).



3.7 pav. Fe (II) koncentracija ($\mu\text{mol/l}$) jonažolių, kultivuočių su skirtingais augimo fitohormonais, ekstraktuose

Kita tyrimo dalis buvo ištirti salicilo rūgšties įtaką jonažolės antioksidaciniam aktyvumui. Buvo tirtos skirtingos salicilo rūgšties koncentracijos ir jų įtaka jonažolės šaknų, stiebų ir lapų kaliaus kultūroms *in vitro*. Iš pateikto grafiko matyti (žr. 3.8 pav.), kad geriausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo jonažolė, kultivuota su mažiausia salicilo rūgšties koncentracija – BAP (0,5 mg/l) ir SA (1 mM). Jonažolės šaknų kaliaus kultūrų antioksidacinis poveikis įvertintas 241,09 (μmol/l), stiebų kaliaus kultūrų – 133,66 (μmol/l), o lapų kaliaus kultūrų 193,07 (μmol/l). Šaknų ir lapų kaliaus kultūrų antioksidacinis aktyvumas nustatytas dvigubai didesnis už natūraliai gamtoje augusios jonažolės *in vivo* antioksidacinį aktyvumą, kuris buvo 101,24 (μmol/l). Kitos jonažolės, augintos su didesnėmis salicilo rūgšties koncentracijomis – 2,5 (mM) ir 5 (mM), turėjo labai panašias, tačiau mažesnes, nei jonažolė, auginta su salicilo rūgštimi, kurios koncentracija buvo 1 mM, antioksidacines savybes.

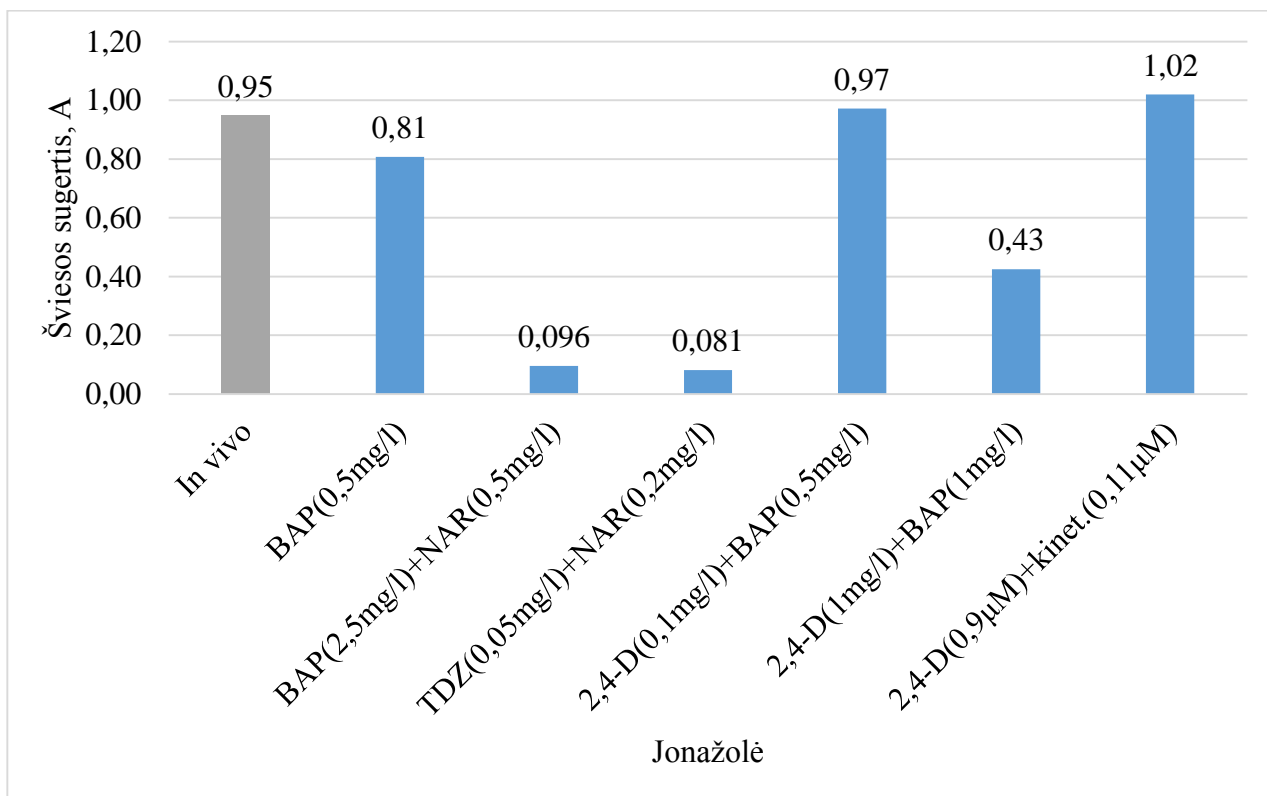


3.8 pav. Fe (II) koncentracija (μmol/l) jonažolių, kultivuočių su skirtingomis salicilo rūgšties koncentracijomis, ekstraktuose

3.2.2 Redukcinių savybių įvertinimas

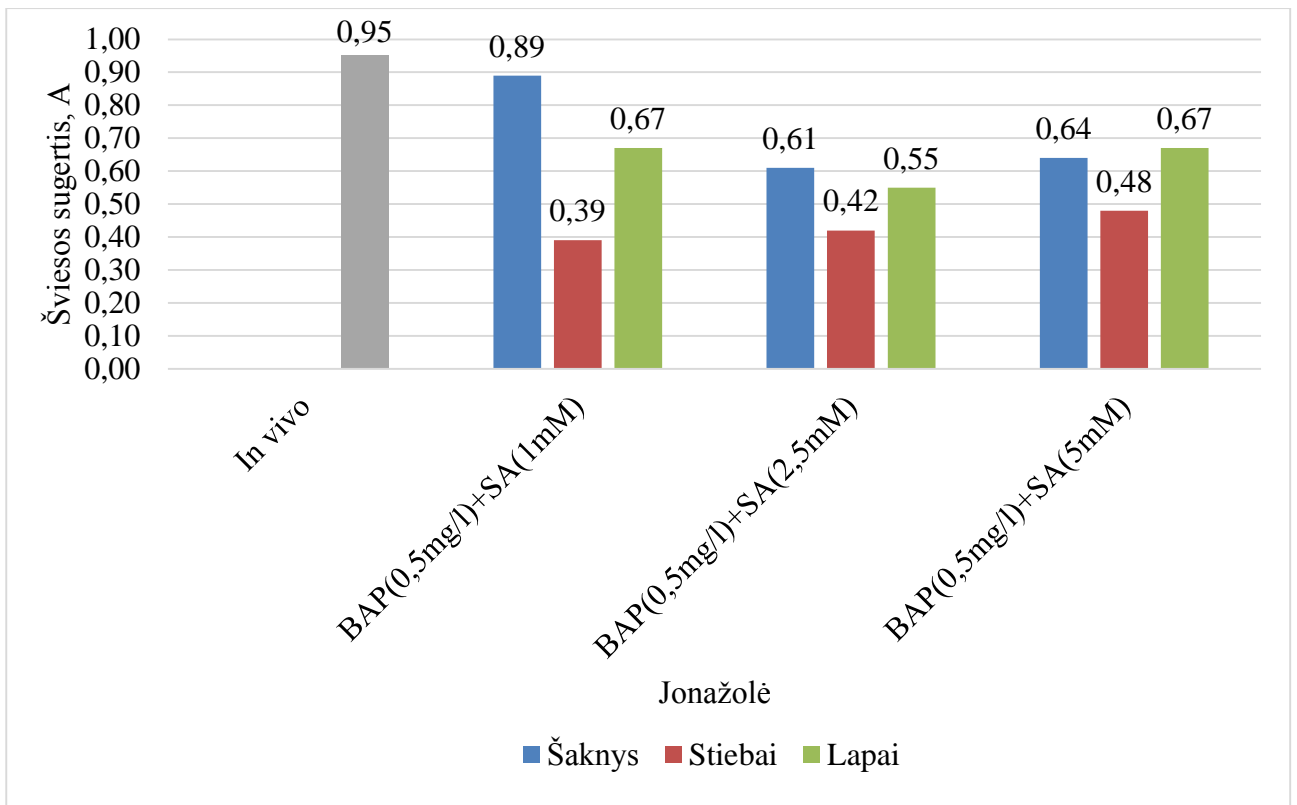
Pasirinktas antrasis augalų antioksidacinių savybių įvertinimo metodas buvo redukcinis įvertinimas. Tyrimui pasirinkta jonažolių ekstraktų koncentracija buvo 0,0025 (g/ml). Didesnė šviesos sugerties reikšmė rodo didesnes redukcines savybes. Visi tyrimų rezultatai buvo lyginami su jonažole *in vivo*, kurios šio tyrimo metu gauta reikšmė buvo 0,95 A. Pirmoje dalyje buvo įvertintos jonažolės, kultivuotos su skirtingais augimo fitohormonais. Pagal pateiktą 3.9 paveikslą matyti, kad didžiausiomis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo (kaip ir naudojant FRAP metodą) jonažolė, kultivuota su 2,4-D (0,9 μM) ir kinetinu (0,11 μM) bei jonažolė, auginta su 2,4-D (0,1 mg/l) ir BAP (0,5 mg/l), jų reikšmės atitinkamai buvo 1,02 A ir 0,97 A, tačiau nedaug skyrėsi nuo jonažolės,

augintos *in vivo* (0,95 A). Šio tyrimo metu mažiausiomis redukciniėmis savybėmis pasižymėjo jonažolė, kultivuota su TDZ (0,05 mg/l) ir NAR (0,2 mg/l) bei jonažolė, užauginta su BAP (2,5 mg/l) ir NAR (0,5 mg/l) augimo fitohormonais, jų reikšmės atitinkamai lygios 0,081 A ir 0,096 A ir yra 10 kartų mažesnės už jonažolę, augintą *in vivo* (0,95 A).



3.9 pav. Jonažolių, kultivuočių su skirtingais augimo fitohormonais, ekstraktų šviesos sugertis pagal redukcinių savybių įvertinimą

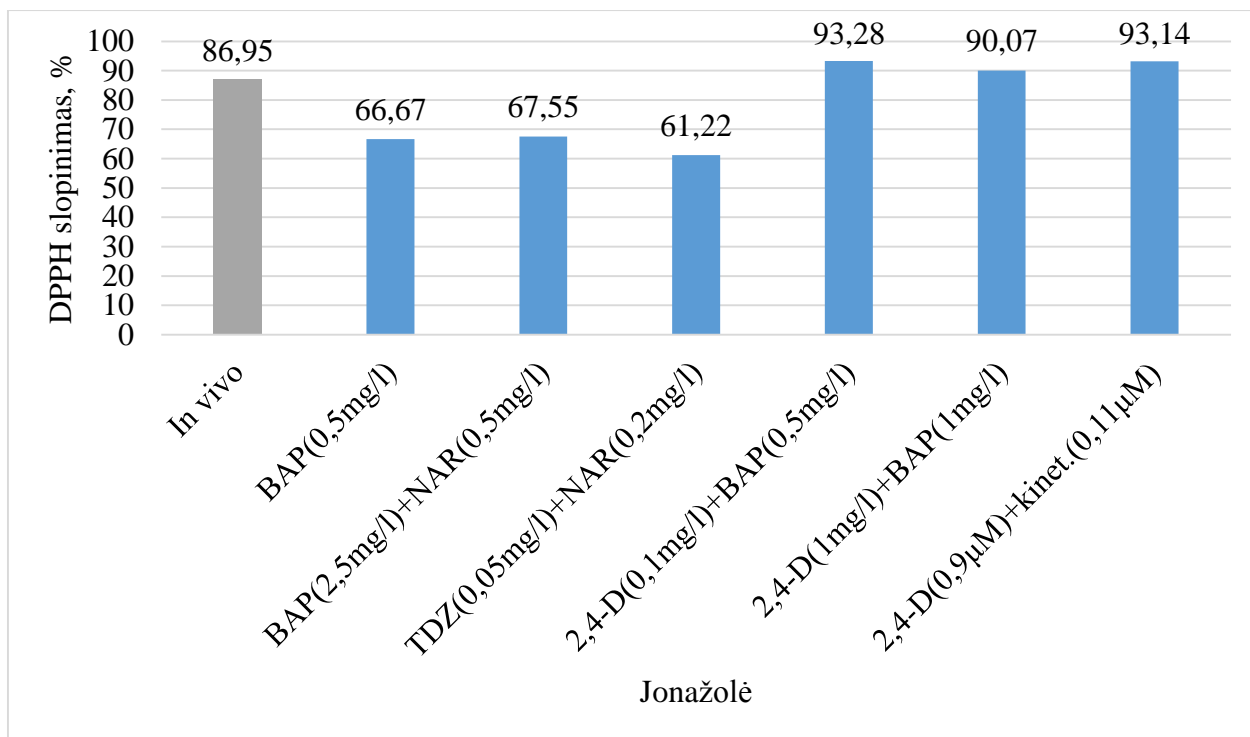
Vertinant salicilo rūgšties koncentracijos įtaką jonažolių redukciniams savybėms (žr. 3.10 pav.), didžiausiomis redukciniėmis savybėmis pasižymėjo jonažolės šaknų kaliaus kultūra, auginta su BAP (0,5 mg/l) ir SA (1 mM), kurios reikšmė lygi 0,89 A, artima jonažolės *in vivo* reikšmei – 0,95 A. Jonažolės stiebų kaliaus kultūros pasižymėjo mažiausiomis redukciniėmis savybėmis, jų vertės svyravo nuo 0,39 A iki 0,48 A ir buvo dvigubai mažesnės už *in vivo* jonažolę, kurios reikšmė buvo 0,95 A. Jonažolės lapų kaliaus kultūrų redukcinių savybių vertės (0,67 A) vienodos tiek jonažolei, augintai su BAP (0,5 mg/l) ir SA (1 mM), tiek jonažolei, augintai su BAP (0,5 mg/l) ir SA (5 mM). Jonažolės lapų kaliaus kultūros, kultuotos su BAP (0,5 mg/l) ir SA (2,5 mM) vertė šiek tiek mažesnė – 0,55 A. Mažiausiomis redukciniėmis savybėmis pasižymėjo jonažolės stiebų kaliaus kultūros, augintos su BAP (0,5 mg/l) ir SA (1 mM), jos vertė buvo 0,39 A.



3.10 pav. Jonažolių, kultivuočių su skirtingomis salicilo rūgšties koncentracijomis, ekstraktų šviesos sugertis pagal redukcinių savybių įvertinimą

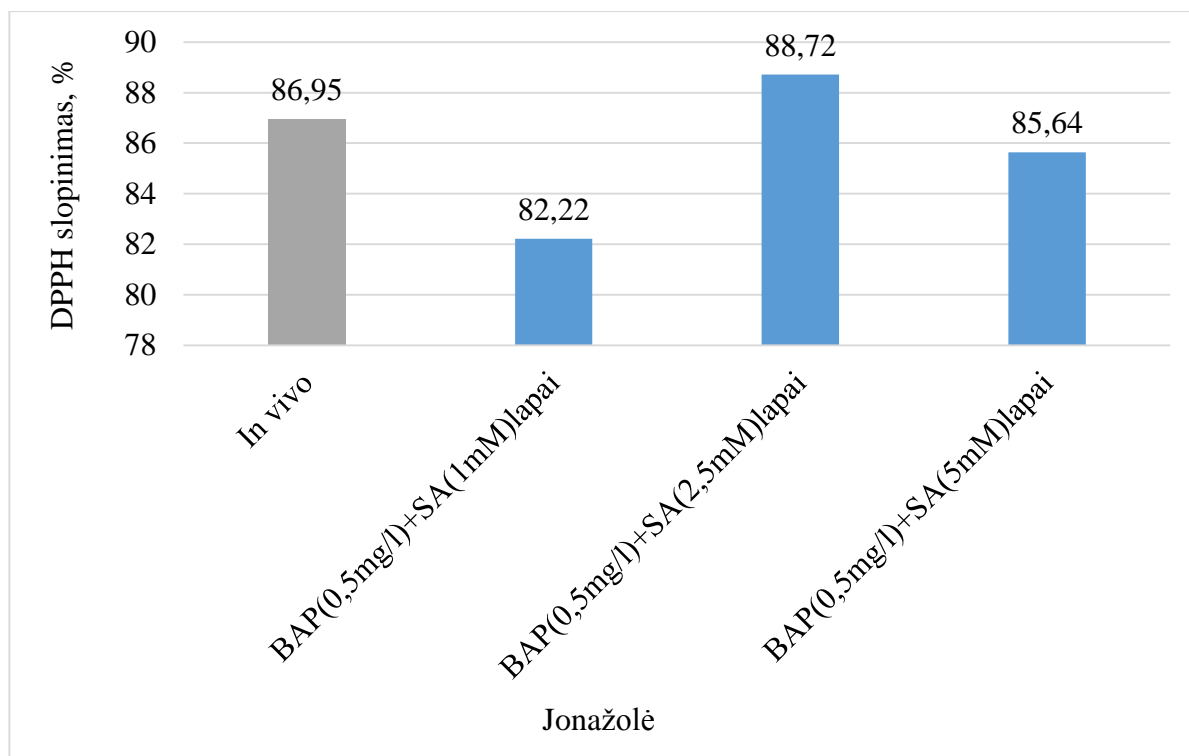
3.2.3 Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal DPPH metodą

Trečiasis metodas, pasirinktas antioksidaciniam jonažolės kaliaus kultūrų aktyvumui nustatyti – metodas, naudojant DPPH reagentą. Iš gautų rezultatų matosi (žr. 3.11 pav.) antioksidacinis aktyvumas, kai jonažolės buvo kultivuotos su skirtingais augimo fitohormonais. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu, kaip ir anksčiau aptartuose metoduose, pasižymėjo jonažolė, užauginta su 2,4-D (0,1 mg/l) ir BAP (0,5 mg/l) augimo fitohormonais, kurios antioksidacinis aktyvumas buvo 93,28 %. Tik dešimtosiomis dalimis procento mažesnėmis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo jonažolė, kultivuota su 2,4-D (0,9 μ M) ir kinetinu (0,11 μ M) – 93,14 %. Mažiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo su TDZ (0,05 mg/l) ir NAR (0,2 mg/l) augimo fitohormonais kultivuota jonažolės kaliaus kultūros, jos reikšmė buvo 61,22 %.



3.11 pav. DPPH slopinimo įvertinimas (%) jonažolės kaliaus kultūrų, kultivuotų su skirtingais augimo fitohormonais, ekstraktuose

Salicilo rūgšties įtakai jonažolės antioksidacinėms savybėms nustatyti buvo vertintos jonažolių lapų kaliaus kultūros, augintos terpėse su skirtingomis salicilo rūgšties koncentracijomis (žr. 3.12 pav.). Geriausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo jonažolė, auginta su BAP (0,5 mg/l) ir SA (2,5 mM), kurios antioksidacinis aktyvumas buvo 88,72 %.

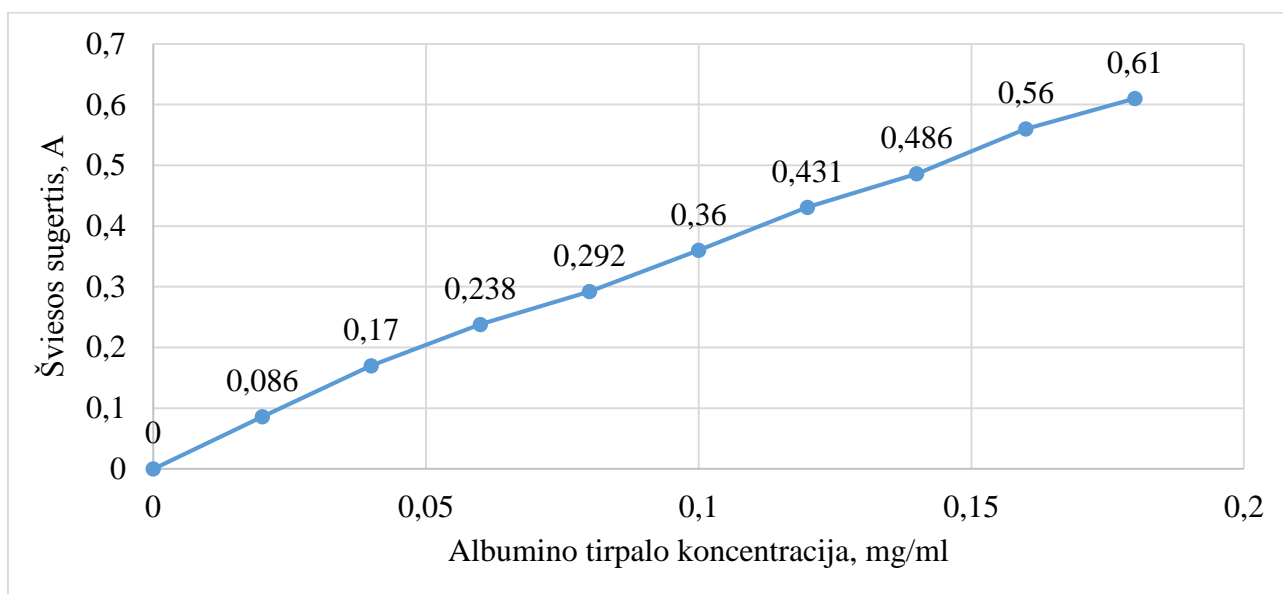


3.12 pav. DPPH slopinimo įvertinimas (%) jonažolių lapų kaliaus kultūrų, kultivuotų su skirtingomis salicilo rūgšties koncentracijomis, ekstraktuose

3.3 Antioksidantinių fermentų aktyvumo įvertinimas

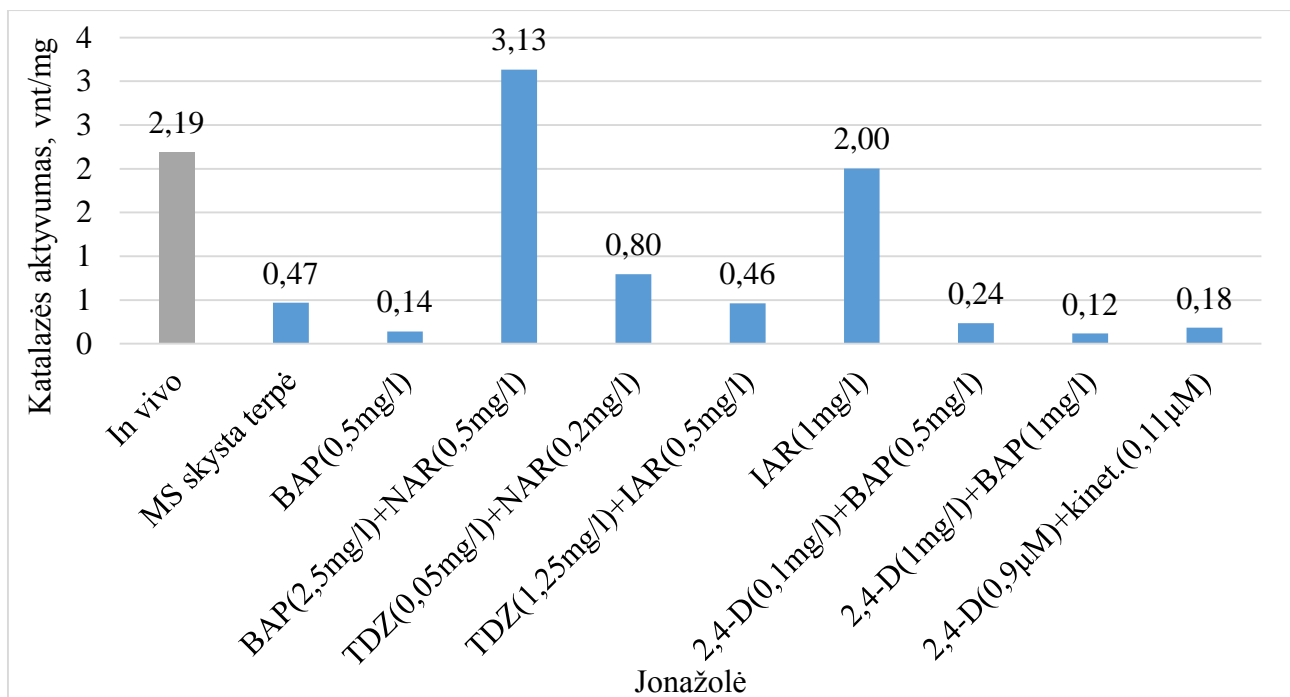
3.3.1 Katalazės aktyvumo įvertinimas

Vertinant jonažolės kaliaus kultūrų antioksidacinį aktyvumą buvo nustatytas fermento katalazės aktyvumas tiriamų ekstraktų tirpaluose. Buvo suformuota kalibracinė tiesė pagal albuminą (žr. 3.13 pav.), iš jos gauta tiesinė lygtis ($y = 3,3439x + 0,0223$), kurios pagalba buvo nustatytas katalazės aktyvumas (vnt/mg).



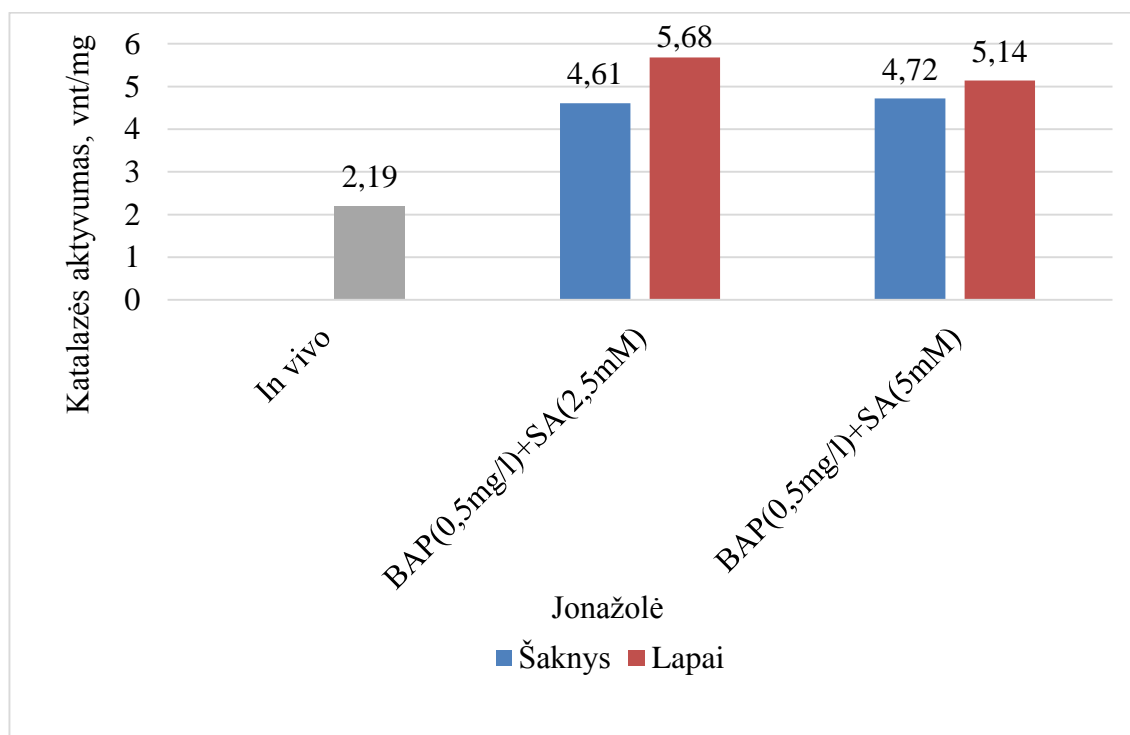
3.13 pav. Albumino tirpalo kalibracinė kreivė

Jonažolės kaliaus kultūros, užaugintos su skirtingais augimo fitohormonais, pasižymėjo skirtingu katalazės aktyvumu. Pagal pateiktus tyrimo rezultatus (žr. 3.14 pav.) didžiausiu katalazės aktyvumu pasižymėjo jonažolė, kultivuota su augimo fitohormonais BAP (2,5 mg/l) ir NAR (0,5 mg/l), jos vertė buvo 3,13 (vnt/mg), kuri buvo 1,5 karto didesnė už jonažolę, augintą *in vivo* (2,19 vnt/mg). Beveik tokiu pat kaip ir jonažolės *in vivo* katalazės aktyvumu pasižymėjo jonažolė, kultivuota su augimo fitohormonu IAR (1 mg/l), jos vertė buvo 2 (vnt/mg). Mažiausiu katalazės aktyvumu pasižymėjo jonažolės, kultivuotos su augimo fitohormonais 2,4-D (1 mg/l) ir BAP (1 mg/l) bei 2,4-D (0,9 μ M) ir kinetinu (0,11 μ M), kurių vertės atitinkamai buvo 0,12 (vnt/mg) ir 0,18 (vnt/mg).



3.14 pav. Fermento katalazės aktyvumas (vnt/mg) jonažolės kaliaus kultūrų, užaugintų su skirtingais augimo fitohormonais, ekstraktuose

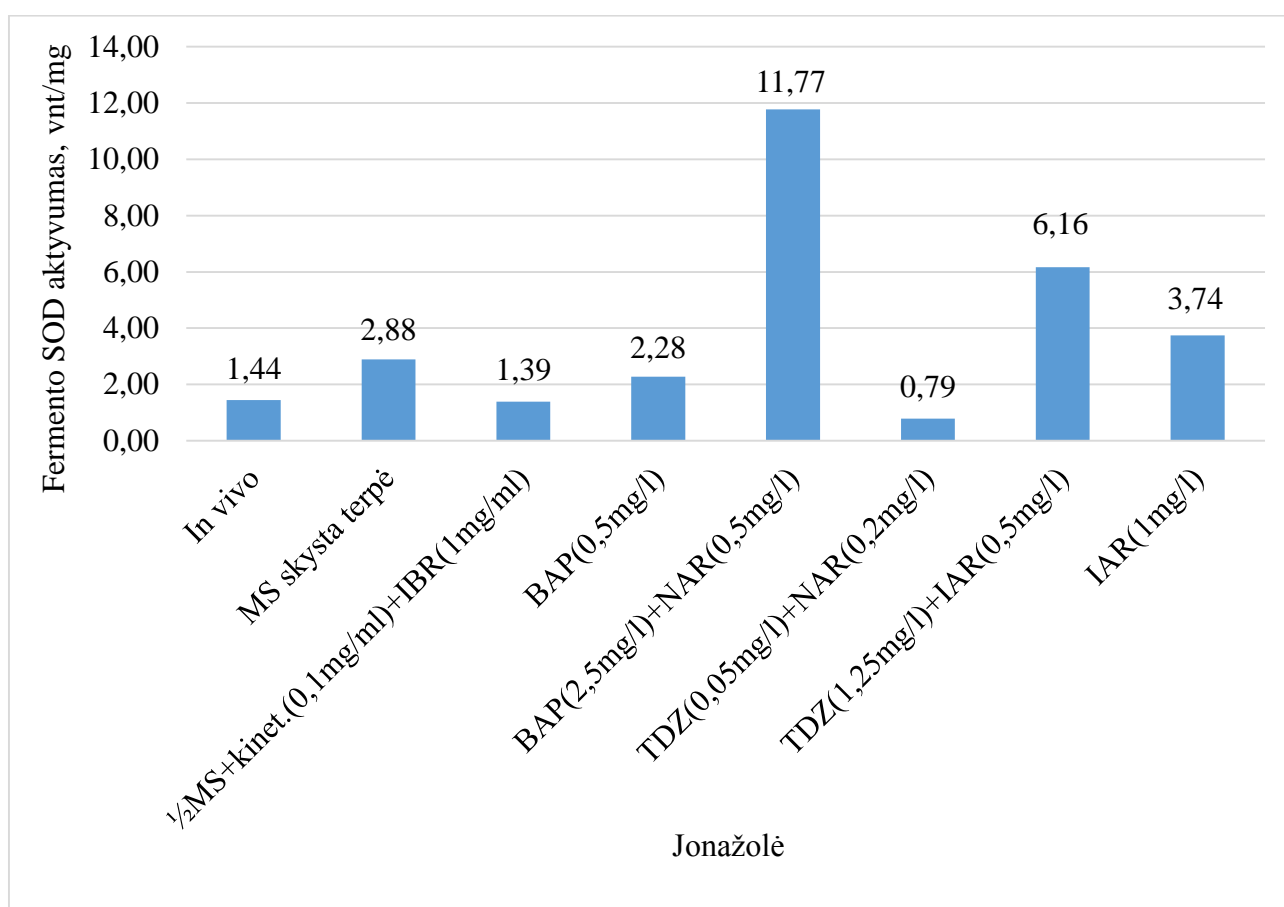
Tiriant salicilo rūgšties įtaką fermento katalazės aktyvumui (žr. 3.15 pav.) nustatyta, kad didžiausias katalazės aktyvumas buvo jonažolės lapų kaliaus kultūrose, augintose su BAP (0,5 mg/l) ir SA (2,5 mM) – 5,68 (vnt/mg), šis aktyvumas buvo 2 kartus didesnis nei jonažolėje *in vivo* – 2,19 (vnt/mg). Mažiausias fermento katalazės aktyvumas nustatytas jonažolės šaknų kaliaus kultūrose, augintose su tuo pačiu augimo fitohormonų ir elicitorių deriniu – BAP (0,5 mg/l) ir SA (2,5 mM), kurios aktyvumas buvo 4,61 (vnt/mg).



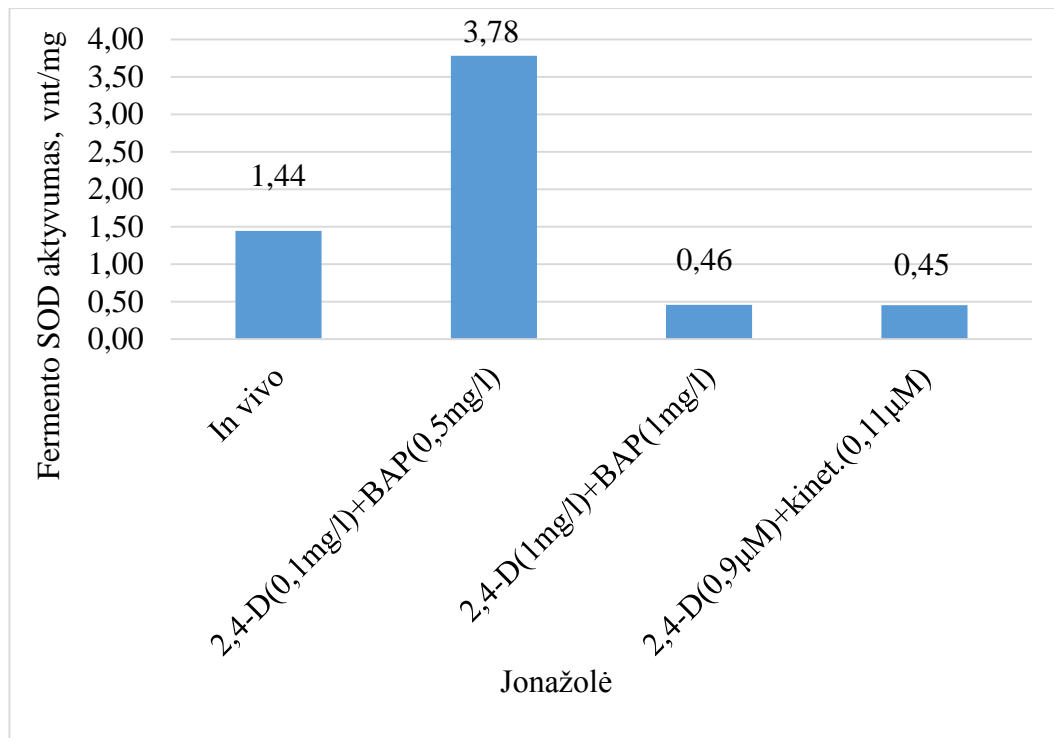
3.15 pav. Fermento katalazės aktyvumas (vnt/mg) jonažolės kaliaus kultūrų, užaugintų su skirtingomis salicilo rūgšties koncentracijomis, ekstraktuose

3.3.2 Fermento superoksido dismutazės (SOD) aktyvumo įvertinimas

Įvertintas kito antioksidacinio fermento – superoksido dismutazės aktyvumas skirtingai užaugintose jonažolės kaliaus kultūrose. Pagal pateiktus rezultatus (žr. 3.16 pav.) didžiausiu superoksido dismutazės aktyvumu pasižymėjo jonažolė, kultivuota su augimo fitohormonais BAP (2,5 mg/l) ir NAR (0,5 mg/l), kuris buvo 11,77 (vnt/mg) – 6 kartus didesnis už jonažolės *in vivo* fermento SOD aktyvumą (1,44 vnt/mg). Keturis kartus didesniu, nei jonažolės *in vivo*, fermento SOD aktyvumu pasižymėjo jonažolė, kultivuota su augimo fitohormonais TDZ (1,25 mg/l) ir IAR (0,5 mg/l), jo vertė buvo 6,16 (vnt/mg). Labai panašiu fermento SOD aktyvumu pasižymėjo jonažolė, užauginta su IAR (1 mg/l) ir jonažolė, kultivuota su 2,4-D (0,1 mg/l) ir BAP (0,5 mg/l) (žr. 3.17 pav.), atitinkamai jų vertės buvo 3,74 (vnt/mg) ir 3,78 (vnt/mg). Tuo tarpu mažiausiu SOD aktyvumu (žr. 3.17 pav.) pasižymėjo jonažolės, kultivuotos su 2,4-D (1 mg/l) ir BAP (1 mg/l) bei 2,4-D (0,9 μM) ir kinetinu (0,11 μM), jų vertės atitinkamai buvo 0,46 (vnt/mg) ir 0,45 (vnt/mg).

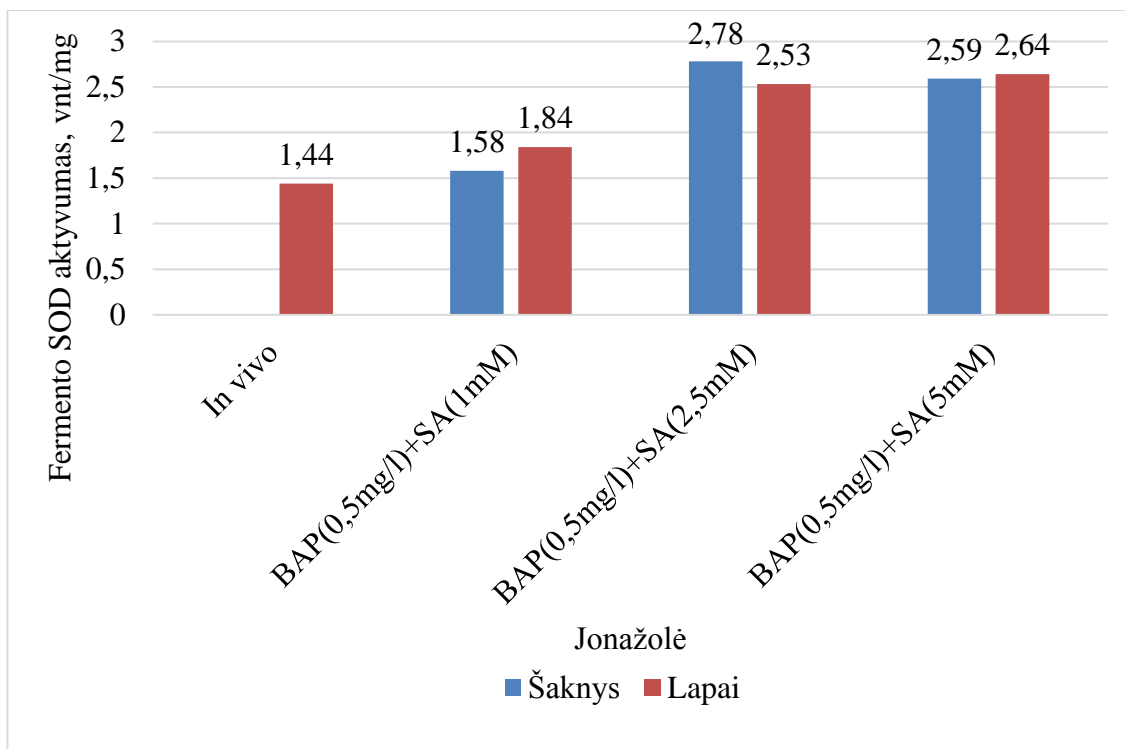


3.16 pav. Fermento superoksido dismutazės aktyvumas (vnt/mg) jonažolės kaliaus kultūrų, užaugintų su skirtingais augimo fitohormonais, ekstraktuose



3.17 pav. Fermento superoksido dismutazės aktyvumas (vnt/mg) jonažolės kaliaus kultūrų, užaugintų su skirtingais augimo fitohormonais, ekstraktuose

Nagrinęjant jonažoles, kultivuotas su skirtingomis salicilo rūgšties koncentracijomis (žr. 3.18 pav.) didžiausiu fermento SOD aktyvumu pasižymėjo jonažolės šaknų kaliaus kultūros, augintos su BAP (0,5 mg/l) ir SA (2,5 mM), kurių vertė buvo 2,78 (vnt/mg). Panašiu SOD fermento aktyvumu pasižymėjo jonažolės šaknų bei lapų kaliaus kultūros, kultivuotos su didžiausia tyrime aptariama salicilo rūgšties koncentracija: BAP (0,5 mg/l) ir SA (5 mM), jų vertės atitinkamai buvo 2,59 (vnt/mg) ir 2,64 (vnt/mg). Mažiausiu aktyvumu pasižymėjo jonažolė, kultivuota su mažiausia salicilo rūgšties koncentracija (1 mM), šaknų kaliaus kultūros vertė buvo 1,58 (vnt/mg), o lapų kaliaus kultūros – 1,84 (vnt/mg).

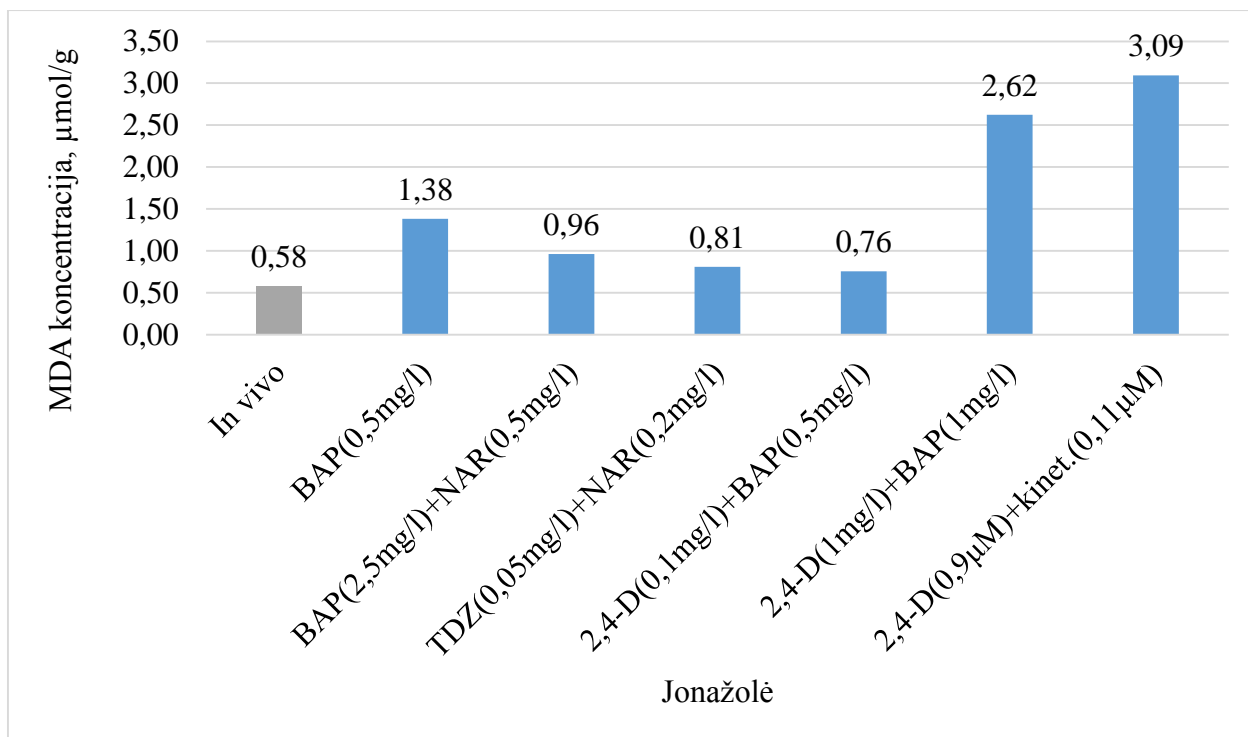


3.18 pav. Fermento superoksido dismutazės aktyvumas (vnt/mg) jonažolės kaliaus kultūrų, užaugintų su skirtingomis salicilo rūgšties koncentracijomis, ekstraktuose

3.4 Metodai, charakterizuojantys oksidacinį stresą augaluose

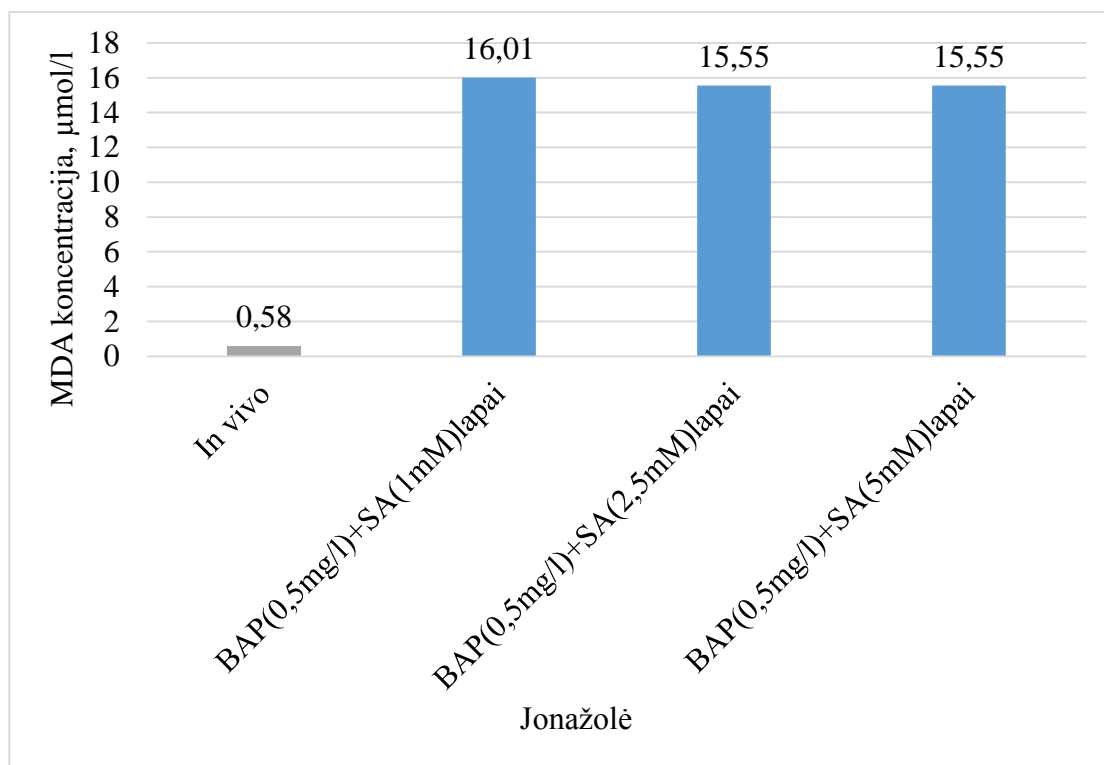
3.4.1 Malondialdehido (MDA) koncentracijos nustatymas

MDA nusako oksidacinį stresą augaluose. Pagal pateiktus tyrimo rezultatus (žr. 3.19 pav.) didžiausia MDA koncentracija buvo nustatyta jonažolės kaliaus kultūrose, kultivuotose su 2,4-D (0,9 μM) ir kinetinu (0,11 μM), kurių reikšmė buvo 3,09 ($\mu\text{mol/g}$) – 5 kartus didesnė už gamtoje augintos jonažolės *in vivo* reikšmę (0,58 $\mu\text{mol/g}$). Šiek tiek mažesne MDA koncentracija pasižymėjo jonažolė, auginta su 2,4-D (1 mg/l) ir BAP (1 mg/l) augimo fitohormonais, jos reikšmė buvo 2,62 ($\mu\text{mol/g}$). Mažiausiomis MDA koncentracijomis pasižymėjo jonažolė, kultivuota su 2,4-D (0,1 mg/l) ir BAP (0,5 mg/l), bei jonažolė, auginta su TDZ (0,05 mg/l) ir NAR (0,2 mg/l), kurių reikšmės atitinkamai buvo 0,76 ($\mu\text{mol/g}$) ir 0,81 ($\mu\text{mol/g}$).



3.19 pav. Augimo fitohormonų įtaka MDA koncentracijai (μmol/g) jonažolės kaliaus kultūrų ekstraktuose

MDA koncentracija buvo vertinta jonažolės lapų kaliaus kultūrose, esant skirtingoms salicilo rūgšties koncentracijoms (žr. 3.20 pav.). Nustatyta, kad didžiausia MDA koncentracija buvo jonažolėje, kultivuojoje su BAP (0,5 mg/l) ir SA (1 mM), jos vertė buvo 16,01 (μmol/l), kuri 28 kartus viršijo jonažolės *in vivo* reikšmę (0,58 μmol/l). Šiek tiek mažesne MDA koncentracija pasižymėjo jonažolės kaliaus kultūros, kultivuotos su BAP (0,5 mg/l) ir SA (2,5 mM) bei BAP (0,5 mg/l) ir SA (5 mM), kurių vertės buvo 15,55 (μmol/l).

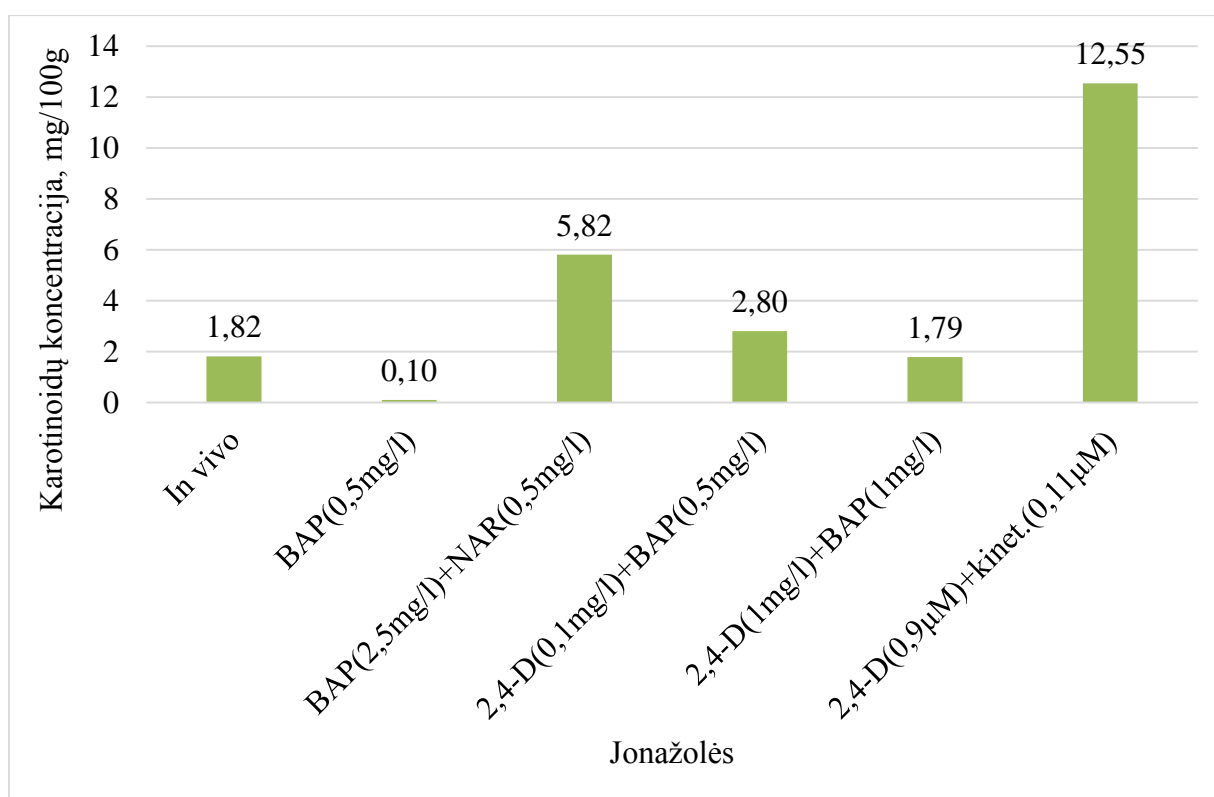


3.20 pav. Salicilo rūgšties įtaka MDA koncentracijai (μmol/g) jonažolės lapų kaliaus kultūrų ekstraktuose

3.5 Biologiškai aktyvių junginių koncentracijos nustatymas

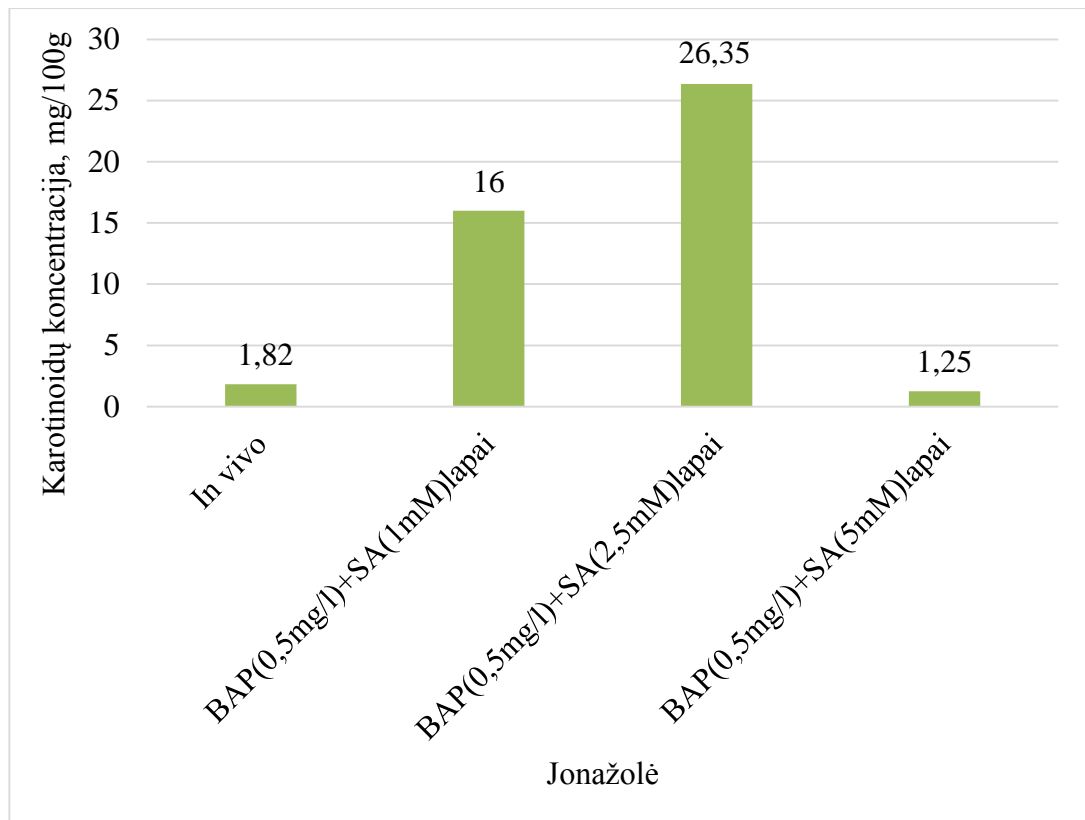
3.5.1 Karotinoidų koncentracijos nustatymas

Eksperimento metu buvo nustatyta karotinoidų koncentracija (mg/100g) jonažolės kaliaus kultūrose, kultivuotose su skirtingais augimo fitohormonais. Karotinoidams nustatyti buvo reikalingas chlorofilo *a* ir chlorofilo *b* nustatymas. Didžiausia karotinoidų koncentracija išsiskyrė (žr. 3.21 pav.) jonažolės kaliaus kultūros, kultivuotos su augimo fitohormonais 2,4-D (0,9 μM) ir kinetinu (0,11 μM), ji buvo 12,55 (mg/100g) – 7 kartus didesnė už jonažolėje *in vivo* užfiksuotą karotinoidų koncentraciją, kuri buvo 1,82 (mg/100g). Jonažolė, kultivuota su BAP (2,5 mg/l) ir NAR (0,5 mg/l) augimo fitohormonais, pasižymėjo 3 kartus didesne karotinoidų koncentracija (5,82 mg/100g) už esančią jonažolėje *in vivo*. Tuo tarpu mažiausiai karotinoidų turėjo jonažolės kaliaus kultūros, kultivuotos su BAP (0,5 mg/l) augimo fitohormonu, jos reikšmė – 0,10 (mg/100g), kuri buvo 18 kartų mažesnė už jonažolę *in vivo*.



3.21 pav. Karotinoidų koncentracijos (mg/100g) jonažolės kaliaus kultūrų, kultivuotų su skirtingais augimo fitohormonais, ekstraktuose

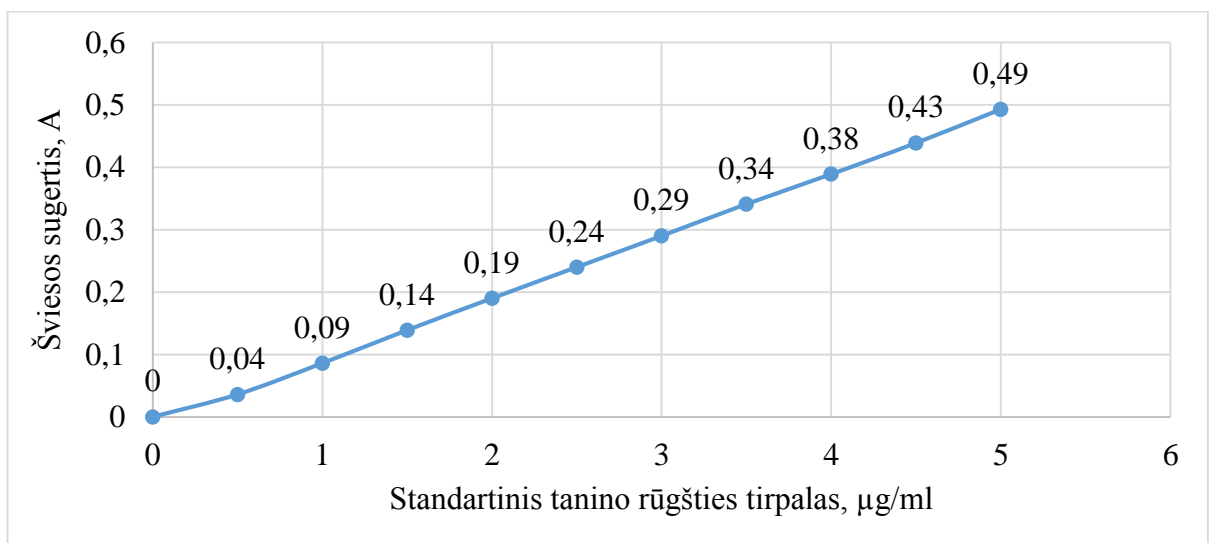
Taip pat buvo ištirtos jonažolės lapų kaliaus kultūros esant skirtingoms salicilo rūgšties koncentracijoms (žr. 3.22 pav.). Didžiausia karotinoidų koncentracija nustatyta jonažolės lapų kaliaus kultūrose, kultivuotose su BAP (0,5 mg/l) ir SA (2,5 mM) – 26,35 (mg/100g), o mažiausia, kultivuotose su BAP (0,5 mg/l) ir SA (5 mM) – 1,25 (mg/100g). Ši koncentracija mažesnė už jonažolėje *in vivo* (1,82 mg/100g) esančią karotinoidų koncentraciją.



3.22 pav. Karotinoidų koncentracijos (mg/100g) jonažolės kaliaus kultūrų, kultivuotų su skirtingomis salicilo rūgšties koncentracijomis, ekstraktuose

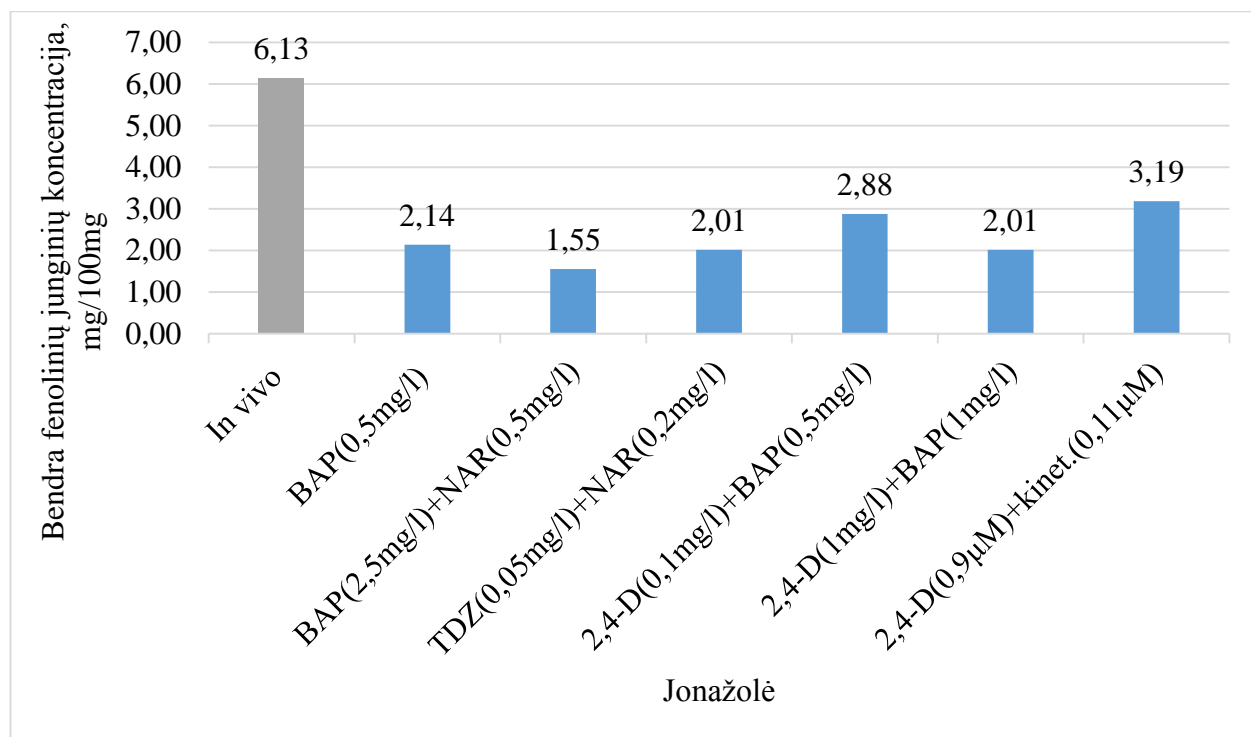
3.5.2 Bendros fenolinių junginių koncentracijos nustatymas Folino-Kiokalto metodu

Fenoliniai junginiai, esantys skirtingose jonažolės kaliaus kultūrose *in vitro*, buvo nustatyti Folino-Kiokalto metodu. Tam padaryti buvo suformuota kalibracinė kreivė pagal standartinį tanino rūgšties tirpalą (žr. 3.23 pav.) iš kurios buvo išvesta tiesnė lygtis ($y = 0,0998x - 0,0093$), pagal kurią buvo apskaičiuoti reikalingi dydžiai, norint nustatyti bendrą fenolinių junginių koncentraciją (mg/100g) jonažolių kaliaus kultūrose.



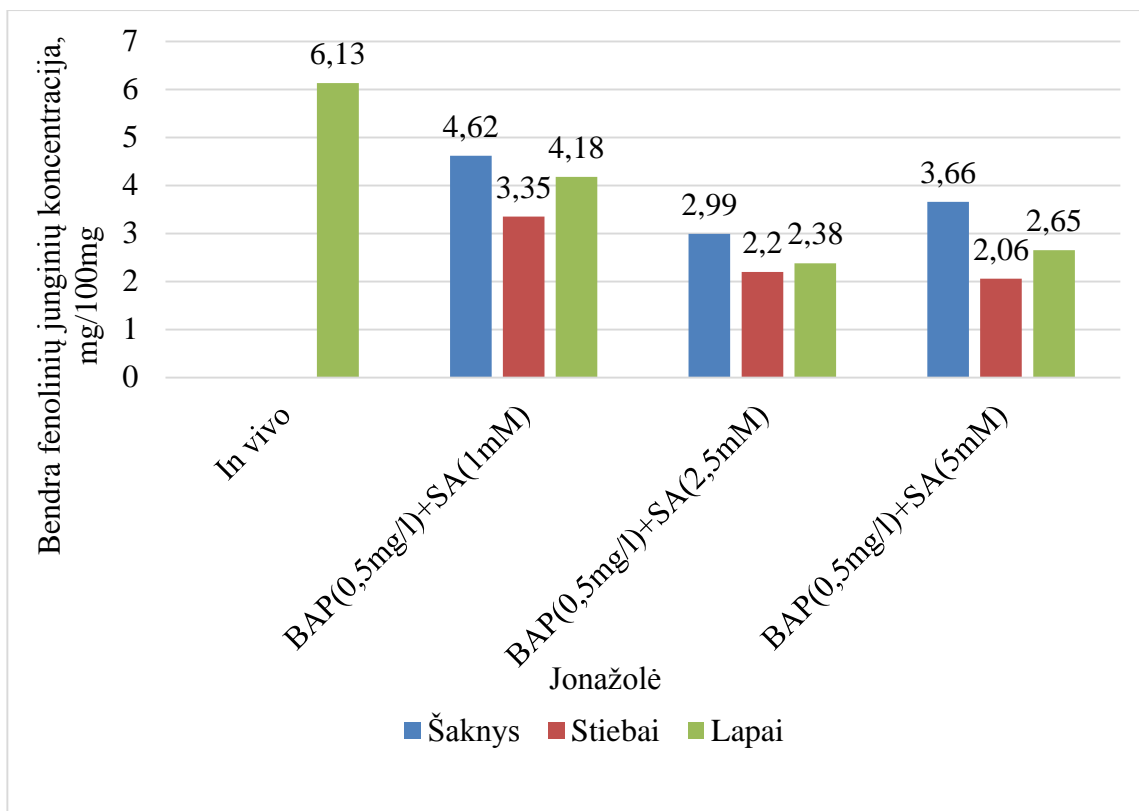
3.23 pav. Standartinio tanino rūgšties tirpalo (µg/ml) kalibracinė kreivė

Pagal gautus duomenis (žr. 3.24 pav.) didžiausia bendra fenolinių junginių koncentracija pasižymėjo jonažolė, kultivuota su 2,4-D (0,9 μM) ir kinet. (0,11 μM) augimo fitohormonais (3,18 mg/100g). Ši fenolinių junginių koncentracija buvo 2 kartus mažesnė už jonažolėje *in vivo* nustatytą fenolinių junginių koncentraciją (6,13 mg/100g).



3.24 pav. Bendra fenolinių junginių koncentracija (mg/100mg) jonažolių kaliaus kultūrų, kultivuočių su skirtingais augimo fitohormonais, ekstraktuose

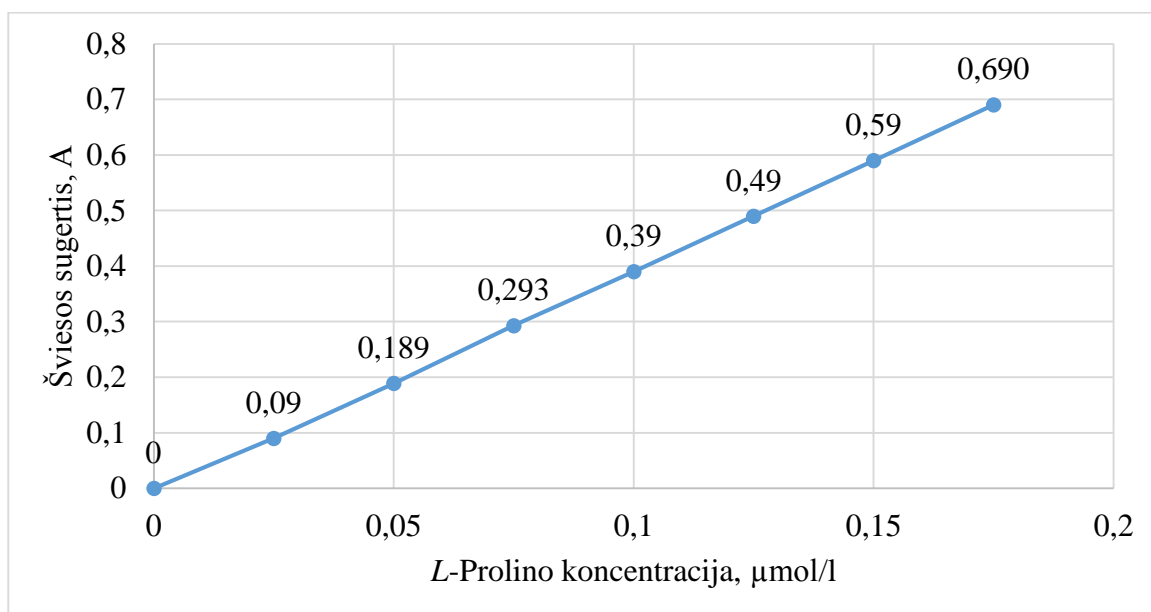
Lyginant jonažoles, augintas su skirtingomis salicilo rūgšties koncentracijomis (žr. 3.25 pav.) nustatyta, kad daugiausiai fenolinių junginių sukaupe jonažolė, auginta su BAP (0,5 mg/l) ir SA (1 mM), šaknų kaliaus kultūrose nustatyta bendra fenolinių junginių koncentracija buvo 4,6 (mg/100g), stiebų kaliaus kultūrose – 3,34 (mg/100g), o lapų kaliaus kultūrose – 4,16 (mg/100g). Ši koncentracija nebuvo didesnė už jonažolėje *in vivo* esančią bendrą fenolinių junginių koncentraciją (6,13 mg/100g).



3.25 pav. Bendra fenolinių junginių koncentracija (mg/100mg) jonažolės kaliaus kultūrų, kultivuotų su skirtingomis salicilo rūgšties koncentracijomis, ekstraktuose

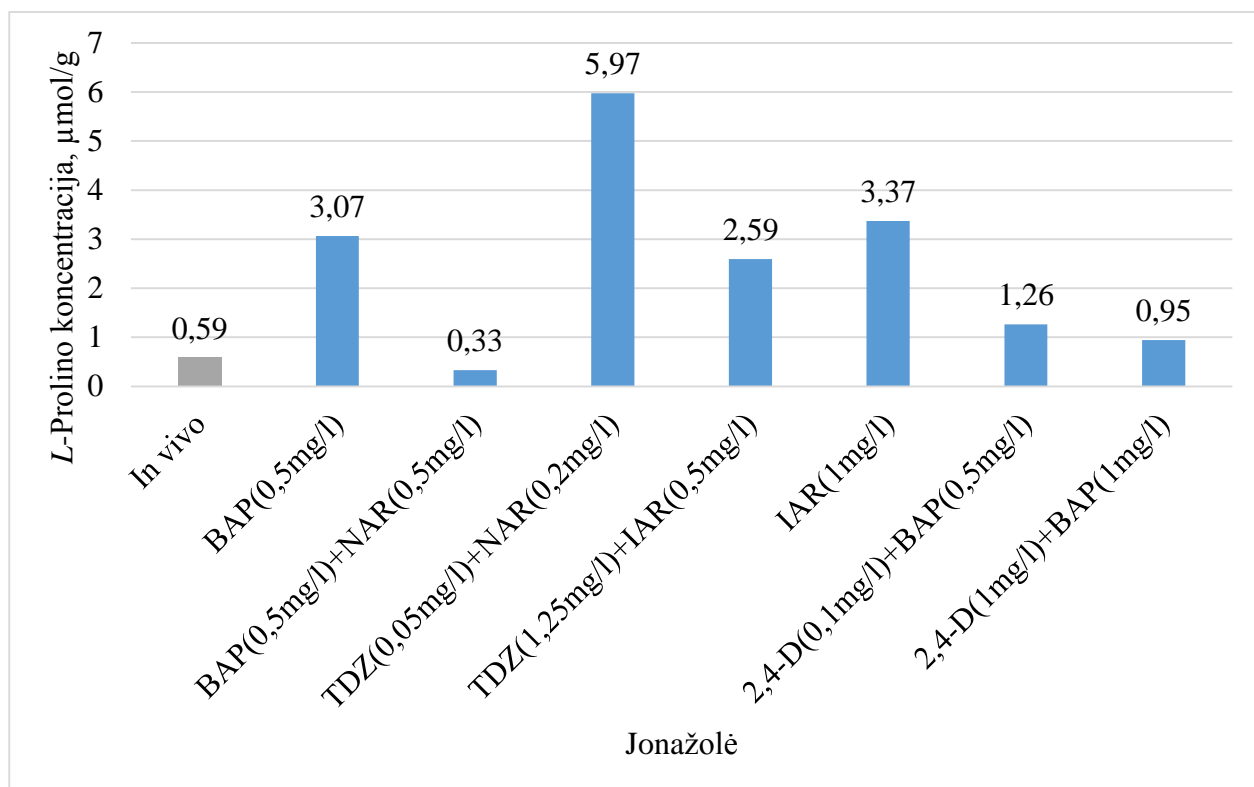
3.5.3 *L*-Prolino koncentracijos nustatymas

L-Prolino koncentracijai nustatyti buvo nubrėžta kalibracinė *L*-proolino tiesė (žr. 3.26 pav.), iš kurios buvo išvesta tiesinė lygtis ($y = 3,9667x - 0,0056$). Pagal šią tiesę buvo nustatytos *L*-proolino koncentracijos skirtingose jonažolės kaliaus kultūrose.



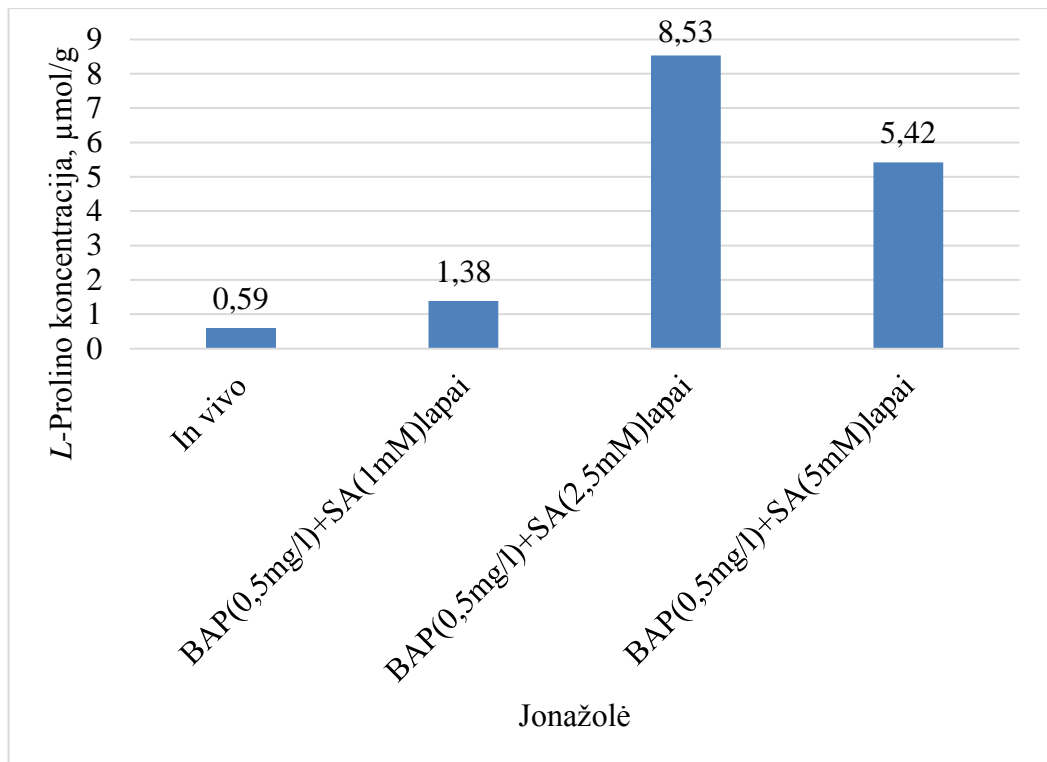
3.26 pav. *L*-Prolino kalibracinė tiesė

Apžvelgiant skirtingais augimo fitohormonais paveiktas jonažolės kaliaus kultūras (žr. 3.27 pav.), didžiausia *L*-proolino koncentracija pasižymėjo jonažolė, kultivuota su TDZ (0,05 mg/l) ir NAR (0,2 mg/l) augimo fitohormonais (5,97 $\mu\text{mol/g}$). Ši koncentracija buvo 10 kartų didesnė už jonažolės *in vivo* koncentraciją, kuri buvo 0,59 ($\mu\text{mol/g}$). Jonažolė, kultivuota su augimo fitohormonais BAP (2,5 mg/l) ir NAR (0,5 mg/l), pasižymėjo 2 kartus mažesne *L*-proolino koncentracija (0,33 $\mu\text{mol/g}$) lyginant ją su jonažole *in vivo*. Vidutinėmis, 5 kartus didesnėmis už jonažolės *in vivo* *L*-proolino koncentracijomis pasižymėjo jonažolė, kultivuota su BAP (0,5 mg/l) augimo fitohormonu, jos reikšmė buvo 3,07 ($\mu\text{mol/g}$) ir jonažolė, auginta su IAR (0,5 mg/l), kurios vertė buvo 3,37 ($\mu\text{mol/g}$).



3.27 pav. *L*-Proolino koncentracija ($\mu\text{mol/g}$) jonažolės kaliaus kultūrų, kultivuočių su skirtingais augimo fitohormonais, ekstraktuose

Jonažolės lapų kaliaus kultūrų, kultivuočių su skirtingomis salicilo rūgšties koncentracijomis, rezultatai pateikti 3.28 pav. Didžiausia *L*-proolino koncentracija pasižymėjo jonažolė, kultivuota su BAP (0,5 mg/l) ir SA (2,5 mM) – 8,53 ($\mu\text{mol/g}$), o mažiausia *L*-proolino koncentracija užfiksuota jonažolėje, kultivuočioje su BAP (0,5 mg/l) ir SA (1 mM), jos vertė buvo 1,38 ($\mu\text{mol/g}$), kuri 2 kartus didesnė už jonažolės *in vivo* *L*-proolino koncentracijos reikšmę (0,59 $\mu\text{mol/g}$).

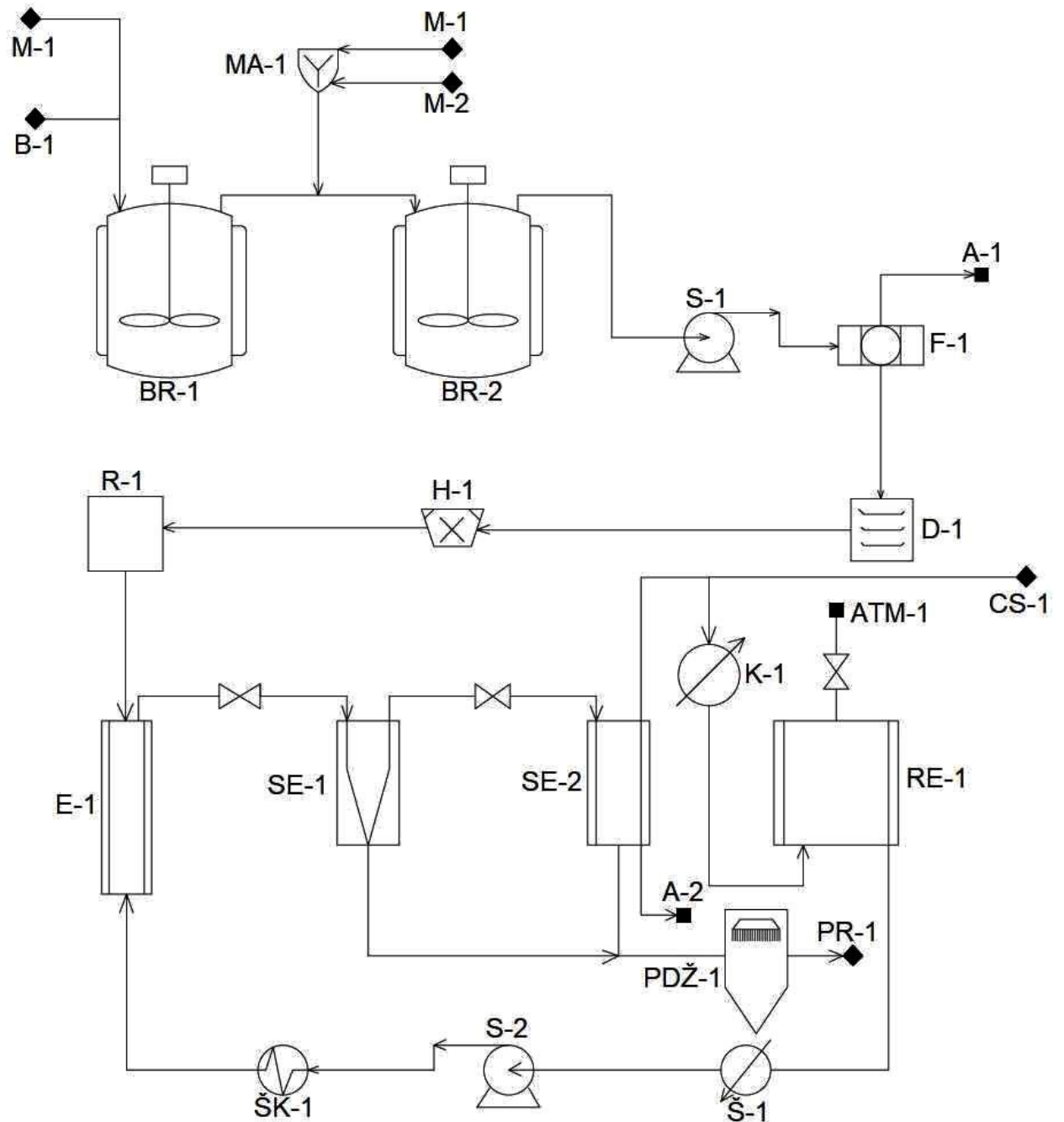


3.28 pav. *L*-Prolino koncentracija (µmol/g) jonažolės lapų kaliaus kultūrų, kultivuotų su skirtingomis salicilo rūgšties koncentracijomis, ekstraktuose

4. Rekomendacijų dalis

Hiperforino gamybos principinėje aparatūrinėje schemoje (žr. 4.1. pav.) pavaizduota, kaip iš jonažolės (*Hypericum perforatum* L.) kaliaus kultūrų, užaugintų *in vitro*, gaunama bioaktyvi medžiaga – hiperforinas.

Aparatūrinės schemos pirmajame bioreaktoriuje (BR-1) auginami jonažolės augalai, kurie perkeliama į antrąjį bioreaktorių (BR-2), kuriame mitybinė MS terpė papildoma atitinkamais augimo fitohormonų ir elicitorių deriniais. Užaugusios jonažolės kaliaus kultūros išcentrinu siurbliu (S-1) perleidžiamos pro filtrą (F1) ir džiovinamos džiovinimo kameroje (D-1). Gauta sausa biomasė susmulkinama homogenizatoriuje (H-1) ir laikoma rezervuare (R-1). Sukaupus pakankamai medžiagos, susmulkintos jonažolės kaliaus kultūros perkeliama į ekstrahavimo indą (E-1). Į tą patį ekstrahavimo indą (E-1) patenka skystas CO₂, kuris yra laikomas aušinamame (-10°C) rezervuare (RE-1). Į ekstrahavimo indą (E-1) skystas CO₂ patenka išcentrinu siurbliu (S-2), kuriame CO₂ suspaudžiamas iki reikiamo slėgio. Šalia esantis aušintuvas (Š-1) neleidžia išcentrinio slėgio siurbliui (S-2) sukelti kavitacijos. Suslėgtas anglies dioksidas pereina per šilumokaitį (ŠK-1), kuriame sureguliuojama ekstrakcijos temperatūra. Įvykus ekstrakcijai ekstrahavimo inde (E-1) pakrautas superkritinis CO₂, per pirmąjį slėgį mažinantį vožtuvą, patenka į pirmąjį separatorių (SE-1), kuris konstruojamas kaip fluidciklonas, ten atsiskiria mažiau tirpūs junginiai. Tada superkritinis CO₂ pereina per antrąjį slėgį mažinantį vožtuvą ir į antrąjį, termostatuojamą separatorių (SE-2), kuriame skystas CO₂ pradeda garuoti ir atsiskiria hiperforinas. Anglies dioksido garai patenka į kondensatorių (K-1), kuriame jie yra vėl suskystinami ir grąžinami į skysto CO₂ laikymo rezervuarą (RE-1). Tuo tarpu atsiskyres hiperforino koncentratas patenka į purkštuvinę džiovyklą (PDŽ-1), kurioje yra išdžiovinamas galutinis produktas – hiperforino milteliai [39, 40].



4.1 pav. Hiperforino gamybos principinė aparatūrinė schema

4.1 lentelė. Principinėje aparatūrinėje schemoje pavaizduoti medžiagų žymėjimai ir jų pavadinimai

Medžiagos žymėjimas	Medžiagos pavadinimas
B-1	Biomasė
M-1	MS terpė
M-2	Reikiami fitohormonų ir elicitorių deriniai
CS-1	CO ₂ saugykla
A-1, A-2	Atliekos
ATM-1	Atmosfera
PR-1	Produktas

4.2 lentelė. Principinės aparatūrinės schemos prietaisų žymėjimai ir pavadinimai

Prietaiso žymėjimas	Prietaiso pavadinimas
BR-1, BR-2	Bioreaktoriai
MA-1	Maišytuvas
S-1, S-2	Išcentriniai siurbLIAI
F-1	Filtrai
D-1	Džiovinimo kamera
H-1	Homogenizatorius
R-1	Rezervuaras
E-1	Ekstrahavimo indas
SE-1, SE-2	Separatoriai
K-1	Kondensatorius
RE-1	Skysto CO ₂ rezervuaras
PDŽ-1	Purkštuvinė džiovykla
ŠK-1	Šilumokaitis
Š-1	Aušintuvas
CS-1	CO ₂ saugykla

Išvados

1. Jonažolės kaliaus genezė *in vitro* geriausiai vyko iš jonažolės šaknų (93 %), užaugintų MS terpėje su BAP (2,5 mg/l) ir NAR (0,5 mg/l) augimo fitohormonais, ir iš jonažolės lapų (96 %), kai buvo naudota 5 (mM) salicilo rūgšties koncentracija.
2. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo jonažolė *in vitro*, auginta su 2,4-D (0,1 mg/l) ir BAP (0,5 mg/l) augimo fitohormonais. Pagal FRAP metodą – 173,51 (μmol/l), redukcinių savybių įvertinimą – 0,97 A, pagal DPPH metodą – 93,28 %. Itin dideliu (241,09 μmol/l) antioksidaciniu aktyvumu pagal FRAP metodą pasižymėjo jonažolė, kultivuota su salicilo rūgštimi, kurios koncentracija buvo 1 (mM).
3. Didžiausiu katalazės (5,68 vnt/mg) fermentiniu aktyvumu pasižymėjo jonažolė, kultivuota su 2,5 (mM) koncentracijos salicilo rūgštimi, o didžiausiu superoksido dismutazės aktyvumu (11,77 vnt/mg) pasižymėjo jonažolės kaliaus kultūros, kultivuotos su augimo fitohormonais BAP (2,5 mg/l) ir NAR (0,5 mg/l).
4. Didžiausia karotinoidų koncentracija buvo jonažolės kaliaus kultūrose *in vitro*, augintose su augimo fitohormonais 2,4-D (0,9 μM) ir kinetinu (0,11 μM) (12,55 mg/100g). Didžiausia (26,35 mg/100g) karotinoidų koncentracija, lyginant su salicilo rūgštimi kultivuotas jonažolės kaliaus kultūras *in vitro*, pasižymėjo jonažolės lapų kaliaus kultūros, augintos su 2,5 (mM) salicilo rūgštimi.
5. Didžiausia L-prolino koncentracija buvo jonažolės kaliaus kultūrose *in vitro*, augintose su TDZ (0,05 mg/l) ir NAR (0,2 mg/l) – 5,97 (μmol/g) augimo fitohormonais. Salicilo rūgštis geriausią poveikį turėjo jonažolės lapų kaliaus kultūroms *in vitro*, kurių maitinamosiose terpėse buvo 2,5 (mM) koncentracijos salicilo rūgšties (8,53 μmol/g).
6. Pateikta siūloma hiperforino gavimo iš jonažolės kaliaus kultūrų aparatūrinė schema.

Literatūros sąrašas

1. TUSEVSKI, O. and STANOEVA, J. P. and MARKOSKA E. and others. Callus cultures of *Hypericum perforatum* L. a novel and efficient source for xanthone production. *Cross Mark*. 2016, 125, 309–319. ISSN 0167-6857.
2. <https://worldoffloweringplants.com/hypericum-perforatum-common-st-johns-wort/> [žiūrėta 2020-05-20].
3. GAID M. and BIEDERMANN E. and FULLER J. and others. Biotechnological production of hyperforin for pharmaceutical formulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017, 126, 10-26. ISSN 0939-6411.
4. SHAKYAA P. and MARSLINB G. and SIRAMC K. and others. Elicitation as a tool to improve the profiles of high-value secondary metabolites and pharmacological properties of *Hypericum perforatum*. *Journal of Pharmacy And Pharmacology*. 2017, 71, 70-82.
5. EBADOLLAHI R. and JAFARIRAD S. and M. KOSARI-NASAB and others. Effect of explant source, perlite nanoparticles and TiO₂/perlite nanocomposites on phytochemical composition of metabolites in callus cultures of *Hypericum perforatum*. *Scientific reports*. 2019, 9, 12998. ISSN 2045-2322.
6. BÁLINTOVÁ M. and BRUŇÁKOVÁ K. and PETIJOVÁ L. and others. Targeted metabolomic profiling reveals interspecific variation in the genus *Hypericum* in response to biotic elicitors. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2018, 135, 348-358. ISSN 0981-9428.
7. EFFERTH T. Biotechnology applications of Plant Callus Cultures. *Engineering*. 2018, 5, 50-59.
8. COPPOCK R. and DZIWENKA M. *Neuraceuticals: efficacy, safety and toxicity*. Elsevier Inc. Academic press, 2016. 619-631. ISBN 9780128021477.
9. GUPTA D. K. and PALMA J. M. and CORPAS F. J. *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plant*. Switzerland: Springer International Publishing AG, 2018. ISBN 9783319750880.
10. BEERHUES L. Hyperforin. *Phytochemistry*. 2006, 67, 2201-2207. ISSN 0031-9422.
11. KARPPINEN K. and HOKKANEN J. and TOLONEN A. and others. Biosynthesis of hyperforin and adhyperforin from amino acid precursors in shoot cultures of *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry*. 2007, 68, 1038-1045. ISSN 0031-9422.
12. KHAN S. A. and VERMA P. and ARBAT A. and others. Development of enhanced hypericin yielding transgenic plants and somaclones: High throughput direct organogenesis from leaf and callus explants of *Hypericum perforatum*. *Industrial Crops & Products*. 2017, 111, 544-554. ISSN 0926-6690.
13. GADZOVSKA S. and MAURY S. and OUNNAR S. Identification and quantification of hypericin and pseudohypericin in different *Hypericum perforatum* L. *in vitro* cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2005, 43, 591-601. ISSN 0981-9428.
14. MURTHY H. N. and KIM Y. and PARK S. And others. Hypericins: biotechnological production from cell and organ cultures. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014, 98, 9187-9198.
15. TANGA S. and DENG X. and ZHOUB J. and others. Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019, 121,109604. ISSN 0753-3322.
16. GADZOVSKA S. and MAURY S. and DELAUNAY A. and others. The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus, and cell suspension cultures on production of naphthodianthrones

- and phenylpropanoids in *Hypericum perforatum* L. *Science+Business Media Dordrecht*. 2013, 113, 25-29.
17. RAMIREZ-ESTRADA K. and VIDAL-LIMON H. and HIDALGO D. and others. Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories. *Molecules*. 2016, 21, 182.
 18. WALKER T.S. and BAIS H.P. and VIVANCO J.M. Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). *Phytochemistry*. 2002, 60, 298-293. ISSN 0031-9422.
 19. SIRVENT T. and GIBSON D. Induction of hypericins and hyperforin in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2002, 60, 311-320. ISSN 0885-5765.
 20. CUI X. and CHAKRABARTY D. and LEE E. and others. Production of adventitious root and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. *Bioresource Technology*. 2010, 101, 4708-4716. ISSN 0960-8524.
 21. ZOBAYEDA S. M. A. and MURCHA S. J. and RUPASINGHEB H. P. V. *In vitro* production and chemical characterization of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem'). *Plant Science*. 2004, 166, 333-340. ISSN 0168-9452.
 22. YAO Y. and KANG T. and JIN L. and others. Temperature-dependent growth and hypericin biosynthesis in *Hypericum perforatum*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2019, 139, 613-619. ISSN 0981-9428.
 23. ZOBAYED S. M. A. and SAXENA P. K. *In vitro*-grown roots: a superior explant for prolific shoot regeneration of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem') in a temporary immersion bioreactor. *Plant Science*. 2003, 165, 463-470. ISSN 0168-9452.
 24. JARZĘBSKIA M. and SMUŁEKB W. and BARANOWSKA H. M. and others. Characterization of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) and the impact of filtration process on bioactive extracts incorporated into carbohydrate-based hydrogels. *Food Hydrocolloids*. 2020, 104. ISSN 0268-005X.
 25. BOOKERA A. and AGAPOUDA A. and FROMMENWILERC D. A. and others. St John's wort (*Hypericum perforatum*) products – an assessment of their authenticity and quality. *Phytomedicine*. 2017, 40, 158-164. ISSN 0944-7113.
 26. DIAS A. C. P. and SEABRA R.M. and ANDRADE P.B. and others. Xanthone production in calli and suspended cells of *Hypericum perforatum*. *Journal of plant physiology*. 2001, 158, 821-827. ISSN 0176-1617.
 27. CUI X. and MURTHY H. N. and JIN Y. and others. Production of adventitious root biomass and secondary metabolites of *Hypericum perforatum* L. in a ballon type airlift reactor. *Bioresource Technology*. 2011, 102, 10072-10079. ISSN 0960-8524.
 28. GAID M. and HAAS P. and BEUERLE T. and others. Hyperforin production in *Hypericum perforatum* root cultures. *Journal of Biotechnology*. 2016, 222, 47-55. ISSN 0168-1656.
 29. BAQUE M.A. and MOH S. and LEE E. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. *Biotechnology Advances*. 2012, 30, 1255-1267, ISSN 0734-9750.
 30. HUANG D. and OU B. and PRIOR R. L. and others. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005, 53, 1841-1856.

31. BHAWYA D. and ANILAKUMAR K. R. Antioxidant, dna damage protection and antibacterial effect of psoralea corylifolia. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2011, 4, 149-155. ISSN 0974-2441.
32. WANG Y. and WANG X. and ZHAO B. and others. Enhancing antioxidative capacity of *Lepidium meyenii* calli by addition of methyl salicylate to culture medium. 2007, 29, 417-423.
33. VITORIA A. P. and LEA P. J. and AZEVEDO R. A. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry*. 2001, 57, 701-710. ISSN 0031-9422.
34. CSISZÁR J. and LANTOS E. and TARI I. and others. Antioxidant enzyme activities in Allium species and their cultivars under water stress. *Plant soil environ*. 2007, 12, 517-523.
35. SAVICKA M. and ŠKUTE N. Effects of high temperature on malondialdehyde content, superoxide production and growth changes in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Ekologija*. 2010, 56, 26-33.
36. MALINAUSKAITĖ R. Šarminio jonizuoto vandens įtaka paprastojo lęšio 'SMĖLINUKAI' augalų morfofiziologiniams rodikliams II ontogenezės etape. *Žmogaus ir gamtos sauga*. 2015, 2, 98-100. ISSN 1822-1823.
37. MAKKAR H. and SIDHURAJU P. and BECKER K. *Plant Secondary Metabolites*. Humana Press, 2007. ISBN 9781588299932.
38. ÁBRAHÁM E. and HOURTON-CABASSA C. and ERDEI L. and others. Methods for Determination of Proline in Plants. *Methods in molecular biology*. 2010.
39. RÖMPPA H. and SEGERB C. and KAISERA C. S. and others. Enrichment of hyperforin from St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) by pilot-scale supercritical carbon dioxide extraction. *Pharmaceutical sciences*. 2004, 21, 443-451. ISSN 0928-0987.
40. COSSUTA D. and VATAI T. and , BÁTHORI M. and others. Extraction of hyperforin and hypericin from st. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) With different solvents. *Journal of Food Process Engineering*. 2012, 35, 222-235. ISSN 1745-4530.