

Dyscyplina: nauki biologiczne

mgr inż. Maria Stasińska-Jakubas

Rozprawa doktorska

Egzogenna aktywacja szlaków biosyntezy metabolitów wtórnych oraz modulacja procesów fizjologicznych u wybranych gatunków roślin leczniczych

*Exogenous activation of secondary metabolite biosynthesis pathways and modulation of physiological processes in selected medicinal plant species* 

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Botaniki i Fizjologii Roślin

Promotor: dr hab. Barbara Hawrylak-Nowak, prof. uczelni

Promotor pomocniczy: prof. dr hab. Sławomir Dresler

Szczególne podziękowania kieruję do Pani Promotor, dr hab. Barbary Hawrylak-Nowak, prof. uczelni, za wsparcie merytoryczne na każdym etapie pracy nad rozprawą doktorską, nieustanne zaangażowanie w mój rozwój naukowy oraz okazaną życzliwość, zaufanie i wiarę wobec moich możliwości.

Serdeczne podziękowania kieruję także do Pana prof. dr. hab. Sławomira Dreslera, za pomoc i naukowe wsparcie podczas realizacji pracy. Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postepowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 05.06.2025.r. Podpis promotora B. Hanglob-Nocolt

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadoma odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/Promotorów/Promotora pomocniczego\* i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami;
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego;
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załaczona na pendrive wersja elektroniczną.

Data OS. OG. NOLISA.

Podpis autora monia Manine - Joursons

\* niepotrzebne skreślić

# Wykaz publikacji naukowych składających się na rozprawę doktorską

Niniejsza rozprawa doktorska jest oparta na cyklu publikacji naukowych, w którym pierwsza (P1) stanowi przegląd aktualnego stanu wiedzy na temat jednego z badanych elicytorów chemicznych i stanowi uzupełnienie teoretyczne dla cyklu badań eksperymentalnych realizowanych w ramach kolejnych prac (P2, P3, P4).

#### Publikacja nr 1 (P1)

**Stasińska-Jakubas M.**, Hawrylak-Nowak B. 2022. Protective, biostimulating, and eliciting effects of chitosan and its derivatives on crop plants. Molecules, 27, 2801. Liczba punktów w roku publikacji: **MEiN = 140; IF = 4,6** 

#### Publikacja nr 2 (P2)

**Stasińska-Jakubas M.**, Hawrylak-Nowak B., Dresler S., Wójciak M., Rubinowska K. 2023. Application of chitosan lactate, selenite, and salicylic acid as an approach to induce biological responses and enhance secondary metabolism in *Melissa officinalis* L. Industrial Crops and Products, 205, 117571.

Liczba punktów w roku publikacji: MEiN = 200; IF = 5,9

### Publikacja nr 3 (P3)

**Stasińska-Jakubas M.**, Dresler S., Strzemski M., Rubinowska K., Hawrylak-Nowak B. 2024. Differentiated response of *Hypericum perforatum* to foliar application of selected metabolic modulators: Elicitation potential of chitosan, selenium, and salicylic acid mediated by redox imbalance. Phytochemistry, 227, 114231.

Liczba punktów w roku publikacji: MEiN = 100; IF = 3,2

#### Publikacja nr 4 (P4)

**Stasińska-Jakubas M.**, Dresler S., Strzemski M., Rubinowska K., Hawrylak-Nowak B. 2025. Effect of soil-applied metabolic modulators on the accumulation of specialized metabolites in *Chelidonium majus* L. (publikacja w trakcie procesu redakcyjnego; major revision, Molecules)

Liczba punktów w roku publikacji: MEiN = 140; IF = 4,2

### Łączna punktacja opublikowanych prac wynosi 440 pkt. MNiSW, łączny Impact Factor (IF) wynosi 13,7.

Streszczenie	6
Abstract	7
Wprowadzenie teoretyczne	
Hipoteza i cel badań	19
Materiały i metody	20
Omówienie wyników	
Dyskusja	
Wnioski	54
Bibliografia	
Kopie opublikowanych prac	66
Oświadczenia doktoranta oraz współautorów	142
Aneks – Życiorys naukowy	151

# Spis treści

#### Streszczenie

Rośliny, jako bogate źródło metabolitów wtórnych o wielokierunkowej aktywności biologicznej, stanowią istotny obiekt zainteresowań przemysłu. Aby pogodzić rosnące wymagania rynku z ograniczonymi zasobami roślinności konieczne jest opracowywanie zrównoważonych metod stymulowania produkcji pożądanych metabolitów wtórnych. Jednym z obiecujących rozwiązań jest wykorzystanie egzogennych modulatorów metabolicznych, w tym elicytorów chemicznych, aktywujących roślinne mechanizmy obronne. W pracy oceniono wpływ mleczanu chitozanu (ChL; 150 mg/L), seleninu sodu (Se; 10 mg/L) i kwasu salicylowego (SA; 100 mg/L) oraz ich mieszaniny (ChL+Se+SA w stosunku 1:1:1) na akumulację metabolitów wtórnych w kontrolowanych uprawach doniczkowych trzech gatunków roślin leczniczych (Melissa officinalis, Hypericum perforatum i Chelidonium majus). Analizowano także oddziaływanie aplikowanych substancji na podstawowe parametry fizjologiczne roślin oraz wybrane wskaźniki stresu oksydacyjnego. Wykazano, że zastosowanie roztworów pojedynczych elicytorów może efektywnie modyfikować biosyntezę związków bioaktywnych zależnie od ich przynależności do różnych klas metabolitów, istotnie zwiększając poziom związków oraz polifenolowych (kwasy fenolowe, flawonoidy) niektórych alkaloidów izochinolinowych. Odnotowane zmiany akumulacji metabolitów wtórnych u M. officinalis i H. perforatum były związane ze zmianami statusu oksydacyjnego roślin (wzrost akumulacji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, poziomu peroksydacji lipidów błonowych, stężenia wolnej proliny i aktywności enzymów antyoksydacyjnych). Zastosowanie elicytorów wpływało także na zwiększenie aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów z badanych gatunków roślin leczniczych. Efektywna indukcja akumulacji metabolitów wtórnych nie wpływała na biomasę roślin i nie wywoływała wizualnych objawów fitotoksyczności, choć w niektórych przypadkach prowadziła do obniżenia parametrów fizjologicznych związanych z fotosyntezą (fluorescencja chlorofilu a, zawartość barwników fotosyntetycznych). Uzyskane wyniki dostarczają nowych informacji na temat wpływu zróżnicowanych chemicznie elicytorów na akumulację wyspecjalizowanych metabolitów w roślinach leczniczych oraz ich kondycję fizjologiczna. Ponadto wskazuja, że elicytacja może być skuteczną metodą stosowaną w kontrolowanej produkcji doniczkowej wysokiej jakości surowców roślinnych o zwiększonej zawartości metabolitów wtórnych o cenionych właściwościach prozdrowotnych i szerokim spektrum działania biologicznego.

Slowa kluczowe: metabolity wtórne, rośliny lecznicze, chitozan, selen, kwas salicylowy

#### Abstract

Plants, as a rich source of secondary metabolites with diverse biological activities, are of significant interest to industry. To reconcile the growing demands of the market with limited plant resources, it is necessary to develop sustainable methods for stimulating the production of desired secondary metabolites. One promising approach involves the use of exogenous metabolic modulators, including chemical elicitors, that activate plant defense mechanisms. In this study, the effects of chitosan lactate (ChL; 150 mg/L), sodium selenite (Se; 10 mg/L), and salicylic acid (SA; 100 mg/L), as well as their mixture (ChL+Se+SA in a 1:1:1 ratio), were evaluated in terms of their influence on the accumulation of secondary metabolites in controlled pot cultivation of three medicinal plant species (Melissa officinalis, Hypericum perforatum, and Chelidonium majus). The impact of the applied substances on basic physiological parameters and selected oxidative stress indicators was also assessed. The results demonstrated that the application of individual elicitor solutions effectively modulated the biosynthesis of bioactive compounds depending on their metabolic class, significantly increasing the levels of polyphenolic compounds (phenolic acids, flavonoids) and certain isoquinoline alkaloids. The observed changes in secondary metabolite accumulation in M. officinalis and H. perforatum were associated with alterations in the oxidative status of the plants, including increased accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, elevated membrane lipid peroxidation, free proline concentration, and enhanced activity of antioxidant enzymes. Moreover, elicitor treatments enhanced the antioxidant activity of extracts from the investigated medicinal plants. Effective induction of secondary metabolite accumulation did not affect plant biomass and did not induce visible symptoms of phytotoxicity, although in some cases a reduction in physiological parameters related to photosynthesis was observed (chlorophyll a fluorescence, content of photosynthetic pigments). The obtained results provide new insights into the influence of chemically diverse elicitors on the accumulation of specialized metabolites and the physiological condition of medicinal plants. Furthermore, they suggest that elicitation may serve as an effective strategy in controlled potted production of high-quality plant raw materials enriched in health-promoting secondary metabolites with a broad spectrum of biological activity.

Keywords: secondary metabolites, medicinal plants, chitosan, selenium, salicylic acid

## Wprowadzenie teoretyczne

#### Wstęp

Rośliny stanowią wyjątkowo bogate źródło zróżnicowanych pod względem struktury chemicznej i właściwości biologicznych metabolitów. Szacuje się, że każdy z pojedynczych gatunków roślin zawiera ich około 5 000, co przekłada się na sumę nawet 1 000 000 występujących w królestwie roślin związków chemicznych [Wang i in. 2019]. Oprócz metabolitów pierwotnych (białka, tłuszcze, węglowodany, kwasy nukleinowe), zaangażowanych bezpośrednio w podstawowe procesy fizjologiczne roślin (wzrost i rozwój, fotosynteza, oddychanie komórkowe, reprodukcja), syntetyzują one również cały szereg niskocząsteczkowych związków - metabolitów wtórnych, które odgrywają kluczową rolę w interakcjach roślin z otoczeniem, umożliwiając ich przetrwanie w zmiennych, niekorzystnych warunkach środowiska. Ze względu na pełnione funkcje komunikacyjne, sygnałowe, obronne czy adaptacyjne, w ostatnich latach związki te coraz częściej określa się mianem metabolitów wyspecjalizowanych. Są one z reguły specyficzne dla poszczególnych grup taksonomicznych roślin i akumulowane w wyspecjalizowanych strukturach komórkowych. Wśród nich wyróżnia się związki o szerokim spektrum aktywności biologicznej, które w zależności od szlaku biosyntezy klasyfikuje się na trzy główne grupy: związki fenolowe, terpenoidy oraz niebiałkowe związki azotowe [Marone i in. 2022, Qaderi i in. 2023, Jalota i in. 2024].

Różnorodność, wielokierunkowe działanie oraz szereg potencjalnych zastosowań roślinnych metabolitów wtórnych zdeterminowały ich kluczową rolę w życiu człowieka. Obecnie rośliny wykorzystywane są w niemal wszystkich dziedzinach współczesnej medycyny i farmakoterapii, jako środki lecznicze lub surowce do ich produkcji. Według Światowej Organizacji Zdrowia ponad 21 000 gatunków roślin wykorzystywanych jest w celach terapeutycznych [Salmerón-Manzano i in. 2020, Pant i in. 2021]. Znajdują one także zastosowanie między innymi jako suplementy diety, składniki kosmetyków i kosmeceutyków, dodatki do żywności, barwniki czy środki ochrony roślin lub ich komponenty [Kandoudi i Nemeth-Zamborine 2022, Jalota i in. 2024]. Z tego względu zawartość metabolitów wtórnych w surowcach roślinnych jest jednym z najważniejszych wskaźników ich jakości [Pant i in. 2021]. Jednak z uwagi na ograniczenia związane z pozyskiwaniem tych substancji, znaczna ich część do tej pory nie została wykorzystana komercyjnie na szeroką skalę. Główną przeszkodę stanowią bardzo niskie stężenia tych

związków w tkankach roślin, z reguły nieprzekraczające kilku procent suchej masy. Ponadto zawartość wyspecjalizowanych metabolitów ulega znacznym wahaniom w zależności od gatunku, wieku i kondycji fizjologicznej rośliny, a także, ze względu na ich rolę w złożonych odpowiedziach obronnych roślin, pod wpływem oddziaływania czynników środowiskowych. Każdy czynnik abiotyczny, występujący w nadmiarze lub niedoborze, jak i czynniki biotyczne, związane z oddziaływaniem innych organizmów mogą być dla roślin bodźcami stresowymi, odpowiedzialnymi za indukcję mechanizmów obronnych i przekierowanie metabolizmu w kierunku biosyntezy metabolitów wtórnych [Isah i in. 2019, Twaij i Hassan 2022, Jalota i in. 2024]. Z tego względu współczesna, dynamicznie rozwijająca się produkcja roślinna musi stawać przed wieloma wyzwaniami związanymi między innymi z produkcją wysokiej jakości surowców w warunkach aktywnego oddziaływania czynników środowiskowych [Zirak i in. 2019].

Jedną ze strategii łączących powyższe zagadnienia jest elicytacja, która wykorzystuje korzystne oddziaływanie umiarkowanego stresu na rośliny w celu pobudzenia ich reakcji biochemicznych oraz stymulowania i/lub indukcji biosyntezy pożądanych metabolitów wtórnych. Metoda ta uznawana jest za jedno z bardziej skutecznych i praktycznych narzędzi w produkcji ważnych gospodarczo substancji biologicznie aktywnych oraz może stanowić potencjalne rozwiązanie problemów związanych z niedostateczną, niepokrywającą istniejących potrzeb ilością naturalnie produkowanych przez rośliny metabolitów [Isah i in. 2019, Kandoudi i Nemeth-Zamborine 2022]. Elicytory, jako bodźce stresowe, stanowią obszerną i różnorodną grupę substancji i czynników, których klasyfikacja uwzględnia przede wszystkim ich charakter – według tego kryterium wyróżnia się elicytory abiotyczne i biotyczne. Biorąc pod uwagę miejsce ich powstawania elicytory można dodatkowo podzielić na endogenne i egzogenne. Szczegółowa klasyfikacja wyróżnia także czynniki pochodzenia chemicznego, fizycznego i substancje hormonalne oraz czynniki o złożonym lub zdefiniowanym składzie i strukturze [Jakupi i Demirbas 2022]. Wszystkie typy elicytorów mogą być stosowane indywidualnie lub łącznie, jako dodatek do roztworów hydroponicznych lub roślinnych kultur zawiesinowych, a także aplikowane dolistnie lub doglebowo, na różnych etapach wzrostu roślin lub po ich zbiorze. Z tego względu ich stosowanie wydaje się stosunkowo prostym i ekonomicznym rozwiązaniem. Wśród dodatkowych zalet tej metody należy także podkreślić jej zgodność z założeniami zrównoważonego rozwoju, a tym samym bezpieczeństwo dla środowiska i akceptację ze strony społeczeństwa [Hawrylak-Nowak i in. 2021, Kandoudi i Nemeth-Zamborine 2022].

9

Wymienione korzyści dotyczą jednak prawidłowo opracowanej, zoptymalizowanej elicytacji, której efektywność zależy od szeregu czynników, takich jak rodzaj i stężenie/natężenie elicytora, sposób i częstotliwość jego aplikacji oraz czas oddziaływania. Dodatkowo wpływ powyższych czynników nie jest jednakowy dla wszystkich gatunków roślin. Z tego względu powodzenie elicytacji jest także ściśle zależne od dostosowania jej parametrów do danego gatunku, a nawet odmiany rośliny, jej wieku i kondycji fizjologicznej, a także wymaga uwzględnienia warunków zewnętrznych [Baenas i in. 2014, Kandoudi i Nemeth-Zamborine 2022]. Złożoność całego procesu oraz wysokie koszty inwestycyjne związane z opracowywaniem warunków elicytacji powodują, że możliwości komercyjnego wykorzystania tej metody są wciąż ograniczone. Pomimo szeregu badań prowadzonych nad wpływem różnego typu elicytorów na rośliny, szczegółowy mechanizm ich biologicznej aktywności wciąż nie został dostatecznie poznany. Ponadto większość eksperymentów odbywała się w warunkach in vitro, co wskazuje na potrzebę prowadzenia dalszych badań nad aplikowaniem elicytorów in vivo w całych systemach roślinnych [Halder i in. 2019, Kandoudi i Németh-Zámboriné 2022].

W wyniku oddziaływania czynnika stresowego na rośliny dochodzi do pobudzenia receptorów na powierzchni błony komórkowej, rozpoznania bodźca i uruchomienia kaskady mechanizmów obronnych na terenie komórki (biosynteza białek i enzymów, ekspresja genów związanych z reakcją obronną roślin, zmiany potencjału osmotycznego komórek, alkalizacja cytoplazmy). Podkreśla się jednak, że wspólnym mianownikiem komórkowej odpowiedzi roślin na oddziaływanie czynnika stresowego, niezależnie od jego rodzaju, jest tzw. fala oksydacyjna lub wybuch oksydacyjny, czyli nagłe uwolnienie reaktywnych form tlenu. Inicjuje ona szereg reakcji oksydoredukcyjnych i zmian metabolicznych, w następstwie których dochodzi do pobudzenia szlaków metabolizmu wtórnego, a tym samym zwiększonej biosyntezy i akumulacji związków warunkujących przetrwanie rośliny w warunkach stresowych. Choć do tej pory dokładnie nie ustalono mechanizmu, za pośrednictwem którego reaktywne formy tlenu uczestniczą w komórkowej odpowiedzi roślin na stres, to przypisuje się im przede wszystkim funkcję sygnałową. Wiadomo również, że kontrolują między innymi ekspresję genów kodujących enzymy antyoksydacyjne czy enzymy uczestniczące w szlakach biosyntezy metabolitów wtórnych [Baenas i in. 2014, Huang i in. 2019, Saleem i in. 2021]. Z drugiej strony, są to wysoce reaktywne cząsteczki, które mogą inicjować szereg reakcji prowadzących do zaburzeń struktur i funkcji komórkowych – inaktywacji białek, peroksydacji lipidów błonowych czy degradacji kwasów nukleinowych. Ze względu na wąski zakres stężeń, w którym reaktywne formy tlenu przechodzą od pełnienia funkcji sygnałowych i regulacyjnych do wywoływania efektów cytotoksycznych, rośliny wykształciły skuteczne sposoby ich wychwytywania oraz kontrolowania poziomu zapewniające utrzymanie homeostazy redoks w komórkach. Choć zmiany te mogą być wspólnym mianownikiem dla indukcji biosyntezy metabolitów wtórnych w ramach reakcji stresowej roślin, nadal konieczne są dalsze badania wyjaśniające poszczególne elementy biologicznych podstaw tych procesów [Huang i in. 2019, Choudhary i in. 2020, Hasanuzzaman i in. 2020].

#### Charakterystyka analizowanych elicytorów

#### Chitozan jako elicytor biotyczny

Chitozan jest biopolimerem, otrzymywanym w wyniku częściowej, chemicznej lub enzymatycznej deacetylacji chityny - jednego z najczęściej występujących w przyrodzie polisacharydów. Jako materiał budulcowy, chityna powszechnie występuje w ścianach komórkowych bakterii, grzybów i glonów oraz w oskórkach owadów, pajęczaków oraz skorupiaków. W praktyce na skalę przemysłową chitozan pozyskuje się najczęściej z chityny pochodzącej z pancerzy bezkręgowców morskich (krewetki, kraby, homary, kryle), stanowiących części odpadowe przetwórstwa morskiego [Skołucka-Szary i in. 2016, Pandit i in. 2021, Hidangmayum i in. 2018]. Rosnace w ostatnich latach zainteresowanie tym biopolimerem wynika z jego naturalnego pochodzenia, biokompatybilności oraz biodegradowalności, a także szerokiej aktywności biologicznej, która warunkuje szereg potencjalnych zastosowań chitozanu i jego pochodnych w wielu dziedzinach. Z perspektywy produkcji roślinnej, największe nadzieje wzbudza możliwość jego aplikacji jako biostymulatora, elicytora lub środka ochrony roślin. Potencjał ten pobudzania wynika ze zdolności chitozanu do mechanizmów obronnych i odpornościowych roślin oraz regulacji procesów metabolicznych. Obejmują one różnego rodzaju zmiany fizjologiczne i biochemiczne, takie jak biosynteza metabolitów wtórnych (związki polifenolowe, fitoaleksyny, flawonoidy, alkaloidy), enzymów (chitynaza, glukonaza, proteaza), inhibitorów wzrostu (kwas abscysynowy, kwas jasmonowy, kwas salicylowy) czy akumulacja ligniny i kalozy [El Hadrami i in. 2010, Malerba i Cerana 2016]. W aktywności biologicznej chitozanu należy jednak podkreślić jego dwojaką naturę - z jednej strony często jest charakteryzowany jako związek o właściwościach

antyoksydacyjnych, zwiększający aktywność enzymów biorących bezpośredni udział w neutralizacji reaktywnych form tlenu; z drugiej strony, w komórkowej odpowiedzi roślin na stres chitozan może także indukować zmiany oksydacyjne i produkcję H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, jako cząsteczki sygnałowej uczestniczącej w reakcjach obronnych, oraz zwiększać aktywność amoniakoliazy L-fenyloalaniny (PAL), co wpływa stymulująco na biosyntezę związków fenolowych u wielu gatunków roślin [Katiyar i in. 2015, Mukhtar Ahmed i in. 2019, Stasińska-Jakubas i in. 2023]. Dodatkowo wykazuje on aktywność przeciwgrzybiczą, przeciwbakteryjną i przeciwwirusową. Jednak na efektywność działania chitozanu, a tym samym na możliwość jego wykorzystania w produkcji roślinnej, wpływa szereg czynników, wśród których wymienia się między innymi pochodzenie surowca, warunki izolacji, stopień deacetylacji, pH oraz rozpuszczalność. Z tego względu poddawany jest on różnego rodzaju modyfikacjom, mającym na celu przede wszystkim poprawę jego właściwości fizykochemicznych, a wśród najczęściej stosowanych pochodnych znajdują się sole chitozanu, takie jak mleczan czy octan [Ostrowska-Czubenko i in. 2016, Hawrylak-Nowak i in. 2021].

#### Kwas salicylowy – elicytor abiotyczny z grupy fitohormonów

Kwas salicylowy jest powszechnym, naturalnie występującym w królestwie roślin fitohormonem. Pod względem biochemicznym należy do grupy prostych związków fenolowych i jest pochodną kwasu benzoesowego. Jego biosynteza w roślinach ma miejsce najprawdopodobniej w chloroplastach, a naturalnie występuje on w postaci wolnej lub w połączeniach glikozydowych i estrowych. Kwas salicylowy pełni rolę cząsteczki sygnałowej oraz regulatora procesów fizjologicznych i metabolicznych roślin (kiełkowanie nasion, wzrost komórek, pobieranie jonów fosforu i potasu, termogeneza, indukcja kwitnienia, ruchy aparatów szparkowych, biosynteza innych fitohormonów). Podobnie jak pozostałe substancje z grupy związków fenolowych, kwas salicylowy odgrywa kluczowa rolę w regulowaniu odpowiedzi odpornościowych roślin na oddziaływanie zarówno abiotycznych, jak i biotycznych czynników stresowych, a w literaturze naukowej określany jest także mianem regulatora homeostazy redoks. Związek ten, w zależności od stężenia i warunków środowiskowych, może zarówno zwiększać akumulację reaktywnych form tlenu poprzez hamowanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych, jak i wspierać ich detoksykację, zmniejszając negatywne skutki stresu oksydacyjnego [Janda i in. 2014, Herrera-Vásquez i in. 2015, Saleem i in. 2021, Ali i in. 2021]. Według jednej z powszechnych hipotez, ochronne działanie kwasu salicylowego w reakcjach odpornościowych roślin polega na stymulowaniu systemu antyoksydacyjnego poprzez indukcję aktywności enzymów antyoksydacyjnych – katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej, reduktazy glutationowej czy peroksydaz. Wpływa on również na metabolizm proliny czy tworzenie białek związanych z patogenezą. Dodatkowo wywiera korzystny wpływ na wzrost i rozwój roślin, efektywność fotosyntezy i akumulację barwników fotosyntetycznych oraz przyswajanie składników mineralnych w warunkach stresu [Armuła 2014, Subban i in. 2019, Ali i in. 2021]. Jednak wyniki badań prowadzonych nad wpływem egzogennej aplikacji kwasu salicylowego w roślinach uprawianych w optymalnych warunkach są niejednoznaczne. Z jednej strony, niektóre doświadczenia potwierdzają opisane wyżej efekty jego korzystnego oddziaływania. Jednak może on również funkcjonować jako czynnik stresowy, wpływając negatywnie na podstawowe procesy fizjologiczne. Działanie kwasu salicylowego jest więc w dużej mierze zależne od szeregu czynników, takich jak jego stężenie, gatunek rośliny i warunki środowiskowe [Janda i in. 2014]. Przy uwzględnieniu i optymalizacji poszczególnych czynników kwas salicylowy może być powszechnie stosowanym elicytorem, który w odpowiednich stężeniach wykazuje dużą skuteczność w stymulowaniu biosyntezy związków należących do różnych grup metabolitów wtórnych [Ali i in. 2021, Urban i in. 2022].

#### Selen – elicytor abiotyczny z grupy pierwiastków śladowych

Selen jest mikroelementem niezbędnym dla prawidłowego funkcjonowania organizmów ludzi, zwierząt oraz niektórych mikroorganizmów. Chociaż do tej pory nie potwierdzono jego niezbędności dla roślin, wykazano że niskie stężenia tego pierwiastka wywierają korzystny wpływ na kiełkowanie, wzrost i rozwój oraz odpowiedź odpornościowa roślin, zwiększając ich tolerancję na niekorzystne czynniki środowiskowe, takie jak susza, wahania temperatury, zasolenie czy toksyczne metale śladowe. Jednak kluczowa jest ścisła zależność biologicznej aktywności selenu od jego stężenia. Działanie ochronne tego pierwiastka polega głównie na zapobieganiu skutkom stresu oksydacyjnego poprzez neutralizację reaktywnych form tlenu. Stwierdzono, że traktowanie roślin związkami selenu pobudza komórkowy system obrony antyoksydacyjnej poprzez zwiększanie aktywności szeregu enzymów (katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy askorbinianowej, reduktazy glutationowej, peroksydazy glutationowej, reduktazy dehydroaskorbinianowej) poziomu przeciwutleniaczy oraz wzrost

nieenzymatycznych (glutation, flawonoidy, karotenoidy, askorbinian). Pierwiastek ten moduluje również ekspresję genów zaangażowanych w reakcję roślin na stres i aktywność kodowanych przez nie białek, stymuluje biosyntezę metabolitów wtórnych i akumulację osmoprotektantów, a także wpływa korzystnie na biosyntezę chlorofilu, parametry fotosyntezy oraz pobieranie wody i składników mineralnych [Hawrylak-Nowak i in. 2018, Łukaszewicz i Politycka 2020, Bano i in. 2021, Yang i in. 2022, Bandehagh i in. 2023]. Jednak granica pomiędzy korzystnym, a toksycznym oddziaływaniem selenu na rośliny jest bardzo wąska, a po przekroczeniu krytycznego stężenia może on wykazywać działanie prooksydacyjne, powodując uszkodzenia komórek. Nadmierne stężenia selenu prowadzą do zmian chlorotycznych i nekrotycznych oraz zahamowania wzrostu roślin, szczególnie w obrębie systemu korzeniowego. Aktywność biologiczna tego pierwiastka jest również ściśle uzależniona od jego formy chemicznej oraz wrażliwości poszczególnych gatunków roślin na selen, co jest związane ze zdolnością do jego fitoakumulacji. Z tego względu, pomimo szeregu potencjalnych korzyści, niezbędność selenu dla roślin jest nadal dyskusyjna i obecnie jest on klasyfikowany jako pierwiastek korzystny [Łukaszewicz i Politycka 2020, Bandehagh i in. 2023, Moulick i in. 2024].

Związki selenu, stosowane w niskich stężeniach, mogą być z powodzeniem aplikowane doglebowo lub dolistnie jako biostymulatory i/lub elicytory abiotyczne, zwiększające odporność roślin i akumulację pożądanych związków o właściwościach prozdrowotnych. Selen jest jednak jednym z mniej dostępnych dla roślin pierwiastków chemicznych, a jego pobieranie w dużej mierze zależy od biodostępności w podłożu [Yang i in. 2022]. Biorąc pod uwagę kryterium rozpuszczalności i dostępności dla roślin, w praktyce preferowane są utlenione, nieorganiczne formy selenu jak selenin (SeO<sub>3</sub><sup>-2</sup>) czy selenian (SeO<sub>4</sub><sup>-2</sup>) [Syed i in. 2021, Moulick i in. 2024].

## Opis badanych gatunków roślin

#### Melisa lekarska (Melissa officinalis L.)

Melisa lekarska jest byliną należącą do rodziny jasnotowatych (Lamiaceae). Pochodzi ze wschodniej części basenu Morza Śródziemnego; obecnie występuje także w umiarkowanych strefach Azji, w Ameryce Północnej i Brazylii. W Europie i Polsce jest gatunkiem stosunkowo dobrze zaaklimatyzowanym – jest uprawiana niemal na terenie całego kraju. Melisa osiąga około 60-100 cm wysokości, posiada rozgałęzioną, bogato ulistnioną i charakterystyczną dla rodziny Lamiaceae czterokanciastą łodygę, na której naprzeciwlegle osadzone są długoogonkowe liście barwy jasnozielonej, o sercowatojajowatej i delikatnie owłosionej blaszce liściowej, na brzegu okrągło piłkowanej. Melisa kwitnie od czerwca do sierpnia, a jej kwiaty są drobne, dwuwargowe, grzbieciste, zrosłopłatkowe, barwy od białej po jasnoróżową, zebrane w kątach liści w nibyokółkach. Owocem jest czterodzielna rozłupnia, która po dojrzeniu na przełomie sierpnia i września rozpada się na brązowe lub czarne, jajowato wydłużone rozłupki [Nurzyńska-Wierdak 2013, Król 2018, Draginic 2021]. Cała roślina wytwarza silny, cytrynowy aromat. Surowcem farmakopealnym są liść (Melissae folium) i ziele (Melissae herba) pozyskiwane na początku kwitnienia [Król 2018]. Średnia zawartość olejku, będącego głównym składnikiem surowca, wynosi od 0,1% do 0,3%, a jego głównymi komponentami są: cytral, cytronelal, geranial, geraniol, neral,  $\beta$ -pinen,  $\alpha$ -pinen i  $\beta$ -kariofilen. Surowce melisy są także bogatym źródłem kwasów fenolowych (rozmarynowy, kawowy, chlorogenowy), flawonoidów (kwercetyna, luteolina), garbników, goryczy, saponin i soli mineralnych [Nurzyńska-Wierdak 2013, Petrisor i in. 2022]. Dzięki obecności metabolitów wtórnych znajdują one szerokie zastosowanie jako składniki różnorodnych leków, komercyjnych preparatów leczniczych i prozdrowotnych czy kosmetyków.

W medycynie tradycyjnej wielu krajów melisa jest rośliną szczególnie cenioną ze względu na właściwości uspokajające i przeciwdepresyjne, poprawiające funkcje poznawcze, działanie przeciwdrobnoustrojowe, rozkurczowe, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne oraz ogólnie wspomagające pracę układu nerwowego, sercowonaczyniowego i trawiennego [Draginic i in. 2021]. Gatunek ten znajduje także zastosowanie w farmakoterapii początkowych etapów choroby Azheimera, bólach reumatycznych i migrenowych oraz napięciowych bólach głowy [Moradkhani 2010]. Wymieniona powyżej aktywność oraz możliwość wykorzystania ekstraktów z melisy w prewencji i leczeniu schorzeń układu sercowo-naczyniowego wynika głównie z zawartych w surowcu substancji o właściwościach antyoksydacyjnych, takich jak kwasy fenolowe [Draginic i in. 2021]. Wiele badań *in vitro* wskazuje również, że wodne ekstrakty z ziela melisy charakteryzują się wysoką aktywnością przeciwko wirusowi opryszczki pospolitej typu 1 (HSV-1). Z kolei olejek eteryczny wykazuje działanie przeciwzapalne, przeciwdrobnoustrojowe oraz przeciwutleniające, a ze względu na właściwości sedatywne znajduje szerokie zastosowanie w aromaterapii [Dobros 2017].

#### Dziurawiec zwyczajny (Hypericum perforatum L.)

Dziurawiec zwyczajny jest jednym z najlepiej poznanych i najpopularniejszych gatunków w rodzinie dziurawcowatych (Hypericaceae). Jest rośliną wieloletnią, występującą naturalnie w Europie Środkowo-Wschodniej, Afryce Północnej, Azji i Ameryce Północnej [Crockett i Robson 2011, Shasmita i in. 2023]. Dziurawiec dorasta do 60-100 cm wysokości; posiada prostą, wzniesioną i rozgałęzioną w górnej części łodygę, na której naprzeciwlegle ułożone są całobrzegie, lancetowate liście. Nazwa dziurawca wskazuje na wygląd jego blaszek liściowych, na których umiejscowione są zbiorniki olejkowe, widoczne w postaci charakterystycznych, prześwitujących, niewielkich plam. Kwitnie od czerwca do września, wytwarzając na szczytach pędów żółte kwiaty, zebrane w gęste baldachogrona. Owocem jest torebka, zawierająca drobne, ciemnobrunatne nasiona o cylindrycznym kształcie i charakterystycznej, cętkowanej powierzchni [Gruszczyk 2018].

Surowcem leczniczym jest ziele dziurawca (Hyperici herba), zbierane w trakcie kwitnienia, zawierające nie mniej niż 0,08% związków diantronowych w przeliczeniu na hiperycynę. Wśród najważniejszych komponentów w składzie chemicznym surowca wyróżnia się także pochodne floroglucyny (głównie hiperforynę), flawonoidy (hiperozyd, kwercetyna, rutyna, kwercytryna, izokwercytryna), olejek eteryczny, garbniki katechinowe oraz kwasy fenolowe (głównie chlorogenowy i kawowy) [Zirak i in. 2019, Nobakht i in. 2022]. Bogaty skład chemiczny tego gatunku warunkuje jego wielokierunkowe działanie oraz globalne zastosowanie w lecznictwie. Pomimo szerokiej aktywności biologicznej, popularność dziurawca wynika głównie z jego ugruntowanej pozycji w leczeniu jednej z najczęściej występujących chorób cywilizacyjnych, jaką jest depresja – to plasuje go w czołówce najlepiej sprzedawanych roślinnych antydepresantów i suplementów diety [Barnes i in. 2018, Mullaicharam i Halligudi 2018, Nobakht i in. 2022]. W literaturze naukowej podkreśla się, że dziurawiec stanowi jedyny roślinny zamiennik syntetycznych leków przeciwdepresyjnych o wysokiej skuteczności [Agapouda i in. 2019]. Dodatkowo gatunek ten znajduje szerokie zastosowanie jako środek przeciwdrobnoustrojowy, przeciwutleniający, przeciwzapalny, przeciwbólowy oraz przeciwdziałający chorobom neurodegeneracyjnym. Należy jednak podkreślić, że kierunek działania preparatów z ziela dziurawca uzależniony jest od sposobu ich przygotowania. Do najczęściej stosowanych należą wyciągi alkoholowe, które wpływają korzystnie na funkcjonowanie układu nerwowego - oprócz wymienionych właściwości przeciwdepresyjnych, łagodzą stany napięcia i wyczerpania nerwowego oraz ułatwiają zasypianie. Aktywność ta przypisywana jest współdziałaniu kilku substancji bioaktywnych, w tym głównie flawonoidów oraz hiperycyny i hyperforyny. Działanie fotouczulające hiperycyny na promieniowanie ultrafioletowe jest dodatkowo wykorzystywane w dermatologii, w leczeniu bielactwa i łuszczycy oraz terapii fotodynamicznej nowotworów, zwłaszcza skóry. Z kolei ekstrakty wodne i olejowe z ziela dziurawca zawierają głównie garbniki i flawonoidy o działaniu antyseptycznym i ściągającym. Z tego względu stosowane są głównie zewnętrznie jako środki wspomagające leczenie ran i oparzeń skóry, podrażnień i stanów zapalnych oraz nerwobólów. Dodatkowo, z uwagi na działanie przeciwzapalne, żółciopędne i poprawiające trawienie, mogą być one również stosowane wewnętrznie w zaburzeniach żołądkowo-jelitowych [Zirak i in. 2019, Rizzo i in. 2020, Dong i in. 2021, Nobakht i in. 2022, Shasmita i in. 2023].

#### Glistnik jaskółcze ziele (Chelidonium majus L.)

Glistnik jaskółcze ziele jest gatunkiem synantropijnym, należącym do rodziny makowatych (Papaveraceae). Występuje pospolicie na terenie całego kraju oraz we wszystkich rejonach Europy i Azji. Jest byliną o rozgałęzionym pokroju, osiągającą wysokość od 50 do 100 cm. Na charakterystycznej, pustej w przekroju łodydze glistnika znajdują się pierzastosieczne liście o wciętych lub karbowanych brzegach i jasnozielonej barwie. Blaszki liści odziomkowych są duże, ogonkowe i zebrane w rozetę; liście łodygowe są niewielkie i siedzące. Glistnik jaskółcze ziele kwitnie od kwietnia października i posiada promieniste, żółtopomarańczowe kwiaty, do zebrane baldaszkowate kwiatostany. Owocem jest wydłużona, wielonasienna torebka W zawierająca ciemnobrązowoczarne, błyszczące i opatrzone w elajosomy nasiona o jajowatym kształcie. Wszystkie organy tego gatunku zawierają duże ilości żółtopomarańczowego soku mlecznego (lateksu), wykorzystywanego powszechnie w medycynie w leczeniu kurzajek, odcisków, egzemy, zakażeń grzybiczych i innych schorzeń skórnych [Arora i Sharma 2013, Zielińska i in. 2018, Dumitru i Gănescu 2022, Borges i in. 2024].

Głównym surowcem farmakopealnym, dla którego uprawiany jest glistnik jaskółcze ziele jest pozyskiwany jesienią korzeń (*Chelidonii radix*), zawierający do 3% alkaloidów izochinolinowych. W grupie alkaloidów glistnika zidentyfikowano około 30 związków, wśród których dominującymi są: chelidonina, chelerytryna, sangwinaryna, berberyna

i koptyzyna. Oprócz alkaloidów, w korzeniu znajdują się także saponiny, flawonoidy, kwasy fenolowe, garbniki, karotenoidy oraz kwasy organiczne. Drugim surowcem leczniczym są kwitnące, ulistnione szczyty pędów glistnika (Chelidonii herba), zawierające nie mniej niż 0,6% sumy alkaloidów w przeliczeniu na chelidoninę. Ziele glistnika jest głównie źródłem alkaloidów i flawonoidów. Ze względu na działanie żółciopędne, rozkurczowe i przeciwwrzodowe, surowce glistnika oraz ich wyciągi najczęściej wchodzą w skład preparatów stosowanych w leczeniu schorzeń oraz dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego i dróg żółciowych. Surowce pozyskiwane z glistnika wykazują aktywność przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczną i przeciwwirusową oraz immunomodulującą, przeciwzapalną i przeciwbólową. Stwierdzono także słabe działanie uspokajające oraz łagodzące wstrząs anafilaktyczny [Gilca i in. 2010, Arora i Sharma 2013, Zielińska i in. 2018, Dumitru i Gănescu 2022]. Ze względu na zawartość alkaloidów izochinolinowych, ekstrakty z glistnika jaskółczego ziela wykazują potencjał przeciwnowotworowy poprzez silne działanie antyoksydacyjne, antyproliferacyjne, proapoptotyczne i cytotoksyczne na niektóre linie komórek nowotworowych [Nadova i in. 2008, Yun i in. 2021].

Biorąc pod uwagę powyższe informacje, w ramach niniejszej pracy przeanalizowano wpływ dolistnej lub doglebowej aplikacji wybranych związków chemicznych (mleczan chitozanu, kwas salicylowy, selenin sodu), reprezentujących różne typy elicytorów, na wybrane parametry fizjologiczne oraz metabolizm wtórny trzech ważnych gospodarczo gatunków roślin leczniczych: melisy lekarskiej, dziurawca zwyczajnego i glistnika jaskółczego ziela w warunkach *in vivo*. Określono również wpływ aplikowanych substancji na poziom stresu oksydacyjnego i odpowiedź antyoksydacyjną roślin jako procesów, które mogą stanowić wspólne podłoże dla indukcji szlaków biosyntezy metabolitów wtórnych należących do różnych, charakterystycznych dla analizowanych gatunków roślin, klas związków chemicznych.

## Hipoteza i cel badań

#### Hipoteza badawcza

W ramach weryfikowanej hipotezy badawczej przyjęto, że egzogenna aplikacja substancji o charakterze elicytorów wpływa pozytywnie na biosyntezę i akumulację metabolitów wtórnych w roślinach leczniczych oraz indukuje zmiany homeostazy redoks w komórkach.

#### Cel badań

Celem badań będących przedmiotem rozprawy doktorskiej była ocena wpływu substancji należących do różnych typów elicytorów chemicznych (mleczan chitozanu, selenin sodu, kwas salicylowy) na akumulację wybranych metabolitów wtórnych o potwierdzonym potencjale terapeutycznym, charakterystycznych dla badanych gatunków roślin leczniczych: melisy lekarskiej (*Melissa officinalis* L.) (P2), dziurawca zwyczajnego (*Hypericum perforatum* L.) (P3) oraz glistnika jaskółczego ziela (*Chelidonium majus* L.) (P4). Analizowano także oddziaływanie aplikowanych związków na poziom stresu oksydacyjnego oraz odpowiedź antyoksydacyjną roślin jako zjawisk, które potencjalnie mogą stanowić wspólne podłoże biologiczne dla indukcji szlaków biosyntezy metabolitów wtórnych należących do zróżnicowanych klas chemicznych.

W celu weryfikacji postawionej hipotezy badawczej wyodrębniono następujące cele szczegółowe, które realizowano kolejno w odniesieniu do poszczególnych gatunków roślin leczniczych:

- Wyznaczenie optymalnych stężeń stosowanych substancji dla indukcji metabolizmu wtórnego roślin w zależności od rodzaju elicytora chemicznego.
- 2) Określenie zmian poziomu metabolitów wtórnych w czasie 4-10 dni po aplikacji związków elicytujących w celu wyznaczenia minimalnego czasu wymaganego do ich maksymalnej akumulacji w tkankach.
- Ocena zależności pomiędzy poziomem akumulacji produktów metabolizmu wtórnego, a zmianami fizjologicznymi oraz natężeniem stresu oksydacyjnego w tkankach roślinnych.

## Materiały i metody

#### Przygotowanie roztworów elicytorów

Optymalizacji stężeń wodnych roztworów badanych elicytorów do dalszych eksperymentów dokonano na podstawie dostępnych danych literaturowych oraz wyników przeprowadzonych badań wstępnych. Do doświadczeń wytypowano następujące roztwory: mleczan chitozanu – ChL (stopień deacetylacji: 80-95%; Heppe Medical Chitosan, Niemcy) o stężeniu 100 mg/L, selenin sodu – Se (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> × 5 H<sub>2</sub>O; Fluka, Szwajcaria) o stężeniu 10 mg/L i kwas salicylowy – SA (PoCH, Polska) o stężeniu 150 mg/L. Roztwory przygotowano poprzez rozpuszczenie badanych substancji w wodzie destylowanej. Biorąc pod uwagę ograniczoną penetrację elicytorów przez kutykulę, w przypadku roztworów przeznaczonych do oprysku roślin (P2, P3) wszystkie kombinacje roztworów, w tym także woda destylowana stosowana do oprysku roślin kontrolnych, zostały wzbogacone w środek zmniejszający napięcie powierzchniowe (0,02% Tween®20, Sigma-Aldrich, USA). Roztwory aplikowane doglebowo (P4) przygotowano analogicznie, jednak bez dodatku Tween®20.

#### Uprawa roślin i układy eksperymentalne

#### Melissa officinalis L. (P2)

Nasiona *M. officinalis* (PNOS, Ożarów Mazowiecki) wysiano po 25 sztuk do plastikowych doniczek o pojemności 0,5 L, wypełnionych podłożem uniwersalnym (pH 5,5-6,5; Kronen). Następnie spryskano je wodą destylowaną i pozostawiono do wykiełkowania w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych. Eksperyment prowadzono w klimatyzowanym fitotronie wyposażonym w lampy LED, przy 14 h fotoperiodzie i temperaturze 26°C/22°C (dzień/noc) oraz 60-65% wilgotności względnej. Gęstość strumienia fotonów, na poziomie wierzchołków roślin, wynosiła około 250-300 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Po 3 tygodniach od wysiewu nasion, siewki *M. officinalis* przepikowano tak, aby w każdej z doniczek znajdowało się po 8 roślin o podobnych rozmiarach i cechach morfologicznych.

Po 6 tygodniach od wysiewu nasion rośliny opryskano roztworami testowanych elicytorów. Zastosowano następujące kombinacje doświadczalne, z czterema powtórzeniami w każdej z nich: kontrola (woda destylowana), 100 mg/L ChL, 10 mg/L Se,

150 mg/L SA oraz mieszanina ChL+Se+SA w proporcji 1:1:1. Elicytory aplikowano przy pomocy atomizera, w objętości 10 mL na doniczkę, zapewniającej pełne i równomierne wysycenie blaszek liściowych. Zróżnicowany schemat oprysku zastosowano dwukrotnie w dwudniowym odstępie. Podczas wegetacji rośliny podlewano regularnie wodą wodociągową.

W pozyskanych w 4., 6., 8. i 10. dniu elicytacji próbkach materiału roślinnego przeprowadzono analizy biochemiczne (identyfikacja i analiza ilościowa wybranych metabolitów wtórnych, oznaczenia całkowitej zawartości związków polifenolowych i flawonoidów, poziom peroksydacji lipidów, akumulacja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, zdolność ekstraktów do redukcji rodnika DPPH, aktywność enzymów antyoksydacyjnych), histochemiczne (wizualizacja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i O<sub>2</sub><sup>--</sup> w liściach), fizjologiczne (zawartość barwników fotosyntetycznych, fluorescencja chlorofilu *a*) i biometryczne (sucha masa pędów).

#### Hypericum perforatum L. (P3)

Nasiona *H. perforatum* (PNOS, Ożarów Mazowiecki) wymieszano w plastikowym pojemniku z wilgotnym podłożem w stosunku 1:10 i stratyfikowano przez 9 tygodni w temperaturze 5 °C. Przygotowany w ten sposób materiał umieszczono na tacy do wysiewu nasion i pozostawiono do wykiełkowania w klimatyzowanym fitotronie pod lampami LED o gęstości strumienia fotonów w zakresie 170-200 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Doświadczenie prowadzono przy 16 h fotoperiodzie, temperaturze 25 °C/22 °C (dzień/noc) i 60-65% wilgotności względnej. Po 6 tygodniach od wysiewu nasion, przesadzono po 10 roślin *H. perforatum* do wypełnionych podłożem doniczek o pojemności 0,5 L. Do stratyfikacji, kiełkowania nasion oraz późniejszej uprawy roślin wykorzystano podłoże przygotowane poprzez wymieszanie ziemi uniwersalnej COMPO BIO (pH 6,0; Kronen) z piaskiem w stosunku 3:1.

Po 12 tygodniach od wysiewu nasion dokonano pierwszego oprysku roślin roztworami badanych związków. Wyodrębniono pięć kombinacji doświadczalnych z czterema powtórzeniami każdej z serii: kontrola (woda destylowana), 100 mg/L ChL, 10 mg/L Se, 150 mg/L SA oraz mieszanina ChL+Se+SA w proporcji 1:1:1. Roztwory aplikowano za pomocą atomizera, w objętości 10 mL na doniczkę. Zgodnie ze zróżnicowanym schematem doświadczenia, elicytory stosowano dwukrotnie w trzydniowym odstępie. Podczas wegetacji rośliny podlewano regularnie wodą wodociągową. W pozyskanych w 5., 8. i 10. dniu elicytacji próbkach materiału roślinnego przeprowadzono analizy biochemiczne (identyfikacja i oznaczenie zawartości wybranych metabolitów wtórnych, całkowita zawartość polifenoli i flawonoidów, aktywność antyoksydacyjna ekstraktów, aktywność enzymów antyoksydacyjnych, zawartość wolnej proliny), histochemiczne (wizualizacja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i O<sub>2</sub><sup>--</sup> w liściach), fizjologiczne (zawartość barwników fotosyntetycznych, fluorescencja chlorofilu *a*) i biometryczne (świeża masa pędów).

#### Chelidonium majus L. (P4)

Nasiona *C. majus* (HORTICO S.A.) wysiano po 25 sztuk do plastikowych doniczek o pojemności 0,5 L, wypełnionych podłożem uniwersalnym COMPO BIO (pH 6,0; Kronen), a następnie spryskano wodą destylowaną i pozostawiono do wykiełkowania. Eksperyment prowadzono w klimatyzowanym fitotronie, wyposażonym w lampy LED (gęstość strumienia fotonów na poziomie wierzchołków roślin 170-200 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; temperatura 26/22 °C dzień/noc; wilgotność względna 60-65%), początkowo przy fotoperiodzie 14/10 h, a następnie 16/8 h (dzień/noc). Po 3 tygodniach rośliny przepikowano tak, aby w każdej z doniczek znajdowało się po 8 podobnie rozwiniętych siewek. Podczas kiełkowania nasion i wzrostu roślin regularnie podlewano je odpowiednią objętością wody. Po 5 tygodniach fotoperiod wydłużono do 16 h, a rośliny podlano taką samą objętością pożywki Hoagland'a [Hoagland i Arnon 1950].

Po 10 tygodniach od wysiewu nasion dokonano zróżnicowania doświadczenia. Ze względu na silnie hydrofobową powierzchnię liści *C. majus*, roztwory elicytorów wprowadzono doglebowo w objętości 30 mL na doniczkę. Zastosowano cztery kombinacje eksperymentalne, z czterema powtórzeniami w każdej serii: kontrola (woda destylowana), 100 mg/L ChL, 10 mg/L Se i 150 mg/L SA. Podczas wegetacji rośliny podlewano co 2–3 dni wodą wodociągową.

Pozyskane w 4., 7. i 10. dniu elicytacji próbki materiału roślinnego poddano analizom biochemicznym (identyfikacja i oznaczenie zawartości wybranych alkaloidów, całkowita zawartość związków polifenolowych i flawonoidów, zdolność ekstraktów do redukcji rodnika DPPH, aktywność wybranych enzymów antyoksydacyjnych, zawartość wolnej proliny), histochemicznym (wizualizacja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i O<sub>2</sub><sup>--</sup> w liściach), fizjologicznym (zawartość barwników fotosyntetycznych, fluorescencja chlorofilu *a*) oraz biometrycznym (świeża masa pędów).

## Oznaczenie zawartości wybranych metabolitów wtórnych (P2, P3, P4)

#### Przygotowanie ekstraktów roślinnych do analiz laboratoryjnych

		Terminy		Rodzaj i ilość	Parametry				
Gatunek	Charakterystyka	zbioru	Naważka	rozpuszczalnika	ekstrakcji (rodzaj				
rośliny	surowca	(dzień		użytego do	i charakterystyka)				
		elicytacji)		ekstrakcji					
Melissa	liście, wysuszone	4, 6, 8, 10	50 mg	metanol 80%	Ekstrakcja				
officinalis	do stałej masy			(v/v), 2 mL	ultradźwiękowa				
(P2)	w temperaturze				(Sonic-3,				
	pokojowej;				Polsonic),				
	zmielone				temperatura				
	w młynku				pokojowa, 15 min.				
	laboratoryjnym								
Hypericum	liście, wysuszone	5, 8, 10	200 mg	metanol 80%	Ekstrakcja				
perforatum	do stałej masy			(v/v), 5 mL	ultradźwiękowa				
(P3)	w temperaturze				(Sonic-3,				
	pokojowej;				Polsonic);				
	zmielone				temperatura				
	w porcelanowym				pokojowa, 30 min.				
	moździerzu								
Chelidonium	ziele, wysuszone	4, 7, 10	750 mg	metanol 100%,	Ekstrakcja przy				
majus (P4)	do stałej masy			22 mL	użyciu Accelerated				
	w temperaturze				Solvent Extractor				
	pokojowej;				(Dionex ASE 350,				
	zmielone				Thermo Scientific);				
	w porcelanowym				stalowa komora				
	moździerzu				ekstrakcyjna,				
					temperatura 80 °C,				
					15 min. pod stałym				
					ciśnieniem 1500				
					psi				

Tab. 1. Parametry ekstrakcji badanych surowców roślinnych

#### Analiza jakościowa i ilościowa metabolitów wtórnych (P2, P3, P4)

Ekstrakty z liści *M. officinalis* (P2) analizowano metodą ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej (UHPLC) przy użyciu systemu Infinity Series II, połączonego z detektorem spektrofotometrycznym (DAD) oraz detektorem masowym Agilent 6224 ESI/TOF (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono w temperaturze 30 °C, a szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0,2 mL/min. Szczegółowy opis metody oraz warunków separacji przedstawiono w pracy

Stasińska-Jakubas i in. [2023]. Analiza ilościowa zidentyfikowanych związków została przeprowadzona z wykorzystaniem krzywych kalibracyjnych sporządzonych dla kwasu rozmarynowego, kwasu litospermowego, kwasu salwianolowego A, kwasu kaftarowego i kwasu kawowego (Sigma-Aldrich, USA).

Metabolity wtórne w ekstraktach z liści *H. perforatum* (P3) analizowano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z użyciem systemu VWR Hitachi Elite LaChrom, wyposażonego w detektor diodowy i oprogramowanie EZChrom Elite (Merck, Darmstadt, Niemcy), zgodnie z metodyką opisaną przez Dreslera i in. [2018].

Alkaloidy w ekstraktach *C. majus* (P4) oznaczono zgodnie z metodą opisaną w pracy Wójciak-Kosior i in. [2019], przy użyciu chromatografu VWR Hitachi Chromaster 600 z detektorem spektrofotometrycznym (DAD) oraz oprogramowaniem EZChrom Elite (Merck). Związki w ekstraktach roślinnych identyfikowano przez porównanie ich czasów retencji i widm UV-Vis z odpowiednimi materiałami referencyjnymi. Analizę ilościową przeprowadzono przy następujących długościach fal:  $\lambda$ =288 nm dla protopiny, allokryptopiny i chelidoniny,  $\lambda$ =357 nm dla koptyzyny,  $\lambda$ =327 nm dla sangwinaryny,  $\lambda$ =344 nm dla berberyny oraz  $\lambda$ =268 nm dla chelerytryny.

#### Ogólna zawartość związków fenolowych (P2, P3, P4)

Ogólną zawartość związków fenolowych w badanych ekstraktach roślinnych oznaczono metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem odczynnika Folina-Ciocalteau [Wang i in. 2011]. Do probówek pipetowano po 1,9 mL wody destylowanej, 1 mL odczynnika F-C oraz 50  $\mu$ L badanego ekstraktu. Otrzymaną w ten sposób mieszaninę reakcyjną mieszano przy użyciu mikrowytrząsarki. Po upływie 5 minut dodano 3 mL nasyconego roztworu Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i ponownie wymieszano. Następnie próbki inkubowano przez 30 minut w temperaturze 40 °C. Absorbancję roztworów zmierzono spektrofotometrycznie przy długości fali  $\lambda$ =756 nm (Cecil CE 9500, Cecil Instruments, Cambridge, UK). Ogólną zawartość związków fenolowych odczytano z krzywej standardowej sporządzonej dla kwasu galusowego.

#### Zawartość rozpuszczalnych flawonoli (P2, P3, P4)

Ogólną zawartość flawonoli w ekstraktach oznaczono według uproszczonej metody Christa-Müllera [Farmakopea Polska V, 1999], opartej na ich zdolności do tworzenia kompleksowych połączeń z jonami glinu. Do probówek pipetowano po 450  $\mu$ L 80% metanolu, 750  $\mu$ L 2% AlCl<sub>3</sub> oraz 300  $\mu$ L badanego ekstraktu, a następnie wymieszano przy użyciu mikrowytrząsarki. Roztwory umieszczono w zacienionym miejscu w temperaturze pokojowej. Po upływie 30 minut zmierzono ich absorbancję przy długości fali  $\lambda$ =425 nm (Cecil CE 9500, Cecil Instruments, Cambridge, UK). Koncentrację flawonoli odczytano z krzywej standardowej sporządzonej dla rutyny.

#### Oznaczanie wybranych parametrów statusu oksydacyjnego roślin

#### Poziom peroksydacji lipidów (P2, P3, P4)

Poziom peroksydacji lipidów oszacowano na podstawie stężeń substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS). Do oznaczeń stosowano zmodyfikowaną metodę Heatha i Packera [1968], wykorzystywaną do oceny peroksydacji lipidów błon komórkowych, której produktem ubocznym jest dialdehyd malonowy. Próbki świeżego materiału roślinnego (0,5 g) pobierano w dniu likwidacji eksperymentu (po 10 dniach od pierwszej aplikacji elicytorów), z trzeciej pary liści właściwych licząc od wierzchołka wzrostu (P2, P3) lub ze środkowej części pędu (P4). Próbki rozcierano z 4,5 mL 0,1% kwasu trichlorooctowego (TCA) i wirowano (10 minut, 10 000 rpm). Następnie do 1 mL supernatantu dodawano 4 mL 20% TCA zawierającego 0,5% kwasu tiobarbiturowego (TBA). Aby zapobiec powstawaniu TBARS podczas reakcji, roztwór TCA+TBA wzbogacono butylowanym hydroksytoulenem (BHT). Uzyskane mieszaniny reakcyjne ogrzewano w łaźni wodnej przez 30 minut w temperaturze 95 °C, a następnie szybko schłodzono w lodzie i ponownie zwirowano (10 minut; 10 000 rpm). Absorbancje roztworów zmierzono przy długościach fal  $\lambda$ =532 nm i  $\lambda$ =600 nm (Cecil CE 9500, Cecil Instruments, Cambridge, UK). Stężenie TBARS obliczono na podstawie molowego współczynnika absorbancji kompleksu TBARS-TBA wynoszącego ε=155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

#### Stężenie nadtlenku wodoru (P2, P3, P4)

Zawartość nadtlenku wodoru ( $H_2O_2$ ) w liściach badanych gatunków roślin określono za pomocą metody Jena i Choudhuri [1981]. Próbki świeżego materiału roślinnego (0,25 g) homogenizowano w 3 mL 50 mM buforu fosforanowego o pH 6,5 w temperaturze 4 °C, a następnie wirowano (30 minut; 6 000 rpm). W celu przygotowania mieszaniny reakcyjnej, do probówek pipetowano po 1,5 mL supernatantu i 0,5 mL 0,1% ditlenku tytanu (TiO<sub>2</sub>) w 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i ponownie wirowano (15 minut; 6 000 rpm). Intensywność żółtego zabarwienia supernatantu zmierzono spektrofotometrycznie przy długości fali  $\lambda$ =410 nm (Cecil CE 9500, Cecil Instruments, Cambridge, UK). Stężenie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obliczono uwzględniając jego molowy współczynnik absorbancji ( $\epsilon$ =0,28  $\mu$ M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

#### Aktywność enzymów antyoksydacyjnych (P2, P3, P4)

Próbki świeżego materiału roślinnego (250 mg) pobierano z trzeciej i czwartej pary liści właściwych licząc od wierzchołka wzrostu (P2, P3) lub ze środkowej części pędu (P4). Próbki homogenizowano w 0,05 M buforze fosforanowym o pH 7,0 (oznaczenie aktywności katalazy (CAT) i peroksydazy gwajakolowej (GPOX)) lub w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 6,0 zawierającym kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA), poliwinylopirolidon (PVP) oraz askorbinian sodu (oznaczanie aktywności peroksydazy askorbinianowej (APOX)). Otrzymane supernatanty wirowano przy prędkości 10 000 rpm (10 minut, 4 °C). Aktywność enzymów oznaczono spektrofotometrycznie (Cecil CE 9500, Cecil Instruments, Cambridge, UK). Do pomiaru aktywności CAT wykorzystano metodę Golan i in. [2013]. Absorbancję próbek mierzono przy długości fali  $\lambda$ =240 nm, a aktywność CAT obliczano wykorzystując molowy współczynnik absorbancji (E=0,036 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Aktywność GPOX określono na podstawie zmodyfikowanej metody Małolepszej i in. [1994]. Absorbancję próbek odczytywano przy długości fali  $\lambda$ =480 nm przez 4 minuty w odstępach 1-minutowych. Aktywność APOX oznaczono metodą opracowaną przez Nakano i Asada [1981]. Utlenianie askorbinianu mierzono przy długości fali  $\lambda$ =290 nm przez 5 minut w odstępach 1-minutowych.

#### Wizualizacja reaktywnych form tlenu w tkankach liści (P2, P3)

Histochemicznej detekcji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i O<sub>2</sub><sup>-•</sup> dokonano z wykorzystaniem metody Kumar i in. [2014] przy użyciu odpowiednio 3,3'-diaminobenzydyny (DAB) i błękitu nitrotetrazoliowego (NBT). Roztwory do barwienia przygotowywano bezpośrednio przed ich wykorzystaniem. DAB (1mg/mL) rozpuszczano w wodzie destylowanej przy pH 3,8 na mieszadle magnetycznym aż do uzyskania klarownego roztworu. Z kolei 0,2% roztwór NBT uzyskano rozpuszczając NBT w 50 mM buforze fosforanowym (pH 7,5). Całe liście delikatnie pobierano z trzeciej lub czwartej pary liści właściwych licząc od wierzchołka wzrostu (P2, P3) lub ze środkowej części pędu (P4). Następnie umieszczano je na szalkach Petri'ego z roztworami barwiącymi i pozostawiono w ciemności na minimum 24 godziny w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu, liście wypłukano i usunięto z nich chlorofil zanurzając w 96% gorącym etanolu. Reaktywne formy tlenu zidentyfikowano na podstawie charakterystycznego dla poszczególnych reakcji zabarwienia – w pozbawionych chlorofilu tkankach  $H_2O_2$  widoczny jest w postaci brązowych przebarwień powstałych w wyniku jego reakcji z DAB, natomiast NBT w reakcji z  $O_2^{--}$  ulega redukcji tworząc nierozpuszczalny formazan o ciemnoniebieskiej barwie.

#### Aktywność antyoksydacyjna metodą redukcji rodnika DPPH (P2, P3, P4)

Aktywność antyoksydacyjną ekstraktów roślinnych określono metodą redukcji W DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl). syntetycznego rodnika tym celu do kuwet spektrofotometrycznych pipetowano po 2 mL 200 µM roztworu DPPH w metanolu oraz 15 µL (P2), 50 µL (P3) lub 100 µL (P4) badanego ekstraktu metanolowego i wymieszano. Zróżnicowana objętość ekstraktów umożliwiła uchwycenie różnic w ich zdolności do redukcji DPPH. Równolegle przygotowano próbę kontrolną (A0), w której wyciąg roślinny zastąpiono taką samą objętością 80% (P2, P3) lub 100% (P4) metanolu. Po 15 minutach od dodania ekstraktu dokonano pomiaru absorbancji roztworów przy długości fali λ=517 nm (Cecil CE 9500, Cecil Instruments, Cambridge, UK). Zdolność ekstraktów do redukcji DPPH obliczono według następującego wzoru [Molyneux 2004]:

% redukcji DPPH =  $100 \times (A_0 - A_{15}) / A_0$ 

gdzie:

 $A_0$  – wartość absorbancji próby kontrolnej  $A_{15}$  – wartość absorbancji po 15 minutach od dodania próby badanej

#### Oznaczanie parametrów biometrycznych i fizjologicznych

#### Sucha (P2) i świeża (P3, P4) masa pędów

W dniu likwidacji eksperymentu zebrano po trzy pędy melisy lekarskiej z każdej z doniczek (9 roślin z każdej serii) i wysuszono je w temperaturze pokojowej. Następnie określono ich masę przy pomocy wagi laboratoryjnej. Wyniki wyrażono w gramach na roślinę (P2). Świeżą masę pędów dziurawca i glistnika jaskółcze ziele określono w dniu likwidacji eksperymentu. Pędy roślin w każdej z doniczek odcięto kilka milimetrów nad powierzchnią podłoża i zważono. Wyniki wyrażono w gramach na doniczkę (P3) lub w gramach na roślinę (P4).

#### Wybrane parametry fluorescencji chlorofilu a (P2, P3, P4)

Wskaźniki fluorescencji chlorofilu *a* mierzono z wykorzystaniem przenośnego fluorymetru Handy-PEA (Hansatech Instruments, Japan). Oznaczono następujące parametry:  $F_0$  – fluorescencję minimalną,  $F_m$  – fluorescencję maksymalną oraz  $F_v/F_m$  – stosunek fluorescencji zmiennej do fluorescencji maksymalnej, uważany za nieinwazyjny i najbardziej wiarygodny wskaźnik maksymalnej wydajności kwantowej fotosystemu PSII po adaptacji w ciemności [Murchie i Lawson 2013]. Fragmenty blaszek liściowych zaciemniano przy pomocy specjalnych klipsów. Po upływie 15 minut dokonywano pomiaru i odczytu analizowanych wartości.

#### Zawartość barwników fotosyntetycznych (P2, P3, P4)

Zawartość barwników fotosyntetycznych (chlorofilu *a* i *b* oraz karotenoidów) oznaczono metodą Lichtenthaler i Wellburn [1983]. Materiał roślinny do analiz pobierano z trzeciej pary liści licząc od wierzchołka wzrostu (P2, P3) lub ze środkowej części pędu (P4) i ważono. W celu ekstrakcji barwników, próby rozcierano w moździerzu z dodatkiem 80% acetonu. Powstały homogenat przenoszono ilościowo na sączek sprzężony z pompą próżniową, a następnie przemywano niewielkimi ilościami acetonu. Otrzymany ekstrakt przenoszono do kolb miarowych i uzupełniano roztworem acetonu do objętości 25 mL. Absorbancję badanych roztworów mierzono przy trzech długościach fal:  $\lambda$ =663 nm,  $\lambda$ =646 nm oraz  $\lambda$ =470 nm (Cecil CE 9500, Cecil Instruments, Cambridge, UK). Stężenie poszczególnych barwników fotosyntetycznych wyliczono na podstawie poniższych wzorów, a następnie przeliczono na mg g<sup>-1</sup> świeżej masy liści:

C chlorofil a =  $((12,21 \times A_{663} - 2,81 \times A_{646}) \times 25) / (m \times 1000)$ 

C chlorofil b =  $((20,13 \times A_{646} - 5,03 \times A_{663}) \times 25) / (m \times 1000)$ 

 $C_{karotenoidy} = ((1000 \times A_{470} - 3,27 \times C_{chlorofil a} - 104 \times C_{chlorofil b}) / 227) / (m \times 1000)$ 

gdzie:

A – absorbancja roztworu przy danej długości fali m – masa próbki wyrażona w gramach

#### Akumulacja wolnej proliny (P3, P4)

Zawartość proliny w liściach *H. perforatum* i *C. majus* oznaczono standardową metodą Bates i in. [1973]. Około 0,5 g materiału roślinnego homogenizowano w 10 mL 3% wodnego roztworu kwasu sulfosalicylowego, a homogenat przesączono przez sączki jakościowe Whatman'a (typ 42). Do probówek pipetowano po 2 mL przesączu, 2 mL kwaśnej ninhydryny i 2 mL lodowatego kwasu octowego, a następnie umieszczono w łaźni wodnej w temperaturze 100 °C. Po godzinie reakcję zatrzymano poprzez schłodzenie probówek. Następnie mieszaninę reakcyjną ekstrahowano z 4 mL toluenu intensywnie mieszając. Fazę toluenową oddzielano od fazy wodnej i odczytano jej absorbancję przy długości fali  $\lambda$ =520 nm. Stężenie proliny obliczono na podstawie krzywej standardowej sporządzonej dla czystej proliny i przeliczono na świeżą masę.

## Analiza statystyczna (P2, P3, P4)

Eksperymenty przeprowadzono w całkowicie losowym układzie. Wyniki dotyczące stężeń metabolitów i aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów z liści *M. officinalis* i *H. perforatum* (P2, P3) poddano dwuczynnikowej analizie wariancji (ANOVA), w której głównymi czynnikami były rodzaj elicytora i czas jego oddziaływania. Wyniki analizy statystycznej tych danych przedstawiają wpływ czynników głównych oraz zachodzące pomiędzy nimi interakcje. Pozostałe dane, dotyczące parametrów biometryczno-fizjologicznych poddano jednoczynnikowej analizie wariancji, aby ocenić jedynie reakcje roślin na zastosowanie elicytorów w dniu likwidacji eksperymentu. Istotność różnic oceniono przy użyciu testu Tukeya przy p < 0,05. Wszystkie dane liczbowe z analizi laboratoryjnych przeprowadzonych na *C. majus* (P4) poddano jednoczynnikowej analizie wariancji (ANOVA) i analizie post hoc przy użyciu testu NIR Fischer'a przy p < 0,05, aby bezpośrednio ocenić reakcję roślin na zastosowane elicytory.

Do analizy statystycznej danych wykorzystano oprogramowanie Statistica ver. 13.3 (TIBCO Software Inc. 2017, USA) (P2, P3, P4). Wartości procentowe znormalizowano za pomocą transformacji kątowej Blissa przed dokonaniem analizy wariancji (P2, P3, P4). Mapę cieplną stworzono przy użyciu programu Microsoft Excel (2010) na podstawie danych standaryzowanych (P2).

## Omówienie wyników

# Metabolity wtórne zidentyfikowane w ekstraktach z badanych gatunków roślin leczniczych

W metanolowych ekstraktach roślinnych zidentyfikowano i oznaczono zawartość poszczególnych związków należących do różnych klas metabolitów, charakterystycznych dla składu chemicznego badanych gatunków roślin (Tab. 2).

Tab. 2. Metabolity wtórne zidentyfikowane w ekstraktach metanolowych z liści M. offic	inalis
i H. perforatum oraz z ziela C. majus	

Melisa lekarska (Melissa officinalis L.) (P2)													
Kwasy fenolowe	kwas rozmarynowy glukozyd kwasu rozmarynowego kwas litospermowy kwas salwianolowy pochodna kwasu salwianolowego C kwas kaftarowy glukozyd kwasu kaftarowego kwas kawowy	HO +											
Dziurawiec zwyczajny ( <i>Hypericum perforatum</i> L.) (P3)													
Flawonoidy	epikatechina hiperozyd rutozyd izokwercetyna kwercetyna (dwie niezidentyfikowane pochodne k	он носсетупу)											
Kwasy fenolowe	kwas chlorogenowy	HO OH OH											
Naftodiantrony	hiperycyna pseudohiperycyna												
Floroglucynole	hiperforyna	он он hiperycyna											
	Glistnik jaskółcze ziele ( <i>Chelidonium n</i>	ıajus L.) (P4)											
Alkaloidy izochinolinowe	koptyzyna chelidonina protopina berberyna allokryptopina chelerytryna	$ \begin{array}{c} \begin{array}{c} \begin{array}{c} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \\ \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \\ \\ \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \\ \\ \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \\ \\ \\ \\ \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \\ \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \\ \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \\ \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \\ \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \\ \\ \end{array} $											

# Zmiany zawartości metabolitów wtórnych pod wpływem elicytorów w badanych gatunkach roślin leczniczych

Biorac pod uwagę udział metabolitów fenolowych w składzie chemicznym surowca M. officinalis (P2), oceny efektywności dolistnej aplikacji badanych substancji (150 mg/L ChL, 10 mg/L Se, 100 mg/L SA; mieszanina ChL+Se+SA w proporcji 1:1:1) z uwzględnieniem czasu ich oddziaływania (4., 6., 8., 10. dzień) dokonano głównie w oparciu o zmiany całkowitego steżenia zwiazków (poli)fenolowych i rozpuszczalnych flawonoli oraz ośmiu zidentyfikowanych kwasów fenolowych. Zawartość oznaczonych metabolitów w ekstraktach z liści melisy zmieniała się w zależności od rodzaju elicytora oraz czasu jego oddziaływania (Rys. 1; Tab. 3). ChL i SA na ogół charakteryzowały się większą efektywnością w stymulowaniu biosyntezy zidentyfikowanych związków niż Se, a mieszanina ChL+Se+SA z reguły nie powodowała istotnych zmian ich zawartości. Niezależnie od rodzaju elicytora najwyższe stężenia metabolitów fenolowych notowano przeważnie w 8. dniu elicytacji. Największą efektywność w indukcji biosyntezy związków (poli)fenolowych ogółem, w odniesieniu do roślin kontrolnych, stwierdzono po 6 i 10 dniach od pierwszej aplikacji SA - ich zawartość wzrosła wówczas o odpowiednio 80% i 40% (Rys. 1A). Również w tych samych terminach po aplikacji Se obserwowano 46% i 48% wzrost ogólnej zawartości związków (poli)fenolowych. Ich stężenie zwiększyło się jedynie o 36% po 10 dniach od zastosowania ChL. Testowane elicytory w mniejszym stopniu wpływały na akumulację rozpuszczalnych flawonoli, a analiza statystyczna interakcji pomiędzy badanymi czynnikami wykazała istotny wzrost ich zawartości (o 37-61% w porównaniu z kontrolą) jedynie w 10. dniu eksperymentu (Rys. 1B).



**Rys. 1.** Wpływ dolistnej aplikacji elicytorów (ChL – mleczan chitozanu; Se – selenin sodu; SA – kwas salicylowy; ChL+Se+SA – mieszanina elicytorów) na całkowitą zawartość związków (poli)fenolowych (A) i rozpuszczalnych flawonoli (B) w liściach *M. officinalis* w 4., 6., 8. i 10. dniu elicytacji. Wartości średnie ( $\pm$  odchylenie standardowe; n = 3) oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie (p < 0,05). Istotne różnice dla czynników głównych (typ elicytora oraz długość procesu elicytacji) oznaczono analogicznie wielkimi literami. GAE – ekwiwalent kwasu galusowego; RUE – ekwiwalent rutyny.

W ekstraktach z liści M. officinalis zidentyfikowano i oznaczono ilościowo osiem metabolitów fenolowych, wśród których dominowały pochodne kwasu hydroksycynamonowego – kwas rozmarynowy (14,57–23,21 mg g<sup>-1</sup> s.m.) i litospermowy (10,00-19,20 mg g<sup>-1</sup> s.m.) (Tab. 3). Wydłużenie czasu ekspozycji roślin na działanie elicytorów wpływało korzystnie na akumulację kwasu rozmarynowego – po 10 dniach od zastosowania ChL, Se i SA jego stężenie wzrosło o odpowiednio 120%, 92% i 107% odniesieniu do roślin kontrolnych. Stężenie heksozydu kwasu rozmarynowego W w badanych ekstraktach było znacznie niższe, jednak wzrastało nawet kilkukrotnie pod wpływem elicytacji. W pierwszych dniach po zastosowaniu SA odnotowano aż 9–10 razy większą zawartość tego metabolitu w porównaniu z kontrolą. Z kolei akumulacja kwasu

litospermowego była najefektywniej stymulowana po 8 dniach od pierwszej aplikacji Se oraz mieszaniny elicytorów, wzrastając o odpowiednio 40% i 52%. Najwyższe stężenia kwasu salwianolowego odnotowano po zastosowaniu ChL – w 10. dniu eksperymentu jego poziom w odniesieniu do roślin kontrolnych wzrósł aż o 150%, a w 6. i 8. dniu odpowiednio o 66% i 41%. Pozostałe elicytory lub ich mieszanina charakteryzowały się niższą skutecznością – istotny wzrost stężenia kwasu salwianolowego stwierdzono jedynie w 10. dniu elicytacji pod wpływem Se i SA (wzrost o 60% i 73%). Pozostałe ze zidentyfikowanych kwasów fenolowych występowały w znacznie mniejszych ilościach, a ich poziom ulegał mniejszym wahaniom pod wpływem testowanych związków. ChL i SA powodowały największe zmiany w akumulacji kwasu kaftarowego i jego heksozydu, których stężenie wzrosło o około 100-150% w porównaniu z kontrolą. Z kolei zawartość kwasu kawowego w najmniejszym stopniu wahała się pod wpływem zastosowanych elicytorów, a podwyższoną akumulację tego metabolitu obserwowano jedynie w roślinach traktowanych ChL+Se+SA w 4. dniu elicytacji (Tab. 3).

**Tab. 3.** Wpływ dolistnej aplikacji elicytorów (ChL – mleczan chitozanu; Se – selenin sodu; SA – kwas salicylowy; ChL+Se+SA – mieszanina elicytorów) na zawartość kwasów fenolowych w liściach *M. officinalis* w 4., 6., 8. i 10. dniu elicytacji. Wartości średnie ( $\pm$  odchylenie standardowe; n = 3) oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie (p < 0,05). Kolorem zielonym wyróżniono komórki z wartościami średnimi dla związków, które wykazywały najwyższy stopień indukcji pod wpływem elicytorów.

	Melissa officinalis L. (P2)																				
4. dzień 6. dzień 8											8. dzień			10. dzień							
K	vasy fenolowe	Kontrola	ChL	Se	SA	ChL +Se +SA	Kontrola	ChL	Se	SA	ChL +Se +SA	Kontrola	ChL	Se	SA	ChL +Se +SA	Kontrola	ChL	Se	SA	ChL +Se +SA
	kwas rozmarynowy	27,2 <sup>d-f</sup>	30,9 <sup>de</sup>	29,5 <sup>d-f</sup>	30,6 <sup>de</sup>	31,0 <sup>de</sup>	29,9 <sup>d-f</sup>	44,7 <sup>ab</sup>	31,7 <sup>cd</sup>	46,5 <sup>ab</sup>	30,4 <sup>de</sup>	34,8 <sup>cd</sup>	48,6 <sup>a</sup>	39,5 <sup>bc</sup>	47,4 <sup>ab</sup>	33,3 <sup>cd</sup>	21,9 <sup>f</sup>	48,1 <sup>a</sup>	42,00 <sup>ab</sup>	45,3 <sup>ab</sup>	18,3 <sup>d-f</sup>
s.m.	heksozyd kwasu rozmarynowego	0,47 <sup>g</sup>	3,21 <sup>de</sup>	1,74 <sup>fg</sup>	4,30 <sup>cd</sup>	0,59 <sup>g</sup>	0,58 <sup>g</sup>	3,99 <sup>de</sup>	2,07 <sup>fg</sup>	6,23 <sup>cd</sup>	0,41 <sup>g</sup>	1,85 <sup>fg</sup>	7,81 <sup>a</sup>	4,77 <sup>bc</sup>	5,08 bc	1,41 <sup>fg</sup>	0,32 <sup>g</sup>	2,62 <sup>ef</sup>	1,74 <sup>fg</sup>	1,46 <sup>fg</sup>	0,70 <sup>g</sup>
mg gʻ	kwas litospermowy	15,4 <sup>bc</sup>	14,4 <sup>bc</sup>	10,0 <sup>c</sup>	11,3 °	13,1 bc	14,9 bc	22,1 <sup>a</sup>	18,0 <sup>ab</sup>	18,8 <sup>ab</sup>	12,5 °	12,6 <sup>c</sup>	17,0 <sup>ab</sup>	19,2 <sup>ab</sup>	15,5 bc	17,5 <sup>ab</sup>	12,1 <sup>c</sup>	16,7 <sup>ab</sup>	14,4 <sup>bc</sup>	12,5 °	11,7 <sup>c</sup>
	kwas salwianolowy A	1,7 <sup>cd</sup>	1,8 <sup>c</sup>	1,2 <sup>d</sup>	1,8 <sup>cd</sup>	1,8 <sup>cd</sup>	1,8 <sup>cd</sup>	2,9 <sup>a</sup>	1,9 <sup>c</sup>	2,3 <sup>ab</sup>	1,8 <sup>cd</sup>	1,9 <sup>c</sup>	2,7 <sup>ab</sup>	2,1 <sup>bc</sup>	2,1 <sup>bc</sup>	2,0 <sup>c</sup>	1,1 <sup>d</sup>	2,9 <sup>a</sup>	1,8 °	2,0 <sup>c</sup>	1,3 <sup>d</sup>
µg g <sup>4</sup> s.m.	pochodna kwasu salwianolowego C	0,82 <sup>cd</sup>	0,80 <sup>cd</sup>	0,46 <sup>e</sup>	0,70 <sup>de</sup>	1,01 bc	0,82 <sup>c-e</sup>	1,11 <sup>bc</sup>	1,28 <sup>ab</sup>	1,23 <sup>ab</sup>	0,59 <sup>de</sup>	0,83 <sup>cd</sup>	0,69 <sup>de</sup>	1,18 <sup>ab</sup>	1,48 <sup>a</sup>	1,48 <sup>a</sup>	0,61 <sup>de</sup>	0,66 <sup>de</sup>	0,74 <sup>c-e</sup>	0,96 <sup>b-d</sup>	1,27 <sup>ab</sup>
	kwas kaftarowy	70,3 <sup>ef</sup>	78,7 <sup>de</sup>	47,44 <sup>f</sup>	50,86 <sup>f</sup>	92,11 de	98,50 <sup>de</sup>	142,23 <sup>ab</sup>	105,17 <sup>cd</sup>	136,98 <sup>bc</sup>	80,58 <sup>de</sup>	72,39 <sup>ef</sup>	172,07 <sup>a</sup>	137,92 <sup>bc</sup>	142,91 <sup>ab</sup>	128,57 <sup>bc</sup>	48,45 <sup>f</sup>	108,95 <sup>cd</sup>	108,63 <sup>cd</sup>	64,30 <sup>ef</sup>	76,67 <sup>de</sup>
	heksozydu kwasu kaftarowego	80,2 <sup>cd</sup>	70,2 <sup>cd</sup>	71,3 <sup>cd</sup>	63,7 <sup>de</sup>	84,7 <sup>cd</sup>	91,7 <sup>bc</sup>	113,1 <sup>ab</sup>	99,6 <sup>bc</sup>	135,6 <sup>a</sup>	86,0 <sup>cd</sup>	86,7 <sup>cd</sup>	134,1 <sup>a</sup>	95,6 <sup>bc</sup>	124,8 <sup>a</sup>	96,0 <sup>bc</sup>	57,9 <sup>de</sup>	118,2 <sup>ab</sup>	89,0 <sup>cd</sup>	99,6 <sup>bc</sup>	73,0 <sup>cd</sup>
	kwas kawowy	42,9 <sup>b</sup>	35,5 <sup>bc</sup>	31,9 <sup>bc</sup>	24,5 °	63,1 <sup>a</sup>	37,2 <sup>bc</sup>	40,8 <sup>bc</sup>	35,0 <sup>bc</sup>	42,4 <sup>b</sup>	48,8 <sup>ab</sup>	40,8 <sup>bc</sup>	40,3 <sup>bc</sup>	34,1 <sup>bc</sup>	40,2 <sup>bc</sup>	43,8 <sup>b</sup>	38,7 <sup>bc</sup>	38,5 <sup>bc</sup>	34,9 <sup>bc</sup>	42,0 <sup>bc</sup>	44,5 <sup>b</sup>

Badania dotyczące wpływu modulatorów metabolicznych (150 mg/L ChL, 10 mg/L Se, 100 mg/L SA, mieszaniny ChL+Se+SA w proporcji 1:1:1) na metabolizm wtórny H. perforatum, na podstawie których przygotowano drugą publikację oryginalną (P3), wskazują na ich niejednoznaczne oddziaływanie. Całkowita zawartość związków (poli)fenolowych w ekstraktach zmieniała się w zależności od długości ekspozycji roślin na dolistne działanie elicytorów (5., 8. lub 10. dzień), a najwyższe stężenia (poli)fenoli we wszystkich grupach doświadczalnych, z wyjątkiem ChL+Se+SA, odnotowano w 10. dniu eksperymentu (Rys. 2A). W tym terminie stwierdzono także największą związków, aktywność elicytacyjną testowanych а najwyższą skutecznością charakteryzował się roztwór Se – po jego zastosowaniu zawartość (poli)fenoli ogółem wzrosła o 23% w odniesieniu do roślin kontrolnych. Aplikacja SA i ChL również skutkowała odpowiednio 16% i 12% wzrostem stężenia tych związków. Podobną tendencję obserwowano w 5. dniu elicytacji – po oprysku roślin Se i SA całkowita zawartość (poli)fenoli w liściach dziurawca wzrosła o 19% i 12%. Jednak zastosowanie mieszaniny ChL+Se+SA skutkowało z reguły obniżeniem poziomu tych związków. Wyjątek stanowił 8. dzień elicytacji – wówczas całkowite stężenie związków fenolowych było o 12% większe niż w roślinach kontrolnych. Z kolei najwyższe stężenia rozpuszczalnych flawonoli odnotowano w 5. dniu eksperymentu (Rys. 2B). Ich akumulacja była wówczas najwyższa w roślinach kontrolnych i traktowanych roztworem Se (około 27 mg RUE g<sup>-1</sup> s.m.), ale ulegała wyraźnej redukcji pod wpływem ChL+Se+SA. Aplikowanie ChL najefektywniej stymulowało biosyntezę rozpuszczalnych flawonoli, ale tylko w 10. dniu elicytacji (Rys. 2B).



**Rys. 2.** Wpływ dolistnej aplikacji elicytorów (ChL – mleczan chitozanu; Se – selenin sodu; SA – kwas salicylowy; ChL+Se+SA – mieszanina elicytorów) na całkowitą zawartość związków (poli)fenolowych (A) i rozpuszczalnych flawonoli (B) w liściach *H. perforatum* w 5., 8. i 10. dniu elicytacji. Wartości średnie ( $\pm$  odchylenie standardowe; n = 3) oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie (p < 0,05). Istotne różnice dla czynników głównych oznaczono w ten sam sposób wielkimi literami. GAE – ekwiwalent kwasu galusowego; RUE – ekwiwalent rutyny.

Zawartość zidentyfikowanych metabolitów wtórnych w ekstraktach z liści *H. perforatum* zmieniała się zarówno w zależności od rodzaju elicytora, jak i czasu jego oddziaływania (Tab. 4). Ponownie, największą efektywnością charakteryzowały się z reguły roztwory pojedynczych elicytorów, a największe zmiany analizowanych parametrów obserwowano wraz z wydłużeniem czasu ekspozycji roślin na ich działanie, szczególnie w 10. dniu eksperymentu. Głównymi komponentami ekstraktów metanolowych były flawonoidy, a dominującym w tej grupie składnikiem była epikatechina, choć jej zawartość z reguły nie zmieniała się istotne pod wpływem elicytorów. Największy wzrost jej stężenia (o 20-21% w odniesieniu do roślin kontrolnych) odnotowano po 10 dniach od pierwszej aplikacji Se i SA. Z kolei zawartość kwercetyny we wszystkich grupach eksperymentalnych utrzymywała się na wysokim
poziomie w 5. dniu eksperymentu. Roztwory pojedynczych substancji w podobnym stopniu wpływały na zwiększenie stężenia tego metabolitu po 10 dniach od oprysku – porównując z odpowiednią kontrolą, zawartość kwercetyny wzrosła o ok. 48% po zastosowaniu ChL i SA oraz o 41% pod wpływem Se. Stężenie izokwercytryny nie zmieniało się istotnie pod wpływem elicytorów z wyjątkiem Se – po 5 dniach od jego zastosowania zawartość tego flawonoidu wzrosła o 83% w odniesieniu do kontroli. Dolistna aplikacja pojedynczych elicytorów powodowała również istotne zmiany stężenia rutozydu – po 10 dniach od zastosowania ChL i SA jego zawartość podwyższyła się o odpowiednio 50% i 58% w porównaniu z kontrolą. W tym terminie nieznacznie mniejszą skuteczność odnotowano w przypadku Se (wzrost o 36%). Podobne zmiany obserwowano w zawartości hiperozydu – po 10 dniach od zastosowania SA stężenie tego metabolitu wzrosło o 40%. W tym samym czasie roztwory ChL i Se charakteryzowały się mniejszą efektywnością, a po ich aplikacji zawartość hiperozydu w liściach dziurawca wzrosła o ok. 29% w porównaniu z kontrolą. Zastosowanie ChL+Se+SA powodowało na ogół znaczącą redukcję stężenia tego flawonoidu, szczególnie po 5 dniach elicytacji.

Chociaż wśród oznaczonych metabolitów wtórnych dominującym pod względem ilościowym był kwas neochlorogenowy, jego stężenie na ogół nie zmieniało się pod wpływem elicytorów. Istotny wzrost akumulacji tego fenolokwasu odnotowano jedynie po 5 dniach od pierwszej aplikacji Se i SA – jego zawartość podwyższyła się o odpowiednio 51% i 41% w odniesieniu do kontroli. Stężenie naftodiantronów w ekstraktach było znacznie niższe oraz w większym stopniu zależne od rodzaju zastosowanego elicytora niż czasu jego oddziaływania. Najwyższy poziom hiperycyny i pseudohiperycyny stwierdzono w roślinach kontrolnych w 5. dniu trwania eksperymentu. Pod wpływem badanych elicytorów akumulacja hiperycyny wykazywała jednak tendencję spadkową - jej zawartość po 5 dniach od oprysku ChL+Se+SA była aż czterokrotnie niższa niż w roślinach kontrolnych. Pojedyncze modulatory metaboliczne również powodowały istotny spadek jej stężenia o 38%, 30% i 21% po oprysku odpowiednio SA, ChL i Se. W kolejnych dniach eksperymentu zawartość hiperycyny ulegała podwyższeniu, szczególnie pod wpływem Se i SA. Jednak jej stężenie w odniesieniu do odpowiedniej kontroli znacząco wzrosło (o 69%) dopiero po 8 dniach od oprysku SA. Podobne tendencje obserwowano w przypadku pseudohiperycyny – najwyższą jej akumulację odnotowano w 5 dniu elicytacji w liściach roślin kontrolnych oraz traktowanych Se. Aplikacja pozostałych elicytorów z reguły nieznacznie redukowała poziom tego związku (Tab. 4).

**Tab. 4.** Wpływ dolistnej aplikacji elicytorów (ChL – mleczan chitozanu; Se – selenin sodu; SA – kwas salicylowy; ChL+Se+SA – mieszanina elicytorów) na zawartość wybranych metabolitów wtórnych w liściach *H. perforatum* w 5., 8. i 10. dniu elicytacji. Wartości średnie ( $\pm$  odchylenie standardowe; n = 3) oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie (p < 0,05). Kolorem zielonym wyróżniono komórki z wartościami średnimi dla związków, które wykazywały najwyższy stopień indukcji pod wpływem elicytorów.

Hypericum perforatum L. (P3)																
		5. dzień					8. dzień					10. dzień				
		Kontrola	ChL	Se	SA	ChL +Se +SA	Kontrola	ChL	Se	SA	ChL +Se +SA	Kontrola	ChL	Se	SA	ChL +Se +SA
	epikatechina	2,53 <sup>fg</sup>	2,84 <sup>e-g</sup>	4,94 <sup>ab</sup>	3,62 <sup>d-f</sup>	2,12 <sup>g</sup>	2,93 <sup>e-g</sup>	3,06 <sup>d-g</sup>	3,27 <sup>c-g</sup>	3,82 <sup>b-e</sup>	3,06 <sup>d-g</sup>	4,31 <sup>a-c</sup>	4,16 <sup>a-d</sup>	5,19 <sup>a</sup>	5,23 <sup>a</sup>	3,46 <sup>c-f</sup>
_	hiperozyd	1,84 <sup>b-d</sup>	1,55 <sup>de</sup>	1,79 <sup>a-c</sup>	1,57 <sup>de</sup>	0,96 <sup>f</sup>	0,91 <sup>ef</sup>	1,15 <sup>de</sup>	1,16 <sup>de</sup>	1,39 <sup>b-d</sup>	1,21 <sup>de</sup>	1,26 <sup>c-e</sup>	1,63 <sup>ab</sup>	1,63 <sup>ab</sup>	1,76 <sup>a</sup>	1,24 <sup>de</sup>
g' <sup>1</sup> s.m.	rutozyd	1,84 bc	1,55 <sup>cd</sup>	1,79 <sup>bc</sup>	1,57 <sup>cd</sup>	0,96 <sup>e</sup>	1,22 <sup>de</sup>	1,59 <sup>cd</sup>	1,64 <sup>b-d</sup>	1,80 <sup>bc</sup>	1,56 <sup>cd</sup>	1,58 <sup>cd</sup>	2,38 <sup>a</sup>	2,16 <sup>ab</sup>	2,50 <sup>a</sup>	1,84 <sup>bc</sup>
idy [mg	izokwercetyna	0,41 <sup>b</sup>	0,44 <sup>b</sup>	0,75 <sup>a</sup>	0,45 <sup>b</sup>	0,36 <sup>b</sup>	0,37 <sup>b</sup>	0,50 <sup>b</sup>	0,39 <sup>b</sup>	0,39 <sup>b</sup>	0,41 <sup>b</sup>	0,41 <sup>b</sup>	0,45 <sup>b</sup>	0,47 <sup>b</sup>	0,46 <sup>b</sup>	0,50 <sup>b</sup>
lawono	kwercetyna	2,51 <sup>ab</sup>	2,27 <sup>a-d</sup>	2,73 <sup>a</sup>	2,39 <sup>a-c</sup>	1,22 <sup>e</sup>	1,58 ef	2,03 <sup>b-e</sup>	1,72 <sup>d-f</sup>	2,11 <sup>b-e</sup>	1,68 <sup>d-f</sup>	1,85 <sup>c-e</sup>	2,60 <sup>ab</sup>	2,45 <sup>ab</sup>	2,59 <sup>ab</sup>	1,65 <sup>d-f</sup>
-	pochodna kwercetyny 1	1,98 <sup>a</sup>	1,61 <sup>a-d</sup>	1,78 <sup>ab</sup>	1,48 <sup>a-e</sup>	0,88 <sup>f</sup>	1,24 <sup>c-f</sup>	1,13 <sup>d-f</sup>	1,23 <sup>c-f</sup>	1,69 <sup>a-c</sup>	1,52 <sup>a-e</sup>	1,55 <sup>a-e</sup>	1,79 <sup>ab</sup>	1,67 <sup>a-c</sup>	1,04 ef	1,35 <sup>b-f</sup>
	pochodna kwercetyny 2	0,02 <sup>b</sup>	0,08 <sup>b</sup>	0,15 <sup>a</sup>	0,05 <sup>bc</sup>	0,02 <sup>d</sup>	0,11 <sup>b-d</sup>	0,09 <sup>b</sup>	0,05 <sup>cd</sup>	0,02 <sup>b-d</sup>	0,04 <sup>b-d</sup>	0,15 <sup>b-d</sup>	0,06 <sup>bc</sup>	0,10 bc	0,09 <sup>b-d</sup>	0,19 bc
Kwasy fenolowe [mg g <sup>-1</sup> s.m.]	kwas neochlorogenowy	5,88 <sup>c-e</sup>	5,78 <sup>c-e</sup>	8,83 <sup>a</sup>	8,27 <sup>ab</sup>	4,35 <sup>e</sup>	5,83 <sup>c</sup>	6,61 <sup>b-d</sup>	4,87 <sup>de</sup>	8,27 <sup>c-e</sup>	5,42 <sup>de</sup>	5,50 <sup>c-e</sup>	5,13 <sup>de</sup>	7,27 <sup>a-c</sup>	6,09 <sup>c-e</sup>	6,38 <sup>cd</sup>
Naftodiantrony [mg g <sup>-1</sup> s.m.]	hiperycyna	0,24 <sup>a</sup>	0,17b <sup>c-e</sup>	0,19 <sup>a-d</sup>	0,15 <sup>c-e</sup>	0,06 <sup>f</sup>	0,13 <sup>ef</sup>	0,08 <sup>fg</sup>	0,16 <sup>c-e</sup>	0,22 <sup>ab</sup>	0,14 <sup>d-f</sup>	0,14 <sup>c-f</sup>	0,20 <sup>a-c</sup>	0,14 <sup>d-f</sup>	0,16 <sup>b-e</sup>	0,12 <sup>e-g</sup>
	pseudohiperycyna	0,51 <sup>ab</sup>	0,48 <sup>a-c</sup>	0,61 <sup>a</sup>	0,48 <sup>a-c</sup>	0,22 <sup>f</sup>	0,43 <sup>b-e</sup>	0,28 <sup>ef</sup>	0,37 <sup>b-e</sup>	0,45 <sup>b-d</sup>	0,39 <sup>b-e</sup>	0,33 <sup>d-f</sup>	0,45 <sup>b-d</sup>	0,32 <sup>d-f</sup>	0,33 <sup>c-f</sup>	0,34 <sup>c-f</sup>
Floroglucynole [mg g' s.m.]	hiperforyna	8,85 <sup>a-d</sup>	8,89 <sup>a-c</sup>	10,48 <sup>a</sup>	9,17 <sup>a-c</sup>	6,31 <sup>e</sup>	6,44 <sup>de</sup>	7,17 <sup>b-e</sup>	8,13 <sup>a-e</sup>	9,93 <sup>a</sup>	9,24 <sup>ab</sup>	10,38 <sup>a</sup>	8,73 <sup>a-e</sup>	10,01 <sup>a</sup>	8,89 <sup>a-c</sup>	6,74 <sup>c-e</sup>

W ramach badań przeprowadzonych na C. majus (P4), porównano wpływ doglebowej aplikacji elicytorów (150 mg/L ChL, 10 mg/L Se, 100 mg/L SA) na profil alkaloidów w zielu w odniesieniu do czasu trwania elicytacji (4., 7. i 10. dzień). Zawartość poszczególnych metabolitów wtórnych w badanych ekstraktach zmieniała się w zależności od czasu oddziaływania oraz rodzaju zastosowanego elicytora (Rys. 3; Tab. 5). Największą akumulację związków (poli)fenolowych ogółem odnotowanopo 4 dniach od aplikacji Se ich stężenie było wyższe o 79% niż w roślinach kontrolnych (Rys. 3A). Jednak najwyższą aktywność elicytacyjną obserwowano po 10 dniach od zastosowania SA – całkowita zawartość (poli)fenoli była wówczas ponad dwukrotnie wyższa w porównaniu z kontrolą. Z kolei w 7. dniu doświadczenia wszystkie analizowane elicytory charakteryzowały się podobną efektywnością, powodując 96-120% wzrost poziomu (poli)fenoli. Roztwór ChL stymulował ich akumulację również w 10. dniu elicytacji - stężenie tych związków wzrosło o 124% w odniesieniu do kontroli. Doglebowa aplikacja elicytorów nie wpływała jednak na akumulację rozpuszczalnych flawonoli u C. majus, a ich zawartość w poszczególnych kombinacjach doświadczalnych utrzymywała się na podobnym poziomie w trakcie trwania eksperymentu (Rys. 3B).



**Rys. 3.** Wpływ doglebowej aplikacji elicytorów (ChL – mleczan chitozanu; Se – selenin sodu; SA – kwas salicylowy) na całkowitą zawartość związków (poli)fenolowych (A) i rozpuszczalnych flawonoli (B) w zielu *C. majus* w 4., 7. i 10. dniu elicytacji. Wartości średnie ( $\pm$  odchylenie standardowe; n = 3) oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie (p < 0,05). GAE – ekwiwalent kwasu galusowego; RUE – ekwiwalent rutyny.

W ekstraktach metanolowych pozyskanych z ziela C. majus zidentyfikowano oraz oznaczono ilościowo sześć alkaloidów izochinolinowych. Stężenia poszczególnych komponentów wahały się w zależności od rodzaju aplikowanego elicytora oraz czasu ekspozycji roślin na jego działanie, jednak w większości przypadków analiza statystyczna nie potwierdziła istotności obserwowanych zmian (Tab. 5). Choć dominującym wśród oznaczonych alkaloidów była koptyzyna, jej stężenie nie zmieniało się istotnie pod wpływem elicytacji. Zastosowane elicytory również w niewielkim stopniu wpływały na poziom chelidoniny. Największy wzrost zawartości tego alkaloidu (o 38%) odnotowano po 10. dniach od zastosowania SA. Pozostałe alkaloidy występowały w znacznie niższych stężeniach (<1 mg g<sup>-1</sup> s.m.), ale ich poziom w większym stopniu zmieniał się pod wpływem elicytorów. Akumulacja protopiny była najefektywniej stymulowana przez SA w 7. dniu eksperymentu jej zawartość wzrosła o 188%, porównując z odpowiednią kontrolą. W tym samym czasie nieznacznie mniejszą aktywnością elicytacyjną charakteryzował się Se, którego zastosowanie spowodowało dwukrotny wzrost stężenia protopiny w odniesieniu do roślin kontrolnych. Największe zmiany w zawartości berberyny obserwowano po 4 i 7 dniach od zastosowania elicytorów. Ponownie, najwyższą efektywność wykazywał SA – po 4 dniach od jego aplikacji zawartość berberyny wzrosła o 140%. Pozostałe elicytory w tym samym czasie w mniejszym stopniu oddziaływały na akumulację tego alkaloidu – stężenie berberyny wzrosło o 108% i 57% w odniesieniu do kontroli pod wpływem odpowiednio ChL i Se. Najwyższe stężenie allokryptopiny oraz jednocześnie największy wzrost jej poziomu (o 85% w odniesieniu do odpowiedniej kontroli) obserwowano po 7 dniach od zastosowania SA. Aplikowanie ChL stymulowało akumulację tego alkaloidu w roślinach, ale jedynie w 4. dniu elicytacji, gdzie odnotowano 86% wzrost jego stężenia. Nie obserwowano istotnego wpływu analizowanych elicytorów na poziom chelerytryny (Tab. 5).

**Tab. 5.** Wpływ doglebowej aplikacji elicytorów (ChL – mleczan chitozanu; Se – selenin sodu; SA – kwas salicylowy; ChL+Se+SA – mieszanina elicytorów) na zawartość wybranych metabolitów wtórnych w zielu *C. majus*. Wartości średnie ( $\pm$  odchylenie standardowe; n = 3) oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie (p < 0,05). Kolorem zielonym wyróżniono komórki z wartościami średnimi dla związków, które wykazywały najwyższy stopień indukcji pod wpływem elicytorów.

	Chelidonium majus L. (P4)													
Alkaloidy izochinolinowe			4. d	zień			7. d	zień	A	10. dzień				
		Kontrola	ChL	Se	SA	Kontrola	ChL	Se	SA	Kontrola	ChL	Se	SA	
mg g' <sup>1</sup> s.m.	koptyzyna	12,9 <sup>a</sup>	14,8 <sup>a</sup>	12,3 <sup>a</sup>	14,1 <sup>a</sup>	12,2 <sup>a</sup>	10,9 <sup>a</sup>	12,1 <sup>a</sup>	11,6 <sup>a</sup>	9,1 <sup>a</sup>	9,5 <sup>a</sup>	10,2 <sup>a</sup>	12,5 <sup>a</sup>	
	chelidonina	1,98 <sup>ab</sup>	2,31 <sup>a</sup>	1,84 <sup>b</sup>	2,15 <sup>ab</sup>	1,78 <sup>a</sup>	1,83 <sup>a</sup>	2,07 <sup>a</sup>	2,25 <sup>a</sup>	2,02 <sup>a</sup>	2,08 <sup>a</sup>	2,10 <sup>a</sup>	2,78 <sup>a</sup>	
	protopina	0,34 <sup>a</sup>	0,54 <sup>a</sup>	0,37 <sup>a</sup>	0,49 <sup>a</sup>	0,32 <sup>b</sup>	0,41 <sup>b</sup>	0,62 <sup>ab</sup>	0,92 <sup>a</sup>	0,46 <sup>a</sup>	0,43 <sup>a</sup>	0,66 <sup>a</sup>	0,56 <sup>a</sup>	
	berberyna	0,35 <sup>b</sup>	0,73 <sup>ab</sup>	0,55 <sup>ab</sup>	0,84 <sup>a</sup>	0,54 <sup>a</sup>	0,49 <sup>a</sup>	0,55 <sup>a</sup>	0,49 <sup>a</sup>	0,32 <sup>b</sup>	0,37 <sup>ab</sup>	0,40 <sup>ab</sup>	0,77 <sup>a</sup>	
	allokryptopina	0,15 <sup>a</sup>	0,28 <sup>a</sup>	0,19 <sup>ab</sup>	0,25 <sup>ab</sup>	0,21 <sup>a</sup>	0,19 <sup>a</sup>	0,27 <sup>a</sup>	0,39 <sup>a</sup>	0,22 <sup>b</sup>	0,24 <sup>b</sup>	0,35 <sup>a</sup>	0,34 <sup>a</sup>	
	chelerytryna	0,18 <sup>ab</sup>	0,19 <sup>a</sup>	0,13 <sup>b</sup>	0,17 <sup>ab</sup>	0,17 <sup>a</sup>	0,15 <sup>a</sup>	0,15 <sup>a</sup>	0,15 <sup>a</sup>	0,15 <sup>a</sup>	0,12 <sup>a</sup>	0,16 <sup>a</sup>	0,17 <sup>a</sup>	

### Wpływ elicytorów na status oksydoredukcyjny roślin leczniczych

Dolistna aplikacja elicytorów w zróżnicowany sposób wpływała na poziom peroksydacji lipidów błon komórkowych, akumulację H2O2 oraz aktywność enzymów antyoksydacyjnych w liściach M. officinalis (P2). Największe zmiany prooksydacyjne stwierdzono w roślinach traktowanych SA, gdzie odnotowano ponad 2,5 razy większe stężenie H2O2 oraz 75% wzrost poziomu TBARS (wskaźnika stopnia peroksydacji lipidów). Pozostałe elicytory również powodowały zmiany akumulacji H2O2; pod wpływem ChL i Se odnotowano odpowiednio 60% i 56% wzrost stężenia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w odniesieniu do kontroli. Z kolei poziom peroksydacji lipidów, będący konsekwencją zwiększonego poziomu reaktywnych form tlenu, podwyższył się o 31% pod wpływem ChL, ale pozostał na poziomie kontroli pod wpływem Se. Zastosowanie mieszaniny ChL+SA+Se powodowało wzrost akumulacji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i TBARS o 27%. Wyniki te są zgodne z rezultatami uzyskanymi w wyniku wizualizacji reaktywnych form tlenu (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Ich zwiększoną akumulację obserwowano głównie w ogonkach liściowych, jednak było to prawdopodobnie wynikiem mechanicznego uszkodzenia tkanek podczas odcinania liści. Krótko po aplikacji elicytorów (po 1 dniu) podwyższony poziom O2<sup>-</sup> widoczny był jedynie w liściach roślin traktowanych ChL. Z kolei po upływie 8 dni obserwowano wyraźną akumulację H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w tkankach roślin traktowanych SA w formie pokrywających blaszkę liściową punktowych przebarwień. Na podstawie zmian aktywności wybranych enzymów antyoksydacyjnych stwierdzono, że elicytory (z wyjątkiem ChL) wpływały na nieznaczne obniżenie aktywności CAT; natomiast aktywność APX wzrosła (o 31% i 35%) pod wpływem SA oraz ChL+Se+SA, choć różnice te nie były istotne statystycznie. W liściach melisy nie wykazano aktywności GPOX. Zastosowane elicytory wywierały z reguły korzystny wpływ na zdolność ekstraktów roślinnych do redukcji rodnika DPPH. wzrost aktywności antyoksydacyjnej odnotowano Największy W ekstraktach pochodzących z roślin po 10 dniach elicytacji. Po tym czasie stopień redukcji DPPH w ekstraktach z roślin kontrolnych wynosił ok. 62%, podczas gdy w ekstraktach z roślin traktowanych ChL, Se lub SA wartość tego parametru osiągała 88-93%.

Wizualizacja reaktywnych form tlenu (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>) w liściach *H. perforatum* (P3) nie ujawniła ich zwiększonej akumulacji krótko po zastosowaniu elicytorów (1 dzień po oprysku). Podobnie jak w przypadku melisy, największe stężenia obserwowano głównie w ogonkach liściowych i wzdłuż unerwienia blaszki liściowej. Jednak po 8. dniach od oprysku roztworami pojedynczych elicytorów, wyraźne zmiany zabarwienia

wskazywały na zwiększony poziom reaktywnych form tlenu, zwłaszcza O2<sup>-</sup>. W tym samym czasie, akumulacja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> była widoczna w postaci niewielkich, punktowych zmian na blaszce liściowej roślin traktowanych roztworami ChL i Se. Wyniki dotyczące aktywności enzymów antyoksydacyjnych w liściach H. perforatum pod wpływem elicytorów są jednak niejednoznaczne. Największe zmiany aktywności APX (ponad dwukrotny wzrost w odniesieniu do kontroli) odnotowano po upływie jednego dnia od aplikacji SA oraz po 10 dniach od zastosowania ChL+Se+SA. W przypadku CAT początkowo wszystkie zastosowane elicytory powodowały istotny spadek aktywności tego enzymu w odniesieniu do roślin kontrolnych, a najniższą aktywność CAT (ponad dwukrotnie) odnotowano po oprysku SA. Jednak po 10 dniach elicytacji stwierdzono nawet czterokrotny wzrost aktywności tego enzymu po zastosowaniu Se. Pozostałe elicytory również w istotny sposób zwiększały aktywność CAT (o 118-257%). Z kolei aktywność GPX z reguły wykazywała tendencję spadkową pod wpływem testowanych substancji, niezależnie od czasu ich oddziaływania. Wyjątek stanowiła mieszanina ChL+Se+SA – po jej aplikacji aktywność GPX zwiększyła się zarówno w po 1, jak i po 10 dniach od oprysku roślin (wzrost o odpowiednio 116% i 150%). Zastosowane związki z reguły nie wpływały istotnie na aktywność antyoksydacyjną badanych ekstraktów roślinnych. Jednak wszystkie analizowane elicytory znacząco zwiększały akumulację wolnej proliny w liściach H. perforatum. Po 3 dniach od pierwszej aplikacji ChL i ChL+Se+SA odnotowano ok. 60% podwyższenie jej stężenia; po zastosowaniu Se i SA było ono o 45% wyższe w odniesieniu do roślin kontrolnych.

Akumulacja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w liściach *C. majus* (P4) wahała się w zależności od czasu oddziaływania elicytorów (2 lub 10 dni). Po aplikacji Se i SA początkowo notowano 32-40% wzrost poziomu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w odniesieniu do roślin kontrolnych. Jednak szczególnie wyraźne zmiany obserwowano dopiero po 10 dniach – wówczas każdy z testowanych elicytorów zwiększał stężenie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, które wzrastało ponad dwukrotnie pod wpływem ChL i SA oraz około 2,5 razy pod wpływem Se. Elicytory w podobnym stopniu wpływały na poziom peroksydacji lipidów w liściach *C. majus*, krótko po ich aplikacji (po 2 dniach) powodując ok. 31% wzrost stężenia TBARS pod wpływem ChL i Se oraz 24% wzrost pod wpływem SA, w odniesieniu do kontroli. Po upływie 10 dni odnotowano jednak 40% spadek zawartości TBARS pod wpływem SA. Aktywność CAT w liściach *C. majus* utrzymywała się na podobnym poziomie w analizowanych terminach i seriach doświadczalnych. Jedynie po 10 dniach od zastosowania Se aktywność tego enzymu znacząco wzrosła (o 95% w porównaniu z odpowiednią kontrolą). Z kolei aktywność

GPOX oznaczona w 2. dniu elicytacji utrzymywała się na bardzo niskim poziomie, ale pod wpływem doglebowej aplikacji Se wzrosła aż 15 razy w porównaniu z kontrolą. W dniu likwidacji eksperymentu (10. dzień elicytacji) aktywność tego enzymu była znacznie większa, jednak ulegała wyraźnej redukcji po zastosowaniu elicytorów, szczególnie ChL i Se (spadek o połowę). W liściach C. majus nie wykryto aktywności APOX. Ekstrakty z ziela C. majus charakteryzowały się stosunkowo niską zdolnością do redukcji rodnika DPPH, która zmieniała się w zależności od rodzaju zastosowanego elicytora oraz terminu zbioru materiału roślinnego. Największe zmiany aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów odnotowano po 10 dniach od aplikacji SA (prawie trzykrotny wzrost w odniesieniu do kontroli). W tym samym czasie, po zastosowaniu ChL i Se odnotowano odpowiednio 96% i 84% wzrost aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów. Stężenie wolnej proliny w liściach C. majus było również zależne od rodzaju elicytora oraz czasu ekspozycji roślin na jego oddziaływanie, jednak nie wszystkie z zastosowanych substancji powodowały istotne zmiany akumulacji tego aminokwasu. Po 2 dniach od aplikacji Se obserwowano aż czterokrotny wzrost stężenia wolnej proliny. Z kolej po 10 dniach od zastosowania SA jej zawartość wzrosła o 91% w odniesieniu do kontroli. W analizowanych terminach nie odnotowano istotnego wpływu ChL na poziom tego aminokwasu.

## Wpływ elicytorów na procesy fizjologiczne roślin leczniczych

Analizowane elicytory nie wpływały istotnie na biomasę pędów *M. officinalis* (P2). W porównaniu z roślinami kontrolnymi obserwowano jednak niewielki spadek zawartości chlorofilu *b* i karotenoidów (ok. 11-17%). Spośród testowanych substancji jedynie Se nie wywierał istotnego wpływu na koncentrację barwników fotosyntetycznych. Ponadto dolistne aplikowanie elicytorów powodowało niewielkie, chociaż w niektórych przypadkach istotne, wahania parametrów fluorescencji chlorofilu *a*. Po 10 dniach od aplikacji badanych związków odnotowano spadek maksymalnej wydajności fotosystemu PSII (wskaźnik F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>), jednak tylko w roślinach traktowanych SA. Wartość F<sub>m</sub> ulegała istotnemu obniżeniu w porównaniu do kontroli we wszystkich kombinacjach doświadczalnych, przy czym największy spadek odnotowano po zastosowaniu SA.

Dolistna aplikacja elicytorów nie powodowała także istotnych zmian w biomasie pędów *H. perforatum* (P3). Jednak ich zastosowanie wywołało, podobnie jak w przypadku melisy, redukcję zawartości chlorofilu a i b (o ok. 11-12% w odniesieniu do roślin kontrolnych). Pod wpływem aplikowanych substancji stwierdzono również wahania

wartości wybranych parametrów fluorescencji chlorofilu *a*. Po 4 dniach od pierwszego oprysku roślin roztworem ChL+Se+SA odnotowano 15% wzrost wartości  $F_0$  oraz jednocześnie 5% spadek wartości  $F_v/F_m$ . Z kolei w 10. dniu elicytacji istotne obniżenie parametru  $F_v/F_m$  oraz wzrost  $F_0$  wykazano po zastosowaniu roztworów Se oraz SA. Wartość  $F_m$  uległa znaczącemu obniżeniu po zastosowaniu pojedynczych elicytorów, przy czym największy spadek odnotowano pod wpływem ChL i Se.

Doglebowe aplikowanie elicytorów nie wywierało istotnego wpływu ani na biomasę pędów *C. majus*, ani na oznaczane parametry fluorescencji chlorofilu *a* (P4). Początkowo, w 4. dniu elicytacji, nie obserwowano także istotnych zmian w koncentracji barwników fotosyntetycznych. Jednak po 10 dniach od aplikacji elicytorów zawartość chlorofilu *a* i *b* uległa redukcji pod wpływem Se – ich poziom zmniejszył się o odpowiednio 32% i 26% w odniesieniu do roślin kontrolnych.

# Dyskusja

Zawartość metabolitów wtórnych jest jednym z najważniejszych wskaźników jakości, wartości terapeutycznej oraz ekonomicznej produkowanych surowców leczniczych pochodzenia roślinnego [Li i in. 2020]. Jednak gatunki roślin będące źródłem ich pozyskiwania, rosnąc w optymalnych warunkach z reguły nie akumulują wystarczających ilości pożądanych związków. Z kolei ich uprawa w warunkach polowych często prowadzi do znaczących i nieprzewidywalnych wahań w zawartości substancji bioaktywnych, wywołanych oddziaływaniem abiotycznych i biotycznych czynników środowiskowych. Z tego względu zmienność jakościowa i ilościowa składu chemicznego roślin leczniczych jest jednym z głównych ograniczeń, z jakimi mierzy się współczesny przemysł zielarski. Aby sprostać rosnącym wymaganiom rynku, wiele działań podejmowanych w kierunku optymalizacji produkcji roślinnej koncentruje się na stymulowaniu metabolizmu wtórnego roślin z wykorzystaniem elicytorów, a literatura naukowa często potwierdza ich korzystny wpływ na akumulację związków aktywnych biologicznie należących do różnych klas chemicznych, zwłaszcza z grupy (poli)fenoli [Ghasemian i in. 2020, Hawrylak-Nowak i in. 2021, Li i in. 2021, Kandoudi i in. 2022]. Efektywność działania elicytorów jest jednak uzależniona od szeregu czynników (stężenie, sposób aplikacji i czas oddziaływania elicytora; gatunek, odmiana, wiek i kondycja fizjologiczna rośliny; warunki środowiskowe). Ponadto znaczna część prowadzonych obecnie eksperymentów koncentruje się na efektywnym wykorzystaniu elicytorów jedynie w warunkach in vitro, podczas gdy niemal wyłącznym źródłem wielu ważnych ekonomicznie gatunków roślin leczniczych, w tym również M. officinalis i H. perforatum, są uprawy polowe [Gadzovska Simic i in. 2014, Murthy i in. 2014, Shakya i in. 2017, Barnes i in. 2018]. Prowadzenie badań nad biologiczną aktywnością elicytorów w warunkach polowych jest jednak znacznie utrudnione ze względu na oddziaływanie czynników środowiskowych, których wpływ na właściwości fitochemiczne surowców roślinnych jest niejednoznaczny i wręcz niemożliwy do przewidzenia [Shasmita i in. 2023]. Z tego względu, dla wiarygodnego oszacowania skuteczności elicytacji, istotne jest planowanie i prowadzenie większej ilości eksperymentów na poszczególnych gatunkach roślin z zastosowaniem elicytorów w warunkach in vivo, ale przy zachowaniu kontrolowanych warunków uprawy [Kandoudi i in. 2022].

Z uwagi na złożoność składu chemicznego badanych gatunków roślin leczniczych, oceny skuteczności elicytacyjnej testowanych związków dokonano głównie w oparciu

o zmiany zawartości głównych metabolitów wtórnych, determinujących ich aktywność terapeutyczną. Choć porównywane elicytory różnią się pod względem chemicznym, ich wspólną cechą jest funkcja regulacyjna w procesach fizjologicznych i metabolicznych roślin, w tym również reakcjach obronnych i odpornościowych. W przeprowadzonych badaniach po raz pierwszy porównano ich aktywność elicytacyjną w różnych gatunkach roślin leczniczych w warunkach *in vivo*, uwzględniając czas trwania procesu elicytacji.

Uzyskane wyniki wskazują, że efektywność stymulowania metabolizmu wtórnego badanych gatunków była zależna od rodzaju i sposobu aplikacji analizowanych elicytorów, czasu ekspozycji roślin na ich działanie, jak również gatunku rośliny i przynależności produkowanych przez nią wyspecjalizowanych metabolitów do poszczególnych klas związków chemicznych. W pierwszym doświadczeniu (P2) potwierdzono wysoką aktywność biologiczną analizowanych substancji, zwłaszcza ChL i SA, które bardzo efektywnie pobudzały akumulację metabolitów fenolowych w liściach melisy lekarskiej. Pod wpływem elicytorów największy, czasami nawet kilkakrotny wzrost, odnotowano w przypadku glikozydu kwasu rozmarynowego, a najmniejsze wahania obserwowano w zawartości kwasu kawowego. Z kolei stężenie kwasu rozmarynowego, dominującego pod względem ilościowym kwasu fenolowego, w liściach melisy traktowanej pojedynczymi elicytorami było około dwukrotnie wyższe (42-48 mg  $g^{-1}$  s.m.) niż w roślinach kontrolnych (22 mg g<sup>-1</sup> s.m.) w 10. dniu elicytacji. Wysoka efektywność indukcji biosyntezy przeważających ilościowo kwasów fenolowych u melisy lekarskiej może wynikać z ich podobnej struktury chemicznej i wspólnych szlaków biosyntezy. Przeprowadzone wcześniej badania dotyczące możliwości zwiększenia akumulacji kwasu rozmarynowego u tego gatunku nie wykazały tak efektywnej indukcji biosyntezy ani pod wpływem NaCl, gdzie wykazano 40-67% wzrost jego stężenia [Hawrylak-Nowak i in. 2021], ani pod wpływem stresu cieplnego, gdzie notowano wzrost o 59% w odniesieniu do kontroli [Pistelli i in. 2019].

Porównując rezultaty otrzymane w ramach badań prezentowanych w publikacjach P2 i P3, dotyczące efektywności dolistnej aplikacji elicytorów stwierdzono, że skuteczność tych związków do zwiększania biosyntezy wyspecjalizowanych metabolitów, szczególnie fenolowych, była znacznie większa w przypadku melisy lekarskiej niż dziurawca zwyczajnego. Przykładowo ponad 20% wzrost ogólnej puli (poli)fenoli, który obserwowano po 10 dniach od aplikacji Se, jednego z najskuteczniejszych w przypadku dziurawca elicytorów, w melisie był ponad dwukrotnie wyższy. Zastosowanie elicytorów stymulowało również akumulację niektórych kwasów fenolowych liściach melisy, a zawartość heksozydu kwasu rozmarynowego po zastosowaniu SA wzrosła nawet dziesięciokrotnie w porównaniu z kontrolą. W przypadku dziurawca największy wzrost stężenia kwasu neochlorogenowego odnotowano po oprysku Se, ale wynosił on jedynie 50% w odniesieniu do roślin kontrolnych. Dostępne doniesienia literaturowe wskazują na skuteczność wymienionych powyżej modulatorów metabolicznych w indukcji biosyntezy ważnych dla jakości surowca dziurawca zwyczajnego związków bioaktywnych w warunkach in vitro. Wśród najczęściej stosowanych elicytorów abiotycznych, zwłaszcza w produkcji hiperycyny, wymienia się cząsteczki sygnałowe, w tym również SA. Przykładowo obecność 50, 100 lub 200 µM SA w kulturach zawiesinowych H. perforatum powodowała około dwukrotny wzrost zawartości hiperycyny i pseudohiperycyny w odniesieniu do kontroli, niezależnie od zastosowanego stężenia [Gadzovska i in. 2013]. Zwiększoną akumulację hyperforyny wykazano także pod wpływem 1 M SA w kulturach merystemów wierzchołkowych pędów tego gatunku [Sirvent i Gibson 2002]. Z kolei zastosowanie chitozanu w kulturach korzeni dziurawca stymulowało produkcję epikatechiny, ksantonów i terpenoidów [Brasili i in. 2014]. Z tego względu mniejsza skuteczność elicytacyjna, jaką obserwowano w przeprowadzonym eksperymencie (P3), związana jest najprawdopodobniej z pewnymi cechami morfologicznymi roślin z rodzaju Hypericum – niewielka powierzchnia blaszki liściowej, pokryta silnie hydrofobową kutykulą o wysokiej zawartości lipidów może silnie ograniczać dyfuzję i penetrację aplikowanych dolistnie elicytorów [Li i in. 2017].

Wyniki eksperymentu przeprowadzonego na dziurawcu zwyczajnym (P3) potwierdziły także odnotowaną wcześniej w przypadku melisy lekarskiej (P2) przewagę roztworów pojedynczych elicytorów nad ich mieszaniną, której zastosowanie u dziurawca skutkowało nawet obniżeniem stężenia niektórych metabolitów. Przykładowo po 5 dniach od oprysku roślin ChL+Se+SA odnotowano aż czterokrotny spadek zawartości hiperycyny. Niewielka efektywność zastosowanej mieszaniny mogła być związana ze znacznie niższymi stężeniami zawartych w niej związków, które odpowiadały jedynie 1/3 ich zawartości w roztworach pojedynczych elicytorów, co prawdopodobnie było przyczyną ograniczonej aktywności biologicznej. Biorąc jednak pod uwagę negatywny wpływ ChL+Se+SA na akumulację niektórych komponentów składu chemicznego dziurawca nie można także wykluczyć wzajemnych oddziaływań pomiędzy elicytorami, szczególnie pomiędzy Se i SA. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, Se może wpływać na funkcjonowanie układu hormonalnego roślin, zarówno pozytywnie – zwiększając poziom endogennego SA oraz zwiększając odporność roślin stres, jak i negatywnie –

zaburzając jego prawidłowe funkcje. Z drugiej strony, SA wraz z innymi fitohormonami pełni funkcję regulatora w procesie pobierania i akumulacji Se w roślinach, odgrywając istotną rolę w łagodzeniu objawów fitotoksyczności tego pierwiastka [Tamaoki i Maruyama-Nakashita 2017, Mostofa i in. 2020, Skrypnik i in. 2022]. Niemniej jednak, aby potwierdzić te założenia, konieczne są dodatkowe eksperymenty i analizy, ponieważ w innych badaniach z powodzeniem stosowano mieszaninę Se i SA w stymulowaniu produktywności roślin [Norouzi i in. 2018].

W ramach ostatniej publikacji eksperymentalnej porównano wpływ doglebowej aplikacji badanych elicytorów na szeroki profil alkaloidów *C. majus* w odniesieniu do czasu trwania procesu elicytacji (P4). Biorąc jednak pod uwagę wyniki eksperymentów przeprowadzonych wcześniej na *M. officinalis* (P2) i *H. perforatum* (P3), doświadczenie to zostało odpowiednio zmodyfikowane. Zrezygnowano z aplikacji mieszaniny ChL+Se+SA, która wykazywała nieznaczny lub nawet negatywny wpływ na biosyntezę niektórych metabolitów wtórnych. Ponadto, biorąc pod uwagę silnie hydrofobową kutykulę liści *C. majus* oraz jej ograniczający wpływ na przenikanie i skuteczność aplikowanych dolistnie elicytorów, który obserwowano w przypadku *H. perforatum*, zmieniono formę aplikacji i wszystkie roztwory badanych substancji zostały wprowadzone doglebowo.

Nie wykazano istotnego wpływu elicytorów na akumulację koptyzyny i chelidoniny – alkaloidów dominujących w ekstraktach metanolowych z ziela C. majus. Pod wpływem SA i Se stwierdzono jednak zwiększoną akumulację innych kluczowych alkaloidów, takich jak protopina, berberyna i allokryptopina. Spośród testowanych elicytorów ChL okazał się najmniej skuteczny w stymulowaniu biosyntezy tych metabolitów – po 4 dniach od jego zastosowania obserwowano jedynie wzrost poziomu allokryptopiny. Analizowane elicytory skutecznie zwiększyły także całkowity poziom związków (poli)fenolowych (ale nie rozpuszczalnych flawonoli), nawet dwukrotnie w porównaniu z odpowiednią kontrolą. Chociaż badania nad zastosowaniem elicytorów w stymulacji produkcji alkaloidów, zwłaszcza u C. majus są nadal niewystarczające, rozważano już kilka strategii zwiększających ich akumulację. Jednym z przykładów są badania szklarniowe, w których analizowano wpływ stresu suszy oraz jasmonianu metylu (MeJa) i SA na zawartość metabolitów wtórnych w trzech gatunkach roślin, w tym glistniku jaskółczym ziele [Kleinwächte i in. 2015]. Wykazano, że zarówno umiarkowany stres suszy, jak i zastosowanie MeJa wpływało korzystnie na całkowitą zawartość alkaloidów u tego gatunku. Te same elicytory testowano w kulturach in vitro, gdzie pod wpływem MeJa odnotowano istotny wzrost poziomu chelidoniny i sangwinaryny [Hashemi i in. 2021]. Choć w niniejszym eksperymencie generalnie nie obserwowano istotnego wpływu elicytorów abiotycznych na akumulację dominujących alkaloidów w zielu *C. majus* to warto podkreślić, że koncentracja innych ważnych alkaloidów, takich jak protopina czy berberyna była efektywnie stymulowana pod wpływem SA i Se. Opracowanie skutecznych strategii optymalizacji produkcji najbardziej istotnych pod kątem właściwości tej rośliny alkaloidów wymaga lepszego zrozumienia szlaków ich biosyntezy. Pojawiają się już pierwsze prace eksperymentalne, w których *C. majus* stanowi gatunek modelowy w badaniach nad biosyntezą alkaloidów izochinolinowych [Yahyazadeh i in. 2018]. W doświadczeniach Yahyazadeha i in. [2018] zbadano wpływ stresu suszy i zasolenia na akumulację alkaloidów u tego gatunku. Stwierdzono, że znaczący wzrost biosyntezy dihydrokoptyzyny w roślinach *C. majus*, który obserwowano w warunkach stresu, miał związek ze zwiększoną aktywnością enzymatyczną syntazy stylopiny, enzymu odgrywającego kluczową rolę w biosyntezie alkaloidów izochinolinowych.

Literatura naukowa zawiera kilka doniesień dotyczących prac badawczych prowadzonych in vivo z wykorzystaniem ChL, Se lub SA, które potwierdzają skuteczność tych elicytorów w efektywnej elicytacji metabolitów wtórnych u innych gatunków roślin leczniczych. Skuteczność tych związków może być związana ze zdolnością do indukowania ekspresji genów odpowiedzialnych za biosyntezę pewnych grup wyspecjalizowanych metabolitów (kwasów fenolowych, flawonoidów) [Habibi i in. 2016; Mukhtar Ahmed i in. 2019]. Stwierdzono, że dolistna aplikacja ChL skutkowała podwyższeniem ogólnej zawartości (poli)fenoli, kwasu rozmarynowego i antocyjanów u M. officinalis oraz kwasu rozmarynowego u O. basilicum [Hawrylak-Nowak i in. 2021], a także ogólnego stężenia (poli)fenoli, flawonoidów, antocyjanów oraz niektórych kwasów fenolowych u Plectranthus amboinicus [Stasińska-Jakubas i in. 2023]. Z kolei w uprawie polowej Artemisia annua oprysk roztworem chitozanu okazał się najskuteczniejszym, spośród porównywanych elicytorów, zabiegiem stymulującym biosyntezę artemizyny i olejku eterycznego [Sayed i Ahmed 2022]. W badaniach Kandoudi i in. [2022] po dwóch tygodniach od zastosowania oprysku SA w warunkach polowych obserwowano zwiększenie całkowitej zawartości związków (poli)fenolowych oraz aktywności antyoksydacyjnej u Origanum majorana, Mentha piperita i O. basilicum. SA okazał się również najskuteczniejszym modulatorem metabolicznym, spośród związków stosowanych dolistnie w uprawie polowej Echinacea purpurea, stymulującym akumulację całkowitej puli (poli)fenoli [Kuzel i in. 2009]. W uprawach hydroponicznych M. officinalis obecność Se zwiększała akumulację niektórych komponentów olejku eterycznego (kariofilenu, tlenku kariofilenu, z-citralu, cytralu i octanu geranylu) [Tavakoli i in. 2020] oraz ogólną zawartość (poli)fenoli i kwasu rozmarynowego u *O. basilicum* [Puccinelli i in. 2020]. W przypadku *H. perforatum* dolistna aplikacja Se w stężeniu 8 mg/L lub 10 mg/L zwiększała poziom odpowiednio hiperycyny i hyperforyny w warunkach szklarniowych [Nazari i in. 2022].

Ze względu na złożoność procesu elicytacji, uwzględnienie czasu ekspozycji roślin na oddziaływanie badanych związków jest ważnym wskaźnikiem w ocenie ich efektywności. W przeprowadzonych eksperymentach wyraźny wzrost akumulacji analizowanych metabolitów wtórnych obserwowano z reguły wraz z wydłużeniem ekspozycji roślin na działanie elicytorów. Wzrost akumulacji metabolitów fenolowych w liściach melisy lekarskiej (P2) następował dopiero w 6. dniu elicytacji, natomiast najwyższy wzrost w odniesieniu do odpowiedniej kontroli stwierdzono w 10. dniu elicytacji. Również istotną odpowiedź dziurawca zwyczajnego (P3) odnotowano po 10 dniach od pierwszej aplikacji badanych elicytorów. W przypadku glistnika jaskółczego ziela (P4) najbardziej znaczące zmiany obserwowano w 7. i 10. dniu elicytacji. Podobne efekty obserwowano w kulturach korzeni włośnikowych Ocimum tenuiflorum, gdzie największą akumulację metabolitów wtórnych (kwas ursolowy i eugenolowy) odnotowano po 8 dniach ekspozycji roślin na działanie trzech różnych elicytorów (ekstrakt drożdżowy, MeJa, SA) [Sharan i in. 2019]. W innym eksperymencie zastosowanie krótkotrwałego stresu cieplnego (38 °C, 5 h) w hydroponicznej uprawie melisy lekarskiej skutkowało podwyższeniem zawartości kwasu rozmarynowego już po 2 h, która wzrastała stopniowo w ciągu kolejnych 24 h [Pistelli i in. 2019]. Z kolei efekt elicytacyjny salicylanów, w tym SA, utrzymywał się nawet po 20 dniach od ich ostatniej aplikacji [Kuzel i in. 2009]. Tak więc zmiany metabolizmu wtórnego wymagają odpowiedniego, ale jak wskazują powyższe przykłady, niekiedy bardzo zróżnicowanego czasu.

Wzmożona produkcja reaktywnych form tlenu, szczególnie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i O<sup>2-'</sup>, jest jedną ze wspólnych i powszechnych reakcji roślin na oddziaływanie czynników stresowych. Choć ich rola w odpowiedzi komórkowej roślin na działanie elicytorów nie jest do końca poznana, przypisuje się im najczęściej rolę cząsteczek sygnałowych, powiązanych z produkcją metabolitów wtórnych. Istotną rolę w utrzymaniu homeostazy redoks odgrywa także prolina, a jej zwiększona akumulacja jest jedną ze strategii adaptacji roślin do warunków stresowych [Ghosh i in. 2022]. Porównywane w doświadczeniu substancje należą do zróżnicowanych pod względem chemicznym elicytorów, jednak ich wspólną cechą jest rola regulacyjna w utrzymaniu równowagi oksydoredukcyjnej [Skrypnik i in. 2020]. W tym kontekście wszystkie analizowane w niniejszej pracy elicytory charakteryzuje dwojaka natura - w zależności od stężenia i warunków środowiskowych, mogą zarówno zwiększać akumulację reaktywnych form tlenu, jak i wspierać ich detoksykację, zmniejszając negatywne skutki stresu oksydacyjnego [Herrera-Vásquez i in. 2015, Saleem i in. 2021]. Wyniki eksperymentów prowadzonych in vitro oraz in vivo wskazują także na pewne powiązania pomiędzy zmianami homeostazy redoks, a aktywacją odpowiedzi obronnych roślin pod wpływem elicytorów. Sugeruje się nawet bezpośredni udział reaktywnych form tlenu w biosyntezie niektórych metabolitów wtórnych. Indukowana działaniem elicytorów produkcja H2O2, jako cząsteczki sygnałowej w reakcjach obronnych i zwiększaniu aktywności enzymu PAL, może stymulować biosyntezę związków fenolowych, co potwierdzono u wielu gatunków roślin [Katiyar i in. 2015, Mukhtar Ahmed i in. 2019], a także pośrednio wykazano we własnych doświadczeniach. W badaniach przeprowadzonych przez Mejía-Teniente i in. [2013] również obserwowano wzrost zawartości H2O2, indukcję ekspresji genów i aktywności CAT i PAL po zastosowaniu SA i ChL w uprawie Capsicum annuum. Z kolei według Moon i Mitra [2016] zwiększone stężenie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktywuje kluczowe enzymy szlaku szikimowego, stymulując tym samym biosyntezę ksantonów. W warunkach in vitro wykazano pozytywną korelację pomiędzy podwyższoną zawartością flawonoidów i hiperycyny w pędach, a zwiększoną aktywnością peroksydazy (POD) u H. perforatum rosnącym w obecności polisacharydów (chityna, pektyna, dekstran) [Gadzovska Simic i in. 2014]. Podobne zjawisko stwierdzono w przypadku roślin kurkumy poddanych oddziaływaniu chitozanu - wraz ze wzrostem aktywności POD notowano zwiększoną akumulację kurkuminy [Sathiyabama et al. 2016]. Wyniki badań własnych także wskazują, że obserwowana pod wpływem ChL, Se i SA wzmożona biosynteza metabolitów fenolowych w liściach M. officinalis była powiązana z podwyższonymi stężeniami H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O2<sup>--</sup> i większym poziomem peroksydacji lipidów (P2). W przypadku H. perforatum analizowane elicytory, zwłaszcza Se i SA, zwiększyły akumulację związków fenolowych i niektórych flawonoidów. Jednocześnie obserwowano wzrost poziomu wolnej proliny i O<sub>2</sub><sup>--</sup>, a także zmiany aktywności analizowanych enzymów antyoksydacyjnych (P3). Jednak na podstawie wyników otrzymanych w doświadczeniu przeprowadzonym na C. majus nie można wskazać jednoznacznej zależności pomiędzy statusem oksydoredukcyjnym roślin, a akumulacją analizowanych alkaloidów (P4). Może to wynikać z innej, doglebowej metody aplikacji elicytorów, która mogła znacząco wpłynąć na reakcję roślin. Jednocześnie wszystkie analizowane w niniejszych doświadczeniach elicytory powodowały z reguły podwyższenie aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów z liści *M. officinalis*, *H. perforatum* i ziela *C. majus*, co jest stosunkowo powszechne przy wzroście zawartości związków z grupy (poli)fenoli.

Zgodnie z założeniami hormezy, oddziaływanie stresorów na podstawowe procesy fizjologiczne roślin jest jednym z ważnych elementów badań nad procesem elicytacji, a brak oddziaływań fitotoksycznych stanowi kluczowy element efektywnego zastosowania elicytorów [Godinez-Mendoza i in. 2023]. W przeprowadzonych doświadczeniach nie obserwowano objawów fitotoksyczności aplikowanych związków, choć w niektórych przypadkach wywierały one istotny wpływ na analizowane parametry związane z funkcjonowaniem aparatu fotosyntetycznego (fluorescencja chlorofilu a, stężenie chlorofilu a, b i karotenoidów). Należy podkreślić, że nawet nieznaczne wahania koncentracji barwników fotosyntetycznych mogą wpływać na przebieg fotosyntezy, determinując tym samym wzrost i rozwój roślin oraz akumulację metabolitów wtórnych. Z tego względu jest to kolejny czynnik, który mógł wywierać potencjalny wpływ na efektywność stymulowania metabolizmu wtórnego porównywanych gatunków roślin leczniczych. Nie wykazano jednak istotnego wpływu ChL, Se i SA na biomasę M. officinalis, H. perforatum i C. majus (P2, P3, P4). Wyniki eksperymentów z zastosowaniem testowanych elicytorów in vivo również wskazują na ich niewielki lub nieistotny wpływ na wzrost roślin oraz funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego u innych gatunków roślin leczniczych: M. officinalis, O. basilicum [Ghasemian i in. 2020, Hawrylak-Nowak i in. 2021], Plectranthus amboinicus [Stasińska-Jakubas i in. 2023].

Weryfikowana w ramach niniejszej pracy hipoteza badawcza zakładała, że egzogenna aplikacja elicytorów o różnym charakterze chemicznym może indukować biosyntezę i akumulację metabolitów wtórnych w roślinach leczniczych oraz wywoływać zmiany w ich w statusie oksydoredukcyjnym. Hipoteza ta została potwierdzona. Wykazano, że zastosowanie roztworów pojedynczych elicytorów może prowadzić do zwiększenia akumulacji pożądanych związków bioaktywnych w zależności od ich przynależności do określonych grup metabolitów. Stwierdzono także, że efektywna indukcja biosyntezy metabolitów wtórnych nie wpływa negatywnie na biomasę roślin i nie wywołuje wizualnych objawów fitotoksyczności, choć może prowadzić do obniżenia niektórych parametrów fizjologicznych związanych z funkcjonowaniem aparatu fotosyntetycznego, takich jak zawartość barwników fotosyntetycznych czy fluorescencja chlorofilu *a*.

## Wnioski

Na podstawie wyników badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej sformułowano następujące wnioski:

- Egzogenna aplikacja elicytorów (mleczan chitozanu, selenin sodu, kwas salicylowy) w warunkach *in vivo* wpływa w zróżnicowanym stopniu na biosyntezę i akumulację metabolitów wtórnych w roślinach leczniczych (*M. officinalis*, *H. perforatum*, *C. majus*). Efektywność pobudzania wyspecjalizowanego metabolizmu badanych gatunków zależy od rodzaju i sposobu aplikacji elicytorów, czasu ekspozycji roślin na ich działanie oraz gatunku rośliny i klasy chemicznej indukowanych metabolitów.
- Zastosowanie roztworów pojedynczych elicytorów charakteryzuje się znacznie większą skutecznością w zwiększaniu akumulacji metabolitów wtórnych w porównaniu z aplikacją ich mieszaniny.
- 3. Najwyższy poziom akumulacji metabolitów wtórnych w roślinach leczniczych oraz największy przyrost ich zawartości pod wpływem testowanych elicytorów odnotowano pomiędzy 7. a 10. dniem od aplikacji. W okresie wcześniejszym, tj. do 4. dnia elicytacji zmiany w poziomie badanych związków z reguły nie były istotne.
- Aplikowanie elicytorów wpływa pozytywnie na całkowitą zawartość związków (poli)fenolowych u wszystkich badanych gatunków roślin leczniczych oraz rozpuszczalnych flawonoli u *M. officinalis* i *H. perforatum*.
- 5. Dolistna aplikacja elicytorów znacząco zwiększa akumulację metabolitów fenolowych w liściach *M. officinalis*, powodując nawet kilkukrotny wzrost stężenia heksozydu kwasu rozmarynowego oraz około dwukrotny wzrost zawartości kwasu rozmarynowego, litospermowego i salwianolowego.
- Dolistna aplikacja elicytorów stymuluje biosyntezę i akumulację flawonoidów w liściach *H. perforatum*, ale jednocześnie powoduje redukcję zawartości związków z grupy naftodiantronów.
- 7. Doglebowa aplikacja elicytorów wpływa pozytywnie na akumulację niektórych alkaloidów izochinolinowych w zielu *C. majus*, zwiększając poziom protopiny, berberyny i allokryptopiny.
- 8. Spośród testowanych elicytorów, mleczan chitozanu i kwas salicylowy najefektywniej pobudzają biosyntezę kwasów fenolowych u *M. officinalis*; selenin

sodu i kwas salicylowy najskuteczniej stymulują biosyntezę flawonoidów u *H. perforatum* oraz alkaloidów izochinolinowych u *C. majus*.

- 9. Zastosowanie testowanych elicytorów zwiększa potencjał antyoksydacyjny ekstraktów metanolowych uzyskanych z badanych gatunków roślin leczniczych.
- 10. Aplikowanie elicytorów indukuje zmiany homeostazy redoks w tkankach badanych gatunków roślin leczniczych, powodując podwyższenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych, zwiększenie akumulacji reaktywnych form tlenu (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) oraz poziomu peroksydacji lipidów. Zastosowana metoda elicytacji wywołuje także podwyższenie akumulacji wolnej proliny w liściach *H. perforatum* i *C. majus*.
- Odnotowane zmiany wartości parametrów oksydoredukcyjnych są na ogół dodatnio skorelowane ze zwiększoną akumulacją metabolitów wtórnych u *M. officinalis* i *H. perforatum*, ale nie są jednoznacznie powiązane z ich produkcją u *C. majus*.
- 12. Aplikacja elicytorów nie wpływa na biomasę roślin leczniczych oraz nie wywołuje widocznych objawów fitotoksyczności, ale powoduje niewielkie zaburzenia parametrów fluorescencji chlorofilu *a* oraz zmiany zawartości barwników fotosyntetycznych u *M. officinalis* i *H. perforatum*.
- 13. Zastosowanie elicytorów w kontrolowanych uprawach roślin leczniczych umożliwia skuteczne zwiększenie akumulacji pożądanych substancji biologicznie aktywnych, zwłaszcza z grupy metabolitów fenolowych oraz stanowi obiecujące narzędzie w optymalizacji produkcji wysokiej jakości surowców roślinnych o podwyższonych właściwościach prozdrowotnych i terapeutycznych.

## **Bibliografia**

- Agapouda A., Bookera A., Tivadar Kiss T.D., Hohmanne J., Heinricha M., Csupor D. 2019. Quality control of *Hypericum perforatum* L. analytical challenges and recent progress. J. Pharm. Pharmacol. 71(1), 15–37.
- Ali B. 2021. Salicylic acid: An efficient elicitor of secondary metabolite production in plants. Biocatal. Agric. Biotechnol. 31, 101884.
- Armuła M. 2014. Charakterystyka kwasu salicylowego oraz jego działania na rośliny i zwierzęta. Nauki Przyr. 1(3), 10-37.
- 4. Arora D., Sharma A. 2013. A review on phytochemical and pharmacological potential of genus *Chelidonium*. Pharmacogn. J. 5(4), 184-190.
- 5. Baenas N., García-Viguera C., Moreno D.A. 2014. Elicitation: a tool for enriching the bioactive composition of foods. Molecules 19(9), 13541–13563.
- Bandehagh A., Dehghanian Z., Gougerdchi V., Hossain M. A. 2023. Selenium: A game changer in plant development, growth, and stress tolerance, via the modulation in gene expression and secondary metabolite biosynthesis. Phyton 92(8), 1-24.
- 7. Bano I., Skalickova S., Sajjad H., Skladanka J., Horky P. 2021. Uses of selenium nanoparticles in the plant production. Agronomy 11, 2229.
- Barnes J., Arnason J.T., Roufogalis B.D. 2018. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): botanical, chemical, pharmacological and clinical advances. J. Pharm. Pharmacol. 71(1), 1–3.
- Bates L., Waldren R., Teare J. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil 39, 205–207.
- Borges A., Calvo M.L.M., Vaz J.A., Calhelha R.C. 2024. Enhancing wound healing: a comprehensive review of sericin and *Chelidonium majus* L. as potential dressings. Materials 17, 4199.
- Brasili E., Pratic'o G., Marini F., Valletta A., Capuani G., Sciubba F., Pasqua G. 2014. A non-targeted metabolomics approach to evaluate the effects of biomass growth and chitosan elicitation on primary and secondary metabolism of *Hypericum perforatum in vitro* roots. Metabolomics 10(6), 1186–1196.
- 12. Choudhary A., Kumar A., Kaur N. 2020. ROS and oxidative burst: Roots in plant development. Plant Divers. 42(1), 33–43.
- Crockett S.L., Robson N.K.B. 2011. Taxonomy and chemotaxonomy of the genus *Hypericum*. Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol. 5, 1–13.

- Dobros N. 2017. Zioła o działaniu uspokajającym i przeciwdepresyjnym. Post. Fitoter. 18(3), 215-222.
- Dong X., Zeng Y., Zhang Z., Fu J., You L., He Y., Hao Y., Gu Z., Yu Z., Qu C., Yin X., Ni J., Cruz L.J. 2021. Hypericin-mediated photodynamic therapy for the treatment of cancer: a review. J. Pharm. Pharmacol. 73(4), 425-436.
- Draginic N., Jakovljevic V., Andjic M., Jeremic J., Srejovic I., Rankovic M., Tomovic M., Turnic T.N., Svistunov A., Bolevich S., Milosavljevic I. 2021. *Melissa* officinalis L. as a nutritional strategy for cardioprotection. Front. Physiol. 12, 661778.
- Dresler S., Kovacik J., Strzemski M., Sowa I., Wojciak-Kosior M. 2018. Methodological aspects of biologically active compounds quantification in the genus *Hypericum*. J. Pharm. Biomed. Anal. 155(5), 82–90.
- Dumitru M.G., Gănescu A. 2022. Antioxidant activity of alcoholic extract of Chelidonium majus L. flowers. Ann. Univ. Craiova Chem. 48, 63-69.
- 19. El Hadrami A., Adam L.R., El Hadrami I., Daayf F. 2010. Chitosan in plant protection. Mar. Drugs 8, 968–987.
- Farmakopea Polska V. 1999. Polskie Wydawnictwo Farmaceutyczne. Warszawa, 56–57.
- Gadzovska S., Maury S., Delaunay A., Spasenoski M., Hag'ege D., Courtois D., Joseph C. 2013. The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus, and cell suspension cultures on production of naphtodianthrones and phenylpropanoids in *Hypericum perforatum* L. Plant Cell Tissue Organ Cult. 113(1), 25–39.
- Gadzovska Simic, S., Tusevski, O., Maury, S., Delaunay, A., Joseph, C., Hag`ege, D.
  2014. Effects of polysaccharide elicitors on secondary metabolite production and antioxidant response in *Hypericum perforatum* L. shoot cultures. Sci. World J. 2014, 609649.
- Ghasemian S., Masoudian N., Nematpour F.S., Afshar A.S. 2020. Selenium enhances nutrient uptake and rosmarinic acid biosynthesis in *Melissa officinalis* L. under salinity stress. Iran. J. Plant Physiol. 11(1), 3489–3498.
- Ghosh U.K., Islam M.N., Siddiqui M.N., Cao X., Khan M.A.R. 2022. Proline, a multifaceted signaling molecule in plant responses to abiotic stress: understanding the physiological mechanisms. Plant Biol. 24(2), 227–239.

- Gilca M., Gamana L., Panaita E., Stoiana I., Atanasiu V. 2010. *Chelidonium majus* an integrative review: traditional knowledge versus modern findings. Forsch Komplementmed 17, 241–248.
- 26. Godínez-Mendoza P.L., Rico-Chavez A.K., Ferrusquía-Jimenez N.I., Carbajal-Valenzuela I.A., Villagomez-Aranda A.L., Torres-Pacheco I., Guevara-Gonzalez R.G. 2023. Plant hormesis: revising of the concepts of biostimulation, elicitation and their application in a sustainable agricultural production. Sci. Total Environ. 894, 164883.
- Golan K., Rubinowska K., Gorska-Drabik E. 2013. Physiological and biochemical responses of fern *Nephrolepis biserrata* (Sw.) Schott. to *Coccus hesperidum* L. infestation. Acta Biol. Crac. Bot. 55(1), 93–98.
- Gorelick J., Bernstein N. 2014. Elicitation: An underutilized tool in the development of medicinal plants as a source of therapeutic secondary metabolites. Adv. Agron. 124, 201–230.
- 29. Gruszczyk M. 2018. Dziurawiec zwyczajny (*Hypericum perforatum* L.). W: Uprawa ziół. poradnik dla plantatorów, Kołodziej B. (red.), PWRiL, Warszawa, s. 181-184.
- 30. Habibi G., Ghorbanzadeh P., Abedini M. 2016. Effects of selenium application on physiological parameters of *Melissa officinalis* L. plants. IJMAPR 32, 698–715.
- Halder M., Sarkar S., Jha S. 2019. Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. Eng. Life Sci. 19, 880– 895.
- 32. Hasanuzzaman M., Bhuyan B., Zulfiqar F., Raza A., Mohsin S.M., Al Mahmud J., Fujita M., Fotopoulos V. 2020. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: revisiting the crucial role of a universal defense regulator. Antioxidants 9(8), 681.
- Hashemi S.M., Naghavi M.R., Bakhshandeh E., Ghorbani M., Priyanatha C., Zandi P. 2021. Effects of abiotic elicitors on expression and accumulation of three candidate benzophenanthridine alkaloids in cultured greater celandine cells. Molecules 26(5), 1395.
- Hawrylak-Nowak B., Dresler S., Rubinowska K., Matraszek-Gawron R. 2021. Eliciting effect of foliar application of chitosan lactate on the phytochemical properties of *Ocimum basilicum* L. and *Melissa officinalis* L. Food Chem. 342, 128358.

- 35. Hawrylak-Nowak B., Hasanuzzaman M., Matraszek-Gawron R. 2018. Mechanisms of selenium-induced enhancement of abiotic stress tolerance in plants. W: Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance. Hasanuzzaman M., Fujita M., Oku H., Nahar K., Hawrylak-Nowak B. (red.), Springer, s. 269-295.
- Heath R.L., Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125, 189– 198.
- Herrera-Vásquez A., Salinas P., Holuigue L. 2015. Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. Front. Plant Sci. 6, 171.
- Hidangmayum A., Dwivedi P., Katiyar D., Hemantaranjan A. 2019. Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. Physiol. Mol. Biol. Plants 25(2), 313–326.
- Huang, H., Ullah, F., Zhou, D.-X.1, Yi, M., Zhao, Y., 2019. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. Front. Plant Sci. 10, 800.
- 40. Isah T. 2019. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. Biol Res. 52(1), 39.
- 41. Jakupi M., Demirbas S. 2022. Production of secondary metabolites through elicitors: their application in agriculture. JBST 1(3), 165-172.
- 42. Jalota K., Sharma V., Agarwal C., Jindal S. 2024. Eco-friendly approaches to phytochemical production: elicitation and beyond. Nat. Prod. Bioprospect. 14(1), 5.
- 43. Janda T., Gondor O.K., Yordanova R., Szalai G., Pál M. 2014. Salicylic acid and photosynthesis: signalling and effects. Acta Physiol. Plant. 36, 2537-2546.
- 44. Jena S., Choudhuri M.A. 1981. Glucolate metabolizm of three submerged aquatic angiosperms during aging. Aquat. Bot. 12, 345–354.
- 45. Kandoudi W., Németh-Zámboriné É. 2022. Stimulating secondary compound accumulation by elicitation: Is it a realistic tool in medicinal plants *in vivo*? Phytochem. Rev. 21, 2007–2025.
- 46. Kandoudi W., Radácsi P. Gosztola B., Zámboriné Németh É. 2022. Elicitation of medicinal plants *in* vivo – is it a realistic tool? The effect of methyl jasmonate and salicylic acid on Lamiaceae species. Horticulturae 8, 5.
- Katiyar D., Hemantaranjan A., Singh B. 2015. Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: A review. Ind. J. Plant Physiol. 20, 1–9.

- 48. Kleinwächter M., Paulsen J., Bloem E., Schnug E., Selmar D. 2015. Moderate drought and signal transducer induced biosynthesis of relevant secondary metabolites in thyme (*Thymus vulgaris*), greater celandine (*Chelidonium majus*) and parsley (*Petroselinum crispum*). Ind. Crops Prod. 64, 158-166
- 49. Król B. 2018. Melisa lekarska (*Melissa officinalis* L.). W: Uprawa ziół. Poradnik dla plantatorów, Kołodziej B. (red.), PWRiL, Warszawa, s. 298-302.
- Kumar D., Yusuf M.A., Singh P., Sardar M., Sarin N.B. 2014. Histochemical detection of superoxide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in Brassica juncea seedlings. Bio-Protocol 4(8), 1–4.
- Kuzel S., Vydra J., Triska J., Vrchotova N., Hruby M., Cigler P. 2009. Elicitation of pharmacologically active substances in an intact medical plant. J. Agric. Food Chem. 57 (17), 7907–7911.
- 52. Li Q., Li Y., Zh L., Xing B., Chen B. 2017. Dependence of plant uptake and diffusion of polycyclic aromatic hydrocarbons on the leaf surface morphology and microstructures of cuticular waxes. Sci. Rep. 7, 46235
- Li Y., Kong D., Fu Y., Sussman M.R., Wu H. 2020. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. Plant Physiol. Biochem. 148, 80-89.
- Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R. 1983. Determination of total carotenoids and chlorophyll *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. Biochem. Soc. Trans. 603, 591–592.
- 55. Łukaszewicz S., Politycka B. 2020. Selen w roślinach i jego wpływ na żerowanie i rozwój fitofagów. Prog. Plant Prod. 60(2), 119-127.
- 56. Malerba M., Cerana R. 2016. Chitosan effects on plant systems. Int. J. Mol. Sci., 17(7), 996.
- Małolepsza A., Urbanek H., Polit J. 1994. Some biochemical reactions of strawberry plants to infection with *Botrytis cinerea* and salicylic acid treatment. Acta Agrobot. 47(2), 73–81.
- 58. Marone D., Mastrangelo A.M., Borrelli G.M., Mores A., Laidò G., Russo M.A., Ficco D.B.M. 2022. Specialized metabolites: Physiological and biochemical role in stress resistance, strategies to improve their accumulation, and new applications in crop breeding and management. Plant Physiol. Biochem. 172, 48-55.
- 59. Mejía-Teniente L., Duran-Flores D.F., Chapa-Oliver A.M., Torres-Pacheco I., Cruz-Hern'andez A., Gonzalez-Chavira M.M., Ocampo-Velazquez R.V., Guevara-

Gonzalez R.G. 2013. Oxidative and molecular responses in *Capsicum annuum* L. after hydrogen peroxide, salicylic acid and chitosan foliar applications. Int. J. Mol. Sci. 14(5), 10178–10196.

- 60. Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J. Sci. Technol. 26, 211–219.
- Moon U.R., Mitra A. 2016. A mechanistic insight into hydrogen peroxide-mediated elicitation of bioactive xanthones in *Hoppea fastigiata* shoot cultures. Planta 24(1), 259–274.
- Moradkhani H., Sargsyan E., Bibak H., Naseri B., Sadat-Hosseini M., Fayazi-Barjin A., Meftahizade H. 2010. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant. J. Med. Plants Res. 4, 2753-2759.
- 63. Mostofa M.G., Rahman M.M., Siddiqui M.N., Fujita M., Tran L.S.P. 2020. Salicylic acid antagonizes selenium phytotoxicity in rice: selenium homeostasis, oxidative stress metabolism and methylglyoxal detoxification. J. Hazard. Mater. 394, 122572
- Moulick D., Mukherjee A., Das A., Roy A., Majumdar A., Dhar A., Pattanaik B.K., Chowardhara B., Ghosh D., Upadhyay M.K., Yadav P., Hazra S., Sarkar S., Mahanta S., Santra S.C., Choudhury S., Maitra S., Mishra U.N., Bhutia K.L., Skalicky M., Hossain A. 2024. Selenium – an environmentally friendly micronutrient in agroecosystem in the modern era: An overview of 50-year findings. Ecotoxicol. Environ. Saf. 270, 115832.
- Mukhtar Ahmed K.B., Khan M.M.A., Siddiqui H., Jahan A. 2020. Chitosan and its oligosaccharides, a promising option for sustainable crop production A review. Carbohydr. Polym. 227, 115331.
- Mullaicharam A., Halligudi N. 2018. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. Int. J. Res. Phytochem. Pharmacol. 1(1), 5–11.
- 67. Murchie E.H., Lawson T. 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. J. Exp. Bot. 64, 3983–3998.
- Murthy H.N., Kim Y.S., Par S.Y., Paek K.Y. 2014. Hypericins: biotechnological production from cell and organ cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98 (22), 9187– 9198.
- Nadova S., Miadokova E., Alfoldiova L., Kopaskova M., Hasplova K., Hudecova A., Vaculcikova D., Gregan F., Cipak L. 2008. Potential antioxidant activity, cytotoxic

and apoptosis-inducing effects of *Chelidonium majus* L. extract on leukemia cells. Neuro. Endocrinol. Lett. 29, 649-652.

- 70. Nakano Y., Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 22, 867–880.
- Nazari M.R., Abdossi V., Hargalani F.Z., Larijani K. 2022. Antioxidant potential and essential oil properties of *Hypericum perforatum* L. assessed by application of selenite and nano-selenium. Sci. Rep. 12, 6156.
- Nobakht S.Z., Akaberi M., Mohammadpou A.H., Tafazoli Moghadam A., Emami S.A. 2022. *Hypericum perforatum*: traditional uses, clinical trials, and drug interactions. Iran. J. Basic Med. Sci. 25(9), 1045–1058.
- 73. Norouzi M., Sajedi N.A., Gomarian M. 2018. Effects of salicylic acid and selenium at growth stages on yield and yield components of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under dryland farming condition. Environ. Stresses Crop Sci. 11(3), 579–589.
- 74. Nurzyńska-Wierdak R. 2013. Melisa lekarska (*Melissa officinalis* L.) skład chemiczny i aktywność biologiczna. Ann. UMCS, Sect. EEE, 23(1), 25–35.
- Ostrowska-Czubenko J., Pieróg M., Gierszewska M. 2016. Modyfikacja chitozanu krótki przegląd. Wiad. Chem. 70, 9–10.
- Pandit A., Indurkar A., Deshpande C., Jain R., Dandekar P. 2021. A systematic review of physical techniques for chitosan degradation. Carbohydr. Polym. Technol. Appl. 2, 1-10.
- Pant P., Pandey S., Dall'Acqua S. 2021. The influence of environmental conditions on secondary metabolites in medicinal plants: A literature review. Chem. Biodivers. 18(11), 2100345.
- Petrisor G., Motelica L., Craciun L.N., Oprea O.C., Ficai D., Ficai A. 2022. *Melissa officinalis*: Composition, pharmacological effects and derived release systems A review. Int. J. Mol. Sci. 23(7), 3591.
- Pistelli L., Tonelli M., Pellegrini E., Cotrozzi L., Pucciariello C., Trivellini A., Lorenzini G., Nali C. 2019. Accumulation of rosmarinic acid and behaviour of ROS processing systems in *Melissa officinalis* L. under heat stress. Ind. Crops Prod. 138, 111469.
- Qaderi M.M., Martel A.B., Strugnell C.A. 2023. Environmental factors regulate plant secondary metabolites. Plants 12, 447.
- 81. Ramirez-Estrada K., Vidal-Limon H., Hidalgo D., Moyano E., Goleniowski M., Cusidó R.M., Palazon J. 2016. Elicitation, an effective strategy for the

biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. Molecules 21, 182.

- Rizzo P., Altschmied L., Ravindran B.M., Rutten T., D'Auria J.C. 2020. The biochemical and genetic basis for the biosynthesis of bioactive compounds in *Hypericum perforatum* L., one of the largest medicinal crops in Europe. Genes 11(10), 1210.
- 83. Saleem M., Fariduddin Q., Castroverde, C.D.M. 2021. Salicylic acid: a key regulator of redox signalling and plant immunity. Plant Physiol. Biochem. 168, 381–397.
- Salmerón-Manzano E., Garrido-Cardenas J.A., Manzano-Agugliaro F. 2020. Worldwide research trends on medicinal plants. Int. J. Environ. Res. Public Health 17, 3376.
- Sathiyabama M., Bernstein N., Anusuya S. 2016. Chitosan elicitation for increased curcumin production and stimulation of defence response in turmeric (*Curcuma longa* L.). Ind. Crops Prod. 89, 87–94.
- Sayed T.E., Ahmed E.S.S. 2022. Improving artemisinin and essential oil production from Artemisia plant through in vivo elicitation with gamma irradiation nanoselenium and chitosan coupled with bio-organic fertilizers. Front. Energy Res. 10, 996253.
- Shakya P., Marslin G., Karthik S., Beerhuesd L., Franklin G. 2017. Elicitation as a tool to improve the profiles of high-value secondary metabolites and pharmacological properties of *Hypericum perforatum*. J. Pharm. Pharmacol. 71(1), 70–82.
- Sharan S., Sarin N.B., Mukhopadhyay K. 2019. Elicitor-mediated enhanced accumulation of ursolic acid and eugenol in hairy root cultures of *Ocimum tenuiflorum* L. is age, dose, and duration dependent. S. Afr. J. Bot. 124, 199–210.
- Shasmita B.S., Mishra P., Mishra P., Samal M., Mohapatra D., Monalisa K., Kumar Naik S. 2023. Recent advances in tissue culture and secondary metabolite production in *Hypericum perforatum* L. Plant Cell Tissue Organ Cult. 154, 13–28.
- Sirvent T., Gibson D. 2002. Induction of hypericins and hyperform in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. Physiol. Mol. Plant Pathol. 60, 311–320.
- 91. Skołucka-Szary K., Rieske P., Piaskowski S. 2016. Praktyczne aspekty zastosowania chityny i jej pochodnych w leczeniu ran. Chemik 70(2), 89–98.

- 92. Skrypnik L., Feduraev P., Golovin A., Maslennikov P., Styran T., Antipina M., Riabova A., Katserov D. 2022. The integral boosting effect of selenium on the secondary metabolism of higher plants. Plants 11, 3432.
- 93. Srivastava M., Singh G., Sharma S., Shukla S., Misra P. 2019. Elicitation enhanced the yield of glycyrrhizin and antioxidant activities in hairy root cultures of *Glycyrrhiza glabra* L. J. Plant Growth Regul. 38(2), 373-384.
- 94. Stasińska-Jakubas M., Hawrylak-Nowak B., Wójciak M., Dresler S. 2023. Comparative effects of two forms of chitosan on selected phytochemical properties of *Plectranthus amboinicus* (Lour.). Molecules 28(1), 376.
- 95. Subban K., Subramani R., Srinivasan V.P.M., Johnpaul M., Chelliah J. 2019. Salicylic acid as an effective elicitor for improved taxol production in endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. PLoS ONE 14(2), 0212736.
- 96. Syed F., Zahid N.Y., Hayat R., Khan M.A. 2021. Biofortification of horticultural crops with selenium. Agrobiol. Rec. 6, 36-42.
- Tamaoki M., Maruyama-Nakashita A. 2017. Molecular mechanisms of selenium responses and resistance in plants. W: Pilon-Smits, E., Winkel, L., Lin, Z.Q. (red.), Selenium in Plants. Springer, Cham, str. 35–51.
- Tavakoli S., Enteshari S., Yousefifard M. 2020. Investigation of the effect of selenium on growth, antioxidant capacity and secondary metabolites in *Melissa* officinalis. Iran. J. Plant Physiol. 10(2), 3125–3134.
- 99. Twaij B.M., Hasan M.N. 2022. Bioactive secondary metabolites from plant sources: types, synthesis, and their therapeutic uses. Int. J. Plant Biol. 13, 4-14.
- 100.Wang S., Alseekh S., Fernie A.R., Luo J. 2019. The structure and function of major plant metabolite modifications. Mol. Plant 12(7), 899-919.
- 101.Wójciak-Kosior M., Sowa I., Dresler S., Kováčik J., Staniak M., Sawicki J., Zielińska S., Świeboda R., Strzemski M., Kocjan R. 2019. Polyaniline based material as a new SPE sorbent for pre-treatment of *Chelidonium majus* extracts before chromatographic analysis of alkaloids. Talanta 194, 32–37.
- 102.Yahyazadeh M., Meinen R., Hänsch R., Abouzeid S., Selmar D. 2018. Impact of drought and salt stress on the biosynthesis of alkaloids in *Chelidonium majus* L. Phytochemistry 152, 204-212.
- 103.Yang H., Yang X., Ning Z., Kwon S.Y., Li M.L., Tack F.M., Kwon E.E., Rinklebe J., Yin R. 2022. The beneficial and hazardous effects of selenium on the health of the soil-plant-human system: An overview. J. Hazard. Mater. 422, 126876.

- 104. Yang L., Wen K.-S., Ruan X., Zhao Y.-X., Wei F., Wang Q. 2018. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. Molecules 23, 762.
- 105.Yun D., Yoon S.Y., Park S.J., Park Y.J. 2021. The anticancer effect of natural plant alkaloid isoquinolines. Int. J. Mol. Sci. 22, 1653.
- 106.Zielińska S., Jezierska-Domaradzka A., Wójciak-Kosior M., Sowa I., Junka A., Matkowski A.M. 2018. Greater celandine's ups and downs – 21 centuries of medicinal uses of *Chelidonium majus* from the viewpoint of today's Pharmacology. Front. Pharmacol. 9, 299.
- 107.Zirak N., Shafiee M., Soltani G., Mirzaei M., Sahebkar A. 2019. *Hypericum perforatum* in the treatment of psychiatric and neurodegenerative disorders: current evidence and potential mechanisms of action. J. Cell. Physiol. 234(6), 8496–8508.

Kopie opublikowanych prac





# **Protective, Biostimulating, and Eliciting Effects of Chitosan and Its Derivatives on Crop Plants**

Maria Stasińska-Jakubas and Barbara Hawrylak-Nowak \*D

Department of Botany and Plant Physiology, Faculty of Environmental Biology, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 15, 20-950 Lublin, Poland; maria.jakubas@up.lublin.pl \* Correspondence: barbara.nowak@up.lublin.pl

Abstract: Chitosan is a biodegradable and biocompatible polysaccharide obtained by partial deacetylation of chitin. This polymer has been gaining increasing popularity due to its natural origin, favorable physicochemical properties, and multidirectional bioactivity. In agriculture, the greatest hopes are raised by the possibility of using chitosan as a biostimulant, a plant protection product, an elicitor, or an agent to increase the storage stability of plant raw materials. The most important properties of chitosan include induction of plant defense mechanisms and regulation of metabolic processes. Additionally, it has antifungal, antibacterial, antiviral, and antioxidant activity. The effectiveness of chitosan interactions is determined by its origin, deacetylation degree and acetylation pattern, molecular weight, type of chemical modifications, pH, concentration, and solubility. There is a need to conduct research on alternative sources of chitosan, extraction methods, optimization of physicochemical properties, and commercial implementation of scientific progress outcomes in this field. Moreover, studies are necessary to assess the bioactivity and toxicity of chitosan nanoparticles and chitosan conjugates with other substances and to evaluate the consequences of the large-scale use thereof. This review presents the unique properties of chitosan and its derivatives that have the greatest importance for plant production and yield quality as well as the benefits and limitations of their application.

Keywords: chitosan; biostimulants; biotic elicitor; polycationic polymers; secondary metabolites

### 1. Introduction

Chitosan is a biopolymer obtained from chitin, which is the second most common natural polysaccharide after cellulose [1,2]. The discovery and first research on this compound date back to the 19th century, when the links between chemistry, botany, and medicine were discerned. Chitin was probably discovered in 1799 by English scientist A. Hachett, who extracted the compound from shells of marine invertebrates and described it as "a material with particular resistance to ordinary chemicals". However, he did not conduct further research on this compound. For this reason, it is believed that chitin, originally called fungine, was first isolated from fungi by French researcher H. Braconnot and subsequently described by Swiss chemist A. Hoffman in his doctoral thesis. Almost 20 years later, the same compound was isolated from insect cuticle by A. Odier and named chitin (Greek: chitōn-tunic, coat). In turn, chitosan was discovered accidentally in 1859 by French physiologist C. Rouget during the production of natural soap. The process of boiling water-dissolved chitin with the addition of concentrated potassium hydroxide resulted in the deacetylation of chitin in the alkaline solution yielding chitosan. Intensive research on the structure and properties of chitin and chitosan was carried out in the following years. The modified form of chitin was eventually named "chitosan" by German chemist and physiologist F. Hoppe-Seiler in 1894; however, the chemical structure of this compound was determined only in the mid-20th century [3–7].

Currently, the term chitosan denotes a group of biopolymer substances obtained in the process of chemical or enzymatic deacetylation of chitin with different (but not lower



Citation: Stasińska-Jakubas, M.; Hawrylak-Nowak, B. Protective, Biostimulating, and Eliciting Effects of Chitosan and Its Derivatives on Crop Plants. *Molecules* **2022**, *27*, 2801. https://doi.org/10.3390/ molecules27092801

Academic Editor: Agnieszka Ewa Wiącek

Received: 6 April 2022 Accepted: 26 April 2022 Published: 28 April 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https:// creativecommons.org/licenses/by/ 4.0/). than 50%) deacetylation degrees. Both chitosan and chitin are linear copolymers consisting of D-glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine linked together by  $\beta$ -1,4-glycosidic bonds. The main difference between these polymers is their deacetylation degree (DD) expressed as a percentage and defined as the ratio of the number of amino groups  $(-NH_2)$  to the total number of acetylamino groups (-NHCOCH<sub>3</sub>) present in chitin [1,4,8]. In addition, the solubility in dilute acids is a practical criterion for discriminating chitosan from chitin. The extraction of chitin begins with demineralization aimed at dissolving the calcium carbonate by acid treatment followed by deproteinization which uses, depending on the method (biological or chemical), enzymes or alkaline solutions. In order to obtain pure and colorless chitin, the last step is decolorization (Figure 1). The deacetylation process results in the removal of the acetyl groups ( $-CH_3CO$ ) from chitin and substitution of reactive  $-NH_2$  groups, thus resulting in the formation of chitosan, whose deacetylation degree depends primarily on the duration of the reaction, the temperature (90–120  $^{\circ}$ C), and the concentration of the aqueous NaOH solution (40–50%) used in the process. Although it occurs naturally in the cell walls of some fungi, bacteria, and algae as well as insect cuticles, chitosan for industrial and laboratory use is obtained from chitin derived mainly from the shells of marine invertebrates (shrimps, crabs, lobsters, and krill), which are wastes of marine food processing industry [1,8–10]. Until recently, the use of marine resources was considered one of the most effective methods for the extraction of chitin and the production of chitosan. An additional advantage was the possibility of disposal of a huge amount of waste generated by the marine food sector. However, some disadvantages and threats posed by this practice have been noticed in recent years, e.g., dependence on the fish industry, environmental hazards, and allergenicity of the final product, which depends on its purity. According to Ravindranathan et al. [11], chitosan thoroughly purified from impurity proteins and endotoxins is low-allergenic. However, the global chitin and chitosan market is developing very dynamically, and it has become important to look for alternative sources of these polymers for commercial and sustainable production. Currently, an increase in the number of studies on the production and applications of chitosan from various insect species can be observed. The primary cause of the interest is the speed of insect reproduction and the possibility of year-round breeding. Additionally, the results of many studies show that insect chitosan has even more favorable properties than that derived from shellfish. Recently, there have been attempts to produce chitosan from chitin derived from cell walls of fungi, which are the second-largest source of chitin after marine invertebrates [10,12–15], and biological methods are increasingly being used to obtain these polymers [2].

Chitosan is a compound with a number of physicochemical properties determining its suitability to be used in medicine, pharmacy, environmental protection, and agriculture as well as food, cosmetic, textile, and paper industries. These properties include nontoxicity; biodegradability; biocompatibility; hydrophilicity; film-forming properties; high sorption capacity; and high affinity for metals, proteins, and dyes. A summary of the extraction and applications of chitosan is presented in Figure 1. However, chitosan also exhibits many physicochemical properties that impede its wider use in some areas. The main limitation is its solubility, which largely depends on the isolation conditions, degree of deacetylation, type of acetyl group distribution, and molecular weight. There are many types of chitosan which are well soluble in both alkaline and neutral media, but in most cases, the best solvents for this group of polysaccharides are some acids. Additionally, chitosan swells strongly in an acidic environment and is characterized by poor mechanical and chemical strength. Therefore, chitosan is subjected to various types of physical and chemical modifications primarily aimed at improvement of its solubility and other physicochemical properties, e.g., mechanical strength, thus expanding the spectrum of its potential applications [8,13,16–19]. Three basic groups of chitosan modification techniques are used, i.e., methods leading to an increase in the molecular weight or extension of the chitosan chain; generation of chitosan derivatives through substitution reactions; and methods of physical, chemical, or enzymatic depolymerization. Chitosan derivatives

obtained through modifications are an important object in research on their application in biotechnology, agro-technology, and medicine as well as food, pharmaceutical, and textile industries [20,21].



Figure 1. Extraction, preparation, and applications of chitosan and chitosan derivatives.

### 2. Biological Activity of Chitosan

Chitosan is a biopolymer with a wide potential for application in plant production mainly due to its biocompatibility and biodegradability as well as high biological activity. Although it is not part of the structure of plant tissues, chitosan exerts a considerable impact on plant growth and development. It initiates and modulates various types of physiological reactions, e.g., defense and immune responses in plants, and regulates metabolic processes [22]. Chitosan also exhibits strong antibacterial, antifungal, and antiviral properties. The first investigations of its antimicrobial activity were reported in 1979 by Allan and Hadwiger, whose publication contributed to the growing interest in the potential application of chitosan in the agricultural industry. However, the practical use of this compound in plant production became possible with the wider availability of industrial amounts of chitosan. The compound has been used for protecting plants against pathogens and fighting diseases affecting plants during the vegetation and postharvest period only since the 1990s [23].

The mechanism of the antimicrobial activity of chitosan has not been fully elucidated yet, but many literature reports indicate that it is most probably related to its polycationic nature. The interactions of chitosan molecules with negatively charged molecules on the surface of microbial cells lead to agglutination of their cell walls, loss of intracellular components, and cell death. Another hypothesis assumes that chitosan limits the entry of pathogens into plant cells by reduction in stomatal opening. In turn, the antifungal activity of chitosan results from its ability to bind and inhibit the synthesis of toxins and stimulate induced systemic resistance and production of many secondary fungistatic metabolites, e.g., phytoalexins, abscisic acid, methyl jasmonate, and phenolic compounds, and various enzymes such as hypha-degrading chitinase and  $\beta$ -glucanase. Additionally, microscopic studies have shown that chitosan induces clear morphological changes in fungal cells at various stages of development. This polymer also reinforces plant cell walls through lignification and constitutes a mechanical barrier limiting plant contact with adverse external factors [4,24–29]. Consequently, the effectiveness of chitosan action against microorganisms is associated with its bidirectional action: control of the presence of pathogens and induction of plant defense reactions [30].

The high biological activity of chitosan in the induction of plant immune response may be related to the processes taking place in plant cell walls. Acid pectins present in the cell walls bind calcium and form chain dimers at higher concentrations of the element. Cationic chitosan can interact with negatively charged pectin and pectin dimers, thus influencing their supramolecular conformation, which induces a specific alarm signal informing plant cells about the degradation of cell walls and the presence of pathogens. The plant response to chitosan–pectin dimer complexes is considerably stronger than that in the case of separately interacting components [31].

Chitosan has been shown to have antioxidant activity consisting in the neutralization of such reactive oxygen species (ROS) as superoxide anion radicals, free hydroxyl radicals, and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). It is also involved in interactions of hydroxyl and amine groups with metal ions resulting in metal chelation, adsorption, and ion exchange [27,32]. However, research results have indicated that chitosan can also induce the synthesis of  $H_2O_2$  in plant cells as a signal molecule in defense reactions to stress and increase the activity of superoxide dismutase (SOD), peroxidases (POX), and catalase (CAT), i.e., enzymes involved in the direct neutralization of ROS [33]. As reported by Hawrylak-Nowak et al. [34], spraying plants with a chitosan lactate solution increased CAT and guaiacol peroxidase (GPOX) activity in Ocimum basilicum and ascorbate peroxidase (APX) in Melissa officinalis. Similarly, foliar application of chitosan nanoparticles increased the activity of CAT, APX, and glutathione reductase (GR) in *Catharanthus roseus* exposed to salt stress [35]. In turn, Quitadamo et al. [36] reported an important role of chitosan as a regulator of antioxidant responses to salinity in *Triticum durum*. It was observed that the use of this polymer neutralized the harmful effects of stress through a reduction in the content of superoxide radicals, H2O2, and malondialdehyde and via enhancement of CAT activity. In turn, the addition of chitosan as an elicitor in *Psammosilene tunicoides* hair root cultures was found to induce the production of nitric oxide and increase the activity of ROS-scavenging enzymes [37]. A similar effect was observed in *Curcuma longa* [38], where chitosan contributed to an increase in the activity of POX and polyphenol oxidase (PPO). Additionally, the results of research on the induction of oxidative responses by salicylic acid, chitosan, and exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Capsicum annuum* plants demonstrated

that, in comparison with other substances, the foliar application of chitosan induced the lowest  $H_2O_2$  accumulation in the leaves of this species [39]. The antioxidant activity of chitosan is also one of the criteria of its suitability to be used for enhancement of the storage stability of raw materials, which is described in detail in the next section. For example, in a study conducted by Wang and Gao [40], treatment of strawberries with chitosan induced a number of defense reactions; i.e., it increased the activity of CAT, GPOX, glutathione peroxidase (GSH-POX), dehydroascorbate reductase (DHAR), and monodehydroascorbate reductase (MDHAR).

The biological activity of chitosan and the viscosity of its solutions, and thus the effectiveness of its use, are determined by a number of different factors, e.g., the origin, type of modifications, polymerization and deacetylation degrees, pH, positive charge, concentration, solubility, and chelation capacity [26,41]. Recent studies also indicate the importance of the pattern of chitosan acetylation, which may be an important molecular carrier of information [42].

The effect of chitosan depends on the plant species, developmental stage, and physiological condition. In turn, the antimicrobial activity of this polymer depends on the type of microorganisms. However, molecular weight is the most important parameter with a large impact on the level of biological activity of chitosan [26,33]. For example, it was observed in an experiment carried out by Kulikov et al. [43] that a decrease in the molecular weight of chitosan was accompanied by an increase in its inhibitory activity against mosaic virus infection in *Phaseolus vulgaris*. Animal-derived chitosan is a high-molecular-weight polymer. Moreover, it exhibits antimicrobial activity only in an acidic environment, in which it is soluble. Therefore, it is important to develop technologies for modification and adaptation of chitosan in order to elicit adequately targeted biological activity of this compound [9,44].

#### 3. Application of Chitosan as a Biostimulant in Cultivation of Plants

Plant production is one of the most important elements of agriculture and the economy, which require continuous progress. The introduction of various novel technologies has contributed to the rapid increase in agricultural performance, but the search for ecological solutions increasing the efficiency of plant production has currently become essential [33]. Pro-ecological activities in this area are also enforced by the latest changes in agricultural policies, such as the European Green Deal, with one of the strategies aimed at a reduction in the use of plant protection products and the promotion of organic farming [45]. Hence, the interest in the use of natural-origin substances as stimulants of plant growth and development, the so-called biostimulants, has increased in recent years. The concept of biostimulants was proposed at the end of the 20th century but has not been clearly defined to date. Moreover, there are no adequate legal regulations for the systematization of available preparations or registration of new agents. However, the term "plant biostimulant" is assumed to denote any substance or formulation that is not a plant constituent, fertilizer, or pesticide but contains natural compounds (single or mixtures) or microorganisms. It is intended to be applied onto the whole plant, a part of a plant, or the rhizosphere in order to intensify natural physiological processes, increase plant resistance to stress, enhance the utilization of minerals, and improve the size and quality of crop yields [46–48].

Given its biological activity and film-forming properties, chitosan is widely used in treatments improving the propagation material, such as coating or encapsulation. It is most often used as an independent bioactive compound or a binding substance in combination with other agents stimulating plant growth and development and ensuring protection against pathogens. It is believed that coating the propagation material with a solution of this polymer mainly ensures adequate water and gas permeability, thus stimulating germination and development of seedlings [25,49]. It is also suggested that chitosan can activate hydrolytic enzymes required for the degradation and mobilization of storage substances, such as starch and protein [50]. A study conducted by Ruan and Xue [51] showed that coating *Oryza sativa* seeds with chitosan accelerated their germination and increased the

tolerance of these plants to salt stress. In turn, experiments carried out on tubers of freesia [52] showed that the application of a 0.2% chitosan solution increased the biomass and the number of progeny tubers in this species. Subsequent studies [53] demonstrated a positive effect of coating *Ornithogalum saundersiae* bulbs with a 0.5% aqueous solution of oligochitosan with 5000 or 100,000 g × mol<sup>-1</sup> molecular weight on plant yields and most of the analyzed biometric and physiological indicators. It was also found that different doses of chitosan stimulated seed germination and had a positive effect on the fresh weight of cucumber roots and shoots [54]. Similar results were reported by Zeng et al. [55]; i.e., treatment with a chitosan solution stimulated germination and increased yields in soybean.

Current literature reports indicate a high effectiveness of foliar or soil application of chitosan in the stimulation of plant growth. This may be related to its stimulating effect on the uptake of water and essential minerals and its impact on the osmotic pressure in cells [41]. It was reported that a solution of this polymer sprayed on strawberry plants exerted a beneficial effect on plant growth and fruit yield [56]. This finding was confirmed in a study conducted by Rahman et al. [57], where foliar treatment of strawberry with chitosan had a positive effect not only on the growth and yield of fruits but also on their chemical composition. Furthermore, the results reported by Poterańska et al. [58] indicated that foliar application of chitosan-containing agents had a positive effect on the weight of haskap berries. In turn, *Eustoma grandiflorum* plants grown in soil with the addition of chitosan flowered much earlier and produced a larger number and greater weight of flowers [59]. Equally positive results were reported by Chookhongkha et al. [60], who additionally indicated a variable effectiveness of chitosan depending on its molecular weight. It was found that 1% high-molecular-weight chitosan applied to soil had a beneficial effect on fruit and seed yields in *Capsicum annuum*.

The literature provides information on the potential use of chitosan in the fertilizer industry as an ingredient for the production of sustained (SRF) or controlled release (CRF) fertilizers. The interest in this polymer has mainly been aroused by its beneficial effect on soil and plants and some physicochemical features. Given its film-forming properties as well as high biocompatibility and biodegradability, chitosan can be used as a coating material regulating the rate of release of minerals into the soil solution; additionally, it can be used to solve the problem with the disposal of residues of coatings produced from non-biodegradable polymers. In the agrochemical industry, chitosan nanoparticles are used both to optimize the activity and efficiency of various types of formulations and to reduce their toxicity to the environment [23,61,62]. An example of such an application was shown in an experiment carried out by Abdel-Aziz et al. [63], in which the foliar application of a nanochitosan-NPK fertilizer contributed to an increase in wheat growth and yields compared to plants treated with traditional forms of nitrogen, phosphorus, and potassium.

### 4. Chitosan as a Plant Protection Agent

The presence of harmful organisms poses a serious threat to agriculture and many industries worldwide. According to data published in 2019 by the Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO), agrophages cause approximately 20–40% of losses of the world's crops annually [64]. The use of chemical plant protection products raises increasing concerns related to their negative impact on the environment despite their effectiveness. Given the growing ecological and consumer awareness and changes in the agricultural sector, the search for natural and safe methods for the protection of crops against pathogens and pests has become relevant. Chitosan is commonly described in the literature as a stimulant of plant resistance inducing natural defense mechanisms, which may reduce the amounts of synthetic plant protection products used in cultivation [33]. With its film-forming properties, this polymer can also act as a physical barrier limiting the contact between plants and pathogenic microorganisms [65]. Moreover, due to their potent antimicrobial activity, chitosan-based products can be used separately or in combination with other agents as biocides applied as hydrogels for coating tubers, fruits, and seeds; as a solution for soil or foliar application during or after vegetation; or as medium supplements
in hydroponic or tissue cultures [33]. Numerous studies have been carried out to assess the potential use of chitosan as a plant health-promoting agent. It was shown that soaking freesia tubers in a 0.2% solution of chitosan with different molecular weights (in the range of  $2000-970,000 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$ ) exerted a positive effect on their health [52]. In turn, the treatment of cucumber seeds with chitosan increased the resistance of seedlings to *Phytophthora capsici* in a concentration-dependent manner (0, 125, 250, and 500 ppm). The highest concentration ensured complete resistance of young cucumber plants to blight caused by the pathogen [54]. Treatment of soybeans with a chitosan solution was reported to reduce the presence of herbivorous insects [55]. Moreover, chitosan was found to induce an effective reduction in the viability of *Phomopsis viticola* spores [66]. Given its properties, it is also possible to use this polymer for the protection of herbal plants against pathogens. Szczeponek et al. [67] demonstrated the efficacy of a chitosan-based formulation against fungal species that infest lemon balm and peppermint most frequently. Chitosan can also be used to control pathogenic soil nematodes and increase plant resistance to these pests [41].

Chitosan is also one of the few active substances contained in formulations and fungicides approved for use in forestry for the protection of forest nurseries against pathogenic diseases [68]. As shown in an experiment carried out by Aleksandrowicz-Trzcińska et al. [69], foliar application of a chitosan-containing formulation increased the resistance of Scots pine to fungal infections. Other results of laboratory studies indicated that chitosan exerted a negative effect on growth and caused changes in the morphological and structural structure of *Cylindrocladium floridanum*, *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium acuminatum*, and *Fusarium oxysporum* fungi responsible for root rot in forest nurseries [70]. Moreover, there are a number of chitosan-based agents on the market for coating injuries and wounds in trees and shrubs.

### 5. Application of Chitosan in Storage

The main goal of storage is to reduce food losses by ensuring the longest possible shelf life, good quality of stored products, and the best possible protection of product stability before further distribution. An important role in this process is mainly played by the selection of optimal conditions and storage methods as well as the monitoring of such product quality parameters as the color, weight, firmness, content of bioactive compounds, and rate of ethylene and carbon dioxide production. However, in the case of low-processed raw materials, it is often necessary to employ various types of preservation methods. One of the options to preserve the quality of stored raw materials consists in a reduction in respiration and transpiration through the use of natural edible coatings. The potential of using chitosan in storage is associated with its physicochemical properties and biological activity. Given its natural origin, ability to form semipermeable coatings, and high antioxidant and antimicrobial activity, this polymer facilitates the maintenance and optimization of the postharvest stability of raw materials and food products and influences their chemical composition. Additionally, chitosan delays fruit ripening through the limitation of ethylene and carbon dioxide release. Therefore, it can be widely used in the production of biodegradable films, food packaging, fibers, gels, and films with high strength and flexibility. It can also be used as nanoparticles. Moreover, this polymer can be applied directly to fruits and vegetables as a single ingredient or in combination with other substances in order to create edible protective coatings with bacteriostatic and fungistatic properties [28,44,71]. Modifications achieved by combining chitosan with various types of substances offer many possibilities for the production of edible coatings and food packaging with required properties. For instance, conjugates of chitosan with phenolic (gallic and caffeic) acids produced durable films with adequate properties to serve as a barrier against water vapor and oxygen. They exhibited stronger antioxidant and antimicrobial activity than films based on traditional chitosan [72].

Numerous reports have demonstrated the suitability of chitosan for storage purposes, as its properties help to enhance the stability and quality of stored products. One of the examples is the research on the effect of chitosan coatings on the shelf life and quality of plum

fruit. The results of the experiment showed that the use of coatings containing 2% chitosan had a significant effect on the maintenance of the color, firmness, and weight of fruit stored at low temperature [73]. Similar results were obtained in a study of guava fruit stored at low temperature; i.e., the use of 2% chitosan coatings exerted a positive effect on the quality, firmness, and weight of fruit [74]. It was also observed that chitosan coatings increased the antioxidant properties of apricot fruits and contributed to the longer maintenance of a high total content of phenolic compounds [75]. Moreover, another experiment showed that chitosan coatings increased the storage stability of longan fruits and had a positive effect on their quality, color, and weight during storage [76]. A similar effect was reported in a study of *Actinidia melanandra* fruits, whose storage stability increased after the application of gel coatings containing this polymer [77]. In an experiment conducted by Zhu et al. [78], the application of chitosan coatings delayed the maturation and degradation of mangoes.

A study conducted by Tayel et al. [79] demonstrated that coating lemon fruit with chitosan inhibited the occurrence of *Penicillium* fungi. Moreover, the application of a chitosan-based formulation during the potato vegetation period was found to exert a limiting effect on the presence of *Fusarium* spp. and *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* causing dry and wet tuber rot during storage [80]. A similar protective effect against the presence of the bacterial pathogen *Acidovorax citrulli*, which causes fruit blotch, was achieved in the case of watermelon seedlings [81]. In turn, as reported by He et al. [82], the use of a chitosan spray before harvesting strawberries had a beneficial effect on the quality and shelf life of the fruit through maintenance of the content of sugars; vitamin *C*; and numerous secondary metabolites, e.g., total phenolic compounds, flavonoids, and anthocyanins. Furthermore, the use of different concentrations of chitosan with different molecular weights was shown to increase the resistance of tomato fruit to grey mold caused by *Botrytis cinerea*. This was associated with both the direct antifungal activity of chitosan and the induction of a biochemical defense response in the fruit, which resulted in increased accumulation of phenolic compounds and enhanced activity of PPO [83].

### 6. Chitosan and its Derivatives as Biotic Elicitors

The potential for application of chitosan and its derivatives in the elicitation process is related to the biological activity of this compound, which primarily involves the ability to stimulate natural plant defense mechanisms and increase plant resistance to stress. This is associated with various types of physiological and biochemical changes, such as oxidative stress; accumulation of  $H_2O_2$ ; synthesis of secondary metabolites (polyphenolic compounds, phytoalexins, flavonoids, alkaloids), enzymes (chitinase, glucanase, protease), and growth inhibitors (abscisic acid, jasmonic acid, salicylic acid); and accumulation of lignin and callose. The effect of chitosan on plants is reflected in changes in the chromatin structure, the inhibition of H<sup>+</sup>-ATPase activity in the cell membrane, the activation of MAP kinases, and an increase in the cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration [23,44,84]. Elicitation is aimed at stimulation of the biosynthesis of secondary metabolites present in plants or induction of the formation of new substances. It can solve problems related to the insufficient amount of bioactive compounds produced by plants, which does not cover the current needs, and bring benefits by providing high-quality raw materials with increased content of healthenhancing compounds [85]. The effectiveness of chitosan in elicitation largely depends on its solubility; therefore, chitosan salts, such as lactate or acetate, are the most commonly used derivatives of this polymer [21,34].

Numerous research publications report the effectiveness of chitosan and its derivatives in the elicitation process. Studies on *Curcuma longa* [86] indicated that the foliar application of a 0.1% chitosan solution triggered defense responses in the plants and had a positive effect on both plant growth and accumulation of curcumin in their rhizomes. A stimulating effect of 0.1% and 0.2% chitosan solutions was also reported in a study of *Stevia rebaudiana*. The application of chitosan increased the biomass and concentration of phenolic compounds and rebaudioside A [87]. A field experiment conducted on *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* demonstrated that the use of different concentrations of chitosan oligosaccharides (50,

200, 500, or 1000 ppm) exerted a beneficial effect on plant growth and the content of polyphenolic compounds [88].

The study conducted by Gerami et al. [89] suggested the possibility of the use of chitosan as an elicitor increasing S. rebaudiana tolerance to salinity and reducing its phytotoxic effects on these plants. Similar results were obtained in an experiment conducted by Safikhan et al. [90], in which chitosan mitigated the harmful effects of salt stress, stimulated growth, and had a positive effect on the physiological parameters of Silybum marianum. Furthermore, a study conducted in water deficit conditions showed that chitosan treatment of Salvia officinalis reduced the negative impact of drought stress. It also had a positive effect on the quantity and quality of essential oil, the total content of phenolic compounds and flavonoids, and the antioxidant properties of sage extracts [91]. A stimulating effect of a chitosan suspension and a chitosan solution in 1% acetic acid on the production of flavonoids in *Ononis arvensis* in in vitro conditions was demonstrated as well [92]. A chitosan solution in acetic acid used as an elicitor in *Mentha piperita* suspension cultures produced a significant increase in the accumulation of menthol [93]. In turn, the treatment of M. piperita with chitosan in greenhouse conditions increased the total content of phenolic compounds and flavonoids and enhanced the antioxidant activity of the extracts [94]. Chitosan also stimulated the production of triterpenoid saponins in *Psammosilene tunicoides* hair root cultures [37]. Moreover, the polymer was found to have a beneficial effect on biomass accumulation in cell cultures of three basil species: Ocimum basilicum, O. sanctum, and O. gratissimum [95]. Other studies carried out on O. basilicum indicated the effectiveness of chitosan elicitation in the stimulation of biomass growth, intensified accumulation of total phenolic and terpene compounds, elevation of rosmarinic acid and eugenol concentrations, and enhancement of antioxidant activity [96]. The foliar application of chitosan lactate stimulated the biosynthesis of rosmarinic acid, anthocyanins, and phenolic compounds in *O. basilicum* and *M. officinalis* raw materials [34].

The effects of the application of chitosan and its derivatives on the accumulation of secondary metabolites in selected plant species are shown in Table 1.

Plant Species	Plant Species Plant Growth Conditions		Dose, Method, and Number of Chitosan Applications	Effect of Chitosan on the Level of Secondary Metabolites	Reference
Artemisia annua	laboratory conditions; hairy root cultures	chitosan	50, 100, or 150 mg $L^{-1}$ of chitosan added to hairy root cultures	increased artemisinin production	Putalun et al. [97]
Curcuma longa	<i>Curcuma longa</i> field conditions		0.1% chitosan; foliar application; seven treatments	increased curcumin content	Sathiyabama et al. [38]
Dracocephalum kotschyi	glasshouse; mixture of peat, sandy soil, and perlite substrate	chitosan	100 or 400 mg L <sup>-1</sup> of chitosan; triple foliar application	enhanced biosynthesis of total phenolic and flavonoid compounds, including rosmarinic acid and apigenin	Kahromi and Khara [98]
Catharanthus roseus	greenhouse; sandy soil	chitosan nanoparti- cles	1% chitosan nanoparticles; single foliar application in salinity stress conditions	increased alkaloid accumulation	Hassan et al. [35]

**Table 1.** Effects of application of chitosan and its derivatives on the level of secondary metabolites in selected plant species.

Plant Species	Plant Growth Conditions	Chitosan Form	Dose, Method, and Number of Chitosan Applications	Effect of Chitosan on the Level of Secondary Metabolites	Reference	
Fragaria × annanasa	field conditions	chitosan	125, 250, 500, or 1000 ppm chitosan; foliar application; six treatments	increased amount of phenolic compounds, carotenoids, flavonoids, and anthocyanins in strawberry fruits	Rahman et al. [57]	
Ginkgo biloba	laboratory conditions; callus cultures	chitosan	25, 50, 100, or 200 mg $\rm L^{-1}$ of chitosan added to MS medium	enhanced production of total flavonoids and total phenolic compounds	Elateeq et al. [99]	
Iberis amara	laboratory conditions; cell suspension cultures	chitosan	50, 100, or 200 mg L <sup>-1</sup> of chitosan	enhanced total phenolic compounds, flavonoid, flavonol, and anthocyanin contents	Taghizadeh et al. [100]	
Isatis tinctoria	laboratory conditions; hairy root cultures	chitosan	50, 100, 150, 200, or 400 mg $L^{-1}$ of chitosan; hairy root cultures elicited for 6–96 h	increased total flavonoid accumulation	Jiao et al. [101]	
Melissa officinalis	phytotron room; soil substrate	chitosan lactate	100 or 500 mg L <sup>-1</sup> of chitosan lactate; single foliar application	increased accumulation of rosmarinic acid, anthocyanins, and total phenolic compounds	Hawrylak-Nowak et al. [34]	
Mentha piperita	greenhouse; soil phosphate	chitosan	50 or 100 μM chitosan; single foliar application	increased content of phenolic and flavonoid compounds	Salimgandomi and Shabrangi [94]	
Ocimum basilicum	greenhouse; potting substrate irrigated with a fertilizer solution	chitosan	0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5% or 1% chitosan; seed soaking (30 min.)	increased content of total phenolic and terpenic compounds (rosmarinic acid, eugenol)	Kim et al. [96]	
Origanum vulgare ssp. hirtum	field conditions	chitosan oligosaccha- rides	50, 200, 500, or 1000 ppm chitosan oligosaccharides; single foliar application	increased accumulation of total flavonoids and total polyphenolic compounds	Yin et al. [88]	
Psammosilene tunicoides	laboratory conditions; hairy root cultures	chitosan	200 mg L <sup>-1</sup> of chitosan; hairy roots elicited by chitosan for nine days	enhanced accumulation of total saponins, increased content of quillaic acid, gypsogenin, and gypsogenin-3-O-β-D- glucuronopyranoside	Qui et al. [37]	
Salvia officinalis	field conditions	chitosan	0.25 or 0.50 g $L^{-1}$ of chitosan; single foliar application in reduced irrigation conditions	increased amount of total phenolic and flavonoid content; enhanced production of $\alpha$ - and $\beta$ -pinene, limonene, $\alpha$ - and $\beta$ -thujone, camphor, and 1,8-cineole in the essential oil	Vosoughi et al. [91]	

### Table 1. Cont.

Plant Species	Plant Growth Conditions	Chitosan Form	Dose, Method, and Number of Chitosan Applications	Effect of Chitosan on the Level of Secondary Metabolites	Reference
Satureja isophylla	greenhouse; sandy soil	chitosan	0.2 or 0.4 g L <sup>-1</sup> of chitosan; foliar application	increased amount of essential oil; increased concentrations of essential oil constituents (carvacrol, β-bisabolene)	Salehi et al. [102]
Stevia rebaudiana	greenhouse; perlite and peat substrate	chitosan	0.2, 0.4, or 0.6 g $L^{-1}$ of chitosan; double foliar application in salinity stress conditions	increased content of steviol glycosides: stevioside and rebaudioside A	Gerami et al. [89]
Sylibum marianum	laboratory conditions; cell suspension cultures	chitosan	0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, or 50 mg L <sup>-1</sup> of chitosan in MS medium	enhanced accumulation of total flavonoids, total phenolic compounds, and silymarin	Shah et al. [103]

### Table 1. Cont.

### 7. Prospects for New Applications of Chitosan

Due to the wide availability and a number of its beneficial properties, an increase in the number of potential applications of chitosan and its derivatives has been observed in recent years. Nevertheless, despite its numerous advantages, the practical commercial-scale use of this polymer is still limited by some of its physicochemical features and is dependent on progress in the development of optimal methods for chemical modification and adaptation of the polymer for specific applications. To date, the greatest success in this regard has been achieved in nanotechnology, which is regarded as one of the five most groundbreaking fields of science and technology of the last century [6,104,105]. The achievements of this discipline facilitate a wide use of chitosan nanomaterials in various types of biomedical, cosmetic, food, ecological, and agrotechnical innovations [13,16]. The application of nanoparticles facilitates more effective utilization of the biological properties of chitosan.

One of the most important prospects for the use of chitosan in nanotechnology is the concept of sustainability of the agrochemical industry through the production of the so-called agronanochemicals. It mainly involves the preparation of chitosan nanoparticles and chitosan nanocomposites or encapsulation of active substances in chitosan-based nanocarriers. The preparations primarily exhibit high efficiency and bioavailability; hence, they can constitute a more economical environmentally friendly alternative limiting the amounts of currently available chemicals [17,104,106,107].

Chitosan may exert a positive effect on plant photosynthetic efficiency, ability to biosynthesize and accumulate chlorophyll, and nutrient uptake [27,106,108,109]. The available research results demonstrate that chitosan nanoparticles have a greater impact on the macronutrient uptake efficiency than chitosan oligomers. Experiments carried out in greenhouse conditions showed that chitosan nanoparticles contributed to an increase in photosynthetic efficiency; chlorophyll content; and nitrogen, phosphorus, and potassium absorption in *Coffea canephora* [110]. Similar results were reported by Sathiyabama and Manikandan [111], who found that the foliar application of nanochitosan stimulated growth and increased the mineral content in *Eleusine coracana*.

Various research results also indicate the possibility of using chitosan to increase plant tolerance to abiotic and biotic stress factors and mitigate their phytotoxic effects [35,107,109]. Many reports show the effectiveness of chitosan in increasing plant resistance to salinity, drought, or low-temperature stress [112,113]. It was shown that spraying with a solution containing 1% chitosan nanoparticles alleviated the effects of salt stress through the

activation of defense mechanisms in *Catharanthus roseus* [35,109]. The foliar application of a solution containing chitosan nanoparticles (400 mg  $L^{-1}$ ) to bananas enhanced their tolerance to low temperature and improved biometric parameters via a reduction in the oxidative stress intensity [113]. In turn, Kocięcka and Liberacki [112] reported the effectiveness of chitosan, its derivatives, and nanoparticles in the stimulation of the resistance of cereals to such abiotic stress factors as low temperature, drought, and salinity and in the enhancement of the health of plants and improvement of their quality.

This polymer can also be used in combination with other compounds not only to extend the spectrum of its activity but also to produce materials with more favorable mechanical, chemical, thermal, and barrier properties [17,107,114]. The use of chitosan in the production of nanocomposites may also increase the effectiveness of other chemical compounds or elements, e.g., zinc, iron, copper, and silver [107,114]. In addition to the stimulation of the efficiency of agrochemicals, these nanocomposites enhance the biosynthesis of secondary metabolites and may accelerate plant regeneration. An example of this type of use is the application of zinc encapsulated chitosan nanoparticles, which had a beneficial effect on the growth, health, and quality of maize kernels [115]. In turn, studies of *Capsicum annuum* tissue cultures showed that a composite of zinc oxide and chitosan nanoparticles contributed to a significant increase in its elicitation efficiency [116].

Chitosan nanoparticles can reduce the amount and frequency of application of plant protection products, ameliorate their negative effects, and help to monitor and remove their excess from soils and waters [23,117]. Due to its cationic nature and high affinity to metals and dyes, chitosan is also one of the preferred natural and relatively cheap adsorbents replacing the currently used active carbon, with similar sorption properties in water engineering [2,10,105,118]. In water remediation, similar to other applications, chitosan can be used alone or in combination with other substances, e.g., activated carbon or silicon dioxide. Nanocomposites made of chitosan and activated carbon, whose combination ensures a significant increase in their adsorption capacity, are one example [118,119].

The main applications of chitosan and its derivatives in plant production are summarized in Figure 2.



Figure 2. Application of chitosan and its derivatives in plant production.

### 8. Conclusions

Chitosan is an easily available environmentally friendly biopolymer with numerous favorable biological properties; hence, it has many applications in various fields. Additionally, it can be a potential solution to various ecological problems, especially in the production of plants by increasing their internal potential. Biodegradable and biocompatible chitosan and chitosan-based nanomaterials are becoming essential in agriculture due to their unique properties, such as biostimulating, eliciting, and antimicrobial activity and stimulation of plant growth and tolerance to environmental stresses. However, the use of other effective sources of chitosan, the methods for extraction and optimization of its physicochemical properties, and the practical implementation of laboratory results should be investigated comprehensively. Moreover, detailed studies on the potential toxicity of chitosan-based nanomaterials and the ecological consequences of their large-scale use are required. At present, these substances are not being widely used in agriculture, as the mechanisms of their biological activity in plants and action against pathogenic microorganisms have not been fully elucidated to date.

**Author Contributions:** Conceptualization, B.H.-N. and M.S.-J.; formal analysis, B.H.-N.; writing—original draft preparation, M.S.-J.; writing—review and editing, B.H.-N.; visualization, M.S.-J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding. The APC (Article Processing Charges) was partially funded by the Doctoral School of the University of Life Sciences in Lublin (grant number SD/48/NB/2022).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

### References

- 1. Hidangmayum, A.; Dwivedi, P.; Katiyar, D.; Hemantaranjan, A. Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. *Physiol. Mol. Biol. Plants* **2019**, *25*, 313–326. [CrossRef] [PubMed]
- Muthu, M.; Gopal, J.; Chun, S.; Devadoss, A.J.P.; Hasan, N.; Sivanesan, I. Crustacean waste-derived chitosan: Antioxidant properties and future perspective. *Antioxidants* 2021, 10, 228. [CrossRef] [PubMed]
- 3. Khoushab, F.; Yamabhai, M. Chitin research revisited. Mar. Drugs 2010, 8, 1988–2012. [CrossRef]
- Ferri, M.; Tassoni, A. Chitosan as elicitor of health beneficial secondary metabolites in in vitro plant cell cultures. In *Handbook* of Chitosan Research and Applications; Mackay, R.G., Tait, J.M., Eds.; Nova Science Publishers Inc.: Hauppauge, NY, USA, 2011; pp. 389–414.
- 5. Berezina, N. Production and application of chitin. *Phys. Sci. Rev.* 2016, *1*, 20160048. [CrossRef]
- 6. Bakshi, P.S.; Selvakumar, D.; Kadirvelu, K.; Kumar, N.S. Chitosan as an environment friendly biomaterial–A review on recent modifications and applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *150*, 1072–1083. [CrossRef]
- Iber, B.T.; Kasan, N.A.; Torsabo, D.; Omuwa, J.W. A review of various sources of chitin and chitosan in nature. *J. Renew. Mater.* 2022, 10, 1097–1123. [CrossRef]
- From Chitin to Chitosan. Available online: http://www.glycopedia.eu/IMG/pdf/from\_chitin\_to\_chitosan-2.pdf. (accessed on 17 November 2021).
- 9. Pandit, A.; Indurkar, A.; Deshpande, C.; Jain, R.; Dandekar, P. A systematic review of physical techniques for chitosan degradation. *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* **2021**, *2*, 100033. [CrossRef]
- 10. Ma, J.; Faqir, Y.; Tan, C.; Khaliq, G. Terrestrial insects as a promising source of chitosan and recent developments in its application for various industries. *Food Chem.* **2022**, *373*, 131407. [CrossRef]
- 11. Ravindranathan, S.; Koppolu, B.P.; Smith, S.G.; Zaharoff, D.A. Effect of chitosan properties on immunoreactivity. *Mar. Drugs* **2016**, 14, 91. [CrossRef]
- 12. Hahn, T.; Tafi, E.; Paul, A.; Salvia, R.; Falabella, P.; Zibek, S. Current state of chitin purification and chitosan production from insects. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2020**, *95*, 2775–2795. [CrossRef]
- 13. Santos, V.P.; Marques, N.S.S.; Maia, P.C.S.V.; Lima, M.A.B.; Franco, L.O.; Campos-Takaki, G.M. Seafood waste as attractive source of chitin and chitosan production and their applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4290. [CrossRef] [PubMed]

- Mohan, K.; Ganesan, A.R.; Muralisankar, T.; Jayakumar, R.; Sathishkumar, P.; Uthayakumar, V.; Chandirasekar, R.; Revathi, N. Recent insights into the extraction, characterization, and bioactivities of chitin and chitosan from insects. *Trends Food Sci. Technol.* 2020, 105, 17–42. [CrossRef] [PubMed]
- 15. Shahrajabian, M.H.; Chaski, C.; Polyzos, N.; Tzortzakis, N.; Petropoulos, S. Sustainable agriculture systems in vegetable production using chitin and chitosan as plant biostimulants. *Biomolecules* **2021**, *11*, 819. [CrossRef] [PubMed]
- 16. Venkatraman, P. Chitosan: An antimicrobial polymer. J. Undergrad. Mater. Res. 2015, 5, 11–13. [CrossRef]
- Azmana, M.; Mahmood, S.; Hilles, A.R.; Rahman, A.; Arifin, M.A.B.; Ahmed, S. A review on chitosan and chitosan-based bionanocomposites: Promising material for combatting global issues and its applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 2021, 185, 832–848. [CrossRef] [PubMed]
- Varum, K.M.; Ottoy, M.H.; Smidsrod, O. Water-solubility of partially N-acetylated chitosans as a function of pH: Effect of chemical composition and depolymerisation, *Carbohydr. Polym.* 1994, 25, 65–70. [CrossRef]
- Blagodatskikh, I.V.; Kulikov, S.; Vyshivannaya, O.; Bezrodnykh, E.; Tikhonov, V. N-Reacetylated oligochitosan: pH dependence of self-assembly properties and antibacterial activity. *Biomacromolecules* 2017, *18*, 1491–1498. [CrossRef]
- Ji, J.; Wang, L.; Yu, H.; Chen, Y.; Zhao, Y.; Zhang, H.; Amer, W.A.; Sun, Y.; Huang, L.; Saleem, M. Chemical modifications of chitosan and its applications. *Polym. Plast. Technol. Eng.* 2014, 53, 1494–1505. [CrossRef]
- Kowalczyk, D.; Kordowska-Wiater, M.; Nowak, J.; Baraniak, B. Characterization of films based on chitosan lactate and its blends with oxidized starch and gelatin. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015, 77, 350–359. [CrossRef]
- Placek, M.; Dobrowolska, A.; Wraga, K.; Zawadzińska, A.; Żurawik, P. The use of chitosan in cultivation, preservation and protection of horticultural plants. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 2009, 3–4, 101–109. (In Polish)
- 23. Malerba, M.; Cerana, R. Chitosan effects on plant systems. Int. J. Mol. Sci. 2016, 17, 996. [CrossRef] [PubMed]
- Bautista-Banos, S.; Hernandez-Lauzardo, A.N.; Velazquez-del Valle, M.G.; Hernandez-Lopez, M.; Ait Barka, E.; Bosquez-Molina, E.; Wilson, C.L. Chitosan as a potential natural compound to control pre- and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Prot.* 2006, 25, 108–118. [CrossRef]
- Hadwiger, L.A. Multiple effects of chitosan on plant systems: Solid science or hype. *Plant Sci.* 2013, 208, 42–49. [CrossRef] [PubMed]
- Hosseinnejad, M.; Jafari, S.M. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. Review. Int. J. Biol. Macromol. 2016, 85, 467–475. [CrossRef] [PubMed]
- 27. Divya, K.; Jisha, M.S. Chitosan nanoparticles preparation and applications. Environ. Chem. Lett. 2018, 16, 101–112. [CrossRef]
- Morin-Crini, N.; Lichtfouse, E.; Torri, G.; Crini, G. Applications of chitosan in food, pharmaceuticals, medicine, cosmetics, agriculture, textiles, pulp and paper, biotechnology and environmental chemistry. *Environ. Chem. Lett.* 2019, 17, 1667–1692. [CrossRef]
- Wang, W.; Xue, C.; Mao, X. Chitosan: Structural modification, biological activity and application, Review. Int. J. Biol. Macromol. 2020, 164, 4532–4546. [CrossRef]
- 30. Hassan, O.; Chang, T. Chitosan for eco-friendly control of plant disease. Asian J. Plant Pathol. 2017, 11, 53–70. [CrossRef]
- Cabrera, J.C.; Boland, A.; Cambier, P.; Frettinger, P.; Van Cutsem, P. Chitosan oligosaccharides modulate the supramolecular conformation and the biological activity of oligogalacturonides in *Arabidopsis*. *Glycobiology* 2010, 20, 775–786. [CrossRef]
- 32. Rajalakshmi, A.; Krithiga, N.; Jayachitra, A. Antioxidant activity of the chitosan extracted from shrimp exoskeleton. *Middle-East J. Sci. Res.* 2013, *16*, 1446–1451. [CrossRef]
- Katiyar, D.; Hemantaranjan, A.; Singh, B. Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: A review. *Ind. J. Plant Physiol.* 2015, 20, 1–9. [CrossRef]
- Hawrylak-Nowak, B.; Dresler, S.; Rubinowska, K.; Matraszek-Gawron, R. Eliciting effect of foliar application of chitosan lactate on the phytochemical properties of *Ocimum basilicum* L. and *Melissa officinalis* L. *Food Chem.* 2021, 342, 128358. [CrossRef] [PubMed]
- Hassan, F.A.S.; Ali, E.; Gaber, A.; Fetouh, M.I.; Mazrou, R. Chitosan nanoparticles effectively combat salinity stress by enhancing antioxidant activity and alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Physiol. Biochem.* 2021, 162, 291–300. [CrossRef] [PubMed]
- 36. Quitadamo, F.; De Simone, V.; Beleggia, R.; Trono, D. Chitosan-induced activation of the antioxidant defense system counteracts the adverse effects of salinity in durum wheat. *Plants* **2021**, *10*, 1365. [CrossRef]
- Qiu, H.; Su, L.; Wang, H.; Zhang, Z. Chitosan elicitation of saponin accumulation in *Psammosilene tunicoides* hairy roots by modulating antioxidant activity, nitric oxide production and differential gene expression. *Plant Physiol. Biochem.* 2021, 166, 115–127. [CrossRef]
- 38. Sathiyabama, M.; Bernstein, N.; Anusuya, S. Chitosan elicitation for increased curcumin production and stimulation of defence response in turmeric (*Curcuma longa* L.). *Ind. Crops Prod.* **2016**, *89*, 87–94. [CrossRef]
- Mejía-Teniente, L.; Durán-Flores, D.; Chapa-Oliver, A.; Torres-Pacheco, I.; Cruz-Hernández, A.; González-Chavira, M.; Ocampo-Velázquez, R.; Guevara-González, R. Oxidative and molecular responses in *Capsicum annuum* L. after hydrogen peroxide, salicylic acid and chitosan foliar applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 10178–10196. [CrossRef]
- 40. Wang, S.; Gao, H. Effect of chitosan-based edible coating on antioxidants antioxidant enzyme system and postharvest fruit quality of strawberries (*Fragaria* × *aranassa* Duch). *Food Sci. Technol.* **2013**, *52*, 71–79. [CrossRef]
- 41. Chakraborty, M.; Hasanuzzaman, M.; Rahman, M.; Khan, M.A.R.; Bhowmik, P.; Mahmud, N.U.; Tanveer, M.; Islam, T. Mechanism of plant growth promotion and disease suppression by chitosan biopolymer. *Agriculture* **2020**, *10*, 624. [CrossRef]

- 42. Basa, S.; Nampally, M.; Honorato, T.; Das, S.N.; Podile, A.R.; El Gueddari, N.E.; Moerschbacher, B.M. The pattern of acetylation defines the priming activity of chitosan tetramers. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 1975–1986. [CrossRef]
- 43. Kulikov, S.N.; Chirkov, S.N.; Il'ina, A.V.; Lopatin, S.A.; Varlamov, V.P. Effect of the molecular weight of chitosan on its antiviral activity in plants. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2006**, *42*, 200–203. [CrossRef]
- Rabea, E.I.; Badawy, M.E.T.; Stevens, C.V.; Smagghe, G.; Steurbaut, W. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules* 2003, 4, 1457–1465. [CrossRef] [PubMed]
- 45. A European Green Deal. Available online: https://ec.europa.eu/info/strategy/priorities-2019-2024/european-green-deal (accessed on 7 December 2021).
- Dmytryk, A.; Rój, E.; Wilk, R.; Chojnacka, K.; Górecki, H. Effect of new biostimulators on the initial phase of plant growth. *Przem. Chem.* 2014, 93, 1020–1025. (In Polish)
- 47. Matyjaszczyk, E. The introduction of biostimulants on the Polish market. The present situation and legal requirements. *Przem. Chem.* **2015**, *10*, 1841–1844. (In Polish) [CrossRef]
- 48. Posmyk, M.M.; Szafrańska, K. Biostimulators: A new trend towards solving an old problem. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 748. [CrossRef]
- 49. Korbecka-Glinka, G.; Wiśniewska-Wrona, M.; Kopania, E. The use of natural polymers for treatments enhancing sowing material. *Polimery* **2021**, *66*, 11–20. [CrossRef]
- 50. Hameed, A.; Sheikh, M.; Hameed, A.; Farooq, T.; Basra, S.; Jamil, A. Chitosan priming enhances the seed germination, antioxidants, hydrolytic enzymes, soluble proteins and sugars in wheat seeds. *Agrochimica* **2013**, *67*, 32–46.
- 51. Ruan, S.; Xue, Q. Effects of chitosan coating on seed germination and salt-tolerance of seedling in hybrid rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Agron. Sin.* **2002**, *28*, 803–808.
- 52. Salachna, P.; Bartkowiak, A.; Mazurkiewicz-Zapałowicz, K.; Placek, M. Assessment of the effect of chitosan on the yield and health of freesia tubers (*Freesia* Eckl. Ex klatt) cv. 'Versailles'. *Rocz. AR Pozn. CCCLXXXIII Ogrodn.* **2007**, *41*, 177–181. (In Polish)
- 53. Salachna, P. Use of chitosan derivatives to improve the growth of ornamentals. *Inż. Ekolog.* **2017**, *18*, 63–68. [CrossRef]
- 54. Zohara, F.; Surovy, M.Z.; Khatun, A.; Prince, M.F.R.K.; Akanda, A.M.; Rahman, M.; Islam, T. Chitosan biostimulant controls infection of cucumber by *Phytophthora capsici* through suppression of asexual reproduction of the pathogen. *Acta Agrobot.* **2019**, 72, 1763. [CrossRef]
- 55. Zeng, D.; Luo, X.; Tu, R. Application of bioactive coatings based on chitosan for soybean seed protection. *Int. J. Carbohydr. Chem.* **2012**, 2012, 104565. [CrossRef]
- 56. El-Miniawy, S.M.; Ragab, M.E.; Youssef, S.M.; Metwally, A.A. Response of strawberry plants to foliar spraying of chitosan. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* **2013**, *9*, 366–372.
- Rahman, M.; Mukta, J.A.; Sabir, A.A.; Gupta, D.R.; Mohi-Ud-Din, M.; Hasanuzzaman, M.; Miah, M.G.; Rahman, M.; Islam, M.T. Chitosan biopolymer promotes yield and stimulates accumulation of antioxidants in strawberry fruit. *PLoS ONE* 2018, 13, e0203769. [CrossRef] [PubMed]
- Poterańska, N.; Mijowska, K.; Ochmian, I. The influence of foliar calcium fertilizers and bio-stimulators on bushes growth, yield and fruit quality of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) Czarna cultivar. In *Research and Development of Young Scientists in Poland–Life Sciences*; Young Scientists: Szczecin, Poland, 2015; pp. 132–138. (In Polish)
- Ochta, K.; Taniguchi, A.; Konishi, N.; Hosoki, T. Chitosan treatment affects plant growth and flower quality in *Eustoma grandiflorum*. *HortScience* 1999, 34, 233–234. [CrossRef]
- Chookhongkha, N.; Miyagawa, S.; Jirakiattikul, Y.; Photchanachai, S. Chili growth and seed productivity as affected by chitosan. In Proceedings of the International Conference on Agriculture Technology and Food Sciences (ICATFS'2012), Manila, Philippines, 17–18 November 2012; pp. 146–149.
- 61. Lubkowski, K.; Grzmil, B. Controlled release fertilizers. Pol. J. Chem. Technol. 2007, 9, 81–84. [CrossRef]
- 62. Gumelar, M.D.; Hamzah, M.; Hidayat, A.S.; Saputra, D.A.; Idvan. Utilization of chitosan as coating material in making NPK slow release fertilize. *Macromol. Symp.* 2020, 391, 1900188. [CrossRef]
- Abdel-Aziz, H.M.M.; Hasaneen, M.N.A.; Omer, A.M. Nano chitosan-NPK fertilizer enhances the growth and productivity of wheat plants grown in sandy soil. Span. J. Agric. Res. 2016, 14, e0902. [CrossRef]
- 64. New Standards to Curb the Global Spread of Plant Pests and Diseases. Available online: https://www.fao.org/news/story/en/ item/1187738/icode/ (accessed on 17 December 2021).
- 65. Orzali, L.; Corsi, B.; Forni, C.; Riccioni, L. Chitozan in agriculture: A new challenge for managing plant disease. In *Biological Activities and Application of Marine Polysaccharide*; Shalaby, E.A., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2016; pp. 17–36. [CrossRef]
- 66. Król, E. Influence of some chemicals on the viability of Phomopsis viticola Sacc. spores. J. Plant Prot. Res. 2005, 45, 195203.
- 67. Szczeponek, A.; Mazur, S.; Nawrocki, J. The usage of chitosan in protection of some peppermint and lemon balm pathogens. *Prog. Chem. Appl. Chitin Deriv.* 2006, *Monograph XI*, 193–200.
- Karmiłowicz, E. The use of fungicides in a protection of forest nurseries against fungal diseases in Poland. *Post. Ochr. Roślin* 2019, 59, 53–61. (In Polish)
- Aleksandrowicz-Trzcińska, M.; Bogusiewicz, A.; Szkop, M.; Drozdowski, S. Effect of chitosan on disease control and growth of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in a forest nursery. *Forests* 2015, 6, 3165–3176. [CrossRef]
- Laflamme, P.; Benhamou, N.; Bussires, G.; Dessureault, M. Different effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries. *Can. J. Bot.* 2000, 77, 1460–1468. [CrossRef]

- 71. Abd El-Hack, M.E.; El-Saadony, M.T.; Shafi, M.E.; Zabermawi, N.M.; Arif, M.; Batiha, G.E.; Khafaga, A.F.; Abd El-Hakim, Y.M.; Al-Sagheer, A.A. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020, 164, 2726–2744. [CrossRef]
- 72. Wang, Y.; Du, H.; Xie, M.; Ma, G.; Yang, W.; Hu, Q.; Pei, F. Characterization of the physical properties and biological activity of chitosan films grafted with gallic acid and caffeic acid: A comparison study. *Food Packag. Shelf Life* **2019**, 22, 100401. [CrossRef]
- 73. Kumar, P.; Sethi, S.; Sharma, R.R.; Srivastav, M.; Varghese, E. Effect of chitosan coating on postharvest life and quality of plum during storage at low temperature. *Sci. Hortic.* **2017**, *226*, 104–109. [CrossRef]
- 74. Hong, K.; Xie, J.; Zhang, L.; Sun, D.; Gong, D. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of guava (*Psidium guajava* L.) fruit during cold storage. *Sci. Hortic.* **2012**, *144*, 172–178. [CrossRef]
- Ghasemnezhad, M.; Shiri, M.A.; Sanavi, M. Effect of chitosan coatings on some quality indices of apricot (*Prunus armeniaca* L.) during cold storage. *Casp. J. Env. Sci.* 2010, *8*, 25–33.
- 76. Jiang, Y.; Li, Y. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. Food Chem. 2001, 73, 139–143. [CrossRef]
- 77. Kaya, M.; Cesoniene, L.; Daubaras, R.; Leskauskaite, D.; Zabulione, D. Chitosan coating of red kiwifruit (*Actinidia melanandra*) for extending of the shelf life. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *85*, 355–360. [CrossRef]
- Zhu, X.; Wang, Q.; Cao, J.; Jiang, W. Effects of chitosan coating on postharvest quality of mango (*Mangifera indica* L. Cv. Tainong) fruits. J. Food Process. Preserv. 2008, 32, 770–784. [CrossRef]
- 79. Tayel, A.A.; Moussa, S.H.; Salem, M.F.; Mazrou, K.E.; El-Tras, W.F. Control of citrus molds using bioactive coatings incorporated with fungal chitosan/plant extracts composite. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 1306–1312. [CrossRef] [PubMed]
- Kurzawińska, H.; Mazur, S. Effect of selected preparations used in vegetation period on occurrence of potato tubers rot during the storage. *Post. Ochr. Roślin* 2012, 52, 73–77. (In Polish)
- 81. Li, B.; Shi, Y.; Shan, C.; Zhou, Q.; Ibrahim, M.; Wang, Y.; Wu, G.; Li, H.; Xie, G.; Sun, G. Effect of chitosan solution on the inhibition of *Acidovorax citrulli* causing bacterial fruit blotch of watermelon. *J. Sci. Food Agric.* **2013**, *93*, 1010–1015. [CrossRef] [PubMed]
- He, Y.; Bose, S.K.; Wang, W.; Jia, X.; Lu, H.; Yin, H. Pre-harvest treatment of chitosan oligosaccharides improved strawberry fruit quality. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 2194. [CrossRef] [PubMed]
- Badawy, M.E.I.; Rabea, E.I. Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 2009, *51*, 110–117. [CrossRef]
- 84. El Hadrami, A.; Adam, L.R.; El Hadrami, I.; Daayf, F. Chitosan in plant protection. Mar. Drugs 2010, 8, 968–987. [CrossRef]
- 85. Gorelick, J.; Bernstein, N. Elicitation: An underutilized tool in the development of medicinal plants as a source of therapeutic secondary metabolites. *Adv. Agron.* 2014, 124, 201–230. [CrossRef]
- 86. Sathiyanarayanan, A.; Sathiyabama, M. Effect of chitosan on growth, yield and curcumin content in turmeric under field condition. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2016**, *6*, 102–106. [CrossRef]
- 87. Mehregan, M.; Mehrafarin, A.; Labbafi, M.R.; Naghdi Badi, H.A. Effect of different concentrations of chitosan biostimulant on biochemical and morphophysiological traits of stevia plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *J. Med. Plants* **2017**, *16*, 169–181.
- Yin, H.; Frette, X.C.; Christensen, L.P.; Grevsen, K. Chitosan oligosaccharides promote the content of polyphenols in Greek oregano (*Origanum vulgare ssp. hirtum*). J. Agric. Food Chem. 2012, 60, 136–143. [CrossRef] [PubMed]
- 89. Gerami, M.; Majidian, P.; Ghorbanpour, A.; Alipour, Z. *Stevia rebaudiana* Bertoni responses to salt stress and chitosan elicitor. *Physiol. Mol. Biol. Plants* **2020**, *26*, 965–974. [CrossRef] [PubMed]
- Safikhan, S.; Khoshbakht, K.; Chaichi, M.R.; Amini, A.; Motesharezadeh, B. Role of chitosan on the growth, physiological parameters and enzymatic activity of milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) in a pot experiment. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* 2018, 10, 49–58. [CrossRef]
- Vosoughi, N.; Gomarian, M.; Pirbalouti, A.G.; Khaghani, S.; Malekpoor, F. Essential oil composition and total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) extract under chitosan application and irrigation frequencies. *Ind. Crops Prod.* 2018, 117, 366–374. [CrossRef]
- 92. Tumova, L.; Backovska, M. Chitosan and the flavonoid production. *Herba Pol.* **1999**, 45, 114–119.
- Chang, J.H.; Shin, J.H.; Chung, I.S.; Lee, H.J. Improved menthol production from chitosan-elicited suspension culture of *Mentha* piperita. Biotechnol. Lett. 1998, 20, 1097–1099. [CrossRef]
- 94. Salimgandomi, S.; Shabrangy, A. The effect of chitosan on antioxidant activity and some secondary metabolites of *Mentha piperita* L. *J. Pharm. Health Sci.* **2016**, *4*, 135–142.
- 95. Mathew, R.; Sankar, P.D. Effect of methyl jasmonate and chitosan on growth characteristics of *Ocimum basilicum* L., *Ocimum sanctum* L. and *Ocimum gratissimum* L. cell suspension cultures. *Afr. J. Biotechnol.* **2012**, *11*, 4759–4766. [CrossRef]
- Kim, H.; Chen, F.; Wang, X.; Rajapakse, N.C. Effect of chitosan on the biological properties of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 3696–3701. [CrossRef]
- 97. Putalun, W.; Luealon, W.; De-Eknamkul, W.; Tanaka, H.; Shoyama, Y. Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. *Biotechnol. Lett.* **2007**, *29*, 1143–1146. [CrossRef]
- Kahromi, S.; Khara, J. Chitosan stimulates secondary metabolite production and nutrient uptake in medicinal plant *Dracocephalum* kotschy. J. Sci. Food Agric. 2021, 101, 3898–3907. [CrossRef] [PubMed]
- 99. Elateeq, A.; Saad, Z.; Eissa, M.A.; Ullah, S. Effect of chitosan and light conditions on the production of callus biomass, total flavonoids and total phenolics in *Ginkgo biloba* L. *J. Agric. Res.* **2021**, *46*, 28–42. [CrossRef]

- 100. Taghizadeh, M.; Nekonan, M.; Setorki, M. Enhancement production of phenolic compounds in the cell suspension culture of *Iberis amara* L.: The effect of chitosan elicitation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2021; *submitted.* [CrossRef]
- 101. Jiao, J.; Gai, Q.-Y.; Wang, X.; Qin, Q.-P.; Wang, Z.-Y.; Liu, J.; Fu, Y.-J. Chitosan elicitation of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures for enhancing flavonoid productivity and gene expression and related antioxidant activity. *Ind. Crop. Prod.* 2018, 124, 28–35. [CrossRef]
- Salehi, S.; Rezayatmand, Z.; Ghasemi Pirbalouti, A. The effect of foliar application of chitosan on yield and essential oil of savory (*Satureja isophylla* L.) under salt stress. J. Herb. Drug 2017, 8, 101–108. [CrossRef]
- Shah, M.; Jan, H.; Drouet, S.; Tungmunnithum, D.; Shirazi, J.H.; Hano, C.; Abbasi, B.H. Chitosan elicitation impacts flavonolignan biosynthesis in *Silybum marianum* (L.) Gaertn. cell suspension and enhances antioxidant and anti-inflammatory activities of cell extracts. *Molecules* 2021, 26, 791. [CrossRef]
- Sun, C.; Zeng, Z.; Cui, H.; Verheggen, F. Polymer-based nanoinsecticides: Current developments, environmental risks and future challenges. A review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2020, 24, 59–69. [CrossRef]
- 105. Sadiq, A.C.; Olasupo, A.; Ngah, W.S.W.; Rahim, N.Y.; Suah, F.B.M. A decade development in the application of chitosan-based materials for dye adsorption: A short review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2021, 191, 1151–1163. [CrossRef]
- Maluin, F.N.; Hussein, M.Z. Chitosan-based agronanochemicals as a sustainable alternative in crop protection. *Molecules* 2020, 25, 1611. [CrossRef]
- 107. Yu, J.; Wang, D.; Geetha, N.; Khawar, K.M.; Jogaiah, S.; Mujtaba, M. Current trends and challenges in the synthesis and applications of chitosan-based nanocomposites for plants: A review. *Carbohydr. Polym.* **2021**, 261, 117904. [CrossRef]
- 108. Qavami, N.; Naghdi Badi, H.; Labbafi, M.R.; Mehregan, M.; Tavakoli, M.; Mehrafarin, A. Overview on chitosan as a valuable ingredient and biostimulant in pharmaceutical industries and agricultural products. *Trakia J. Sci.* **2017**, *15*, 83–91. [CrossRef]
- 109. Mukhtar Ahmed, K.B.; Khan, M.M.A.; Siddiqui, H.; Jahan, A. Chitosan and its oligosaccharides, a promising option for sustainable crop production–A review. *Carbohydr. Polym.* 2020, 227, 115331. [CrossRef] [PubMed]
- Van, S.N.; Minh, H.D.; Anh, D.N. Study on chitosan nanoparticles on biophysical characteristics and growth of Robusta coffee in green house. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2013, 2, 289–294. [CrossRef]
- 111. Sathiyabama, M.; Manikandan, A. Foliar application of chitosan nanoparticle improves yield, mineral content and boost innate immunity in finger millet plants. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *258*, 117691. [CrossRef] [PubMed]
- 112. Kocięcka, J.; Liberacki, D. The potential of using chitosan on cereal crops in the face of climate change. *Plants* **2021**, *10*, 1160. [CrossRef] [PubMed]
- 113. Wang, A.; Li, J.; AL-Huqail, A.A.; AL-Harbi, M.S.; Ali, E.F.; Wang, J.; Ding, Z.; Rekaby, S.A.; Ghoneim, A.M.; Eissa, M.A. Mechanisms of chitosan nanoparticles in the regulation of cold stress resistance in banana plants. *Nanomaterials* 2021, 11, 2670. [CrossRef]
- 114. Silva, A.O.; Cunha, R.S.; Hotza, D.; Machado, R.A.F. Chitosan as a matrix of nanocomposites: A review on nanostructures, processes, properties, and applications. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *272*, 118472. [CrossRef]
- Choudhary, R.C.; Kumaraswamy, R.V.; Kumari, S.; Sharma, S.S. Zinc encapsulated chitosan nanoparticle to promote maize crop field. Int. J. Biol. Macromol. 2019, 127, 126–135. [CrossRef]
- 116. Asgari-Targhi, G.; Iranbakhsh, A.; Oraghi Ardebili, Z.; Hatami Tooski, A. Synthesis and characterization of chitosan encapsulated zinc oxide (ZnO) nanocomposite and its biological assessment in pepper (*Capsicum annuum*) as an elicitor for *in vitro* tissue culture applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *189*, 170–182. [CrossRef]
- Kumar, S.; Chauhan, N.; Gopal, M.; Kumar, R.; Dilbaghi, N. Development and evaluation of alginate-chitosan nanocapsules for controlled release of acetamiprid. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015, 81, 631–637. [CrossRef]
- 118. Yadav, M.; Goswami, P.; Paritosh, K.; Kumar, M.; Pareek, N.; Vivekanand, V. Seafood waste: A source for preparation of commercially employable chitin/chitosan materials. *Bioresour. Bioprocess* **2019**, *6*, 8. [CrossRef]
- Silva Alves, D.C.; Healy, B.; Pinto, L.A.A.; Cadaval, T.R.S., Jr.; Breslin, C.B. Recent developments in chitosan-based adsorbents for the removal of pollutants from aqueous environments. *Molecules* 2021, 6, 594. [CrossRef] [PubMed]

Contents lists available at ScienceDirect

### Industrial Crops & Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop

# Application of chitosan lactate, selenite, and salicylic acid as an approach to induce biological responses and enhance secondary metabolism in *Melissa officinalis* L.

Maria Stasińska-Jakubas<sup>a</sup>, Barbara Hawrylak-Nowak<sup>a</sup>, Sławomir Dresler<sup>b,c</sup>, Magdalena Wójciak<sup>c</sup>, Katarzyna Rubinowska<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Botany and Plant Physiology, Faculty of Environmental Biology, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 15, 20-95 Lublin, Poland

<sup>c</sup> Department of Analytical Chemistry, Medical University of Lublin, Chodźki 4a, 20-093 Lublin, Poland

### ARTICLE INFO

Keywords: Chitosan Selenium Salicylic acid Lemon balm Elicitation Phenolic metabolites

### ABSTRACT

Given the beneficial aspects of elicitation, plant elicitors are being extensively used in recent years to increase the production of desired secondary metabolites in vitro. However, the potential of elicitors to be used in vivo is still limited due to the insufficient knowledge of their biological activity and the dependence on a number of factors, especially the elicitor type and the duration of the elicitation. For this reason, further in vivo studies are still needed to unravel the biological basis of the elicitation process. Therefore, the aim of the study was to compare the effect of three chemically different substances (150 mg/L chitosan lactate, ChL; 10 mg/L selenium as selenite, Se; 100 mg/L salicylic acid, SA; a mixture of ChL+Se+SA in the proportion of 1:1:1) on some aspects of primary and secondary metabolism in Melissa officinalis L. The main objective of the research was to determine the potential of these foliar-applied compounds in the elicitation of phenolic metabolites in vivo. The strongest elicitation effect was found after the use of ChL and SA, and a slightly weaker effect was noted after the application of Se; in turn, the mixture of the elicitors generally did not cause changes in the level of phenolic metabolites. Moreover, regardless of the elicitor type, their highest concentrations were recorded on the 8th day of elicitation, while no significant increase was generally observed on the 4th day. Among the analyzed metabolites, rosmarinic acid hexoside was most strongly induced by the elicitation, and its level increased even several times compared with the control. A very effective increase in the accumulation of rosmarinic and lithosperimic acids was detected as well. The elicitors also increased the antioxidant activity of the plant extracts. No visual signs of toxicity of these compounds or their effect on plant biomass were found, although there were some elicitor-induced changes in parameters related to oxidative stress (increase in  $H_2O_2$  and  $O^{2-}$  accumulation and lipid peroxidation) and photosynthesis (reduction of chlorophyll fluorescence indicators and photosynthetic pigment concentrations). We recommend that ChL or SA alone should be applied for effective and successful elicitation of intact lemon balm in controlled pot cultivation. This method can be an easy and cost-effective alternative to in vitro, suspension, or hydroponic cultures of M. officinalis and can be widely used for acquisition of high-quality plant raw material with improved nutraceutical and pro-health values.

### 1. Introduction

For centuries, plants have been assigned an important economic, social, and cultural role, and elucidation of the biochemical basis of their functioning has long been an object of interest for researchers worldwide. It is primarily associated with the variety of compounds produced by plants, particularly specialized metabolites that include substances from the group of (poly)phenols, terpenoids, and sulfur- or nitrogencontaining compounds (Thakur et al., 2019; Jan et al., 2021; Ali, 2021). These natural sources of substances with multidirectional biological activity are in the focus of attention of many branches of industry. Both whole plant material and single isolated substances are commercially used as e.g. pharmaceuticals, dietary supplements, nutraceuticals, dyes, food additives, cosmetic ingredients, or

\* Corresponding author. *E-mail address:* katarzyna.rubinowska@up.lublin.pl (K. Rubinowska).

https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117571

Received 9 May 2023; Received in revised form 28 August 2023; Accepted 29 September 2023 Available online 4 October 2023 0926-6690/© 2023 Published by Elsevier B.V.







<sup>&</sup>lt;sup>b</sup> Department of Plant Physiology and Biophysics, Institute of Biological Science, Maria Curie-Sklodowska University, 20-033 Lublin, Poland

agricultural chemicals (Chen et al., 2016; Isah, 2019; Wang et al., 2020; Kandoudi and Németh-Zámboriné, 2022). However, due to the limitations associated with their acquisition, many of these compounds have not been used on a large scale so far. The dynamically developing modern plant production faces many challenges associated with e.g. climate change and the strict dependence of production on environmental conditions or changes in agricultural policies. The growing demand for secondary metabolites and, concurrently, their naturally low concentrations in plant tissues (usually below 1% of dry weight) suggest the need for a constant increase in the yield and quality of crops with limitation of the impact of stress factors (Dresselhaus and Hückelhoven, 2018; Khare et al., 2020; Rouphael and Colla, 2020; Cartaxo et al., 2022). Abiotic factors with their excessive or insufficient impact and biotic factors related to the presence of other organisms may influence the biosynthesis and accumulation of phytochemicals, thus exerting a direct effect on the final quality and pro-health value of produced raw materials (Baenas et al., 2014; Applequist et al., 2020; Li et al., 2020; Wang et al., 2020). Therefore, the impact of stress on the metabolism in plants and the development of effective and environmentally friendly methods for biostimulation thereof are an important aspect of recent research, also in terms of hormesis phenomenon. According to the hormesis, the mild/moderate stress (eustress) could be used to optimize sustainable plant production. For this purpose, various types of stress factors are used in research, which at appropriately low doses can have a beneficial effect (Arif et al., 2020; Teklić et al., 2021; Godínez-Mendoza et al., 2023).

One of the methods combining the issues mentioned above is elicitation, which employs the beneficial impact of eustress on plants. It is based on application of moderate doses/concentrations of various types of factors or substances, so-called elicitors, to stimulate biochemical reactions in plants and production of desired secondary metabolites or induction of the biosynthesis of completely new compounds (Isah, 2019; Kandoudi and Németh-Zámboriné, 2022). The use of elicitors of abiotic or biotic origin is considered one of the most effective tools in the production of economically important bioactive substances and may be a potential solution to the problems associated with their acquisition (Isah, 2019). The additional advantages of this method include its environmental friendly nature and social acceptance as well as the relatively low cost and simplicity of application of elicitors. They can be used alone or in combinations in soil or foliar applications in plant cultivation at every stage of plant growth and development (Gawlik-Dziki et al., 2013; Hawrylak-Nowak et al., 2021a; Kandoudi and Németh-Zámboriné, 2022).

However, despite the benefits mentioned above, the potential of elicitors to be used commercially, especially in vivo, is still limited (Hawrylak-Nowak et al., 2021b; Kandoudi et al., 2022; Kianersi et al., 2022; Riahi-Madvar et al., 2014). This is related to the insufficient knowledge of their biological activity and the dependence of the elicitation process on a number of factors: the type, concentration, and duration of the exposure to the elicitor, the method of its application, the species, variety, age, and physiological status of plants, or environmental conditions (Baenas et al., 2014). Although it is assumed that changes in redox homeostasis in cells may be the common basis for the induction of the biosynthesis of products of plant specialized metabolism as part of the plant stress response, detailed information on the biological basis of these changes is still required. Additionally, only few scientific papers published on this subject have reported results of in vivo studies (Pistelli et al., 2019). Although the use of elicitors to stimulate bioactive compounds in whole plants (especially medicinal and/or seasoning plants) grown in controlled or field conditions has been reported in the literature, further in vivo studies are still needed to elucidate the biological basis of the elicitation process (Kandoudi and Németh-Zámboriné, 2022).

Given this information, the present study was focused on comparing the impact of three substances representing different types of elicitors applied in foliar treatments: chitosan lactate (biotic elicitor), salicylic acid (abiotic elicitor from the group of phytohormones), and sodium selenite (abiotic elicitor from the group of trace elements) on the primary and secondary metabolism in lemon balm (*Melissa officinalis* L.) growing in controlled pot cultivation conditions. The impact of these substances on the indicators of oxidative stress and the antioxidant response of the plants was analyzed as well, as these processes may potentially constitute a common biological basis for the induction of biosynthetic pathways of specialized metabolites from different chemical classes. The hypothesis that the three chemically different substances vary in their elicitation activity and influence the metabolism through modulation of the oxidant status of *M. officinalis* was tested. This research provides new insight into the impact of the application of these elicitors, applied alone or in combination, on the primary and specialized metabolism in this pharmaceutically important plant.

### 2. Materials and methods

### 2.1. Plant growth conditions and experimental treatments

*M. officinalis* seeds (producer: PNOS, Ożarów Mazowiecki) were sown into 0.5 L pots (25 seeds per pot) filled with universal substrate and left to germinate in controlled laboratory conditions. The soil substrate (pH = 5.5–6.5) used in the experiment contained high peat with varying degrees of decomposition (manufacturer: Kronen). The plants were grown in an air-conditioned room equipped with LED lamps at temperature of 26 °C/22 °C (day/night), a 14 h photoperiod, and 60–65% relative humidity. The photon flux density at the level of plant tops was 250–300 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. On day 21 after sowing the seeds, the *M. officinalis* young plants were repotted, with each pot containing eight plants of equal height.

In the experiment, the impact of three elicitors: chitosan lactate -ChL (Heppe Medical Chitosan, Germany, deacetylation degree: 80-95%), salicylic acid - SA (PoCH, Poland), and sodium selenite - Se (Fluka, Switzerland) and their combination - ChL+Se+SA (at a ratio of 1:1:1) was compared on subsequent elicitation days (1-10). On day 43 after sowing the seeds, the lemon balm was sprayed with aqueous solutions of the analyzed elicitors in the following configurations: 0 (distilled water), 100 mg/L ChL, 10 mg/L Se, 150 mg/L SA, and ChL+Se+SA. The concentrations of elicitors were selected based on literature data and preliminary studies. The solutions were prepared by dissolving compounds in distilled water. The elicitor combination was a 1:1:1 mixture of single elicitor solutions, thus the concentration of the tested substances in the applied volume of the mix solution used for spraying was 1/3 of the concentration of the given substance in the solution of a single elicitor. We intended to test whether a mixture of lower concentrations of the tested substances would be more, equally, or less effective than the compounds applied alone. Considering the limited penetration of the elicitors through the cuticle, all the spraying combinations, including distilled water, were enriched with 0.02% Tween® 20 (Sigma-Aldrich, USA) to reduce surface tension. The elicitors were applied at a dose of 10 mL per pot using an atomizer, which ensured full saturation of the leaf blades with the solutions. A varied spraying pattern was applied twice at two-day interval. During the vegetation, the plants were watered every 2-3 days using tap water.

The experiment also consisted in biochemical analyses (identification and determination of the content of selected secondary metabolites, levels of lipid peroxidation, accumulation of  $H_2O_2$ , total content of polyphenolic compounds, concentration of flavonoids, DPPH radical reduction by the extracts, antioxidant enzyme activity) and histochemical assays (visualization of reactive oxygen forms in the leaves). On the day of termination of the experiment, selected biometric and physiological indices were measured (fresh weight of shoots, content of photosynthetic pigments, chlorophyll fluorescence).

### 2.2. Determination of selected secondary metabolites

### a) Preparation of methanol leaf extracts

Dried lemon balm leaves were ground in a laboratory mill on days 4, 6, 8, and 10 after the elicitation. Next, 50 mg of the raw material was extracted in 2 mL of an 80% methanol aqueous solution ( $\nu/\nu$ ) using an ultrasonic bath. After 15 min, the extracts were centrifuged (18,000 rpm, 5 min).

b) Total phenolic compounds and flavonols

The total content of (poly)phenols was determined spectrophotometrically at the 756 nm wavelength using the classic Folin-Ciocalteau method (Wang et al., 2011). The content of phenolics was calculated from the standard curve for gallic acid.

The level of soluble flavonols was determined spectrophotometrically using the simplified Christ-Müller technique (Polish Pharmacopoeia V, 1999). Absorbance of the solutions was measured at 425 nm. The concentration of soluble flavonols was read from the standard curve for rutin.

c) UHPLC-MS analysis

The plant extracts were analyzed by ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC). Chromatographic separation was carried out at 30 °C and the flow rate of the mobile phase was 0.2 mL/min. Detailed description of the method is presented in our previous publication (Stasińska-Jakubas et al., 2023). Quantification of the identified compounds was based on calibration curves obtained for reference substances including rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid A, caftaric acid hexoside, and salvianolic acid C derivative were quantified based on calibration curve for rosmarinic acid, caftaric acid, and salvianolic acid, respectively.

### 2.3. Determination of the oxidative status of plants

a) Lipid peroxidation level

The lipid peroxidation was determined based on the concentrations of TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) (Heath and Packer, 1968). Fresh plant material was collected from the third pair of leaves below the apical meristem on the day of termination of the experiment (day 10 after the first application of the elicitors). The samples were ground in trichloroacetic acid (TCA) solution and centrifuged. Next, 20% TCA containing 0.5% TBA (*w*/*v*) supplemented with BHT (butylated hydroxytoluene) was added to the supernatant. The mixture was heated (95 °C, 30 min) and centrifuged again (10,000 rpm, 10 min). Absorbance was read at 600 and 532 nm, and the TBARS concentration was calculated based on a molar absorbance coefficient (155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

### b) Hydrogen peroxide content

Quantitative determinations of  $H_2O_2$  in the leaves were performed with the spectrophotometric method on the day of termination of the experiment (Jena and Choudhuri, 1981). The plant samples (0.25 g FW) were homogenized in phosphate buffer (3 mL, 50 mM, pH = 6.5, 4 °C) and centrifuged (30 min, 6000 rpm). 1.5 mL of the supernatant and 0.5 mL of 0.1% titanium dioxide in 20%  $H_2SO_4$  ( $\nu/\nu$ ) were pipetted into test tubes and centrifuged again (15 min, 6000 rpm). Absorbance was measured at the 410 nm wavelength. The  $H_2O_2$ concentration was estimated using the molar absorbance coefficient (0.28  $\mu$ M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

### c) Antioxidant enzymes activity

Samples of the plant material (25 mg FW) were taken from the third and fourth pairs of true leaves below the apical meristem on day 10 after the first application of elicitor solutions. To prepare enzyme extracts, the samples were homogenized in 0.05 M phosphate buffer, pH = 7.0 (for determination of catalase (CAT; EC 1.11.1.6) and guaiacol peroxidase (GPOX; EC 1.11.1.7) activity or in phosphate buffer (0.1 M, pH = 6.0) containing PVP

(polyvinylpyrrolidone), sodium ascorbate, and EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (for determination of ascorbate peroxidase activity (APOX; EC 1.11.1.11)). The homogenates were centrifuged (10 min, 4 °C, 10,000 rpm). CAT activity was determined spectrophotometrically as previously described in detail by Golan et al. (2013) and Hawrylak-Nowak et al., 2021a. GPOX activity was determined with the method proposed by Małolepsza et al. (1994) with slight modification (Golan et al., 2013). APOX activity was analyzed with the technique developed by Nakano and Asada (1981). The detailed process of performing the assays has been described previously (Hawrylak-Nowak et al., 2021a).

d) Visualization of reactive oxygen species (ROS) in leaves

Detection of  $H_2O_2$  and  $O_2^{-}$  in the leaves was carried out on elicitation days 1, 3, and 8 using DAB (3,3'-diaminobenzidine, 1 mg mL<sup>-1</sup>) and NBT (nitrotetrazolium blue, 2% in 50 mM phosphate buffer, pH = 7.5) (Kumar et al., 2014). True leaves of the third or fourth pair (below the apical meristem) were stained. The leaves (at least six in each experimental series) were placed in Petri dishes filled with the staining solutions and left for minimum 24 h in the dark at room temperature. Photosynthetic pigments were removed from the leaf blades by boiling in 96% ethanol. ROS were identified based on characteristic staining: brown in the case of  $H_2O_2$  and dark blue in the case of  $O^{2-}$ .

e) Free radical scavenging activity (FRSA)

The FRSA of the plant extracts prepared as described in 2.3.a was examined by the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) reduction method, 10 days after the first spraying with the elicitor solutions. The DPPH solution (2 mL; 200  $\mu$ M) and the extract (15  $\mu$ L) were pipetted into plastic cuvettes. Simultaneously, a control sample (A0), in which the plant extract was replaced with the same volume of 80% methanol, was prepared. Fifteen minutes after the addition of the extract, absorbance was measured at 517 nm. Antioxidant activity was calculated and expressed as % DPPH reduction using the formula of Molyneux (2004).

### 2.4. Determination of plant growth and selected physiological parameters

### a) Dry weight of shoots

At the time of termination of the experiment, shoots of three plants (9 plants from each series) were harvested and dried at room temperature, and their air-dry weight was determined.

b) Chlorophyll fluorescence

Chlorophyll *a* fluorescence parameters ( $F_m$  – maximum fluorescence,  $F_0$  – minimum fluorescence, and  $F_v/F_m$  – ratio of variable fluorescence ( $F_v$ ) to  $F_m$ ) were measured on days 3 and 10 after the first application of the elicitors. The  $F_v/F_m$  ratio is regarded as the most credible indicator of the maximum quantum efficiency of PSII after dark adaptation (Murchie and Lawson, 2013). Fragments of the lemon balm leaf blades were dark-adapted with the use of dedicated clips, and the aforementioned parameters were measured after 15 min

c) Content of photosynthetic pigments

The photosynthetic pigments level was examined on the day of termination of the experiment, i.e. 10 days after the first spraying with the elicitor solutions. The material for the analyses was taken from the third pair of leaves below the apical meristem. The samples were ground in a mortar with 80% acetone (v/v). The homogenate was quantitatively transferred onto a filter coupled to a vacuum pump and washed with acetone. The extract was transferred to volumetric flasks and supplemented with an acetone solution. The absorbance of the solutions was measured at 663 nm, 645 nm, and 470 nm. The content of the pigments was calculated as proposed by Lichtenthaler and Wellburn (1983).

### 2.5. Statistical analyses

The experiment was established in a completely randomized block design (CRBD), with five treatments, four replications per treatment, and eight plants per replication. Plant material for the analysis of specialized metabolites and FRSA was collected on days 4, 6, 8, and 10 after the first spraying with the elicitors. The concentration of phenolic metabolites and FRSA were subjected to two-way ANOVA with the type of elicitor and the duration of elicitation as the main experimental factors, and the results of the statistical analysis of these data represent the main effects and the interaction effect between these two factors. Percentage values (FRSA) were normalized by Bliss angular transformation before ANOVA. However, the data on DW, chlorophyll fluorescence, concentration of photosynthetic pigments, and oxidative status of plants were statistically analyzed using one-way ANOVA to assess merely the reactions of the plants to the application of the elicitors at the end of the experiment. Significance of differences was assessed using Tukey's test at p < 0.05. Statistica ver. 13.3 software (TIBCO Software Inc. 2017, Palo Alto, CA, USA) was used for the statistical analysis. The heat map was created with Microsoft Excel (2010) based on standardized data.

### 2.6. Instrumentation

a) All spectrophotometric data were acquired using a Cecil CE 9500 UV–VIS spectrophotometer (Cecil Instruments, UK). Semi-micro plastic cuvettes (chamber volume 1.5–2.5 mL) or glass cuvettes (3.5 mL) were used for absorbance measurements.

- b) Infinity Series II chromatograph coupled with an Agilent 6224 ESI/ TOF mass detector and a DAD detector (Agilent Technologies, USA) on an RP18 Titan column was used for the analysis ultra-high performance liquid chromatographic (UHPLC) analysis.
- c) Selected parameters of chlorophyll fluorescence were determined by a fluorimeter (Handy-PEA, Hansatech Instruments, Japan).

### 3. Results

### 3.1. Phenolic metabolites in plant leaves treated with different elicitors

The total concentration of phenolic compounds in the leaves varied depending on the elicitor type and exposure time (Fig. 1A). The highest content of these compounds in the control plants was recorded on day 8 of the experiment. In turn, an increase in the concentration of soluble (poly)phenols in comparison with the control was observed especially on days 6 and 10 after the first application of the single elicitors, but not their mixture (interaction effect). The highest efficiency in induction of the accumulation of these compounds was found in the SA-exposure variant, where an approximately 80% and 40% increase in the content of (poly)phenols was recorded on days 6 and 10, respectively, in comparison with the control. The other solutions and their mixtures exhibited lower but significant elicitation efficiency. For example, the accumulation of these compounds after 10 days of elicitation with ChL



**Fig. 1.** Effect of foliar spray with different elicitors (ChL – chitosan lactate; Se – selenite; SA – salicylic acid; ChL+Se+SA – mixture of elicitors) on the concentration of total phenolics (A) and soluble flavonols (B) in *M. officinalis* leaves on elicitation days 4, 6, 8, and 10. Means ( $\pm$  SD; n = 3) sharing the same letter are not significantly different (p < 0.05). Significant effects for the main factors are marked in the same way with capital letters. GAE – gallic acid equivalents; RUE – rutin equivalents.

was 36% higher than in the control plants. In the Se variant, the increase in the content of phenolic compounds on elicitation days 6 and 10 was similar, i.e. 46% and 48%, respectively. In contrast, the application of the combination of all these compounds turned out to be ineffective. Taking into account only the main effects on the total level of phenolic compounds, it was shown that the SA-treated plants had the highest content of these substances, regardless of the duration of the elicitation process. In turn, in terms of the duration of the treatment as the main factor, regardless of the elicitor type, the highest amounts of total phenolics were accumulated by the plants on elicitation day 8, whereas the lowest content was recorded on day 4 (Fig. 1A).

The elicitors used in the study stimulated the biosynthesis of soluble flavonols to a similar extent, although the analysis of the interactions between the experimental factors revealed a significant increase in their content (by 37–61%) versus the control only on elicitation day 10 (Fig. 1B). As in the case of the total phenolic content, the elicitation treatment turned out to be ineffective in induction of accumulation of flavonoids on day 4 after spraying, and Se was even shown to cause a 23% decrease in the content of these compounds. Taking into account only the main effect, it was noted that the amount of flavonols was increased by the substances applied, regardless of the duration of the elicitation. Considering only the impact of the duration of the elicitation, regardless of the elicitor type, it was found that the highest amounts of flavonols were accumulated by the plants on day 8, whereas the lowest levels of these compounds were recorded on day 4.

The UPLC-UV-MS analyses identified and quantified eight different phenolic metabolites, with hydroxycinnamic acid derivatives, i.e.

rosmarinic and lithospermic acids as the main fractions (Tab. S1). The content of rosmarinic acid (Fig. 2A) in the control plants was in the range of 14.57–23.21 mg  $g^{-1}$  DW, with a tendency towards an increase between days 4 and 8 and a decrease on day 10 of the experiment. By analyzing the interaction between the factors, it was found that the application of single elicitors did not induce significant changes in the concentration of rosmarinic acid on elicitation day 4, although there was a tendency towards a slight increase in its content (9–14%) in relation to the control. The longer exposure time to the elicitors resulted in an increase in the accumulation of this metabolite, especially on elicitation day 10. Compared with the control, the concentration of rosmarinic acid increased by 120%, 92%, and 107% in the treatments with ChL, Se, and SA, respectively, and the weakest elicitation effect (26% increase) was achieved in the combined elicitor treatment. Taking into account only the main effects (elicitor type or treatment duration), it was shown that ChL and SA were the most effective stimulators of rosmarinic acid biosynthesis. Significantly lower amounts of this metabolite were recorded in the Se elicitation variant, compared with the ChL and SA treatments, and the combined treatment did not induce an increase in the accumulation of this phenolic acid. In turn, taking into account only the duration of the elicitation process, regardless of the elicitor type, it was found that the plants accumulated the highest amounts of rosmarinic acid on elicitation day 8 (Fig. 2A).

A substantially lower concentration of rosmarinic acid hexoside was detected in the lemon balm leaves (Fig. 2B). However, the level of this compound exhibited a several-fold increase after the exposure to the elicitors. In particular, an even 9–10-fold increase in its content was



**Fig. 2.** Effect of foliar spray with different elicitors (ChL – chitosan lactate; Se – selenite; SA – salicylic acid; ChL+Se+SA - mixture of elicitors) on the concentration of rosmarinic acid (A), rosmarinic acid hexoside (B), lithospermic acid (C), and salvianolic acid A (D) in *M. officinalis* leaves on elicitation days 4, 6, 8, and 10; chemical structure of the main phenolic acids (E). Means ( $\pm$  SD; n = 3) sharing the same letter are not significantly different (p < 0.05). Significant effects for the main factors are marked in the same way with capital letters.

noted on the initial days of elicitation with SA. The significantly highest level of this metabolite (7.81 mg g<sup>-1</sup> DW) in comparison with all the experimental variants was noted on day 8 of elicitation with ChL. No induction of rosmarinic acid hexoside biosynthesis was detected in the combined elicitor treatment. Additionally, the analysis of the main effects revealed that, as in the case of rosmarinic acid, the highest amounts of its hexoside were accumulated in the ChL and SA exposure variants, whereas lower concentrations were detected in the Se treatment. Regardless of the elicitor type, the maximum and minimum concentrations of this compound were accumulated by the plants on elicitation day 8 and 10, respectively.

The concentration of lithospermic acid (Fig. 2C), i.e. the second most abundant phenolic metabolite, in the control plants showed a downward trend along the duration of the experiment. By analyzing the interaction between the factors, it was found that the exposure to the elicitors did not have an impact on the level of this compound on elicitation day 4. In turn, the application of ChL effectively stimulated the biosynthesis of this metabolite during the subsequent elicitation days (34-48% increase in the concentration versus the control). The combination of the elicitors and the Se variant most effectively stimulated the accumulation of lithospermic acid on elicitation day 8 and increased its content by 40% and 52%, respectively, whereas the SA treatment resulted in a 26% increase, which was not significant statistically. The analysis of the effect of the elicitors, regardless of the exposure duration, showed that ChL was the most efficient elicitor inducing lithospermic acid accumulation in the lemon balm leaves, and the significantly highest concentrations of this compound were recorded on elicitation days 6 and 8.

During the exposure to the elicitors, the level of salvianolic acid A (Fig. 2D) did not vary significantly in comparison with the control on elicitation day 4, but an increase in its accumulation was generally observed on the subsequent days. The highest concentrations of salvianolic acid A were recorded in the ChL elicitation variant. In comparison with the control plants, its level increased by 66%, 41%, and approximately 2.5-fold on experimental days 6, 8, and 10. The other elicitors or their combination were not as effective, as a significant increase in the concentration of this acid was found only on elicitation day 10 in the Se and SA treatments (60% and 73% increase, respectively). Taking into

account the main effects, it was shown that ChL exerted the significantly highest elicitation effect, regardless of the duration of the elicitation process. In turn, the highest level of salvianolic acid A was recorded on days 6 and 8, regardless of the elicitor type. It should be emphasized that rosmarinic, lithospermic, and salvianolic acid are characterized by a similar chemical structure (Fig. 2E).

In comparison with the phenolic compounds described above, substantially lower concentrations of salvianolic acid C derivative, caftaric acid, caftaric acid hexoside, and caffeic acid were detected (Fig. 3A-D). The elicitation induced the highest increase in the accumulation of caftaric acid and its hexoside, especially in the ChL and SA treatments, where a 2-2.5-fold increase in the content of these compounds was recorded, compared with the control (Fig. 3B, C). Taking into account the elicitor type as the main factor, regardless of the duration of the treatment, ChL was shown to produce the highest increase in the accumulation of both these metabolites, whereas the combined treatment was the least effective. The highest concentration of caftaric acid and its hexoside was generally recorded on elicitation days 6 and 8, regardless of the elicitor used (Fig. 3B, C). In turn, the concentration of the salvianolic acid C derivative did not increase significantly in the ChL treatment, although the other elicitors used in the foliar application increased the biosynthesis of this metabolite in the plants, especially on elicitation day 8 (Fig. 3A). The lowest elicitor-induced fluctuations were detected in the content of caffeic acid, as increased accumulation of this secondary metabolite was noted only on elicitation day 4 in plants treated with the combination of the tested substances (interaction effect). In the other cases, the changes in its content in comparison with the control were not statistically significant. Similarly, the duration of the elicitation process as a main factor did not alter the levels of this metabolite (Fig. 3D).

The relationships described above are presented in a heat-map (Fig. 4), which graphically shows the abundance of the analyzed phenolic metabolites in the experimental series (on days 4, 6, 8, and 10 after the first application of the elicitors). The standardized parameters are exemplified by colors (dark blue - low content, deep red - high content). Three plant samples are presented for each treatment. The elicitors, mainly ChL and SA, are shown to induce a clear increase in the



**Fig. 3.** Effect of foliar spray with different elicitors (ChL – chitosan lactate; Se – selenite; SA – salicylic acid; ChL+Se+SA - mixture of elicitors) on the concentration of salvianolic acid C derivative (A), caftaric acid (B), caftaric acid hexoside (C), and caffeic acid (D) in *M. officinalis* leaves on elicitation days 4, 6, 8, and 10. Means ( $\pm$  SD; n = 3) sharing the same letter are not significantly different (p < 0.05). Significant effects for the main factors are marked in the same way with capital letters; n.s. – not significant.



**Fig. 4.** Heat map showing the changes in the abundance of phenolic compounds in individual samples of *M. officinalis* leaves treated with different elicitors (ChL – chitosan lactate; Se – selenite; SA – salicylic acid; ChL+Se+SA – mixture of elicitors) on elicitation days 4, 6, 8, and 10. The colors range from dark blue (low concentration) to dark red (high concentration).

accumulation of most of the identified phenolic compounds, especially on elicitation day 8.

To further illustrate the changes in the level of the identified metabolites, their content was summed up (Fig. S3). It was shown that, on elicitation days 6–10, ChL and SA induced an increase in the accumulation of the total (poly)phenols in the range of 38–97%, compared with the corresponding control, while Se induced a 15–69% increase. The ChL+Se+SA combination caused only a 7–18% boost in the sum of these compounds. The elicitation activity of the substances used can be arranged as follows: ChL = SA > Se > ChL+Se+SA.

The principal component analysis (Fig. 5) showed that the first and second factors explained 59 and over 16% of total variations, respectively. Mostly, the variables had negative loading with the first factor except caffeic acid, which was positively correlated with the second component. The first factor facilitated moderate separation of the



Fig. 5. PCA of selected phenolic metabolites (ChL – chitosan lactate; Se – selenite; SA – salicylic acid; ChL+Se+SA - mixture of elicitors; 4, 6, 8, 10 – elicitation days). The length of the lines presents the correlation between the factor axes and the original data.

control and 4-day-old plants on the left side of the X-axis i.e., individuals with low accumulation of most compounds. In contrast, plants treated with ChL (6, 8, 10 days), SA, and Se on days 6 and 8 exhibited higher accumulation of phenolics associated with factor 1. In turn, the second factor facilitated separation of samples exposed to the combination of ChL+SA+Se, i.e. individuals with higher content of caffeic acid.

### 3.2. Oxidative status of plants treated with different elicitors

The application of the elicitors and their combination had a varied impact on the lipid peroxidation, accumulation of H2O2, and the activity of antioxidant enzymes in the lemon balm leaves (Fig. 6A-C). Salicylic acid induced the most pronounced pro-oxidative changes. The level of lipid peroxidation in the SA treatment increased by 75% in comparison with the control, and the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration increased over 2.5 times. Similarly, the other elicitors contributed to a 60% (ChL) and 56% (Se) increase in the accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 6B). The lipid peroxidation level increased by 31% in the ChL elicitation variant but was equal to that in the control in the Se treatment (Fig. 6A). In turn, the combined elicitor treatment (ChL+SA+Se) increased the content of TBARS and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by 27% (Fig. 6A, B). The analysis of changes in the activity of selected antioxidant enzymes revealed that, with the exception of ChL, the elicitors produced a slight decrease in the activity of CAT. In contrast, the activity of APX increased (by 31-35%) in the SA and combined treatments, but the differences were not statistically significant (Fig. 6C). No GPOX activity was detected in the lemon balm leaves.

The in situ visualization of the presence of selected ROS ( $H_2O_2$  and superoxide anion) indicated their accumulation mainly in the petioles, but this was caused by the mechanical tissue damage caused by cutting off the leaves (Fig. S1, Fig. S2). The analysis of the localization of color changes in the leaf blades immediately after the application of the elicitors (day 1) showed an increased level of superoxide radical accumulation only in the ChL elicitation variant (Fig. S1). In turn, after 8 days, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation was manifested as punctate lesions covering the leaf blade in the tissues of plants treated with SA (Fig. S2). These observations are consistent with the measurements of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration carried out as part of the quantitative analyses (Fig. 3B).



**Fig. 6.** Effect of foliar spray with selected elicitors (ChL – chitosan lactate; Se – selenite; SA – salicylic acid; ChL+Se+SA - mixture of elicitors) on the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) **(A)**, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration **(B)**, and activity of CAT (catalase) and APX (ascorbate peroxidase) **(C)** in *M. officinalis* leaves. Means ( $\pm$  SD; n = 3) sharing the same letter are not significantly different (p < 0.05).

Brown discolorations were also observed in the other variants, but they were not as pronounced as in the SA treatment. The superoxide anion accumulation in the different experimental conditions did not differ from that observed in the leaves of the control plants.

The elicitors typically exerted a beneficial effect on the capability of the plant extracts to reduce DPPH radicals (Fig. 7). Compared with the control, the greatest increase in FRSA was observed on day 10 of the treatment with single elicitors. In these variants, the DPPH reduction in the extracts of the control plants reached a value of approximately 62%, whereas the extracts from the ChL-, Se-, or SA-treated plants exhibited 88–93% reduction of DPPH. Considering the main effects, it was shown that all the elicitors used both alone and in mixture caused an increase in FRSA, and the highest value of this parameter was recorded on elicitation day 8.

## 3.3. Selected biometric and physiological parameters of plants treated with different elicitors

The elicitors did not cause changes in the biomass of the lemon balm shoots (Fig. 8A). The foliar treatment with the analyzed elicitors caused a slight decrease in the content of chlorophyll *b* and carotenoids. The concentration of these pigments in the leaves of plants treated with ChL, SA, and ChL+Se+SA decreased by approximately 11–17%, compared with the control. In turn, the concentration of chlorophyll *a* did not vary significantly between the experimental treatments. Only Se did not exert a significant effect on the content of photosynthetic pigments (Fig. 8B).

The elicitation process induced small but in some cases significant changes in the chlorophyll fluorescence parameters (Fig. 9A, B). These parameters were analyzed on days 3 and 10 after the first application of the elicitors. In comparison with the control group, the values of the analyzed parameters did not change during the first days of the treatment (Fig. 9A). The prolonged exposure to the elicitors caused a decrease in the  $F_v/F_m$  value only in the SA-treated plants. In turn, the  $F_m$  value declined significantly in all the experimental variants compared with the control, with the greatest decrease observed after the application of SA (Fig. 9B).

### 4. Discussion

The content of specialized metabolites in aromatic and medicinal raw materials is a direct indication of their quality and therapeutic value, and thus their economic importance (Li et al., 2020). However, plant species that are sources of these raw materials growing in optimal conditions usually do not accumulate sufficient amounts of secondary metabolites. In turn, cultivation of such plants in field conditions often leads to substantial but hardly predictable fluctuations in the content of bioactive substances induced by abiotic and biotic environmental fac-However, according to hormesis phenomenon, tors. the eustress-induced plant defense response can be used as a metabolism-stimulating factor and thus elicitation is one of the methods for effective control and elevation of the content of secondary metabolites (Kuzel et al., 2009, Godínez-Mendoza et al., 2023). Literature data often confirm beneficial effect of different types of elicitors on the accumulation of various groups of compounds, especially (poly)phenols (Ghasemian et al., 2020; Hawrylak-Nowak et al., 2021a,b; Kandoudi et al., 2022; Li et al., 2020, 2021; Salimgandomi and Shabrangy, 2016; Stasińska-Jakubas et al., 2023). Given the high pro-health potential of these compounds, their importance in plant immune responses and oxidoreductive processes, the effectiveness of ChL, SA, Se, or their combination in elicitation of this group of secondary metabolites was assessed in the pot cultivation of lemon balm. Although the elicitors compared in the study differ in terms of their chemistry, their common function is the regulation of metabolic processes in plants, including defense and immune reactions. These experiments are the first to compare the elicitation activity of these compounds in lemon balm in in vivo conditions with reference to the duration of the elicitation process.

The experiment confirmed the high biological activity of the analyzed substances, especially ChL and SA, which proved to be highly efficient in stimulation of the accumulation of phenolic compounds in the lemon balm leaves. The elicitors used contributed to the highest (sometimes several fold) increase in the level of rosmarinic acid hexoside but induced the smallest changes in the content of caffeic acid. In turn, on elicitation day 10, the content of rosmarinic acid, i.e. the dominant phenolic acid, was approximately 2-fold higher (42–48 mg g<sup>-1</sup> DW) in plants treated with single elicitors than in the control plants (22 mg g<sup>-1</sup> DW). The content of lithospermic acid and salvianolic acid A acids also increased. The stimulation of the accumulation of the main phenolic acids, present in the highest concentrations in the leaves, may be related to their similar chemical structure and common biosynthetic pathways as derivatives of caffeic acid. Previous studies on the NaCl-based elicitation of rosmarinic acid in lemon balm



**Fig. 7.** Effect of foliar spray with different elicitors (ChL – chitosan lactate; Se – selenite; SA – salicylic acid; ChL+Se+SA - mixture of elicitors) on free radical scavenging activity (FRSA) of extracts from *M. officinalis* leaves on elicitation days 4, 6, 8, and 10. Means ( $\pm$  SD; n = 8) sharing the same letter are not significantly different (p < 0.05).



**Fig. 8.** Effect of foliar spray with different elicitors (ChL – chitosan lactate; Se – selenite; SA – salicylic acid; ChL+Se+SA - mixture of elicitors) on the biomass (A) and photosynthetic pigments concentrations in *M. officinalis* on elicitation day 10. Means ( $\pm$  SD; n = 9 for DW, n = 3 for photosynthetic pigments) sharing the same letter are not significantly different (p < 0.05).

did not report such a large increase in its content, as a 40–67% increase with a simultaneous decrease in shoot biomass was shown (), or in heat stress experiments, where a 59% increase versus the control was reported (Pistelli et al., 2019). In turn, exogenous in vivo application of methyl jasmonate in Iranian ecotypes of lemon balm enhanced the accumulation of rosmarinic acid several-fold, with a simultaneous increase in the level of the transcripts of important genes involved in the phenylpropanoid pathway (Kianersi et al., 2022). In the present study, we showed that the FRSA value in the extracts obtained from the elicited



**Fig. 9.** Effect of foliar spray with different elicitors (ChL – chitosan lactate; Se – selenite; SA – salicylic acid; ChL+Se+SA - mixture of elicitors) on parameters of chlorophyll fluorescence of *M. officinalis* on elicitation days 3 (A) and 10 (B). Means ( $\pm$  SD; n = 10) for each florescence parameter sharing the same letter are not significantly different (p < 0.05).

plants was higher than in the control. Noteworthy, the changes in the content of total phenolic compounds and the total pool of identified phenolic metabolites generally exhibited similar trends as the changes in the FRSA value.

SA was shown to be highly effective in pot cultivation of yarrow, where foliar application of 0.5 mM or 1 mM SA stimulated the biosynthesis of essential oils and total phenolic compounds, thereby increasing the antioxidant activity of plant extracts (Gorni and Pacheco, 2016). Similarly, chitosan treatment of *Mentha piperita* in greenhouse

conditions resulted in an increase in the content of phenolics and flavonoids and enhancement of the antioxidant activity (Salimgandomi and Shabrangy, 2016). In previous studies conducted with the use of ChL, increased accumulation of total phenolic compounds, rosmarinic acid, and anthocyanins was observed in lemon balm and common basil (Hawrylak-Nowak et al., 2021a). One of the tested elicitors, i.e. Se, was found to modulate the expression of genes and proteins involved in plant stress response, thus stimulating the biosynthesis of products of plant specialized metabolism and the accumulation of osmoprotectants (Hawrylak-Nowak et al., 2018; Bano et al., 2021). It was shown that foliar application of 10 mg/L Se had a positive effect on the growth and content of total polyphenols in field cultivation of lemon balm (Habibi et al., 2016). Additionally, the application of Se at a concentration of 0.2 or 5 µM increased the proportion of caryophyllene and caryophyllene oxide or z-citral, citral, and geranyl acetate in lemon balm oil, respectively (Tavakoli et al., 2020). Foliar application of Se was found to increase the activity of antioxidant enzymes and stimulate the biosynthesis of rosmarinic acid and photosynthetic pigments (Ghasemian et al., 2020). The effectiveness of elicitors used for stimulation of plant secondary metabolism may be associated with e.g. their ability to induce the expression of genes responsible for the biosynthesis of certain groups of specialized metabolites (phenolic acids, flavonoids) (Zhao et al., 2005; Habibi et al., 2016; Mukhtar Ahmed et al., 2019). However, the application of the mixture of elicitors (ChL+Se+SA) in the present study was much less effective in induction of the biosynthesis of (poly) phenols in comparison with the single application of the substances. This was most probably related to the substantially lower concentration of the individual compounds in the mixture, which limited their biological activity. The concentration of the individual compounds of the ChL+Se+SA combination corresponded to only 1/3 of their content in the single-elicitor solutions. Antagonistic interactions between these substances may have occurred as well. Nevertheless, additional experiments and analyses are required to confirm these assumptions.

A clear intensification of the accumulation of the analyzed phenolic metabolites in the lemon balm leaves, including the main bioactive substance, i.e. rosmarinic acid, was observed on elicitation day 6. The highest accumulation of the individual compounds was recorded on elicitation day 8, while the highest increase compared with the control was found on elicitation day 10 due to the reduction of the concentration of metabolites in the control plants on that day. In turn, in an experiment involving the use of a physical elicitor (short-term heat stress; 5 h, 38 °C) in the hydroponic cultivation of this species, an increase in the content of rosmarinic acid was observed as early as 2 h after the application of heat stress with a further gradual increase within the next 24 h (Pistelli et al., 2019). However, such physical elicitors have different mechanisms of action from those exhibited by chemical substances, which additionally have to overcome the cuticle barrier. As in the present study, the highest accumulation of secondary metabolites (eugenol and ursolic acid) in Ocimum tenuiflorum root hair cultures was noted after 8 days of exposure to three different elicitors (SA, methyl jasmonate, yeast extract) (Sharan et al., 2019). In turn, the eliciting effect exerted by salicylates, including SA, persisted even on day 20 after application (Kuzel et al., 2009). Thus, changes in secondary metabolism require an appropriate but sometimes varied time, as shown by some examples.

Despite the large chemical diversity of elicitors, some general patterns of cell signaling leading to metabolic changes and increased plant resistance can be proposed. Plant defense responses include rapid and intense formation of highly reactive and toxic ROS. The oxidative burst, i.e. sudden release of ROS (mainly  $O_2^-$  and  $H_2O_2$ ) by cells, is a common response to (a)biotic stress factors. While  $O_2^-$  has a very short half-life, uncharged  $H_2O_2$  is more stable and can diffuse across membranes and react with polyunsaturated membrane lipids to form lipid peroxides, which leads to lipid peroxidation and biological damage to membranes (Garcia-Brugger et al., 2006). Although the detailed mechanism of their mediation in the plant cellular stress response has not been established to date, ROS are primarily assigned an alarm-signaling function. They are also known to control the expression of genes encoding e.g. antioxidant enzymes or enzymes involved in the formation of secondary metabolites, e.g. PAL (L-phenylalanine ammonia lyase), which is a key enzyme in the biosynthesis of phenolic metabolites in the phenylpropanoid pathway (Zhao et al., 2005; Babenko et al., 2019; Huang et al., 2019; Mousavi and Shabani, 2019). However, ROS are highly reactive molecules that can initiate a number of oxidation-reduction reactions leading to damage to cellular structures and disruption of their function, e.g. inactivation of proteins, lipid peroxidation, or degradation of nucleic acids (Huang et al., 2019; Choudhary et al., 2020; Hasanuzzaman et al., 2020). The visualization of the selected ROS in the present study showed disturbances in ROS homeostasis induced by the elicitors applied. They consisted in increased  $O_2^{\bullet-}$  accumulation on elicitation day 1 in the ChL treatment and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on day 10 in the SA elicitation variant. Additionally, the quantitative analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and TBARS concentrations on elicitation day 10 also revealed increased content of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and increased lipid peroxidation, especially in the SA treatment. Concurrently, there were no significant changes in the activity of antioxidant enzymes in these conditions. In another study, elicitation of lemon balm with heat stress was reported to result in a rapid increase in the biosynthesis of rosmarinic acid with simultaneous disturbances in the production and uptake of ROS, which indicates an vital role of redox homeostasis in the modification of phenolic biosynthetic pathways (Pistelli et al., 2019).

SA plays a key role in plant immune reactions, mainly as a regulator of redox homeostasis. Depending on its concentration and environmental conditions, this compound can both increase ROS accumulation through inhibition of the activity of antioxidant enzymes (mainly CAT) and support ROS detoxification, thereby reducing the negative effects of oxidative stress (Herrera-Vásquez et al., 2015; Saleem et al., 2021). In the present research, the SA treatment did not exert a significant effect on the activity of antioxidant enzymes; simultaneously, the highest concentrations of H2O2 and TBARS were recorded in the SA variant, compared with the other experimental treatments. These results are consistent with literature reports suggesting that SA may interact with ROS to activate defense genes in response to stress factors (Holuigue et al., 2007; Herrera-Vásquez et al., 2015; Arif et al., 2020). As proposed by one hypothesis, SA inhibits CAT activity, thereby contributing to enhancement of H2O2 accumulation and an increase in the concentration of lipid peroxidation products, which may be indirectly involved in transduction of a signal initiating the expression of defense genes. Nevertheless, the SA-induced lipid peroxidation is strictly concentration-dependent also in this case (Herrera-Vásquez et al., 2015; Arif et al., 2020).

Our study also showed an increase in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in the ChL and Se treatments, although it was lower than in the SA elicitation variant. Additionally, ChL increased the concentration of lipid peroxidation products as well. Literature reports on ChL indicate its dual nature. On the one hand, ChL is often shown as a compound with antioxidant properties increasing the activity of enzymes directly involved in ROS neutralization. On the other hand, in the cellular response to stress, chitosan and its derivatives induce the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a signaling molecule in defense reactions and enhance the activity of the PAL enzyme, thus stimulating the synthesis of phenols, including phenolic acids. Additionally, the biological activity of chitosan as an elicitor may be also related to its polycationic nature and the processes taking place in plant cell walls (Stasińska-Jakubas et al., 2022). Other research suggest that the eliciting effect of chitosan on the production of phenolic metabolites in lemon balm might be connected with an increase in endogenous methyl jasmonate as an important signaling molecules, stimulation of activity of defense-related enzymes, and up-regulated expression of tyrosine aminotransferase and rosmarinic acid synthase genes (Fooladi Vanda et al., 2019). The above activity was confirmed in many plant species (Katiyar et al., 2015; Mukhtar Ahmed et al., 2019; Stasińska-Jakubas et al., 2023). A study conducted

by Mejfa-Teniente et al. (2013) demonstrated an increase in the  $H_2O_2$  content and induction of the expression of CAT and PAL genes and activity in *Capsicum annuum* L. treated with SA and ChL. Despite several studies performed with different elicitors on increasing the yield of rosmarinic acid, its production under chitosan treatment is still not well-studied. Treatment of plants with selenium compounds usually increases the activity of antioxidant enzymes and the level of antioxidant secondary metabolites (Hawrylak-Nowak, 2008; Bano et al., 2021). However, in the present study, selenium caused a slight decrease in CAT activity, compared with the control, with no significant effect on the lipid peroxidation level, which may be associated with the simultaneous elevated content of the other antioxidants (phenolic compounds).

One of the important elements of research on elicitation is the impact of stressors on the basic physiological processes in plants. The elicitors compared in this study often have a stimulating impact on the growth of plants and may exert a positive impact on photosynthetic efficiency, accumulation of photosynthetic pigments, or mineral absorption (Ali, 2021; Bano et al., 2021; Stasińska-Jakubas et al., 2022). However, achievement of these outcomes is not the goal of elicitation. Effective elicitation is primarily expected to exert no phytotoxic effects. Therefore, we analyzed the effect of ChL, SA, and Se solutions and their combination on the biomass of shoots and the functioning of the photosynthetic apparatus (chlorophyll a fluorescence, concentration of photosynthetic pigments). Although there are some literature reports on the plant growth-stimulating effect of these elicitors (Gorni and Pacheco, 2016; Habibi et al., 2016; Tavakoli et al., 2020), no significant effect on the biomass of the aboveground parts of lemon balm was observed in our study. This may be associated with the decrease in the level of some photosynthetic pigments and chlorophyll a fluorescence parameters. These factors are closely interrelated: the concentration of photosynthetic pigments is one of the main determinants of the efficiency of the photosynthesis process influencing plant growth (Saheri et al., 2020). The elicitors applied in the present study were expected not to cause significant changes in these parameters. The results of previous in vivo experiments showed that foliar application of ChL solutions slightly stimulated photosynthetic parameters in M. officinalis (Hawrylak-Nowak et al., 2021a) or did not have an effect on the photosynthetic process in other species of the family Lamiaceae (Hawrylak-Nowak et al., 2021a; Stasińska-Jakubas et al., 2023). The present results showed a decrease in the maximum fluorescence value on elicitation day 10 and a significant decrease in the F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> value induced by SA. Disturbances in the photosynthetic electron transport chain may increase oxidative stress and vice versa. Additionally, the content of the photosynthetic pigments (chlorophyll b, carotenoids) analyzed in the present study slightly decreased in the ChL and SA treatments. The lowest effect on the concentration of photosynthetic pigments was exerted by Se, while the same concentration of Se was previously reported to increase their content in lemon balm cultivated in field conditions (Habibi et al., 2016). As a phytohormone and signaling compound, SA may have a direct or indirect impact on photosynthesis efficiency. Depending on the concentration and other environmental factors, it can both mitigate the harmful effects of stress through its contribution to an increase in plant biomass and stimulation of photosynthesis (Arif et al., 2020; Saheri et al., 2020; Ali, 2021) and exert a negative effect through reduction of the content of photosynthetic pigments (Karalija and Parić, 2017).

Our research hypothesis about differences in the elicitation potential of the chemical compounds used and changes in cell redox parameters has been confirmed in this study. We have also shown that the effective induction of phenolic metabolite accumulation does not have an impact on plant biomass and does not cause any visual phytotoxicity signs, although it may reduce some photosynthetic parameters and the content of photosynthetic pigments. In general, the most effective elicitors, i.e. ChL and SA, are natural, biodegradable, and biocompatible compounds fulfilling the existing ecotoxicological criteria of application in the cultivation of plants. The proposed elicitation method can be costeffective and easy-to-use both in controlled cultivation conditions and in field cultivation; nevertheless, its effectiveness requires further confirmation.

### 5. Conclusions

The biochemical and physiological responses of M. officinalis to elicitors (150 mg/L ChL, 10 mg/L Se, 100 mg/L SA, a mixture of ChL+Se+SA) showed that this species reacts to the foliar application thereof with varying intensity, also depend on the duration of the period after the treatment. Our results showed that the tested substances used at the indicated concentrations significantly enhanced secondary metabolism and increased the accumulation of valuable (poly)phenolic compounds in *M. officinalis*. Rosmarinic and lithospermic acids were the main phenolic acids found in the leaf extracts. The PCA analysis and heatmap indicated that the content of phenolic acids varied in the different treatments and elicitation time and revealed a clear separation between the control and treatment groups. Taking into account their potential in induction of the accumulation of phenolic metabolites, the tested elicitors can be ranked as follows: ChL = SA > Se > ChL+Se+SA. Regardless of the elicitor type, the highest concentrations of most of the analyzed phenolic metabolites were recorded on elicitation day 8, while no significant increase in their content was generally observed on elicitation day 4. The compounds used in the study produced the highest increase in the level of rosmarinic acid hexoside and the smallest changes in the caffeic acid content. The main components of the soluble phenolic fraction, i.e. rosmarinic and lithospermic acids, were also very effectively stimulated by the elicitors. The changes in the level of the analyzed metabolites coincided with the change in some parameters of oxidative stress (accumulation of  $H_2O_2$  and  $O^2$  and lipid peroxidation), which may indicate the involvement of ROS imbalance in the induction of plant specialized metabolism. In summary, the study has indicated the most relevant recommendations for the use of the ChL and SA in pot cultivation of M. officinalis for production of raw material with improved concentration of nutraceutical and pro-health compounds. Additionally, more detailed experiments on the effects of these compounds on other secondary metabolic pathways in this species are still needed.

### CRediT authorship contribution statement

Maria Stasińska-Jakubas: Conceptualization, Investigation, Writing – original draft. Barbara Hawrylak-Nowak: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing – original draft, Supervision. Sławomir Dresler: Methodology, Investigation, Writing – review & editing. Magdalena Wójciak: Methodology, Investigation, Writing – review & editing Katarzyna Rubinowska: Methodology, Investigation, Writing – review & editing.

### **Declaration of Competing Interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### **Data Availability**

Data will be made available on request.

### Acknowledgements

This research was supported by project no. SD/48/NB/2022 provided by University of Life Sciences in Lublin, Poland.

### Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.indcrop.2023.117571.

#### M. Stasińska-Jakubas et al.

#### References

- Ali, B., 2021. Salicylic acid: an efficient elicitor of secondary metabolite production in plants. Biocatal. Agric. Biotechnol. 31, 101884 https://doi.org/10.1016/j. bcab.2020.101884.
- Applequist, W.L., Brinckmann, J.A., Cunningham, A.B., Hart, R.E., Heinrich, M., Katerere, D.R., van Andel, T., 2020. Scientists' warning on climate change and medicinal plants. Planta Med. 86 (1), 10–18. https://doi.org/10.1055/a-1041-3406.
- Arif, Y., Sami, F., Siddiqui, H., Bajguz, A., Hayat, S., 2020. Salicylic acid in relation to other phytohormones in plant: a study towards physiology and signal transduction under challenging environment. Environ. Exp. Bot. 175, 104040 https://doi.org/ 10.1016/j.envexpbot.2020.104040.
- Babenko, L.M., Smirnov, O.E., Romanenko, K.O., Trunova, O.K., Kosakivska, I.V., 2019. Phenolic compounds in plants: biogenesis and functions. Ukr. Biochem. J. 91 (3), 5–18. https://doi.org/10.15407/ubj91.03.005.
- Baenas, N., García-Viguera, C., Moreno, D.A., 2014. Elicitation: a tool for enriching the bioactive composition of foods. Molecules 19 (9), 13541–13563. https://doi.org/ 10.3390/molecules190913541.
- Bano, I., Skalickova, S., Sajjad, H., Skladanka, J., Horky, P., 2021. Uses of selenium nanoparticles in the plant production. Agronomy 11 (11), 2229. https://doi.org/ 10.3390/agronomy11112229.
- Cartaxo, P.H., de, A., Silva, D.G., Araújo, J.R.E.S., Barbosa da Silva, J.H., Targino, V.A., Xavier, L.M., da, S., Pereira Neto, F., Oliveira, A.B., Silva, A.M., 2022. Salinity and medicinal plants: challenges and strategies for production. Sci. Elec. Arch. 15 (8), 8–15. https://doi.org/10.36560/15820221579.
- Chen, S.L., Yu, H., Luo, H.M., Qiong, W., Li, C.F., Steinmetz, A., 2016. Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. Chin. Med. 11, 37. https://doi.org/10.1186/s13020-016-0108-7.
- Chudhary, A., Kumar, A., Kaur, N., 2020. ROS and oxidative burst: Roots in plant development. Plant Divers 42 (1), 33–43. https://doi.org/10.1016/j. pld.2019.10.002.
- Dresselhaus, T., Hückelhoven, R., 2018. Biotic and abiotic stress responses in crop plants. Agronomy 8, 267. https://doi.org/10.3390/agronomy8110267.
- Fooladi Vanda, G., Shabani, L., Razavizadeh, R., 2019. Chitosan enhances rosmarinic acid production in shoot cultures of *Melissa officinalis* L. through the induction of methyl jasmonate. Bot. Stud. 60 (26), 2–10. https://doi.org/10.1186/s40529-019-0274-x.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., Pugin, A., 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. Mol. Plant Microbe Inter. 19 (7), 711–724. https://doi.org/10.1094/ MPMI-19-0711.
- Gawlik-Dziki, U., Świeca, M., Dziki, D., Sugier, D., 2013. Improvement of nutraceutical value of broccoli sprouts by natural elicitors. Acta Sci. Pol. Hortoru. 12 (1), 129–140.
- Ghasemian, S., Masoudian, N., Nematpour, F.S., Afshar, A.S., 2020. Selenium enhances nutrient uptake and rosmarinic acid biosynthesis in *Melissa officinalis* L. under salinity stress. Iran. J. Plant Physiol. 11 (1), 3489–3498. https://doi.org/10.22034/ IJPP.2020.677290.
- Godínez-Mendoza, P.L., Rico-Chávez, A.K., Ferrusquía-Jimenez, N.I., Carbajal-Valenzuela, I.A., Villagómez-Aranda, A.L., Torres-Pacheco, I., Guevara-González, R, G., 2023. Plant hormesis: Revising of the concepts of biostimulation, elicitation and their application in a sustainable agricultural production. Sci. Total Environ. 894, 164883 https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164883.
- Golan, K., Rubinowska, K., Górska-Drabik, E., 2013. Physiological and biochemical responses of fern Nephrolepis biserrata (Sw.) Schott. to *Coccus hesperidum* L. Infestation. Acta Biol. Cracov. Bot. 55 (1), 93–98. https://doi.org/10.2478/abcsb-2013-0007.
- Gorni, P.H., Pacheco, A.C., 2016. Growth promotion and elicitor activity of salicylic acid in Achillea millefolium L. Afr. J. Biotechnol. 15 (16), 657–665. https://doi.org/ 10.5897/AJB2016.15320.
- Habibi, G., Ghorbanzadeh, P., Abedini, M., 2016. Effects of selenium application on physiological parameters of *Melissa officinalis* L. plants. IJMAPR 32, 698–715. https://doi.org/10.22092/ijmapr.2016.107141.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S.M., Al Mahmud, J., Fujita, M., Fotopoulos, V., 2020. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: revisiting the crucial role of a universal defense regulator. Antioxidants 9 (8), 681. https://doi.org/10.3390/antiox9080681.
- Hawrylak-Nowak, B., 2008. Enhanced selenium content in sweet basil (Ocimum basilicum L.) by foliar fertilization. Veg. Crop. Res. Bull. 69 (1), 63–72. https://doi.org/ 10.2478/v10032-008-0021-4.
- Hawrylak-Nowak, B., Hasanuzzaman, M., Matraszek-Gawron, R., 2018. Mechanisms of selenium-induced enhancement of abiotic stress tolerance in plants. In: Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Oku, H., Nahar, K., Hawrylak-Nowak, B. (Eds.), Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance. Springer, Dordrecht, pp. 269–295.
- Hawrylak-Nowak, B., Dresler, S., Rubinowska, K., Matraszek-Gawron, R., 2021a. Eliciting effect of foliar application of chitosan lactate on the phytochemical properties of *Ocimum basilicum* L. and *Melissa officinalis* L. Food Chem 1–7. https:// doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128358.
- Hawrylak-Nowak, B., Dresler, S., Stasińska-Jakubas, M., Wójciak, M., Sowa, I., Matraszek-Gawron, R., 2021b. NaCl-induced elicitation alters physiology and increases accumulation of phenolic compounds in *Melissa officinalis* L. Int. J. Mol. Sci. 22, 6844. https://doi.org/10.3390/ijms22136844.
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125, 189–198. https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1.

- Herrera-Vásquez, A., Salinas, P., Holuigue, L., 2015. Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. Front. Plant Sci. 6, 171. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00171.
- Holuigue, L., Salinas, P., Blanco, F., Garretón, B., 2007. Salicylic acid and reactive oxygen species in the activation of stress defense genes. In: Hayat, S., Ahmad, A. (Eds.), Salicylic Acid – A Plant Hormone. Springer, Dordrecht, pp. 197–246.
- Huang, H., Ullah, F., Zhou, D.-X.1, Yi, M., Zhao, Y., 2019. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. Front. Plant Sci. 10, 800. https://doi.org/ 10.3389/fpls.2019.00800.
- Isah, T., 2019. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. Biol. Res. 52 (1), 39. https://doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3.
- Jan, R., Asaf, S., Numan, M., Lubna, Kim, K.M., 2021. Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions. Agronomy 11, 968. https://doi.org/10.3390/agronomy11050968.

Jena, S., Choudhuri, M.A., 1981. Glucolate metabolizm of three submerged aquatic angiosperms during aging. Aquat. Bot. 12, 345–354.

- Kandoudi, W., Németh-Zámboriné, É., 2022. Stimulating secondary compound accumulation by elicitation: Is it a realistic tool in medicinal plants in vivo? Phytochem. Rev. 21, 2007–2025. https://doi.org/10.1007/s11101-022-09822-3.
- Kandoudi, W., Radácsi, P., Gosztola, B., Zámboriné Németh, E., 2022. Elicitation of medicinal plants in vivo — is it a realistic tool? The effect of methyl jasmonate and salicylic acid on Lamiaceae species. Horticulturae 8 (1), 5. https://doi.org/10.3390/ horticulturae8010005.
- Karalija, E., Parić, A., 2017. Effects of salicylic acid foliar application on growth and antioxidant potential of basil (*Ocimum basilicum* L.). Biol. Nyssana 8 (2), 145–150. https://doi.org/10.5281/zenodo.1135966.
- Katiyar, D., Hemantaranjan, A., Singh, B., 2015. Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: A review. Ind. J. Plant Physiol. 20, 1–9. https://doi.org/10.1007/s40502-015-0139-6.
- Khare, S., Singh, N.B., Singh, A., Hussain, I., Niharika, K., Yadav, V., Bano, C., Yadav, R., Amist, N., 2020. Plant secondary metabolites synthesis and their regulations under biotic and abiotic constraints. J. Plant Biol. 63, 203–216. https://doi.org/10.1007/ s12374-020-09245-7.
- Kianersi, F., Amin Azarm, D., Pour-Aboughadareh, A., Poczai, P., 2022. Change in secondary metabolites and expression pattern of key rosmarinic acid related genes in Iranian lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ecotypes using methyl jasmonate treatments. Mol. 27(5), 1715. https://doi. https://doi.org/10.3390/ molecules27051715.
- Kumar, D., Yusuf, M.A., Singh, P., Sardar, M., Sarin, N.B., 2014. Histochemical detection of superoxide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in *Brassica juncea* seedlings. Bio-Protoc. 4 (8) https://doi.org/10,21769/BioProtoc.1108.
- Kuzel, S., Vydra, J., Triska, J., Vrchotova, N., Hruby, M., Cigler, P., 2009. Elicitation of pharmacologically active substances in an intact medical plant. J. Agric. Food Chem. 57 (17), 7907–7911. https://doi.org/10.1021/jf9011246.
- Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M.R., Wu, H., 2020. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. Plant Physiol. Biochem. 148, 80–89. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006.
- Li, Y.P., Tang, D.B., Wang, X.Q., Wang, M., Zhang, Q.F., Liu, Y., Shen, B.Y., Chen, J.G., Yin, Z.P., 2021. Development of *Origanum vulgare* cell suspension culture to produce polyphenols and the stimulation effect of salicylic acid elicitation and phenylalanine feeding. Biotechnol. Bioprocess Eng. 26, 456–467. https://doi.org/10.1007/s12257-020-0193-4.
- Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R., 1983. Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. Biochem. Soc. Trans. 603, 591–592.
- Małolepsza, A., Urbanek, H., Polit, J., 1994. Some biochemical reactions of strawberry plants to infection with *Botrytis cinerea* and salicylic acid treatment. Acta Agrobot. 47 (2), 73–81. https://doi.org/10.5586/aa.1994.014.

Mejía-Teniente, L., Duran-Flores, D.F., Chapa-Oliver, A.M., Torres-Pacheco, I., Cruz-Hernández, A., González-Chavira, M.M., Ocampo-Velázquez, R.V., Guevara-González, R.G., 2013. Oxidative and molecular responses in *Capsicum annuum* L. after hydrogen peroxide, salicylic acid and chitosan foliar applications. Int. J. Mol. Sci. 14 (5), 10178–10196. https://doi.org/10.3390/ijms140510178.

Molyneux, P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J. Sci. Technol. 26, 211–219.

- Mousavi, S.M., Shabani, L., 2019. Rosmarinic acid accumulation in *Melissa officinalis* shoot cultures is mediated by ABA. Biol. Plant 63, 418–424. https://doi.org/ 10.32615/bp.2019.057.
- Mukhtar Ahmed, K.B., Khan, M.M.A., Siddiqui, H., Jahan, A., 2019. Chitosan and its oligosaccharides, a promising option for sustainable crop production - a review. Carbohydr. Polym., 115331 https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115331.

Murchie, E.H., Lawson, T., 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. J. Exp. Bot. 64, 3983–3998.

- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen Peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 22, 867–880. https://doi.org/ 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232.
- Pistelli, L., Tonelli, M., Pellegrini, E., Cotrozzi, L., Pucciariello, C., Trivellini, A., Lorenzini, G., Nali, C., 2019. Accumulation of rosmarinic acid and behaviour of ROS processing systems in *Melissa officinalis* L. under heat stress. Ind. Crops Prod. 138, 111469 https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111469.

Polish Pharmacopoeia V, 1999. Polskie Wydawnictwo Farmaceutyczne. Warsaw 56-57.

Riahi-Madvar, A., Yousefi, K., Nasiri-Bezenjani, M., 2014. Positive effect of Cu and yeast extract elicitors on the content of rosmarinic acid in *Melissa officinalis* L. Iran. J. Med. Aromat. Plants Res 30 (5), 714–723. https://doi.org/10.22092/ijmapr.2014.10709.

Rouphael, Y., Colla, G., 2020. Biostimulants in agriculture. Front. Plant Sci. 11 (40), 1–7. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00040.

#### M. Stasińska-Jakubas et al.

- Saheri, F., Barzin, G., Pishkar, L., Boojar, M.M.A., Babaeekhou, L., 2020. Foliar spray of salicylic acid induces physiological and biochemical changes in purslane (*Portulaca oleracea* L.) under drought stress. Biologia 75, 2189–2200. https://doi.org/10.2478/ s11756-020-00571-2.
- Saleem, M., Fariduddin, Q., Castroverde, C.D.M., 2021. Salicylic acid: a key regulator of redox signalling and plant immunity. Plant Physiol. Biochem. 168, 381–397. https:// doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.10.011.
- Salimgandomi, S., Shabrangy, A., 2016. The effect of chitosan on antioxidant activity and some secondary metabolites of *Mentha piperita* L. J. Pharm. Health Sci. 4 (2), 135–142.
- Sharan, S., Sarin, N.B., Mukhopadhyay, K., 2019. Elicitor-mediated enhanced accumulation of ursolic acid and eugenol in hairy root cultures of *Ocimum tenuiflorum* L. is age, dose, and duration dependent. S. Afr. J. Bot. 124, 199–210. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.05.009.
- Stasińska-Jakubas, M., Hawrylak-Nowak, B., 2022. Protective, biostimulating, and eliciting effects of chitosan and its derivatives on crop plants. Molecules 27 (9), 2801. https://doi.org/10.3390/molecules27092801.
- Stasińska-Jakubas, M., Hawrylak-Nowak, B., Wójciak, M., Dresler, S., 2023. Comparative effects of two forms of chitosan on selected phytochemical properties of *Plectranthus*

amboinicus (Lour.). Molecules 28 (1), 376. https://doi.org/10.3390/molecules28010376.

- Tavakoli, S., Enteshari, S., Yousefifard, M., 2020. The effect of selenium on physiologic and morphologic properties of *Melissa officinalis* L. Iran. J. Plant Physiol. 10 (2), 3125–3134. https://doi.org/10.30495/JJPP.2020.672572.
- Teklić, T., Paradiković, N., Špoljarević, M., Zeljković, S., Lončarić, Z., Lisjak, M., 2021. Linking abiotic stress, plant metabolites, biostimulants and functional food. Ann. Appl. Biol. 178, 169–191. https://doi.org/10.1111/aab.12651.
- Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P.K., Puri, S., 2019. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants 12, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.11.004.
- Wang, C., Lu, J., Zhang, S., Wang, P., Hou, J., Qian, J., 2011. Effects of Pb stress on nutrient uptake and secondary metabolism in submerged macrophyte Vallisneria natans. Ecotoxicol. Environ. Saf. 74 (5), 1297–1303.
- Wang, W., Xu, J., Fang, H., Li, Z., Li, M., 2020. Advances and challenges in medicinal plant breeding. Plant Sci. 298 (110573), 1–10. https://doi.org/10.1016/j. plantsci.2020.110573.
- Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R., 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnol. Adv. 23 (4), 283–333 https://do.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.003.

### 1 <u>SUPPLEMENTARY MATERIALS</u>

2

3	Application of chitosan lactate, selenite, and salicylic acid as an approach to
4	induce biological responses and enhance secondary metabolism in Melissa
5	officinalis L.
6	Maria Stasińska-Jakubas <sup>1</sup> , Barbara Hawrylak-Nowak <sup>1</sup> , Sławomir Dresler <sup>2,3</sup> , Magdalena
7	Wójciak <sup>2</sup> , Katarzyna Rubinowska <sup>1*</sup>
8	
9	<sup>1</sup> Department of Botany and Plant Physiology, Faculty of Environmental Biology, University
10	of Life Sciences in Lublin, Akademicka 15, 20-950 Lublin, Poland
11	<sup>2</sup> Department of Analytical Chemistry, Medical University of Lublin, Chodźki 4a, 20-093
12	Lublin, Poland
13	<sup>3</sup> Department of Plant Physiology and Biophysics, Institute of Biological Science, Maria
14	Curie-Skłodowska University, 20-033 Lublin, Poland
15	
16	*Correspondence: <u>katarzyna.rubinowska@up.lublin.pl</u>



Supplementary Figure S1. Histochemical detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and superoxide anion in *M. officinalis*leaves treated with different elicitors (ChL – chitosan lactate; Se – selenite; SA – salicylic acid;
ChL+Se+SA - mixture of elicitors) after one day of elicitation. The intense brown or blue color
indicates the presence and accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or superoxide anion, respectively.



26 27

Supplementary Figure S2. Histochemical detection of  $H_2O_2$  and superoxide anion in *M. officinalis* leaves treated with different elicitors (ChL – chitosan lactate; Se – selenite; SA – salicylic acid; ChL+Se+SA - mixture of elicitors) after eight days of elicitation. The intense brown or blue color indicates the presence and accumulation of  $H_2O_2$  or superoxide anion, respectively.



### 

Supplementary Figure S3. Cumulative content of individual phenolic compounds in *M. officinalis*leaves treated with different elicitors (ChL – chitosan lactate; Se – selenite; SA – salicylic acid;
ChL+Se+SA - mixture of elicitors) on elicitation days 4, 6, 8, and 10. The increase/decrease in the sum
of phenolic metabolites relative to the corresponding control is shown above the bars.

40 Supplementary Table S1. Results of quantitative determination of individual phenolic acids in leaves of *M. officinalis* treated with different elicitors (ChL – chitosan lactate;

41	Se – selenite: SA – salic	vlic acid: ChL+Se+SA -	mixture of elicitors) on elicitat	tion days 4, 6, 8, and 101	ov UHPLC-MS analysis.
		<b>, , , , , , , , , ,</b>	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		

								Day of elicitation													
		4th day							6th day	7		8th day				10th day					
Ph	enolic acid		t	reatmen	ıt		treatment				treatment						treatmen	nt			
		Control	ChL	Se	SA	ChL +Se +SA	Control	ChL	Se	SA	ChL +Se +SA	Control	ChL	Se	SA	ChL +Se +SA	Control	ChL	Se	SA	ChL +Se +SA
DW)	rosmarinic acid	27.2 ±5.0	30.9 ±4.1	29.5 ±5.3	30.6 ±10.5	31.0 ±5.0	29.9 ±4.9	44.7 ±4.3	31.7 ±5.0	46.5 ±6.3	30.4 ±3.9	34.8 ±4.0	48.6 ±6.2	39.5 ±2.7	47.4 ±4.6	33.3 ±1.1	21.9 ±2.9	48.1 ±5.0	42.0 ±8.07	45.3 ±5.0	18.3 ±4.2
(mg g <sup>-1</sup>	rosmarinic acid hexoside	0.47 ±0.09	3.21 ±0.78	1.74 ±0.06	4.3 ±0.33	0.59 ±0.06	0.58 ±0.06	3.99 ±1.4	2.07 ±0.7	6.23 ±0.66	0.41 ±0.17	1.85 ±0.2	7.81 ±0.72	4.77 ±0.29	$5.08 \\ \pm 0.5$	1.41 ±0.07	0.32 ±0.11	2.62 ±0.8	1.74 ±0.3	1.46 ±0.06	0.7 ±0.06
concentration	lithospermic acid	15.4 ±1.2	14.4 3.0	10.0 ±0.9	11.3 ±0.8	13.1 ±2.0	14.9 ±3.2	22.1 ±2.0	18.0 ±2.7	18.8 ±2.7	12.5 ±1.7	12.6 ±1.9	17.0 ±0.9	19.2 ±1.3	15.5 ±1.5	17.5 ±1.9	12.1 ±1.1	16.7 ±1.9	14.4 ±1.9	12.5 ±0.5	11.7 ±1.1
	salvianolic acid A	1.7 ±0.1	1.8 ±0.3	1.2 ±0.2	1.8 ±0.6	1.8 ±0.1	1.8 ±0.2	2.9 ±0.1	1.9 ±0.1	2.3 ±0.4	1.8 ±0.2	1.9 ±0.2	2.7 ±0.2	2.1 ±0.1	2.1 ±0.2	2.0 ±0,1	1.1 ±0.1	2.9 ±0.2	1.8 ±0.2	2.0 ±0.2	1.3 ±0.1
DW)	salvianolic acid C derivative	0.82 ±0.03	0.80 ±0.03	0.46 ±0.02	0.7 ±0.04	1.01 ±0.06	0.82 ±0.05	1.11 ±0.05	1.28 ±0.11	1.23 ±0.22	0.59 ±0.23	0.83 ±0.11	0.69 ±0.16	1.18 ±0.08	1.48 ±0.01	1.48 ±0.02	0.61 ±0.12	0.66 ±0.14	0.74 ±0.06	0.96 ±0.17	1.27 ±0.11
1 (μg g <sup>-1</sup>	caftaric acid	70.3 ±1.2	78.7 ±17.1	47.4 ±6.6	50.9 ±5.6	92.1 ±9.2	98.5 ±11.1	142.2 ±4.8	105.2 ±5.5	137.0 ±1.0	$\begin{array}{c} 80.6 \\ \pm 8.8 \end{array}$	72.4 ±14.4	172.1 ±27.1	$\begin{array}{c} 138.0 \\ \pm 12.8 \end{array}$	143.0 ±2.1	128.6 ±0.9	48.5 ±9.9	109.0 ±1.0	108.6 ±8.6	64.3 ±14.0	76.7 ±7.5
entration	caftaric acid hexoside	80.2 ±7.9	70.2 ±20.9	71.3 ±1.2	63.7 ±7.7	84.7 ±4.9	91.7 ±5.1	113.1 ±14.1	99.6 ±2.2	135.6 ±1.3	86.0 ±0.3	86.7 ±10.6	134.1 ±28.7	95.6 ±11.8	124.8 ±4.8	96.0 ±7.5	57.9 ±10.4	118.2 ±3.1	89.0 ±7.1	99.6 ±2.1	73.0 ±13.1
conc	caffeic acid	42.9 ±2.6	35.5 ±8.1	31.9 ±6.3	24.5 ±5.5	63.1 ±5.4	37.2 ±7.5	40.8 ±2.5	35.0 ±3.8	42.4 ±3.2	48.8 ±2.6	40.8 ±13.0	40.3 ±4.4	34.1 ±3.8	40.2 ±3.1	43.8 ±5.6	38.7 ±2.0	38.5 ±8.0	34.9 ±6.0	42.0 ±0.8	44.5 ±3.2

Contents lists available at ScienceDirect

### Phytochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phytochem

# Differentiated response of *Hypericum perforatum* to foliar application of selected metabolic modulators: Elicitation potential of chitosan, selenium, and salicylic acid mediated by redox imbalance

Maria Stasińska-Jakubas<sup>a</sup>, Sławomir Dresler<sup>b, c</sup>, Maciej Strzemski<sup>c</sup>, Katarzyna Rubinowska<sup>a</sup>, Barbara Hawrylak-Nowak<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Botany and Plant Physiology, Faculty of Environmental Biology, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 15, 20-950, Lublin, Poland

<sup>b</sup> Department of Plant Physiology and Biophysics, Institute of Biological Science, Maria Curie-Skłodowska University, 20-033, Lublin, Poland

<sup>c</sup> Department of Analytical Chemistry, Medical University of Lublin, Chodźki 4a, 20-093, Lublin, Poland

### ARTICLE INFO

Keywords: St. John's wort Elicitation Eustress Foliar application Phytochemistry Oxidative response

### ABSTRACT

Plants plastically alter their metabolism in response to environmental stimuli, which induces changes in the accumulation of specialized metabolites. This ability can be utilized to manipulate plant phytochemistry in a desired direction. However, the abundance of secondary metabolites in the different plant species, especially medicinal, is enormous; therefore, it is difficult to establish a clear direction for the effects of metabolic modulators on phytochemical composition, especially given the possibility of using different types thereof. In order to gain insight into these changes, we investigated the effects of foliar-applied chitosan (ChL, 100 mg/L), selenium (Se, 10 mg/L), salicylic acid (SA, 150 mg/L), or an equal volume mixture thereof on *Hypericum perforatum* L. metabolism. Selenium and SA proved to be the more effective than ChL in enhancing the accumulation of phenolic compounds. The greatest increase was found in the concentration of neochlorogenic acid after Sespraying. The treatment with the elicitors generally increased the concentration of identified flavonoids, but not the level of naphthodianthrone or phloroglucinol metabolites. The most pronounced response was observed on day 10 following the application of the compounds, and is likely the consequence of elevated levels of  $O_2^-$ , free proline, and modulated activity of enzymatic antioxidants.

### 1. Introduction

Due to the growing demand for plant raw materials, the overexploitation of their natural localities and the difficulties in the field cultivation of some plant species pose new challenges to the modern herbal industry. They are primarily associated with the production of economically important high-quality plant raw materials, taking into account the simultaneous impact of environmental factors, which play a fundamental role in the cultivation of medicinal plants (Crockett and Robson, 2011; Zirak et al., 2019). Extreme and/or violent weather events caused by climate change may exert a negative effect on the quality and quantity of crops (Alvarez et al., 2024). On the other hand, a moderate impact of stress factors (eustress) on crops may stimulate plant metabolism towards the biosynthesis of secondary metabolites, whose content is the most important determinant of the quality of raw materials (Bruni and Sacchetti, 2009; Li et al., 2020). Therefore, the modern environmentally friendly methods for optimization of crops can be based on the effect of eustress on plants, as in the case of elicitation. Given its simplicity and low costs of application, it may be a promising solution helping to combine the needs of the industry with the requirements of sustainable development. In recent years, this method has been gaining popularity and has been used to increase the production of valuable phytochemicals in Hypericum perforatum L. However, the majority of elicitation-based experiments have been conducted in in vitro studies to date, hence the need to investigate its application in entire plant systems (Shakya et al., 2017; Kandoudi and Németh-Zámboriné, 2022). The most frequent elicitors that have so far been successfully used for induction of the production of bioactive compounds (mainly hypericin) in H. perforatum cultivation include abiotic elicitors (e.g. salicylic acid, jasmonic acid, or methyl jasmonate) and biotic agents (chitosan and fungal or bacterial elicitors) (Shakya et al., 2017; Shasmita et al., 2023). However, regardless of the elicitors used, the type of

\* Corresponding author. *E-mail address:* barbara.nowak@up.lublin.pl (B. Hawrylak-Nowak).

https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2024.114231

Received 29 May 2024; Received in revised form 14 July 2024; Accepted 25 July 2024 Available online 26 July 2024

0031-9422/© 2024 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).







culture is highlighted in the literature as a determinant of effective stimulation of the *in vitro* biosynthesis of desirable compounds (Gadzovska et al., 2013; Shakya et al., 2017; Kwiecień et al., 2021).

H. perforatum, commonly named St. John's wort (SJW), is the best known and most popular perennial species of the family Hypericaceae occurring in Central and Eastern Europe, North Africa, Asia, and North America (Crockett and Robson, 2011; Shasmita et al., 2023). In the middle of the last century, the raw material of this species was obtained almost exclusively from natural habitats, whereas the majority of the material currently originates from plantations (Bruni and Sacchetti, 2009). In accordance with pharmacopoeial requirements, the raw material of SJW is the flowering tops of shoots (Hyperici herba) containing not less than 0.08% of dianthrone compounds calculated with reference to the amount of hypericin (Agapouda et al., 2019). A wide spectrum of secondary metabolites has been identified in the chemical composition of *H. perforatum*, with such important components as phloroglucinol derivatives (mainly hyperforin), flavonoids (hyperoside, rutin, quercetin, quercitrin, isoquercitrin), sesquiterpene-rich essential oil, catechin tannins, and phenolic acids (mainly caffeic and chlorogenic acids) (Barnes et al., 2018; Mathioudaki et al., 2018; Zirak et al., 2019; Nobakht et al., 2022). Therefore, both the raw material and its preparations are widely used in medicine as antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, antioxidant, anticancer, and analgesic agents and factors counteracting neurodegenerative diseases. However, the activity and the use of SJW preparations depend on their type. The most frequently used form is the water-alcoholic extract exerting a beneficial effect on the nervous system function, as it exhibits antidepressant and anxiolytic activity, mitigates tension and nervous exhaustion, and helps to fall asleep. This activity is attributed to the interactions between several bioactive substances, primarily hyperforin, hypericin, and flavonoids. The photosensitizing effect to UV rays exerted by hypericin is the basis of the treatment of dermatological diseases, e.g. vitiligo. In turn, water and oil extracts of SJW contain mainly tannins and flavonoids with antiseptic, astringent, anti-inflammatory, choleretic, and digestion-improving properties. Hence, they are used externally in dermatology and cosmetics as adjuvant agents in the treatment of skin wounds and burns, irritation and inflammation of the oral mucosa, sciatica, and neuralgia and internally in gastrointestinal disorders (Mullaicharam and Halligudi, 2018; Zirak et al., 2019; Nobakht et al., 2022; Shasmita et al., 2023).

In addition to its multidirectional biological activity described above, the popularity of SJW is mainly related to its established role in the treatment of mild and moderate depression (Mullaicharam and Halligudi, 2018; Nobakht et al., 2022). Owing to its potential to be used in the phytotherapy of this most common lifestyle diseases, this raw material it one of the most frequently sold dietary supplements and plant-derived antidepressants (Barnes et al., 2018). SJW is regarded as the only substitute for synthetic antidepressants with almost the same effectiveness, but with fewer side effects (Agapouda et al., 2019).

The present study was focused on analyses of the effectiveness of stimulation of the production of valuable secondary metabolites by chemically diverse elicitors in controlled conditions of SJW cultivation. The effects of the foliar application of solutions of chitosan lactate (ChL), selenium (Se), or salicylic acid (SA) as well as their mixture in a 1:1:1 ratio, depending on the exposure time (5, 8, and 10 days) were analyzed. To verify the research hypothesis that the substances used exert a varying effect on the metabolism and redox homeostasis of SJW, we analyzed the impact of the selected metabolic modulators on the primary and secondary metabolism of plants and some oxidative stress indicators. The experiments provided new information on the effect of various metabolic modulators on the physiological processes and the accumulation of secondary metabolites in SJW.

### 2. Results

## 2.1. Selected secondary metabolites in leaves of plants treated with metabolic modulators

The total phenolic compounds (TPC) in the H. perforatum leaf extracts varied, mainly depending on the metabolic modulator type and the duration of the elicitation (Fig. 1A). The highest value of TPC in all the experimental groups, except for the elicitor mixture variant, was recorded on day 10 of the experiment. At that time point, the highest effectiveness of the metabolic modulators was recorded in comparison with the control plants. The Se solution proved to be the most effective then, as its application resulted in a 23% increase in TPC. Simultaneously, the SA and ChL exhibited lower but still significant elicitation activity, as the content of the analyzed compounds increased by 16% and 12%, respectively, compared to the control. A similar tendency was observed on elicitation day 5, i.e. the TPC value in the Se-sprayed SJW leaves increased by 19%. Concurrently, slightly lower amounts of these compounds were accumulated in the SA treatment (a 12% increase). The application of ChL + Se + SA usually resulted in reduced levels of the tested compounds, with the exception of elicitation day 8 characterized by a 12% higher concentration of TPC than the control plants. The analysis of the effect of the main factors on the TPC value confirmed the highest accumulation of these compounds on elicitation day 10, regardless of the elicitor type. In turn, taking into account only the metabolic modulator type, Se and SA proved to be the most effective substances in the induction of TPC biosynthesis.

In contrast to TPC, the highest levels of total soluble flavonols (TSF) were observed on day 5 of the experiment, regardless of the metabolic modulator type (Fig. 1B). The highest concentration of these metabolites



**Fig. 1.** Effect foliar application of ChL – chitosan, Se – selenium, SA – salicylic acid, and the ChL + Se + SA mixture on the concentration of total phenolic compounds (A) and total soluble flavonols (B) in the *H. perforatum* leaves on the 5th, 8th, and 10th day of elicitation. Means ( $\pm$  standard deviation, n = 3) with different letters differ significantly (p < 0.05). Effects of the main factors are marked in the same way with capital letters. GAE – gallic acid equivalents, RUE – rutin equivalents.

was recorded in the control leaves (26.74 mg RUE  $g^{-1}$  DW) and in the treatment with the Se (26.85 mg RUE  $g^{-1}$  DW), but it was significantly reduced in the ChL + Se + SA variant.

An improved HPLC method was used to analyze the profile and amount of major metabolites in *H. perforatum* leaves and the results are in agreement with the profile of flavonoids and specific metabolites achieved in previous studies (Dresler et al., 2018; Carrubba et al., 2021). Typical chromatograms obtained during the separation of *H. perforatum* leaf extracts are shown in Fig. 2 A (separation of phenolic compounds) and Fig. 2 B (separation of pseudohypericin, hyperforin, hypericin).

The HPLC analyses of the *H. perforatum* raw material identified and quantified nine important secondary metabolites: five from the group of flavonoids (epicatechin, hyperoside, rutoside, isoquercitrin, quercetin, and additionally two unidentified quercetin derivatives – querDV1 and querDV2), one from the group of phenolic acids (neochlorogenic acid), two from the group of naphthodianthrones (hypericin, pseudohypericin), and one from the group of phloroglucinols (hyperforin). The accumulation of these substances in the plants depended not only on the elicitor type and the exposure time but also on the groups of metabolites represented by these compounds. For example, the foliar application of the elicitors usually induced an increase in the concentration of flavonoid compounds (Fig. 3) but caused a general decrease in the level of substances from the naphthodianthrone group (Fig. 4B and C).

Flavonoids were the main compounds among the identified secondary metabolites (Fig. 3). Epicatechin was the dominant flavonoid (Fig. 3 A), its content in the extracts from the control plants was  $2.53-4.94 \text{ mg g}^{-1}$  DW, and higher concentrations were recorded on day 10 of the experiment. However, the elicitors generally caused statistically insignificant changes in the content of this compound, compared to the control. The greatest increase in the epicatechin concentration was recorded on day 10 after the application of Se and SA (a 20–21% increase compared to the corresponding control). In turn, the application of the elicitor mixture resulted in an almost 20% decrease (but statistically insignificant) in the epicatechin concentration. The foliar application of the elicitors separately induced significant changes in the rutoside content, i.e. the content of this compound on day 10 after the first application of ChL and SA increased by 50–58%, compared to the



**Fig. 2.** Example HPLC chromatograms of *H. perforatum* leaves extracts during separation of phenolic compounds (A): neochlorogenic acid (1), epicatechin (2), hyperoside (3), rutoside (4), isoquercitrin (5), quercetin (6), and quercetin derivatives (7, 8) and separation of specific metabolites (B): pseudohypericin (1), hyperforin (2), hypericin (3). The green line represents the spectrum of the standard mixture and the blue line represents the spectrum of the test sample.

control. In these conditions, the Se treatment exhibited slightly lower effectiveness (a 36% increase) (Fig. 3C). Similar changes were recorded in the accumulation of hyperoside, as the concentration of this flavonoid increased by 40% on day 10 after the SA application. Simultaneously, the ChL and Se were less effective, and their application increased the hyperoside content by approximately 29%, compared to the control (Fig. 3B). The elicitor mixture generally led to a significant decrease in the concentration of this compound, especially on day 5 of the experiment. The quercetin content was high on day 5 both in the control and in the elicitor-treated plants (Fig. 3E). The solutions of separate elicitors contributed to a similar increase in the concentration of this metabolite on experimental day 10, i.e. the quercetin content increased by approximately 48% after the application of ChL and SA and by 41% after the application of Se. However, taking into account the impact of the main factors, ChL proved to be the most effective elicitor in this case, regardless of the duration of the elicitation. The lowest fluctuations in the content of the flavonoids were exhibited by isoquercitrin, whose concentration did not change significantly depending on the duration of the exposure or the metabolic modulator type. An exception was the Se treatment, where the isoquercitrin content on day 5 increased by 83% compared to the control (Fig. 3D).

Two unidentified quercetin derivatives - querDV1 and querDV2 were detected (Fig. 3F and G). Neither the type of elicitors nor the treatment duration changed the concentration of querDV1 (Fig. 3F). A significant 44% decrease in the querDV1 content, compared to the control, was recorded only on day 5 in the elicitor mixture variant. The elicitors did not generally cause fluctuations in the content of querDV2 (Fig. 3G), with the exception of the Se solution, which increased its concentration by 48% on day 5. At the same time, the elicitor mixture reduced the querDV2 level. The effect of the main factors on all the identified flavonoids was similar. The largest amounts of the flavonoids were detected on elicitation day 10, regardless of the metabolic modulator type. An exception was quercetin, as its highest content was determined on day 5. Se and SA turned out to be the most effective stimulators of the biosynthesis and accumulation of flavonoids, regardless of the time elicited.

In terms of quantity, neochlorogenic acid ranked first among the qualitatively determined metabolites. The level of this phenolic acid (Fig. 4A) in the leaves of the control plants was the same on the individual days of the experiment (average 5.7 mg<sup>-1</sup> DW), and the application of the metabolic modulators generally caused slight variations in its content. An increase in the accumulation of neochlorogenic acid was recorded on day 5 after the first application of Se and SA, during this period, its content increased by 51% and 41%, respectively, compared to the control. The analysis of the effects of the main factors revealed no significant effect of the duration of the exposure to the metabolic modulators on the concentration of this acid but confirmed the highest elicitation efficiency of Se and SA.

The content of naphthodianthrones was substantially lower than that of the phenolic compounds and depended on the elicitor type to a greater extent than on the exposure time (Fig. 4B and C). The highest hypericin concentration was recorded in the control plants on day 5 after spraying (Fig. 4B). However, the concentration of this compound after the application of the tested elicitors exhibited a downward tendency, especially on day 5. At that time, the content of hypericin in the elicitor mixture variant was 4-fold lower than in the control. The application of the elicitors separately induced a significant 38%, 30%, and 21%decrease in the concentration of this compound in the SA, ChL, and Se treatments, respectively. On the subsequent days of the experiment, the hypericin content increased, especially in the Se and SA application variants. However, a significant increase in comparison with the corresponding control was observed only on day 8 after the SA treatment (a 69% increase). The analysis of the impact of the main factors showed no significant effect of the duration of the exposure to the elicitor on the hypericin content, however, its highest concentrations were recorded in the control plants and those treated with Se and SA, whereas the lowest



**Fig. 3.** Effect foliar application of ChL – chitosan, Se – selenium, SA – salicylic acid, and the ChL + Se + SA mixture on the concentration of selected flavonoids – epicatechin (A), hyperoside (B), rutoside (C), isoquercitrin (D), quercetin (E), and quercetin derivatives querDV1 (F) and querDV2 (G) in the *H. perforatum* leaves on the 5th, 8th, and 10th day of elicitation. Means ( $\pm$  standard deviation, n = 3) with different letters differ significantly (p < 0.05). Effects of the main factors are marked in the same way with capital letters, ns – not significant.

level was recorded in the ChL + Se + SA treatment. Similar trends were observed in the pseudohypericin content (Fig. 4C). Its highest accumulation was recorded on elicitation day 5 not only in the leaves of the control plants but also in the Se-treated plants, the content of pseudohypericin on day 5 was in the range of 0.51–0.61 mg g<sup>-1</sup> DW. The other elicitors slightly reduced the content of this compound, but these changes were generally not significant (except for elicitation day 5 in the elicitor mixture variant). The analysis of the impact of the tested metabolic modulators, regardless of the exposure time, revealed that only SA had a beneficial effect on the accumulation of pseudohypericin in the SJW leaves, whereas the ChL + Se + SA mixture reduced the level of this compound.

The concentration of the phloroglucinol derivative, i.e. hyperforin, varied depending on the duration of the experiment and the elicitor used (Fig. 4D). On the first days of exposure, no significant changes in the

content of this compound were induced by the substances applied. An exception was the treatment with the ChL + Se + SA mixture, where a 29% decrease in the hyperforin concentration was noted on day 5. A similar effect was noted on day 10 of the experiment, when the hyperforin content was 35% lower than in the control. A downward trend was simultaneously observed in the other experimental series, but these changes were not statistically significant. The accumulation of hyperforin was most intensively stimulated on day 8 of the experiment, its level increased by 54% in the SA application variant. The mixture of the elicitors was characterized by slightly lower elicitation efficiency, as its application resulted in a 43% increase in the hyperforin level. In terms of the impact of only the main factors, the Se and SA solutions were the most effective elicitors.



**Fig. 4.** Effect of foliar application of ChL – chitosan, Se – selenium, SA – salicylic acid, and the ChL + Se + SA mixture on the concentration of neochlorogenic acid (A), hypericin (B), pseudohypericin (C), and hyperforin (D) in the *H. perforatum* leaves on the 4th, 7th, and 10th day of elicitation. Means ( $\pm$  standard deviation, n = 3) with different letters differ significantly (p < 0.05). Effects of the main factors are marked in the same way with capital letters, ns – not significant.

### 2.2. Oxidative changes in plants treated with metabolic modulators

The activity of selected antioxidant enzymes (APX, CAT, GPX) in the H. perforatum leaves was determined shortly after the first application of the metabolic modulators (day 1) and on the final day of the experiment (day 10) (Fig. 5A and B). Compared to the control, significantly higher APX activity (over 2-fold) was observed in the SA elicitation variant on day 1 and in the treatment with the elicitor mixture on day 10. All the metabolic modulators initially caused a significant decrease in the CAT activity (a decrease ranging from 55% to 2.5-fold). In comparison with the control, the lowest CAT activity was observed in the SA spraying variant, where a 2.5-fold reduction in the catalytic activity was recorded. In contrast, an increase in the activity of this enzyme was observed on elicitation day 10, especially in the Se treatment (over 4-fold versus the control). The other metabolic modulators increased the CAT activity as well (by 118-257%). In turn, the GPX activity usually declined as a result of the elicitation, regardless of the duration of the exposure. An exception was the metabolic modulators mixture, as it increased the GPX activity on days 1 and 10 of the experiment (a 116% and 150% increase, respectively).

The visualization of the reactive oxygen species (ROS;  $O^{2-}$  and  $H_2O_2$ ) did not reveal their increased accumulation shortly after the application of the metabolic modulators (day 1 after spraying) (Fig. 6). The highest levels of ROS on days 1 and 8 after the first treatment were detected mainly in the petioles and along the leaf blade innervation, which was most probably a result of the mechanical damage to these tissues caused by cutting the leaves. However, on day 8 after the application of the elicitors separately, clear color changes indicated an increased level of ROS, in particular  $O^{2-}$ . The accumulation of  $H_2O_2$  was then visible as small point-like changes on the leaf blade of plants treated with the Se and ChL solutions (Fig. 6).

The elicitors used usually had a negligible effect on the ability of the plant extracts to reduce the DPPH radical (Fig. S1). The highest average antioxidant activity was recorded on day 5 of the Se treatment (approximately 86%, compared to 74% in the control).



**Fig. 5.** Effect of foliar application of ChL – chitosan, Se – selenium, SA – salicylic acid, and the ChL + Se + SA mixture on the activity of ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPX) in the *H. perforatum* leaves on the 1st (A) and 10th (B) day of elicitation. Means ( $\pm$ SD, n = 3) with different letters differ significantly (p < 0.05).

Treatment	1 day	y after applie	cation o	felicitors	8 days after application of elicitors						
Control		Ŷ	Q	X	V	×		R			
ChL	Ç	(m)		Ŷ	Ŷ	¥	£	Ł			
Se	0	\$	0	R	R	Ŷ		\$			
SA	¢			ļ	Ŷ	X	Ţ	9			
ChL+Se+SA	0	2	Q	Ø	Ŷ	V		4			
		NBT		DAB	NB	т	DAB				

**Fig. 6.** Histochemical detection of  $O^{2^{-1}}$  and  $H_2O_2$  using NBT and DAB staining, respectively, in the leaves of *H. perforatum* on the 1st and 8th day after the foliar application of ChL – chitosan, Se – selenium, SA – salicylic acid, and the ChL + Se + SA mixture. The intense blue color indicates the presence of  $O^{2^{-1}}$ , the dark brown color indicates the accumulation of  $H_2O_2$ .

### 2.3. Biometric and physiological parameters of elicitor-treated plants

The application of the metabolic modulators did not exert a significant effect on the biomass of SJW shoots (Fig. 7A). However, a slight decrease in the content of photosynthetic pigments was observed, especially in the Se treatment. The level of chlorophyll in the plants treated with the Se decreased by 11–12%, compared to the control (Fig. 7B).

The elicitors applied caused fluctuations in the values of some chlorophyll fluorescence parameters. The measurements were carried out on elicitation days 4 and 10 (Figs. S2A and B). On the first elicitation days, significant changes in comparison with the control plants were observed only in the ChL + Se + SA mixture variant, i.e. there was a 15% increase in the F<sub>0</sub> value with a simultaneous 5% decrease in the F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> (Fig. S2A). On the last elicitation day, a decrease in the F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> and an increase in the F<sub>0</sub> were observed in the Se and SA treatments. The F<sub>m</sub> was reduced after the use of the elicitors separately, with the greatest decrease induced by ChL and Se (Fig. S2A).

All the analyzed elicitor combinations contributed to an increased accumulation of proline in the *H. perforatum* leaves (Fig. 8). On day 4, its concentration increased by 60% after the application of ChL and the elicitor mixture and by 45% in the Se and SA variants.

### 3. Discussion

The qualitative and quantitative variability of the chemical composition in medicinal plants is one of the main limitations faced by the modern herbal industry. To meet the growing market requirements, considerable attention is paid to development of modern and environmentally safe methods for optimization of plant production. One of the proposed solutions is elicitation, which has recently gained great interest among researchers and entrepreneurs worldwide. Despite the popularity of this method, a large part of current experiments focus on the effective use of elicitors only in in vitro conditions, while field cultivation is an almost exclusive source of many economically important medicinal plant species, e.g. H. perforatum (Gadzovska Simic et al., 2014; Murthy et al., 2014; Shakya et al., 2017; Barnes et al., 2018). However, it is difficult to investigate the biological activity of elicitors in field conditions due to the impact of a number of environmental factors exerting various effects on the phytochemical properties of H. perforatum raw material (Kirakosyan et al., 2004; Bruni and Sacchetti, 2009; Shasmita et al., 2023). Therefore, it is essential to carry out more extensive in vivo experiments on different plant species with the use of elicitors in controlled cultivation conditions (Kandoudi and Németh-Zámboriné, 2022; Stasińska-Jakubas et al., 2023a). H. perforatum is so far the best-studied model species, not only in the genus Hypericum, in terms of the determination of its chemical composition and pharmacological properties (Ion et al., 2022) and the



**Fig. 7.** Effect of foliar application of ChL – chitosan, Se – selenium, SA – salicylic acid, and the ChL + Se + SA mixture on the biomass (A) and concentrations of photosynthetic pigments (B) in the *H. perforatum* leaves on the 9th day of elicitation. Means ( $\pm$ SD, n = 10 for DW, n = 3 for photosynthetic pigments) marked with different letters differ significantly (p < 0.05).



**Fig. 8.** Effect of foliar application of ChL – chitosan, Se – selenium, SA – salicylic acid, and the ChL + Se + SA mixture on proline accumulation in the *H. perforatum* leaves on the 3rd day of elicitation. Means ( $\pm$ SD, n = 3) for individual parameters marked with different letters differ significantly (p < 0.05).

elucidation of the pathways of the biosynthesis of naphthodianthrones (Kirakosyan et al., 2004; Shakya et al., 2017) or xanthones (Gaid et al., 2018).

In the present experiment, the varied effects of the metabolic modulators on the primary and secondary metabolism of *H. perforatum* depended on both the type of the applied substances and the duration of the exposure. For example, the application of SA contributed to the greatest increase in the rutoside concentration (by 58% *versus* the control), while the ChL + Se + SA mixture induced the greatest reduction in the hyperforin content (by 35%). The highest biological activity was usually exhibited by the separate elicitors, and the most visible changes in the analyzed parameters were observed on day 10 of the experiment.

The results obtained indicate that the effectiveness of the induction of the biosynthesis of the secondary metabolites was largely associated with the chemical group that they represented. In general, the application of the metabolic modulators had a positive effect on the accumulation of flavonoids, but did not increase the levels of hypericin, pseudohypericin or hyperforin. These discrepancies may be related to the completely different biosynthetic pathways of these compounds (Pradeep and Franklin, 2022) and in their physiological functions in plants (Murthy et al., 2014; Liu et al., 2021; Badiali et al., 2023). The naphthodianthrones (hypericin and its structural analogous) are produced via the polyketide pathway (Karppinen et al., 2008), phloroglucinols (hyperforin) via the non-mevalonate pathway (Rizzo et al., 2020), where phenolic compounds are formed in the phenylpropanoid pathway (Pradeep and Franklin, 2022). Flavonoids are a distinct group of the most widespread antioxidants in the plant kingdom playing an important regulatory and signaling role in basic physiological processes and interactions of plants with the environment. Increased biosynthesis and accumulation of substances from this group of secondary metabolites is one of the common strategies of plant defense and tolerance to (a) biotic stresses factors (Liu et al., 2021; Singh et al., 2021). Furthermore, stimulation of the activity of phenylalanine ammonia lyase and chalcone isomerase, a key enzymes for the synthesis of phenolic metabolites via the phenylpropanoid pathway, by the metabolic modulators (methyl jasmonate, salicylic acid) in H. perforatum was demonstrated in vitro by Wang et al. (2015) and Gadzovska et al. (2013). Elicitors can act at the level of secondary metabolite biosynthesis, not necessarily their accumulation (Gadzovska et al., 2013), but the regulation of this process is very complex and the response of plants grown in vitro does not always reflect their action in vivo.

To the best of our knowledge, no in vivo experiments on the use of ChL, Se, and SA or their combination for the elicitation of secondary metabolites in H. perforatum have been conducted to date. However, available literature reports confirm the effectiveness of these substances in increasing the in vitro biosynthesis of bioactive compounds that are important for this species. Signaling molecules, e.g. SA, are the most frequently used abiotic elicitors, especially in the production of hypericin. For example, the presence of 50, 100, or 200 µM SA in H. perforatum suspension cultures induced an approximately two-fold increase in the content of hypericin and pseudohypericin, regardless of the elicitor concentration (Gadzovska et al., 2013). Enhanced hyperforin accumulation was induced by 1 mM SA in shoot meristem cultures of this species (Sirvent and Gibson, 2002). Some components of H. perforatum, e.g. flavonoids and hyperforin play an important antioxidant and antimicrobial role in plant defense strategies against environmental (mainly biotic) factors (Badiali et al., 2023). Chitosan and its derivatives may have high potential elicitation efficiency. For instance, its presence in H. perforatum root cultures was shown to stimulate the production of epicatechin, xanthones, and terpenoids (Brasili et al., 2014).

In our previous studies the application of ChL, Se, or SA effectively stimulated the accumulation of some phenolic compounds in Melissa officinalis pot cultivation (Stasińska-Jakubas et al., 2023a). However, the efficacy of the stimulation of the biosynthesis of these metabolites in M. officinalis was substantially higher than in the case of H. perforatum. For example, an over 20% increase in TPC was recorded on day 10 after the application of Se, which is one of the most effective elicitors in SJW, whereas an approximately two-fold higher increase was noted in the study of the lemon balm (40% compared to the control). Similarly, the application of the analyzed elicitors efficiently stimulated the biosynthesis of some phenolic acids in M. officinalis leaves, as the content of rosmarinic acid hexoside increased up to 10-fold after the SA application (Stasińska-Jakubas et al., 2023a). In the case of H. perforatum, the greatest increase in the concentration of neochlorogenic acid (approximately 50% compared to the control) was achieved in the Se spraving variant. The lower elicitation efficiency observed in the present experiment may be related to the morphological features of Hypericum plants, i.e. the small surface of the leaf blade covered with a highly hydrophobic
Phytochemistry 227 (2024) 114231

cuticle with high lipid content may limit the diffusion and penetration of elicitors (Perrone et al., 2013; Li et al., 2017).

The present results confirmed the previous report (Stasińska-Jakubas et al., 2023a) on the significant advantage of elicitors applied alone over their mixture, as the use of the latter form in *H. perforatum* even reduced the content of some metabolites. For example, a 4-fold decrease in the hypericin content was recorded on day 5 days after the ChL + Se + SAtreatment. The low effectiveness of the combination may be associated with the lower concentration of each metabolic modulator in their mixture. Nevertheless, given the negative impact of the mixture on the accumulation of some components in the SJW raw material, certain antagonistic effects cannot be ruled out. Literature reports particularly highlight the interrelationships between Se and SA. On the one hand, Se can modulate the functions of the plant hormone system both negatively via disturbances in its proper activity and positively via an increase in the level of endogenous SA and plant resistance to stress. On the other hand, together with other phytohormones, SA is a regulator of the uptake and accumulation of Se in plants, playing an important role in alleviation of Se phytotoxicity (Tamaoki and Maruyama-Nakashita, 2017; Mostofa et al., 2020; Skrypnik et al., 2022). However, a mixture of SA and Se was reported to successfully stimulate plant productivity in some experiments (Norouzi et al., 2018).

The efficiency of in vivo elicitation with single elicitors has also been documented in other studies. However, the results analyzed in reviews of the effect of Se on the accumulation of secondary metabolites in various plant species were not always clear-cut (Skrypnik et al., 2022). In hydroponic cultivation, the presence of Se stimulated the accumulation of some essential oil components (z-citral, citral, caryophyllene, caryophyllene oxide, and geranyl acetate) in M. officinalis (Tavakoli et al., 2020) and increased the content of TPC and rosmarinic acid in O. basilicum (Puccinelli et al., 2020). Even in the case of H. perforatum, the foliar application of Se at a concentration of 8 or 10 mg/L increased the levels of hypericin and hyperforin, respectively, in greenhouse conditions (Nazari et al., 2022). In turn, ChL spraying increased the content of TPC, rosmarinic acid, and anthocyanins in M. officinalis and rosmarinic acid in O. basilicum (Hawrylak-Nowak et al., 2021) or the levels of TPC, TSF, anthocyanins, and some phenolic acids in Plectranthus amboinicus (Stasińska-Jakubas et al., 2023b). In a study conducted by Kandoudi and Németh-Zámboriné (2022), an increase in TPC and antioxidant activity was observed in Origanum majorana, Mentha piperita, and O. basilicum two weeks after SA spraying in field conditions. SA in foliar application also proved to be the most effective elicitor stimulating both the accumulation of phenolic compounds and plant growth in Echinacea purpurea field cultivation (Kuzel et al., 2009). In the field cultivation of Artemisia annua, foliar application of a chitosan was found to be the most effective of the other elicitor treatments (chitosan, nanoselenium, gamma irradiation) stimulating the biosynthesis of artemisinin and essential oil, and thus increasing plant resistance to biotic factors (Sayed and Ahmed, 2022).

According to the assumptions underlying hormesis, which is the basis of the elicitation process, the absence of phytotoxic interactions is one of the key elements of the effective application of elicitors (Godínez-Mendoza et al., 2023). No significant changes were observed in the biomass of H. perforatum in the present experiment. Nevertheless, a decrease in the photosynthetic parameters, especially in the chlorophyll fluorescence, was noted on the last days of the experiment, as the elicitation with Se and SA induced a decline in the Fv/Fm ratio and an increase in the F<sub>0</sub>. In turn, the application of ChL and Se resulted in a decrease in the F<sub>m</sub> value. Concurrently, the content of photosynthetic pigments was slightly reduced, especially in the Se elicitation variant. As the beneficial functions of Se in plants have been demonstrated in many studies (Hawrylak-Nowak, 2022 and references therein), the decrease in photosynthetic pigments and PSII yield was quite unexpected. Perhaps in this case the increased secondary metabolism is at the expense of the primary metabolism, especially as Se was the most effective elicitor. On the other hand, the products of plant specialized metabolism acting as multifunctional integrated components of metabolic networks that are dynamically shaped by environmental pressures, regulate plant defense mechanisms and can also be redirected to primary metabolism once the stress has subsided (Erb and Kliebenstein, 2020). These phenomena are therefore much more complex than previously thought.

Other experiments carried out with the use of elicitors we have tested *in vivo* also indicate their small or negligible impact on plant growth and the photosynthetic apparatus functions in other medicinal plant species, i.e. *M. officinalis, O. basilicum* (Hawrylak-Nowak et al., 2021, 2021a), and *P. amboinicus* (Stasińska-Jakubas et al., 2023b). Despite the absence of visible symptoms of toxicity, even slight fluctuations in the content of photosynthetic pigments may influence the course of photosynthesis, thereby determining plant growth and development as well as the accumulation of secondary metabolites.

Increased production of ROS, especially  $H_2O_2$  and  $O^{2-}$ , is one of the common plant responses to the impact of various stress factors and determinants of the production of secondary metabolites (Hasanuzzaman et al., 2020). Although their role in the cellular response of plants to the activity of elicitors has not been entirely elucidated, they are most often assigned a signaling function. The compounds compared in the experiment are representatives of chemically diverse categories of metabolic modulators, but their common trait is the important role in the maintenance of cellular ROS homeostasis (Skrypnik et al., 2022; Stasińska--Jakubas et al., 2023a). In the present experiment, the accumulation of O<sup>2--</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the *H. perforatum* leaves increased on day 8 after the application of the elicitors separately, in particular ChL and Se. Concurrently, substantial but varied changes in the activity of the analyzed antioxidant enzymes were induced by these substances, probably as a result of the increase in ROS concentrations over the same period. The lowest variation was observed in the APX activity, which increased only shortly after the application of SA and on day 10 after the spraying with ChL + Se + SA. In turn, the combination of the metabolic modulators initially caused a significant decrease in the CAT activity, which was followed by a significant (even several-fold) increase on the last elicitation day. The GPX activity was usually reduced by the elicitor treatment, regardless of the duration of the exposure, with the exception of the elicitor mixture, which induced an increase in the activity of this enzyme on elicitation day 1 and 10. The results of in vitro and in vivo experiments indicate certain relationships between disturbances in cellular redox homeostasis and the activation of plant defense responses induced by elicitors, also in H. perforatum. ROS have been suggested to be involved in the biosynthesis of some components in H. perforatum. As shown by Moon and Mitra (2016), an increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration activates key enzymes of the shikimate pathway, thereby stimulating the biosynthesis of xanthones. Moreover, in in vitro cultivation of H. perforatum shoots with the use of polysaccharides (chitin, pectin, dextran), a positive correlation was found between increased contents of flavonoids and hypericin and increased peroxidase activity (Gadzovska Simic et al., 2014). The present experiment revealed a significant (approximately 50%) increase in the concentration of free proline in the SJW leaves on day 3 after the foliar application of the tested elicitors, regardless of their chemical diversity. Proline plays an important role in the maintenance of cellular homeostasis, including redox balance, and the increased accumulation of proline is one of the strategies of plant adaptation to stress conditions (Ghosh et al., 2022). It has also been suggested that the proline cycle is coupled with the shikimic acid pathway, which may additionally modulate the synthesis of plant secondary metabolism products, especially aromatic compounds (Perassolo et al., 2011). This is in line with the results of the phenolic metabolite accumulation analyses in this study.

### 4. Conclusions

The present experiment reveals the varied response of *H. perforatum* to the foliar application of different types of metabolic modulators depending on the exposure duration. It was shown that the use of

elicitors separately, especially Se and SA, can modify the biosynthesis of secondary metabolites in *H. perforatum*. Changes in the accumulation of secondary metabolites were associated with increased ROS level and fluctuations in the activity of the enzymatic antioxidant system in leaves. At the same time, there was no effect on plant biomass and no visible symptoms of phytotoxicity. Therefore, the foliar Se or SA treatment *in vivo* can be a promising method for producing high-quality *H. perforatum* raw materials with an increased concentration of selected health-promoting compounds. However, given the probable limitation of the penetration of the elicitors through the hydrophobic *H. perforatum* leaf blade, their potential requires further research, perhaps with an alternative method of application.

### 5. Exprimental

### 5.1. Plant material, growth conditions, and experimental design

*H. perforatum* seeds purchased from a local producer (PNOS, Ożarów Mazowiecki) were mixed in a plastic container with a moist substrate in a ratio of 1:10 and subjected to cold stratification at 5 °C for 9 weeks. The seed material was placed on a seed sowing tray and left to germinate in a climate-controlled phytotron under LED lamps with a photon flux density between 170 and 200  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. The experiment was carried out at a 16-h photoperiod, a temperature of 25 °C/22 °C (day/night), and relative humidity maintained at 60–65%. Six weeks after sowing the seeds, SJW plants were transplanted into 0.5-L pots filled with a substrate, with 10 plants in each pot. A substrate prepared by mixing COMPO BIO universal soil (Kronen, pH 6.0) with sand in a ratio of 3:1 was used for the stratification, seed germination, and subsequent cultivation of the plants.

At 12 weeks after sowing, the *H. perforatum* was first sprayed with 10 mL per pot of aqueous solutions of the tested substances. Five experimental combinations (4 pots each) were selected on the basis of available literature data and the results of preliminary research in our laboratory: 0 (distilled water), 100 mg/L ChL (Heppe Medical Chitosan, Germany, deacetylation degree: 80-95%), 10 mg/L Se (Fluka, Switzerland), 150 mg/L SA (PoCH, Poland), and ChL + Se + SA (1:1:1). The solutions for spraying the plants were prepared by dissolution of the substances in distilled water. In view of the restricted penetration of the solutions through the hydrophobic cuticle of SJW leaves, all the combinations were enriched with a 0.02% Tween®20 solution (Sigma-Aldrich, USA). The plants were sprayed using an atomizer twice at threeday intervals according to the varied scheme. Throughout the experiment, the plants were watered regularly with the same volume of tap water.

Plant samples were subjected to biochemical analyses (total polyphenol content, flavonoid concentration, identification and quantification of selected secondary metabolites, radical scavenging activity of the extracts, activity of antioxidant enzymes, free proline content) and histochemical tests (visualization of  $H_2O_2$  and  $O^{2-}$ ). At the end of the experiment (10 days after the first application of the elicitors), some growth and physiological parameters were determined (fresh shoot weight, chlorophyll fluorescence, content of photosynthetic pigments).

### 5.2. Preparation of methanol leaf extracts

Plant material samples were collected on elicitation days 5. 8. and 10. The *H. perforatum* leaves were dried at room temperature in the dark (to prevent degradation of bioactive compounds) and ground into a fine powder in a porcelain mortar. Next, 200 mg of the raw material was extracted in 5 mL of an aqueous solution of 80% methanol (v/v) and kept in an ultrasonic bath for 30 min (the temperature in the ultrasonic bath was kept low by adding ice to the water). After this time, the extracts were centrifuged (5 min, 18,000 rpm, 20 °C).

### 5.3. Determination of selected products of secondary metabolism

### a) Total phenolic compounds (TPC) and total soluble flavonols (TSF)

The concentration of TPC and TSF in the methanolic extracts was determined using a UV-VIS spectrophotometer (Cecil CE 9500, Cecil Instruments, Cambridge, UK). The content of TPC was examined using the Folin-Ciocalteau reagent according to the method of Wang et al. (2011) with slight modifications described previously (Stasińska-Jakubas et al., 2023a). The content of TSF was determined as a complex with aluminum ions following the simplified colorimetric method proposed by Christ-Müller (Polish Pharmacopoeia V, 1999), as described before (Stasińska-Jakubas et al., 2023a).

### b) HPLC analysis

Secondary metabolites were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a VWR Hitachi Elite LaChrom HPLC equipped with a diode array detector and EZChrom Elite software (Merck, Darmstadt, Germany) as described in detail by Dresler et al. (2018). The system used for the analysis of flavonoids and neochlorogenic acid used an RP18 Kinetex (Phenomenex, Torrance, USA) reversed-phase column and the mobile phase being a mixture of acetonitrile with trifluoroacetic acid (solvent A) and water with trifluoroacetic acid (solvent B). The system used for the analysis of hypericin and hyperforin was based on a Kinetex RP18 column (as above), the mobile phase was a mixture of acetonitrile and trifluoroacetic acid-ammonium acetate.

### 5.4. Determination of the oxidative parameters

### a) Antioxidant enzyme activity

Samples were taken from the third and fourth pairs of true leaves of H. perforatum. 250 mg of fresh plant material was homogenized in 5 mL of 0.05 M phosphate buffer with pH = 7.0 to determine the activity of guaiacol peroxidase (GPOX, EC 1.11.1.7) and catalase (CAT, EC 1.11.1.6) or in 5 mL of 0.1 M phosphate buffer at pH = 6.0 containing polyvinylpyrrolidone (PVP), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and sodium ascorbate to determine the activity of ascorbate peroxidase (APOX, EC 1.11.1.11). The homogenates were subjected to centrifugation (10 min, 10,000 rpm, 4  $^{\circ}$ C). The activity of the enzymes was determined spectrophotometrically with the use of a Cecil CE 9500 device. CAT activity was determined by the method of Golan et al. (2013) at a wavelength of 240 nm. GPOX activity was assayed with the method of Małolepsza et al. (1994). Absorbance was measured at a wavelength of 480 nm for 4 min at 1-min intervals. APOX activity was assayed using the technique proposed by Nakano and Asada (1981). Ascorbate oxidation was measured at 290 nm for 5 min at 1-min intervals.

### b) Histochemical detection of reactive oxygen species

Samples of *H. perforatum* material were taken for staining from the true leaves (third and fourth pairs of below the apical meristem) on day 1 and 8 after the first application of the elicitors. The visualization of  $O^{2-}$  and  $H_2O_2$  in the leaves was performed using nitrotetrazolium blue (NBT) and 3,3'-diaminobenzidine (DAB), respectively (Kumar et al., 2014). Detailed test protocol has been described previously (Stasińska-Jakubas et al., 2023a).

### c) Free radical scavenging activity (FRSA)

The FRSA of the *H. perforatum* leaf extracts was determined using the synthetic radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). The analysis and calculations were carried out according to the Molyneux (2004)

### method described in detail previously (Stasińska-Jakubas et al., 2023a).

5.5. Measurement of plant growth, physiological traits and proline accumulation

### a) Fresh weight of shoots

The fresh weight of *H. perforatum* shoots was determined on the day the experiment ended (10 days after the first application of metabolic modulators). The shoots were cut off a few millimeters above the substrate surface and weighed on a laboratory scale. The results are expressed in grams per pot.

### b) Content of photosynthetic pigments

The third pair of leaves below the apical meristem was taken for analysis. The levels of photosynthetic pigments were determined spectrophotometrically on the day of the end of the experiment (10 days after the first spraying of the metabolic modulators) following the Lichtenthaler and Wellburn (1983) method and thorough calculations.

### c) Chlorophyll fluorescence

Selected chlorophyll *a* fluorescence parameters were assayed using a Handy-PEA photofluorimeter (Hansatech Instruments, Japan) as described before (Stasińska-Jakubas et al., 2023a). On days 3 and 10 after the first application of the metabolic modulators, the following parameters were measured:  $F_m$  – maximum fluorescence,  $F_0$  – minimum fluorescence, and  $F_v/F_m$  – ratio of variable fluorescence to maximum fluorescence.

#### d) Free proline accumulation

The accumulation of proline in the *H. perforatum* leaves was determined on elicitation day 4 with the classic method based on the use of acid ninhydrin, glacial acetic acid, and toluene, as described by Bates et al. (1973). Absorbance was measured spectrophotometrically at 520 nm. The proline concentration was read from a standard curve prepared for pure proline and converted to fresh weight.

### 5.6. Statistical analysis

The experiment was established in a completely randomized design. Statistica ver. 13.3 software (TIBCO Software Inc. 2017; USA) was used to process the data provided by the laboratory analyses. The concentrations of selected secondary metabolites and FRSA were subjected to a two-way ANOVA with treatment type and the duration of elicitation as the main factors. The results of the statistical analysis of these data show the main effects and the interaction effects of these two factors. The data on the FW, photosynthetic pigments levels, chlorophyll fluorescence, free proline accumulation, and antioxidant enzyme activity were analyzed by one-way ANOVA to assess only the responses of *H. perforatum* to the application of the metabolic modulators. The significance of the differences was evaluated with the Tukey test at p < 0.05.

### CRediT authorship contribution statement

Maria Stasińska-Jakubas: Writing – original draft, Visualization, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. Sławomir Dresler: Writing – review & editing, Methodology, Investigation, Conceptualization. Maciej Strzemski: Writing – review & editing, Visualization, Validation, Methodology, Investigation. Katarzyna Rubinowska: Methodology, Investigation. Barbara Hawrylak-Nowak: Writing – original draft, Supervision, Project administration, Methodology, Investigation. Conceptualization.

### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### Data availability

Data will be made available on request.

### Acknowledgements

This research was supported by project no. SD/73/NB/2023 provided by University of Life Sciences in Lublin, Poland.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2024.114231.

#### References

- Agapouda, A., Bookera, A., Tivadar Kiss, T.D., Hohmannc, J., Heinricha, M., Csupor, D., 2019. Quality control of *Hypericum perforatum* L. analytical challenges and recent progress. J. Pharm. Pharmacol. 71 (1), 15–37. https://doi.org/10.1111/jphp.12711.
- Alvarez, I.Z., Ahmed, M., McSorley, G., Dunlop, M., Lucas, I., Hu, Y., 2024. An overview of biostimulant activity and plant responses under abiotic and biotic stress conditions. Syst. Microbiol. Biomanufacturing 4, 39–55. https://doi.org/10.1007/ s43393-023-00182-3.
- Badiali, C., Petruccelli, V., Brasili, E., Pasqua, G., 2023. Xanthones: biosynthesis and trafficking in plants, fungi and lichens. Plants 12, 694. https://doi.org/10.3390/ plants12040694.
- Barnes, J., Arnason, J.T., Roufogalis, B.D., 2018. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): botanical, chemical, pharmacological and clinical advances. J. Pharm. Pharmacol. 71 (1), 1–3. https://doi.org/10.1111/jphp.13053.
- Bates, L., Waldren, R., Teare, J., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil 39, 205–207.
- Brasili, E., Praticò, G., Marini, F., Valletta, A., Capuani, G., Sciubba, F., Pasqua, G., 2014. A non-targeted metabolomics approach to evaluate the effects of biomass growth and chitosan elicitation on primary and secondary metabolism of *Hypericum perforatum* in vitro roots. Metabolomics 10 (6), 1186–1196. https://doi.org/ 10.1007/s11306-014-0660-z.
- Bruni, R., Sacchetti, G., 2009. Factors affecting polyphenol biosynthesis in wild and field grown St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. Hypericaceae/Guttiferae). Molecules 14, 682–725. https://doi.org/10.3390/molecules14020682.
- Carrubba, A., Lazzara, S., Giovino, A., Ruberto, G., Napol, E., 2021. Content variability of bioactive secondary metabolites in *Hypericum perforatum* L. Phytochem. Lett. 46, 71–78. https://doi.org/10.1016/j.phytol.2021.09.011.
- Crockett, S.L., Robson, N.K.B., 2011. Taxonomy and chemotaxonomy of the genus Hypericum. Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol. 5, 1–13.
- Dresler, S., Kovácik, J., Strzemski, M., Sowa, I., Wójciak-Kosior, M., 2018. Methodological aspects of biologically active compounds quantification in the genus Hypericum. J. Pharm. Biomed. Anal. 155 (5), 82–90. https://doi.org/10.1016/j. ipba.2018.03.048.
- Erb, M., Kliebenstein, D.J., 2020. Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: the blurred functional trichotomy. Plant Physiol. 184 (1), 39–52. https://doi.org/10.1104/pp.20.00433.
- Gadzovska Simic, S., Tusevski, O., Maury, S., Delaunay, A., Joseph, C., Hagège, D., 2014. Effects of polysaccharide elicitors on secondary metabolite production and antioxidant response in *Hypericum perforatum* L. shoot cultures. Sci. World J. 2014, 609649 https://doi.org/10.1155/2014/609649.
- Gadzovska, S., Maury, S., Delaunay, A., Spasenoski, M., Hagège, D., Courtois, D., Joseph, C., 2013. The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus, and cell suspension cultures on production of naphtodianthrones and phenylpropanoids in *Hypericum perforatum* L. Plant Cell Tissue Organ Cult. 113 (1), 25–39. https://doi. org/10.1007/s11240-012-0248-0.
- Gaid, M., Biedermann, E., Füller, J., Haas, P., Behrends, S., Krull, R., Beerhues, L., 2018. Biotechnological production of hyperforin for pharmaceutical formulation. Eur. J. Pharm. Biopharm. 126, 10–26. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.03.024.
- Ghosh, U.K., Islam, M.N., Siddiqui, M.N., Cao, X., Khan, M.A.R., 2022. Proline, a multifaceted signaling molecule in plant responses to abiotic stress: understanding the physiological mechanisms. Plant Biol. 24 (2), 227–239. https://doi.org/ 10.1111/plb.13363.
- Godínez-Mendoza, P.L., Rico-Chávez, A.K., Ferrusquía-Jimenez, N.I., Carbajal-Valenzuela, I.A., Villagómez-Aranda, A.L., Torres-Pacheco, I., Guevara-González, R. G., 2023. Plant hormesis: revising of the concepts of biostimulation, elicitation and their application in a sustainable agricultural production. Sci. Total Environ. 894, 164883 https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164883.

#### M. Stasińska-Jakubas et al.

Golan, K., Rubinowska, K., Górska-Drabik, E., 2013. Physiological and biochemical responses of fern *Nephrolepis biserrata* (Sw.) Schott. to *Coccus hesperidum* L. infestation. Acta Biol. Crac. Bot. 55 (1), 93–98. https://doi.org/10.2478/abcsb2013-0007.

- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.H.M.B., Parvin, K., Bhuiyan, T.F., Anee, T.I., Nahar, K., Hossen, M.S., Zulfiqar, F., Alam, M.M., Fujita, M., 2020. Regulation of ROS metabolism in plants under environmental stress: a review of recent experimental evidence. Int. J. Mol. Sci. 21 (22), 8695. https://doi.org/10.3390/ijms21228695.
- Hawrylak-Nowak, B., 2022. Biological activity of selenium in plants: physiological and biochemical mechanisms of phytotoxicity and tolerance. In: Hossain, M.A., Ahammed, G.J., Kolbert, Z., El-Ramady, H., Islam, T., Schiavon, M. (Eds.), Selenium and Nano-Selenium in Environmental Stress Management and Crop Quality Improvement. Springer, Cham, pp. 341–363. https://doi.org/10.1007/978-3-031-07063-1\_17.

Hawrylak-Nowak, B., Dresler, S., Rubinowska, K., Matraszek-Gawron, R., 2021. Eliciting effect of foliar application of chitosan lactate on the phytochemical properties of *Ocimum basilicum* L. and *Melissa officinalis* L. Food Chem. 342, 128358. htt ps://doi:10.1016/j.foodchem.2020.128358.

Ion, V., Ielciu, I., Cârje, A.G., Muntean, D.L., Crisan, G., Paltinean, R., 2022. Hypericum spp. – an overview of the extraction methods and analysis of compounds. Separations 9, 17. https://doi.org/10.3390/separations9010017.

Kandoudi, W., Németh-Zámboriné, É., 2022. Stimulating secondary compound accumulation by elicitation: is it a realistic tool in medicinal plants in vivo? Phytochemistry Rev. 21, 2007–2025. https://doi.org/10.1007/s11101-022-09822-2

Karppinen, K., Hokkanen, J., Mattila, S., Neubauer, P., Hohtola, A., 2008. Octaketideproducing type III polyketide synthase from *Hypericum perforatum* is expressed in dark glands accumulating hypericins. FEBS J. 275 (17), 4329–4342. https://doi.org/ 10.1111/j.1742-4658.2008.06576.x.

Kirakosyan, A., Sirvent, T.M., Gibson, D.M., Kaufman, P.B., 2004. The production of hypericins and hyperforin by *in vitro* cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). Biotechnol. Appl. Biochem. 39 (1), 71. https://doi.org/10.1042/ ba20030144.

Kumar, D., Yusuf, M.A., Singh, P., Sardar, M., Sarin, N.B., 2014. Histochemical detection of superoxide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in *Brassica juncea* seedlings. Bio-Protocol 4 (8), 1–4. http://www.bio-protocol.org/e1108.

Kuzel, S., Vydra, J., Triska, J., Vrchotova, N., Hruby, M., Cigler, P., 2009. Elicitation of pharmacologically active substances in an intact medical plant. J. Agric. Food Chem. 57 (17), 7907–7911. https://doi.org/10.1021/jf9011246.

Kwiecień, I., Nicosia, N., Ekiert, H.M., 2021. Cultivation of *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) and biotechnological approaches for improvement of plant raw material quality. In: Ekiert, H.M., Ramawat, K.G., Arora, J. (Eds.), Medicinal Plants: Domestication, Biotechnology and Regional Importance. Springer, Cham, pp. 253–291. https://doi.org/10.1007/978-3-030-74779-4\_8.

Li, Q., Li, Y., Zhu, L., Xing, B., Chen, B., 2017. Dependence of plant uptake and diffusion of polycyclic aromatic hydrocarbons on the leaf surface morphology and microstructures of cuticular waxes. Sci. Rep. 7, 46235 https://doi.org/10.1038/ srep46235.

Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M., Wu, H., 2020. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. Plant Physiol. Biochem. 148, 80–89. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006.

Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R., 1983. Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. Biochem. Soc. Trans. 603, 591–592.

- Liu, W., Feng, Y., Yu, S., Fan, Z., Li, X., Li, J., Yin, H., 2021. The flavonoid biosynthesis network in plants. Int. J. Mol. Sci. 22 (23), 12824 https://doi.org/10.3390/ ijms222312824.
- Matolepsza, A., Urbanek, H., Polit, J., 1994. Some biochemical reactions of strawberry plants to infection with *Botrytis cinerea* and salicylic acid treatment. Acta Agrobot. 47 (2), 73–81. https://doi.org/10.5586/aa.1994.014.

Mathioudaki, A., Berzesta, A., Kypriotakis, Z., Skaltsa, H., Heilmann, J., 2018. Phenolic metabolites from *Hypericum kelleri* Bald., an endemic species of Crete (Greece). Phytochemistry 146, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.11.009.

Molyneux, P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J. Sci. Technol. 26, 211–219.

Moon, U.R., Mitra, A., 2016. A mechanistic insight into hydrogen peroxide-mediated elicitation of bioactive xanthones in *Hoppea fastigiata* shoot cultures. Planta 244 (1), 259–274. https://doi.org/10.1007/s00425-016-2506-6.

Mostofa, M.G., Rahman, M.M., Siddiqui, M.N., Fujita, M., Tran, L.S.P., 2020. Salicylic acid antagonizes selenium phytotoxicity in rice: selenium homeostasis, oxidative stress metabolism and methylglyoxal detoxification. J. Hazard Mater. 394, 122572 https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122572.

Mullaicharam, A., Halligudi, N., 2018. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. Int. J. Res. Phytochem. Pharmacol. 1 (1), 5–11. https://doi.org/10.33974/ijrpps.v1i1.7.

Murthy, H.N., Kim, Y.S., Park, S.Y., Paek, K.Y., 2014. Hypericins: biotechnological production from cell and organ cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98 (22), 9187–9198. https://doi.org/10.1007/s00253-014-6119-3.

- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 22, 867–880. https://doi.org/ 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232.
- Nazari, M.R., Abdossi, V., Hargalani, F.Z., Larijani, K., 2022. Antioxidant potential and essential oil properties of *Hypericum perforatum* L. assessed by application of selenite and nano-selenium. Sci. Rep. 12, 6156. https://doi.org/10.1038/s41598-022-10109-v.

Nobakht, S.Z., Akaberi, M., Mohammadpour, A.H., Tafazoli Moghadam, A., Emami, S.A., 2022. *Hypericum perforatum*: traditional uses, clinical trials, and drug interactions. Iran. J. Basic Med. Sci. 25 (9), 1045–1058. https://doi.org/10.22038/ IJBMS.2022.65112.14338.

Norouzi, M., Sajedi, N.A., Gomarian, M., 2018. Effects of salicylic acid and selenium at growth stages on yield and yield components of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under dryland farming condition. Environ. Stresses Crop Sci. 11 (3), 579–589. https://doi. org/10.22077/escs.2017.796.1156.

Perassolo, M., Quevedo, C.V., Giulietti, A.M., Rodríguez Talou, J., 2011. Stimulation of the proline cycle and anthraquinone accumulation in *Rubia tinctorum* cell suspension cultures in the presence of glutamate and two proline analogs. Plant Cell Tissue Organ Cult. 106, 153–159.

Perrone, R., Rosa, P., Castro, O., Colombo, P., 2013. Leaf and stem anatomy in eight Hypericum species (Clusiaceae). Acta Bot. Croat. 72 (2), 269–286. https://doi.org/ 10.2478/botcro-2013-0008.

Polish Pharmacopoeia V, 1999. Polskie Wydawnictwo Farmaceutyczne. Warsaw, pp. 56–57 (in Polish).

Pradeep, M., Franklin, G., 2022. Understanding the hypericin biosynthesis via reversible inhibition of dark gland development in *Hypericum perforatum* L. Ind. Crops Prod. 182, 114876 https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114876.

Puccinelli, M., Pezzarossa, B., Rosellini, I., Malorgio, F., 2020. Selenium enrichment enhances the quality and shelf life of basil leaves. Plants 9 (6), 801. https://doi.org/ 10.3390/plants9060801.

Rizzo, P., Altschmied, L., Ravindran, B.M., Rutten, T., D'Auria, J.C., 2020. The biochemical and genetic basis for the biosynthesis of bioactive compounds in *Hypericum perforatum* L., one of the largest medicinal crops in Europe. Genes 11 (10), 1210. https://doi.org/10.3390/genes11101210.

Sayed, T.E., Ahmed, E.S.S., 2022. Improving artemisinin and essential oil production from Artemisia plant through *in vivo* elicitation with gamma irradiation nanoselenium and chitosan coupled with bio-organic fertilizers. Front. Energy Res. 10, 996253 https://doi.org/10.3389/fenrg.2022.996253.

Shakya, P., Marslin, G., Karthik, S., Beerhuesd, L., Franklin, G., 2017. Elicitation as a tool to improve the profiles of high-value secondary metabolites and pharmacological properties of *Hypericum perforatum*. J. Pharm. Pharmacol. 71 (1), 70–82. https://doi. org/10.1111/jphp.12743.

Shasmita, B.S., Mishra, P., Mishra, P., Samal, M., Mohapatra, D., Monalisa, K., Kumar Naik, S., 2023. Recent advances in tissue culture and secondary metabolite production in *Hypericum perforatum* L. Plant Cell Tissue Organ Cult. 154, 13–28. https://doi.org/10.1007/s11240-023-02525-3.

Singh, P., Arif, Y., Bajguz, A., Hayat, S., 2021. The role of quercetin in plants. Plant Physiol. Biochem. 166, 10–19. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.05.023.

Sirvent, T., Gibson, D., 2002. Induction of hypericins and hyperform in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. Physiol. Mol. Plant Pathol. 60, 311–320. https://doi.org/10.1006/pmpp.2002.0410.

Skrypnik, L., Feduraev, P., Golovin, A., Maslennikov, P., Styran, T., Antipina, M., Riabova, A., Katserov, D., 2022. The integral boosting effect of selenium on the secondary metabolism of higher plants. Plants 11, 3432. https://doi.org/10.3390/ plants11243432.

Stasińska-Jakubas, M., Hawrylak-Nowak, B., Dresler, S., Wójciak, M., Rubinowska, K., 2023a. Application of chitosan lactate, selenite, and salicylic acid as an approach to induce biological responses and enhance secondary metabolism in *Melissa officinalis* L. Ind. Crops Prod. 205, 117571 https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117571.

Stasińska-Jakubas, M., Hawrylak-Nowak, B., Wójciak, M., Dresler, S., 2023b. Comparative effects of two forms of chitosan on selected phytochemical properties of *Plectranthus amboincus* (Lour.). Molecules 28, 376. https://doi.org/10.3390/ molecules28010376.

Tamaoki, M., Maruyama-Nakashita, A., 2017. Molecular mechanisms of selenium responses and resistance in plants. In: Pilon-Smits, E., Winkel, L., Lin, Z.Q. (Eds.), Selenium in Plants. Springer, Cham, pp. 35–51. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56249-0\_3.

Tavakoli, S., Enteshari, S., Yousefifard, M., 2020. Investigation of the effect of selenium on growth, antioxidant capacity and secondary metabolites in *Melissa officinalis*. Iran. J. Plant Physiol. 10 (2), 3125–3134.

Wang, C., Lu, J., Zhang, S., Wang, P., Hou, J., Qian, J., 2011. Effects of Pb stress on nutrient uptake and secondary metabolism in submerged macrophyte Vallisneria natans. Ecotoxicol. Environ. Saf. 74 (5), 1297–1303.

- Wang, J., Qian, J., Yao, L., Lu, Y., 2015. Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. Bioresour. Bioprocess. 2, 5. https://doi.org/10.1186/s40643-014-0033-5.
- Zirak, N., Shafiee, M., Soltani, G., Mirzaei, M., Sahebkar, A., 2019. Hypericum perforatum in the treatment of psychiatric and neurodegenerative disorders: current evidence and potential mechanisms of action. J. Cell. Physiol. 234 (6), 8496–8508. https:// doi.org/10.1002/jcp.27781.

# SUPPLEMENTARY MATERIALS

Differentiated response of *Hypericum perforatum* to foliar application of selected metabolic modulators: elicitation potential of chitosan, selenium, and salicylic acid mediated by redox imbalance

Maria Stasińska-Jakubas<sup>1</sup>, Sławomir Dresler<sup>2,3</sup>, Maciej Strzemski<sup>3</sup>, Katarzyna Rubinowska<sup>1</sup> Barbara Hawrylak-Nowak<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Botany and Plant Physiology, Faculty of Environmental Biology, University

of Life Sciences in Lublin, Akademicka 15, 20-950 Lublin, Poland

<sup>2</sup>Department of Plant Physiology and Biophysics, Institute of Biological Science, Maria Curie-

Skłodowska University, 20-033 Lublin, Poland

<sup>3</sup> Department of Analytical Chemistry, Medical University of Lublin, Chodźki 4a, 20-093

Lublin, Poland

\*Corresponding author: <u>barbara.nowak@up.lublin.pl</u>, +48 81 445 6096

# Table of contents:

Supplementary Figure S1. Effect of foliar spray with ChL - chitosan, Se - selenium, SA - salicylic	2
acid, and the ChL+Se+SA mixture on free radical scavenging activity (FRSA) in extracts from H.	
perforatum leaves on the 5th, 8th, and 10th day of elicitation.	2
Supplementary Figure S2. Effect of foliar spray with ChL – chitosan, Se – selenite, SA – salicylic	
acid, and the ChL+Se+SA mixture on selected parameters of chlorophyll a fluorescence in the H.	
perforatum leaves on the 4th (A) and 10th (B) day of elicitation.	. 3



**Supplementary Figure S1.** Effect of foliar spray with ChL – chitosan, Se – selenium, SA – salicylic acid, and the ChL+Se+SA mixture on free radical scavenging activity (FRSA) in extracts from *H. perforatum* leaves on the 5th, 8th, and 10th day of elicitation. Means ( $\pm$  SD, n = 8) with different letters differ statistically significantly (p < 0.05)



**Supplementary Figure S2.** Effect of foliar spray with ChL – chitosan, Se – selenite, SA – salicylic acid, and the ChL+Se+SA mixture on selected parameters of chlorophyll a fluorescence in the *H. perforatum* leaves on the 4th (A) and 10th (B) day of elicitation. Means ( $\pm$  SD, n = 10) for individual parameters marked with different letters differ statistically significantly (p < 0.05)

# Effect of soil-applied metabolic modulators on the accumulation of specialized metabolites in *Chelidonium majus* L.

Maria Stasińska-Jakubas <sup>1</sup>, Sławomir Dresler <sup>2,3</sup>, Maciej Strzemski <sup>2</sup>, Katarzyna Rubinowska <sup>1</sup>, Barbara Hawrylak-Nowak <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Botany and Plant Physiology, Faculty of Environmental Biology, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 15, 20-950 Lublin, Poland;

<sup>2</sup> Department of Analytical Chemistry, Medical University of Lublin, Chodźki 4a, 20-093 Lublin, Poland

<sup>3</sup> Department of Plant Physiology and Biophysics, Institute of Biological Science, Maria Curie-Skłodowska University, 20-033, Lublin, Poland

\* Correspondence: <u>barbara.nowak@up.lublin.pl</u>

Abstract: Various metabolic modulators have been widely used in recent years to increase the accumulation of desired secondary metabolites in medicinal plants, although most studies to date have focused on in vitro systems. Although simpler and cheaper, their potential application in vivo is still limited. Therefore, the aim of this study was to compare the effect of three chemically different elicitors (150 mg/L chitosan lactate - ChL; 10 mg/L selenium as selenite - Se; 100 mg/L salicylic acid - SA) applied to the soil substrate on some aspects of the secondary metabolism and physiological responses of Chelidonium majus L. Using HPLC-DAD, six isoquinoline alkaloids were identified and quantified in shoot extracts. The strongest stimulatory effect on the accumulation of protopine, berberine, and allocryptopine was observed in the Se and SA treatment, whereas ChL was less effective. In turn, the dominant alkaloids (coptisine and chelidonine) remained unaffected. There was also an increase in total phenolic compounds, but not in soluble flavonols. The elicitor treatments caused an increase in the antioxidant activity of the plant extracts obtained. Regardless of the metabolic modulator type, the strongest effect was generally observed on days 7 and 10 after application. No visual signs of toxicity and no effect on shoot biomass were found, although some elicitor-induced changes in the oxidative status (increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and enhanced lipid peroxidation) and free proline level in leaves were observed. We suggest that Se or SA can be applied to C. majus grown in a controlled pot culture to obtain high quality raw material and extracts with increased content of valuable specialized metabolites and enhanced antioxidant capacity.

**Keywords**: elicitation; secondary metabolites; isoquinoline alkaloids; greater celandine; phytochemistry

# 1. Introduction

Medicinal plants have been playing a key role in human life since ancient times. Initially, they were used to improve general well-being, but they are currently applied in medicine and modern pharmacotherapy both directly as medicinal agents and indirectly as basic raw materials for the production of medications [1, 2]. The therapeutic value and suitability of medicinal plants are mainly associated with their content of secondary metabolites, which are characterized by a wide spectrum of pharmacological activity, e.g. from antioxidant and antimicrobial to anti-inflammatory and anticancer effects. Moreover, as a rich source of such pro-health substances as phenols, flavonoids, alkaloids, glycosides, and aromatic compounds, they are widely used not only in the pharmaceutical industry but also in the manufacture of cosmetic and food. Therefore, the content of secondary metabolites in plant raw materials is one of the most important indicators in the assessment of their quality [2-5].

In addition to their extremely useful biological activity for humans, secondary metabolites are an important element of complex plant responses to the impact of abiotic and biotic environmental factors and are most often synthesized by plants to serve defensive, signaling, or adaptive functions. This leads to changes in the overall phytochemical profile of plants and properties of plant raw material [6-8]. The growing number of literature reports on the impact of environmental factors on plant metabolism indicates the validity of use of moderate and controlled stimuli in the elicitation process, which is one of the methods for optimization of the production of phytochemicals [5, 7, 9]. This strategy is considered one of the most effective approaches to the manipulation of plant metabolites. Although elicitation is more frequently studied and used in in vitro plant cultivation, the in vivo application of this method may be simpler and more economical, especially in controlled conditions where there is no impact of interfering geographical or climatic factors. The *in vivo* elicitation most often entails foliar or soil application of an elicitor solution or conditioning of seeds [10].

The greater celandine (*Chelidonium majus* L.) from the family Papaveraceae is a perennial plant with a branched habit and a height up to 100 cm. This synanthropic species occurs in all regions of Europe and Asia. Its characteristic hollow stem bears light green pinnate leaves with lobed or serrated margins. The petiolate basal leaves with large blades are gathered in a rosette; the stem has small sessile leaves. *C. majus* blooms from April to October; it produces actinomorphic, umbellate, yellow inflorescences. Its fruit is an elongated capsule with shiny, ovoid, dark brownish-black seeds equipped with elaiosomes. All organs in this species contain large amounts of yellow-orange milky sap (latex), which is commonly used in folk medicine to treat warts, corns, eczema, fungal infections, and other skin diseases [11-14].

The pharmacopoeial raw material provided by the plants is the flowering leafy tops of celandine shoots (Chelidonii herba) containing no less than 0.6% of total alkaloids expressed as chelidonine equivalents. Another raw material used in medicine is the root (Chelidonii radix), which contains up to 3% of alkaloids. Over 30 compounds have been identified in the group of celandine alkaloids, with chelidonine, chelerythrine, sanguinarine, berberine, and coptisine as the dominant compounds. In addition to isoquinoline alkaloids, the roots of the plant contain saponins, flavonoids, tannins, and organic acids. In turn, celandine herb contains mainly 0.2%-0.6% of alkaloids and flavonoids. Due to their antispasmodic, antiulcer, and choleretic effects, celandine raw materials and their extracts are most often used as ingredients in preparations for treatment of gastrointestinal and biliary tract diseases. These materials also exhibit anti-inflammatory, antibacterial, raw antifungal, antiviral, immunomodulatory, and analgesic activity. A slight sedative effect and amelioration of anaphylactic shock have been reported as well [11-13, 15]. With their content of isoquinoline alkaloids, C. majus extracts have anticancer potential, as they have been reported to exert strong antioxidant, antiproliferative, proapoptotic, and cytotoxic effects on cancer cell lines [16-17].

In this study, we verified a hypothesis that the induction of physiological response of *C. majus* plants with chemical elicitors results in changes in plant secondary metabolism and redox balance. The effectiveness of chemically diverse compounds in the elicitation of selected specialized metabolites in controlled pot cultivation conditions was analyzed. The effects of soil application of aqueous solutions of chitosan lactate (ChL), sodium selenite (Se), and salicylic acid (SA) were compared depending on the exposure time (4, 7, and 10 days). This study presents a novel soil-based elicitation protocol targeting isoquinoline alkaloids and phenolic compounds in greater celandine under controlled in vivo conditions. To our knowledge, this specific approach has not been previously reported and addresses the limitations of foliar application in this species due to leaf hydrophobicity. This method may contribute to a controlled increase in the level of pro-health bioactive substances, modifying the effects of celandine raw materials.

# 2. Results

# 2.1. Selected secondary metabolites in *C. majus* shoots grown under exposure to different elicitors

Alkaloids are the most abundant specialized metabolites in the herb of *C. majus*, confirming their dominant role in the phytochemical profile of this species. Six isoquinoline alkaloids were identified and quantified in the extracts from the *C. majus* herb, i.e. coptisine, chelidonine, protopine, berberine, allocryptopine, chelerythrine (Fig. S1). The content of these components in the analyzed extracts depended on the elicitor type and the duration of the experiment (Fig. 1 A-F). Coptisine was the dominant alkaloid (Fig. 1 A), with its content in

the extracts from the control plants ranging from 9.08 to 12.86 mg g<sup>-1</sup> DW on the experiment days. However, the application of the elicitors to the soil did not induce significant changes in the concentration of this compound. The next most abundant compound in the analyzed extracts was chelidonine, whose concentration changed only slightly after the treatment with the elicitors (Fig. 1 B). An exception was SA, which produced a 38% increase in the chelidonine content in the analyzed extracts on day 10 after the application, compared to the control plants. In contrast, the other elicitors were not effective in stimulating the biosynthesis of this compound.

The other alkaloids were present in the analyzed extracts in substantially lower concentrations (< 1 mg g<sup>-1</sup> DW), but their content fluctuated to a greater extent upon the exposure to the elicitors applied (Fig. 1 C-F). The accumulation of protopine in the aboveground parts of C. majus was most effectively stimulated by SA on day 7 of the experiment; in comparison with the corresponding control, the content of this alkaloid increased almost 3-fold (Fig. 1 C). Concurrently, the Se solution exhibited slightly lower elicitation activity, as its use resulted in a 2-fold increase in the protopine concentration compared to the control plants. In the case of berberine, significant changes were found on days 4 and 7 after the application of the elicitors (Fig. 1 D). Again, the highest elicitation activity was exhibited by SA, as the content of berberine increased over 2-fold on day 4 after the application of this elicitor. The other elicitors stimulated the accumulation of this alkaloid as well, although to a lesser extent. In comparison with the control, the concentration of berberine in the analyzed extracts increased by 108% and 57% in the ChL and Se treatments, respectively. The soil application of the elicitors also resulted in significant changes in the content of allocryptopine in the C. majus herb extracts (Fig. 1 E). The highest concentration of this alkaloid (0.39 mg g<sup>-1</sup> DW) and its greatest stimulation relative to the corresponding control were observed on day 7 after the application of SA (an 85% increase). The use of ChL stimulated the allocryptopine content in the analyzed extracts only on day 4 of the experiment, which increased by 86%, compared to the control. On day 10 after the application of Se and SA, the content of allocryptopine increased by 59% and 55%, respectively, in comparison with the control, but the statistical analysis did not confirm that the differences were significant. The elicitors had no significant effect on the accumulation of chelerythrine, whose level was the lowest among the quantified alkaloids (Fig. 1 F).



**Figure 1.** Effect of soil application of ChL – chitosan lactate, Se – sodium selenite, and SA – salicylic acid on the concentration of selected alkaloids – coptisine (a), chelidonine (b), protopine (c) berberine (d), allocryptopine (e), and chelerythrine (f) in the *C. majus* shoots on the 4th, 7th, and 10th day of elicitation. Control plants were treated with distilled water. Means ( $\pm$  standard deviation; n = 3) with different letters differ statistically significantly (p < 0.05, NIR-Fisher test).

The concentration of total phenolic compounds (TPC) in the analyzed extracts from the *C. majus* shoots changed depending on the time after the application of the elicitors and the type of the substance used (Fig. 2 A). The highest accumulation of these compounds was recorded on day 4 of the experiment in the Se application variant. The TPC concentration in this treatment was 6.99 mg g<sup>-1</sup>, which was 79% higher than in the corresponding control plants. However, the highest elicitation activity was observed on day 10 after the application of SA, which produced an over 2-fold increase in the TPC content compared to the control. In turn, on day 7 of the experiment, all the elicitors exhibited a similar level of efficiency, as they caused an approximately 2-fold increase in TPC, compared to the control. The ChL solution also stimulated the TPC accumulation on day 10, and the concentration of these compounds was 124% higher than in the control plants.

The total soluble flavonols (TSF) content in the analyzed plant extracts was similar in each experimental series, and the soil application of the elicitors did not exert a significant effect on the accumulation of these compounds (Fig. 2 B).



**Figure 2.** Effect of soil application of ChL – chitosan lactate, Se – sodium selenite, and SA – salicylic acid on the concentration of TPC – total phenolic compounds (a) and TSF – total soluble flavonols (b) in the *C. majus* shoots on the 4th, 7th, and 10th day of the elicitor exposure. Control plants were treated with distilled water. Means ( $\pm$  SD; n = 3) of individual parameters marked with different letters differ statistically significantly (p < 0.05, NIR-Fisher test).

## 2.2. Oxidative status of C. majus plants treated with different elicitors

Selected parameters of the plant oxidative status were determined on days 2 and 10 to assess early and late responses of *C. majus* plants to the applied elicitors.

The activity of selected antioxidant enzymes (CAT, GPOX, APOX) in the *C. majus* leaves was determined shortly after the exposure of the plants to the elicitors (day 2) and on the day of termination of the experiment (day 10) (Fig. 3 a, b). In general, the CAT activity was similar on both days in all the experimental series. A significant increase in the activity of this enzyme was noted only on day 10 after the application of Se (2-fold higher than in the corresponding control). The GPOX activity determined on day 2 of the experiment was very low (0.02-0.33 U mg<sup>-1</sup>) but increased 15-fold in the soil Se treatment, compared to the control plants. In turn, the activity of this enzyme on the experiment termination day increased

significantly (1.07-2.29 U mg<sup>-1</sup>). In this case, however, the use of the elicitors caused a significant decrease in the GPOX activity, especially in the ChL and Se treatment variants (reduction by half). No APOX activity was detected in the analyzed plant material (data not shown).



**Figure 3**. Effect of soil application of ChL – chitosan lactate, Se – sodium selenite, and SA – salicylic acid on the activity of catalase – CAT (a) and guaiacol peroxidase – GPOX (b) in the *C. majus* leaves on the 2nd and 10th day of elicitation. Control plants were treated with distilled water. Means ( $\pm$  SD; n = 4) with different letters differ statistically significantly (p < 0.05, NIR-Fisher test).

The level of  $H_2O_2$  accumulation in the *C. majus* leaves was determined shortly after the application of the elicitors (day 2) and on the day of termination of the experiment (day 10) (Fig. 4 a). The  $H_2O_2$  level in the treatments varied depending on the duration of the plant exposure to the action of the elicitors. Initially, a 40% and 32% increase in the  $H^2O_2$  concentration was noted in the Se and SA treatments, respectively, compared to the control plants. After 10 days, each of the three elicitors significantly increased the  $H_2O_2$  accumulation, i.e. its concentration increased over 2-fold in the ChL and SA variants and 2.5-fold in the Se treatment, compared to the control.

The analyzed elicitors had a similar effect on the level of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) immediately after their application. On elicitation day 2, the concentration of TBARS increased by approx. 31% in the ChL and Se treatments and by 24%

in the SA variant (Fig. 6). However, on day 10 after the application of the elicitors, the SA treatment resulted in a 40% decrease in TBARS, while the other elicitors had no significant effect on the level of lipid peroxidation in the *C. majus* plants.



**Figure 4.** Effect of soil application of ChL – chitosan lactate, Se – sodium selenite, and SA – salicylic acid on the concentration of  $H_2O_2$  (a) and of TBARS (b) in the *C. majus* leaves on the 2nd and 10th day of the elicitor exposure. Control plants were treated with distilled water. Means ( $\pm$  SD; n = 4) of individual parameters marked with different letters differ statistically significantly (p < 0.05, NIR-Fisher test).

The analyzed methanol extracts of the *C. majus* herb exhibited a relatively low ability to reduce the DPPH radical, which varied depending on the elicitor used and the duration of the experiment (Fig. 5). The highest antioxidant activity was observed on day 7 of the experiment (approx. 27-35%); at that time, its similar levels were determined regardless of the experimental series. At the other experiment time points, the antioxidant activity increased under the influence of the elicitors. The greatest changes relative to the control plants were noted on day 10 after the application of SA (an almost 3-fold increase in the antioxidant activity). In the ChL or Se treatments, the antioxidant activity was stimulated less efficiently but still significantly, as the application of these elicitors resulted in an approximately 2-fold increase in the ability of the extracts to reduce DPPH, compared to the control.



**Figure 5.** Effect of soil application of ChL – chitosan lactate, Se – sodium selenite, and SA – salicylic acid on the free radical scavenging activity of the *C. majus* shoot extracts on the 4th, 7th, and 10th day of elicitation. Control plants were treated with distilled water. Means ( $\pm$  SD; n = 3) with different letters differ statistically significantly (p < 0.05, NIR-Fisher test).

The concentration of free proline in the *C. majus* leaves changed depending on the elicitation day and the type of the compound applied (Fig. 6). Not all of the elicitors used caused changes in the accumulation of this amino acid. On day 2 after the application of Se, the free proline concentration increased 4-fold, compared to the control plants. In turn, on day 10 after the application of SA, the content of free proline increased by 91%. No significant effect of ChL on the level of this amino acid was observed at the analyzed time points.



**Figure 6.** Effect of soil application of ChL – chitosan lactate, Se – sodium selenite, and SA – salicylic acid on free proline accumulation in the *C. majus* leaves on the 2nd and 10th day of the elicitor exposure. Control plants were treated with distilled water. Means ( $\pm$  SD; n = 4) of individual parameters marked with different letters differ statistically significantly (p < 0.05, NIR-Fisher test).

# 2.3. Selected biometric and physiological parameters of *C. majus* treated with different elicitors

The application of the elicitors generally did not have a significant effect on the biomass of the *C. majus* shoots (Fig. S2) or on the chlorophyll fluorescence parameters (Fig. S3 a, b). Initially, on elicitation day 4, there were no statistically significant changes in the content of

photosynthetic pigments in the leaves (Fig. S4 a). However, on day 10 after the application of the elicitors, the content of chlorophyll a and b was reduced by Se, as their levels decreased by 32% and 26%, respectively, in comparison with the control (Fig. S3 b). In turn, the compounds used had no significant effect on the content of carotenoids.

### 3. Discussion

In our study, the effects of the soil application of three chemically different metabolic modulators (chitosan lactate, selenium, salicylic acid) on selected physiological parameters and secondary metabolism of *C. majus* were analyzed. *C. majus* is an important medicinal plant known for its rich content of bioactive compounds, particularly isoquinoline alkaloids, which are largely responsible for the multi-directional pharmacological effects of this species. Research has extensively investigated its biological activities, focusing on antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, antiparasitic, insecticidal and anticancer properties. However, to date, there has been little focus on optimizing the production of this species. Optimization of culture conditions may help to develop standardized cultivation practices to produce high-yielding, high-quality *C. majus* raw materials with enhanced accumulation of bioactive compounds, providing a sustainable source for pharmaceutical applications [18]. Our research can help fill the gap in this area.

Comprehensive research is underway on how to effectively increase the accumulation of bioactive compounds in medicinal plants, including the use of the elicitation method. Despite certain progress, the literature still lacks a thorough exploration, particularly in vivo studies, of the effects of elicitors representing chemically diverse metabolite classes on primary and secondary metabolism across various plant species [10, 19-21]. Furthermore, in the case of medicinal plants, most of the existing research has focused on the elicitation of terpenoids or (poly)phenolic compounds and, less frequently, alkaloids [22-25].

Our in vivo research is the first to comprehensively report the effects of three chemically different metabolic modulators on such a broad profile of alkaloids in *C. majus*, six of which were identified in the shoot extracts. Unlike many medicinal plant species where phenolic compounds or terpenoids dominate the phytochemical profile, *C. majus* is distinguished by its specific and highly concentrated isoquinoline alkaloid content, particularly in shoots. The predominance of alkaloids not only defines the pharmacognostic identity of the species but also reflects their ecological role in plant defence mechanisms against stress factors [12, 15, 26]. Their pharmacological and ecological importance justifies a focused approach to enhance their accumulation through elicitation strategies. The study did not show a significant effect of the elicitors used on the accumulation of the dominant alkaloids (coptisine and chelidonine). Nevertheless, we noted that other key alkaloids, such as protopine, berberine, and allocryptopine accumulated more efficiently under the SA and Se treatments. Of the compounds tested, ChL proved to be the least effective in stimulating

alkaloid biosynthesis, with only allocryptopine levels increasing 4 days after its application. Although similar research on the elicitation of *C. majus* is still insufficient and even marginal, several strategies have been considered to enhance the accumulation of its alkaloids. For instance, a greenhouse study analyzed the effects of drought stress, methyl jasmonate (MeJa), and SA on the concentration of specialized metabolite in three plant species, including C. majus. It was found that both the moderate drought stress and the MeJa application had a beneficial impact on the total alkaloid content in *C. majus* [19]. Similarly, in vitro studies demonstrated a significant increase in chelidonine and sanguinarine under MeJa treatment [18].

Optimization of strategies for stimulating the production of major alkaloids with medicinal properties requires a deeper understanding of their biosynthetic pathways. Encouragingly, the first experimental studies are emerging that use C. majus as a model system in research on the biosynthesis and accumulation of isoquinoline alkaloids. The issue has been addressed by Yahyazadeh et al. [26], who examined the effects of drought and salinity stress on alkaloid accumulation in C. majus. The study reported a significant increase in dihydrocoptisine biosynthesis under stress, which was associated with increased transcript levels of the gene encoding stylopine synthase - a crucial enzyme in alkaloid biosynthesis. Expanding on the influence of abiotic elicitors on the content of other alkaloids, another in vivo experiment demonstrated the effects of foliar application of SA in Catharanthus roseus in salt-stress and non-stress conditions [27]. The results showed that SA reduced the adverse effects of salinity while improving plant growth and stimulating the total concentration of indole alkaloids, vinblastine and vincristine. In turn, Farouk et al. [28] investigated various elicitor treatments in Vinca minor pot cultivation. The study demonstrated that foliar application of chitosan combined with the endophyte *Streptomyces* sp. enhanced plant growth, chlorophyll content, antioxidant capacity, and the accumulation of different phytochemicals (phenols, flavonoids, anthocyanins, and alkaloids). The elicitors tested in our study also effectively increased total levels of phenolic compounds (but not soluble flavonols), even up to 2-fold, compared to the respective control. Simultaneously, all the elicitor treatments used in the experiment resulted in enhanced antioxidant activity of the C. majus shoot extracts, which is a relatively common effect observed with the increase in phenolic compounds. The greatest increase (approx. 3-fold) in the ability of the extracts to reduce DPPH, compared to the control, was noted on day 10 after the SA treatment, but the ChL or Se application also stimulated the antioxidant activity (approx. 2-fold increase, compared to the control). As mentioned above, studies focusing on alkaloid stimulation have been less common, but other examples from the literature indicate that elicitors are increasingly being used in extensive in vivo studies. In an experiment conducted by Sayed and Ahmed [29], three types of elicitors (gamma irradiation, nano-selenium, chitosan) and fertilizers (NPK, Moringa extract, humic acid) were used in vivo in Artemisia plants, and chitosan was proposed as the most effective, compared to the other metabolic modulators tested. Although both chitosan and nanoselenium (in foliar application) were particularly effective in increasing the artemisinin content and the quantity and quality of essential oil in *Artemisia annua*, they also acted synergistically with the fertilisers used. Another experiment demonstrated that foliar application of SA in *Silybum marianum* not only had a positive effect on plant biometric and physiological parameters, but also significantly stimulated the accumulation of silymarin and silybin (A+B) [30].

In response to stress factors, the accumulation of reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced changes in the oxidative status of plants are common. ROS play a crucial role in the plant defence mechanisms, but their overproduction can be toxic, despite the effective protection from a complex antioxidant system [31, 32]. There is a relationship between ROS and proline accumulation in plants. Since both are synthesized in response to stress, it is suggested that proline acts as a non-enzymatic antioxidant against ROS and has been identified as a key molecule in mitigating oxidative stress by scavenging hydroxyl radicals to protect cells from oxidative damage. However, its direct role as a ROS scavenger is debated. Some studies indicate that proline does not directly quench certain ROS, e.g. singlet oxygen. Surprisingly, proline metabolism may also contribute to the generation of ROS [32-34]. Not all of the metabolic modulators tested in our study increased the accumulation of free proline; it also depended on the time of exposure to the elicitors. Comparing the most noticeable changes, the Se application caused a significant increase in proline accumulation after 4 days, but the strongest effect in the SA treatment was observed after 10 days. However, it should be emphasized that the abiotic elicitors (Se and SA) caused these changes, and not ChL.

ROS-induced changes are assigned with their function as secondary messengers and they are interrelated with the production of specialized metabolites [35]. In a study conducted by Stasińska-Jakubas et al. [21], the foliar application of ChL, Se, and SA resulted in a significant increase in the accumulation of phenolic metabolites in Melissa officinalis shoots, which was accompanied by elevated levels of  $H_2O_2$  and  $O_2^{-}$  as well as enhanced lipid peroxidation. Similarly, these elicitors tested in Hypericum perforatum, especially Se and SA, enhanced the accumulation of phenolic compounds and selected flavonoids. At the same time, an increase in the level of free proline and O2-<sup>-</sup> and modulation in the activity of selected antioxidant enzymes were found [36]. The above studies were carried out using foliar application of metabolic modulators, which was not possible with the hydrophobic leaves of C. majus, and another method of application could have significantly influenced the plant response. In the present study, the relationship between the redox status of plants and the levels of specialized metabolites cannot be clearly highlighted. Not all of the elicitors used in our experiment caused significant changes in the oxidative parameters, with Se and SA appearing to induce plant responses more effectively. The accumulation of  $H_2O_2$  in the C. majus leaves was strongly enhanced by Se and SA, especially after 10 days of the elicitor treatment. Nevertheless, these changes were not related to lipid peroxidation, since at the same time the TBARS concentration did not change or even decreased by 40% under the

influence of SA. On the other hand, all of the elicitors tested enhanced the accumulation of TBARS to a similar extent shortly after their application. These results are most likely related to the functioning of an efficient antioxidant system in plants, which allows ROS species to function as signaling molecules but prevents their long-term harmful effects. Comparing these results with the activity of the analyzed antioxidant enzymes, the strongest response was observed at 10 days after the soil application of Se, which caused a 15-fold increase in GPOX activity in relation to the control plants.

Despite the visible dependence of the analyzed parameters on the duration of elicitation, it is still difficult to indicate its optimal time. Although the most significant changes were generally observed on the 7th and 10th day, it should be emphasized that the results are too complex and dependent on the type of elicitor. This study also indicates a clear advantage of the abiotic elicitors used over ChL in *C. majus* elicitation. Together, these findings highlight the need for further investigation into the complex interactions between chemical, especially abiotic, elicitors and plant metabolic pathways to optimize the production of alkaloids in medicinal plants, including *C. majus* as a model species for the biosynthesis of isoquinoline alkaloids.

# 4. Materials and Methods

### 4.1. Plant growth conditions and experimental layout

The experiment was conducted in an air-conditioned phytotron equipped with LED lamps (photosynthetic photon flux density 170-200  $\mu$ mol m-2 s-1; temperature 26/22 °C day/night; relative humidity 60-65%) at an initial photoperiod of 14/10h followed by 16/8h (day/night). The plants were grown in plastic pots (0.5 L) filled with a universal soil substrate (COMPO BIO, Kronen; pH 6.0). The greater celandine (*C. majus*) seeds were purchased from a local producer (HORTICO S.A.) and sown in pots (25 seeds in each). They were sprayed abundantly with distilled water and left to germinate. After 3 weeks, the plants were pricked out so that each pot contained 8 seedlings of equal growth. During seed germination and plant growth, they were regularly watered with an appropriate volume of distilled water. After 5 weeks of cultivation, the photoperiod was extended from 14 to 16 h, and all the plants were watered with an equal volume of Hoagland's medium [37].

The experimental variants were established at 10 weeks after sowing the seeds. Due to the strongly hydrophobic layer of epicuticular waxes on the surface of *C. majus* leaves, the water solutions of the tested elicitors were applied into the soil in a volume of 30 mL per pot. The experiment was conducted in four replicates in each experimental series. Based on available literature data and out previous laboratory research results, four experimental combinations were established and treated with the following solutions: control (distilled water), 100 mg/L chitosan lactate (ChL; Heppe Medical Chitosan, Germany, deacetylation

degree: 80-95%), 10 mg/L selenium (Se; Na2SeO3  $\times$  5 H2O; Fluka, Switzerland), and 150 mg/L salicylic acid (SA; PoCH, Poland).

All plants were at the same physiological stage (10 weeks after sowing) at the start of the elicitor treatment. Sampling at pre-specified times points for each analysis was part of a time course design to monitor the dynamics of biochemical and physiological responses. Fresh samples of the plant material and samples dried to constant weight were subjected to biochemical (total polyphenol content, soluble flavonol concentration, identification and determination of selected alkaloids, antioxidant activity of extracts, activity of selected antioxidant enzymes), physiological (free proline content, photosynthetic pigment content, chlorophyll a fluorescence), and biometric (fresh shoot mass) analyses. The entire dataset was obtained from a single experimental setup conducted under strictly controlled environmental conditions.

# 4.2. Preparation of methanol extracts from shoots

Samples of plant material for phytochemical determinations were collected on elicitation days 4, 7, and 10. To prevent loss of bioactive compounds, *C. majus* shoots were slowly dried at room temperature in the dark place. The material was then ground in a porcelain mortar into a fine powder.

Metabolites from the plant material were extracted using an Accelerated Solvent Extractor (ASE, Thermo Scientific Dionex, ASE 350, New York, USA). Approximately 750 mg of ground, dry shoots were placed in a 22 mL stainless steel extraction cell. Methanol (100%) was used as the solvent. The extraction was carried out at 80 °C for 15 min under a constant pressure of 1500 psi. The resulting crude extracts were directly analyzed by high-performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) and used for TPC and TSF determination.

### 4.3. Determination of selected secondary metabolites in plant extracts

# a) Quantitative and qualitative determination of alkaloids by HPLC-DAD

# Reference Standards and Chemicals

Alkaloids standards: allocryptopine, hydrochloride of chelidonine and protopine, chloride of berberine, chelerythrine, coptisine, sanguinarine, were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ammonium acetate, acetic acid, and HPLC-grade acetonitrile were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Water was deionised and purified by ULTRAPURE Milipore Direct-Q®3UV–R (Merck).

### **HPLC-DAD** Analysis

Alkaloids were determined according to the previously published methodology [38]. Chromatograph VWR Hitachi Chromaster 600 with a spectrophotometric detector (DAD) and EZChrom Elite software (Merck); XB-C18 reversed-phase core-shell column (Kinetex, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) (25 cm × 4.6 mm i.d., 5 µm particle size), at temperature of 25 °C; mobile phase: acetonitrile (solvent A) and 10 mM aqueous solution of ammonium acetate adjusted to pH=4 with acetic acid (solvent B); gradient programme: A 20%, B 80% for 0-20 min, A 25%, B 75 % for 20-27 min and then A 30%, B 70% for 27- 60 min; eluent flow rate 1.2 mL min-1. Compounds in plant extracts were identified by comparison of retention times and UV-Vis spectra with corresponding standards (Fig. S1). Quantitative analysis was performed at  $\lambda = 288$  nm for protopine, allocryptopine, and chelidonine,  $\lambda = 357$  nm for coptisine,  $\lambda = 327$  nm for sanguinarine,  $\lambda = 344$  nm for berberine and  $\lambda = 268$  nm for chelerithrine. Data were recalculated per gram of plant dry weight (DW).

# b) Total phenolic compounds

The concentration of TPC in the methanolic extracts prepared previously (2.2) was examined using spectrophotometry (UV-VIS spectrophotometer Cecil CE 9500, Cecil Instruments, Cambridge, UK) at 756 nm. The content of TPC was determined using the Folin-Ciocalteau reagent according to the method proposed by Wang et al. [39] with slight modifications described before [21]. The content of TPC was calculated from the standard curve of gallic acid.

### c) Total soluble flavonols

The content of TSF in the plant extracts (2.2.) was determined as a complex with aluminium ions following the simplified method proposed by Christ-Müller [40] described previously [21]. Absorbance of the solutions was measured at 425 nm wavelength (UV-VIS spectrophotometer Cecil CE 9500, Cecil Instruments, Cambridge, UK). The concentration of TSF was calculated from the standard curve of rutin.

# 4.4. Determination of the oxidative status

# a) H2O2 accumulation

The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level in the leaves of the control and elicitor-treated plants was determined using the method described by Jena and Choudhuri [41] on days 2 and 10 of elicitation. The leaf samples from the middle part of the shoot were homogenized in phosphate buffer and centrifuged. Next, 1.5 mL of the supernatant and 0.5 mL of 0.1% TiO<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> were mixed and centrifuged again. The yellow colour intensity of the reaction mixture was measured spectrophotometrically at  $\lambda$ =410 nm (UV-VIS spectrophotometer Cecil CE 9500, Cecil Instruments, Cambridge, UK). Based on the absorbance value and the molar absorbance coefficient (0.28  $\mu$ M-1 cm-1), the content of H2O2 was calculated. The detailed procedure was described previously [21].

### b) Lipid peroxidation level

The concentrations of TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) indicating the level of membrane lipid peroxidation were determined in leaf samples collected from the middle part of the shoot on days 2 and 10 of elicitation using a modified method developed by Heath and Packer [42]. The samples were ground in a trichloroacetic acid solution and centrifuged. Next, 20% trichloroacetic acid containing 0.5% thiobarbituric acid supplemented with butylated hydroxytoluene was added to the supernatant. The reaction mixture was heated and centrifuged again and its absorbance was determined spectrophotometrically at 600 and 532 nm (UV-VIS spectrophotometer Cecil CE 9500, Cecil Instruments, Cambridge, UK). The concentration of TBARS was determined based on the molar absorbance coefficient (155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

# c) Antioxidant enzyme activity

The activity of guaiacol peroxidase (GPOX, EC 1.11.1.7), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), and ascorbate peroxidase (APOX, EC 1.11.1.11) in the leaves of *C. majus* were conducted on days 2 and 10 of elicitation. Leaf samples were taken from the middle part of the shoot. CAT activity was determined following the method described by Golan et al. [43] at a wavelength of 240 nm. GPOX activity was assayed with the method used by Małolepsza et al. [44], and absorbance was measured at a wavelength of 480 nm for 4 min at 1-min intervals. APOX activity was assayed using the technique proposed by Nakano and Asada [45]; it was measured at 290 nm for 5 min at 1-min intervals. Detailed descriptions of these methods were described before [Stasińska-Jakubas et al. 2024]. The activity of the enzymes was determined spectrophotometrically with the use of a Cecil CE 9500 device.

# d) Free radical scavenging activity

The free radical-scavenging activity (FRSA) of the C. majus methanol leaf extracts (2.2.) was performed spectrophotometrically at 517 nm using the 200  $\mu$ M solution of synthetic radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) dissolved in 80% methanol. The analysis and calculations were carried out according to the Molyneux [2004] method described in detail before [21].

# 4.5. Determination of plant growth, selected physiological parameters, and free proline accumulation

# a) Fresh weight of shoots

The fresh weight of C. *majus* shoots was determined on the final day of the experiment (10 days after the application of metabolic modulators). The shoots were cut off a few millimeters above the surface of the soil substrate and weighed on a laboratory scale. The results are expressed in grams per plant.

# b) Content of photosynthetic pigments

The concentration of photosynthetic pigments in the leaves of *C. majus* was determined spectrophotometrically on day 2 and 10 after the application of metabolic modulators following the Lichtenthaler and Wellburn [48] method and calculations. For these analyses, leaves located in the central part of the shoot were sampled and homogenized in 80% acetone. The absorbance of the solutions was measured at 663 nm, 645 nm, and 470 nm (UV-VIS spectrophotometer Cecil CE 9500, Cecil Instruments, Cambridge, UK).

# c) Measurement of selected parameters of chlorophyll a fluorescence

Selected chlorophyll a fluorescence parameters were measured on leaves located in the central part of the shoot on days 2 and 10 after the treatment with elicitors. The following parameters were measured: F0 - minimum fluorescence, Fm - maximum fluorescence, and Fv/Fm - ratio of variable fluorescence to maximum fluorescence using a Handy-PEA portable photofluorimeter (Hansatech Instruments, Norfolk, UK) as described before [21].

# d) Free proline accumulation

The accumulation of proline in the *C. majus* leaves was determined on elicitation days 2 and 10 with the method described by Bates et al. [49]. For these analyses, leaves located in the central part of the shoot were sampled. Absorbance was measured spectrophotometrically at 520 nm (UV-VIS spectrophotometer Cecil CE 9500, Cecil Instruments, Cambridge, UK). The proline concentration was read from a standard curve prepared for pure proline standard and converted to fresh weight.

# 4.6. Statistical analysis

The experiment was established in a completely randomized design. All numeric data provided by the laboratory analyses were tested with one–way analysis of variance (ANOVA) and post hoc analysis using NIR-Fisher test at p < 0.05 to assess merely the responses of the plants to the application of the tested chemical substances. Values expressed as percentage (reduction of the DPPH) were normalized by arcsin transformation prior to ANOVA analysis.

### **5.** Conclusions

The present study reveals, for the first time, the distinct biochemical and physiological responses of *C. majus* to different chemically diverse elicitors applied in vivo via the soil substrate. An integrated experimental design was employed, including secondary metabolite profiling, oxidative stress biomarkers and physiological indicators, all assessed under uniform environmental conditions and including exposure time. Given the hydrophobic nature of *C. majus* leaves, the application of chemical elicitors to the soil substrate appears to be the only possible technique for use *in vivo*. Among the tested compounds, Se and SA (abiotic elicitors), led to a significant modification in the concentration of valuable specialized metabolites in the shoots of *C. majus*. The stimulatory effect on the accumulation of selected isoquinoline alkaloids was observed as the content of protopine, berberine, and allocryptopine was strongly enhanced. The elicitor treatments also increased total phenolic content and markedly improved the antioxidant activity of the plant extracts. Although elicitor-induced changes in oxidative status (increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and enhanced lipid peroxidation) and free proline accumulation of specialized metabolite biosynthesis.

Overall, the results support the potential of soil-applied Se and SA as a promising method for improving the phytochemical value of *C. majus* in controlled pot cultivation. However, the complexity of the factors that determine the success of elicitation and the limited information on alkaloid stimulation in this plant species require further research to optimise elicitation in *C. majus*, including analysis of the activity and gene expression of key enzymes involved in isoquinoline alkaloid biosynthetic pathways.

Author Contributions: Conceptualization, M.S.J., B.H.N, and S.D.; methodology, B.H.N., S.D., K.R., and M.S.; validation, M.S.J., S.D., and M.S.; formal analysis, B.H.N; investigation, M.S.J., S.D., M.S., K.R.; resources, B.H.N, S.D.; data curation, M.S.J.; writing—original draft preparation, M.S.J., B.H.N.; writing—review and editing, B.H.N, S.D.; visualization, M.S.J., B.H.N, M.S..; supervision, B.H.N., S.D.; project administration, B.H.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Data Availability Statement: The data sets generated during the study are available from the corresponding author on the request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest

# References

- Salmerón-Manzano, E.; Garrido-Cardenas, J.A.; Manzano-Agugliaro, F. Worldwide research trends on medicinal plants. Int. J. Environ. Res. Public Health 2020, 17, 3376. https://doi.org/10.3390/ijerph17103376
- Pant, P.; Pandey, S.; Dall'Acqua, S. The influence of environmental conditions on secondary metabolites in medicinal plants: A literature review. Chem. Biodiversity 2021, 18, 2100345. https://doi.org/10.1002/cbdv.202100345
- Li, Y.; Kong, D.; Fu, Y.; Sussman, M.R., Wu, H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. Plant Physiol. Biochem. 2020, 148, 80-89. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006
- 4. Babalska, Z.; Karpiński, T. Aspects of antibacterial properties of selected herbs. Herba Polonica 2024, 70, 13-23. https://doi.org/10.5604/01.3001.0054.4605
- Jalota, K.; Sharma, V.; Agarwal, C.; Jindal, S. Eco-friendly approaches to phytochemical production: elicitation and beyond. Natural Prod. Bioprospect. 2024, 14, 5. https://doi.org/10.1007/s13659-023-00419-7
- 6. Shakya, A.K. Medicinal plants: Future source of new drugs. Int. J. Herb. Med. 2016, 4, 59-64.
- Yang, L.; Wen, K.-S.; Ruan, X.; Zhao, Y.-X.; Wei, F.; Wang, Q. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. Molecules 2018, 23, 762. https://doi.org/10.3390/molecules23040762
- Hawrylak-Nowak, B.; Dresler, S.; Stasińska-Jakubas, M.; Wójciak, M.; Sowa, I.; Matraszek-Gawron, R. NaCl-induced elicitation alters physiology and increases accumulation of phenolic compounds in *Melissa officinalis* L. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 6844. https://doi.org/10.3390/ijms22136844
- Dal Bosco Ducatti, R. Plant elicitation: the generation of misleading and biased information. J. Plant Growth Regul. 2023, 42, 3785–3788. https://doi.org/10.1007/s00344-022-10838-4
- 10.Kandoudi, W.; Németh-Zámboriné, E. Stimulating secondary compound accumulation by elicitation: Is it a realistic tool in medicinal plants *in vivo*? Phytochem. Rev. 2022, 21, 2007–2025. https://doi.org/10.1007/s11101-022-09822-3.
- 11. Arora, D..; Sharma, A. A review on phytochemical and pharmacological potential of genus *Chelidonium*. Pharmacogn. J. 2013, 184-190. https://doi.org/10.1016/j.phcgj.2013.07.006
- 12.Zielińska, S.; Jezierska-Domaradzka, A.; Wójciak-Kosior, M.; Sowa, I.; Junka, A.; Matkowski, A.M. Greater celandine's ups and downs 21 centuries of medicinal uses of *Chelidonium majus* from the viewpoint of today's Pharmacology. Front. Pharmacol. 2018, 9, 299. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00299

- 13. Dumitru, M.G.; Gănescu, A. Antioxidant activity of alcoholic extract of *Chelidonium majus* L. flowers. Ann. Univ. Craiova Chem. 2022, 48, 63-69.
- 14.Borges, A.; Calvo, M.L.M.; Vaz, J.A.; Calhelha, R.C. Enhancing wound healing: a comprehensive review of sericin and *Chelidonium majus* L. as Potential Dressings. Materials 2024, 17, 4199. https://doi.org/10.3390/ma17174199
- 15.Gilca, M.; Gamana, L.; Panaita, E.; Stoiana, I.; Atanasiu, V. Chelidonium majus an integrative review: traditional knowledge versus modern findings. Forsch Komplementmed 2010, 17, 241–248. https://doi.org/10.1159/000321397
- 16.Nadova, S.; Miadokova, E.; Alfoldiova, L.; Kopaskova, M.; Hasplova, K.; Hudecova, A.; Vaculcikova, D., Gregan, F., Cipak, L. Potential antioxidant activity, cytotoxic and apoptosis-inducing effects of *Chelidonium majus* L. extract on leukemia cells. Neuro Endocrinol Lett. 2008, 29, 649-652.
- 17. Yun, D.; Yoon, S.Y.; Park, S.J.; Park, Y.J. The anticancer effect of natural plant alkaloid isoquinolines. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 1653. https://doi.org/10.3390/ijms22041653
- 18.Hashemi, S.M.; Naghavi, M.R.; Bakhshandeh, E.; Ghorbani, M.; Priyanatha, C.; Zandi, P. Effects of abiotic elicitors on expression and accumulation of three candidate benzophenanthridine alkaloids in cultured greater celandine cells. Molecules 2021, 26(5), 1395. doi: 10.3390/molecules26051395. Erratum in: Molecules 2022, 27(16), 5244. doi: 10.3390/molecules27165244.
- 19.Kleinwächter, M.; Paulsen, J.; Bloem, E.; Schnug, E.; Selmar, D. Moderate drought and signal transducer induced biosynthesis of relevant secondary metabolites in thyme (Thymus vulgaris), greater celandine (*Chelidonium majus*) and parsley (Petroselinum crispum). Ind. Crops Prod. 2015, 64, 158–166. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.062
- 20.Caicedo-López, L.H.; Aranda, A.L.V.; Sáenz de la O.D.; Gómez, C.E.Z.; Márquez, E.E.; Zepeda, H.R. Elicitors: Bioethical implications for agriculture and human health. Rev. bioét. 2021, 29(1), 76-86. https://doi.org/10.1590/1983-80422021291448
- 21.Stasińska-Jakubas, M.; Hawrylak-Nowak, B.; Dresler, S.; Wójciak, M.; Rubinowska, K. Application of chitosan lactate, selenite, and salicylic acid as an approach to induce biological responses and enhance secondary metabolism in *Melissa officinalis* L. Ind. Crops Prod. 2022, 205, 117571. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117571
- 22.Gorni, P.H.; Pacheco, A.C. Growth promotion and elicitor activity of salicylic acid in *Achillea millefolium* L. Afr. J. Biotechnol. 2016, 15(16), 657-665.
- 23. Mirzamohammad, E.; Alirezalu, A.; Alirezalu, K.; Norozi, A.; Ansari, A. Improvement of the antioxidant activity, phytochemicals, and cannabinoid compounds of *Cannabis sativa* by salicylic acid elicitor. Food Sci. Nutr. 2021, 9(12), 6873-6881.
- 24. Alvarenga, J.P.; Silva, R.R.; Salgado, O.G.; Júnior, P.C.S.; Pavan, J.P.S., Ávila, R.G., Alvarenga, A.A. Variations in essential oil production and antioxidant system of *Ocimum*

gratissimum after elicitation. J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants 2022, 26, 100354. https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2021.100354

- 25.Kandoudi, W.; Radácsi, P.; Gosztola, B.; Zámboriné Németh, É. Elicitation of medicinal plants in vivo—is it a realistic tool? The effect of methyl jasmonate and salicylic acid on Lamiaceae species. Horticulturae 2022, 8, 5. https://doi.org/10.3390/horticulturae8010005
- 26. Yahyazadeh, M.; Meinen R.; Hänsch, R.; Abouzeid, S.; Selmar D. Impact of drought and salt stress on the biosynthesis of alkaloids in *Chelidonium majus* L. Phytochem. 2018, 152, 204-212. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.05.007
- 27. Idrees, M.; Naeem, M.; Aftab, T.; Khan, M.M.A., Moinuddin, F. Salicylic acid mitigates salinity stress by improving antioxidant defence system and enhances vincristine and vinblastine alkaloids production in periwinkle [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don]. Acta Physiol. Plant. 2011, 33, 987-999. https://doi.org/10.1007/s11738-010-0631-6
- 28.Farouk S.; AL-Huqail A.A.; El-Gamal S.M.A. Improvement of phytopharmaceutical and alkaloid production in periwinkle plants by endophyte and abiotic elicitors. Horticulturae 2022, 8(3), 237. https://doi.org/10.3390/horticulturae8030237
- 29.Sayed, T.E.; Ahmed, E.-S.S. Improving artemisinin and essential oil production from *Artemisia* plant through in vivo elicitation with gamma irradiation, nano-selenium and chitosan coupled with bio-organic fertilizers. Front. Energy Res. 2022, 10, 996253. https://doi.org/10.3389/fenrg.2022.996253
- 30.Khattab, S.; Yap, Y.-K.; El Sherif, F. Salicylic acid foliar spray enhanced *Silybum marianum* growth and yield, as well as its chemical constituents and chalcone synthase gene activity. Horticulturae 2022, 8, 556. https://doi.org/10.3390/horticulturae8060556
- 31.Mhamdi, A.; Queval, G.; Chaouch, S.; Vanderauwera, S.; Van Breusegem, F.; Noctor, G. Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. J. Exp. Bot. 2010, 61(15), 4197-4220. https://doi.org/10.1093/jxb/erq282
- 32.Naliwajski, M.; Skłodowska, M. The Relationship between the antioxidant system and proline metabolism in the leaves of cucumber plants acclimated to salt stress. Cells 2021, 10, 609. https://doi.org/10.3390/cells10030609
- 33.Signorelli, S.; Arellano, J.B., Melø, T.B.; Borsani, O.; Monza, J. Proline does not quench singlet oxygen: evidence to reconsider its protective role in plants. Plant Physiol. Biochem. 2013, 64, 80-83. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.12.017
- 34.Rejeb, K.B.; Abdelly, C.; & Savouré, A. How reactive oxygen species and proline face stress together. Plant Physiol. Biochem. 2014, 80, 278-284. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.04.007
- 35.Hasanuzzaman, M.; Bhuyan, M.B., Parvin, K., Bhuiyan, T.F., Anee, T.I., Nahar, K., Fujita, M. Regulation of ROS metabolism in plants under environmental stress: A review of recent experimental evidence. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21(22), 8695. https://doi.org/10.3390/ijms21228695

- 36. Stasińska-Jakubas, M.; Dresler, S.; Strzemski, M.; Rubinowska, K.; Hawrylak-Nowak, B. Differentiated response of *Hypericum perforatum* to foliar application of selected metabolic modulators: Elicitation potential of chitosan, selenium, and salicylic acid mediated by redox imbalance. Phytochemistry 2024, 227, 114231. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2024.114231
- 37.Hoagland, D.R.; Arnon, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. Calif Agric Exp Stn Circ 1950, 347, 1–32.
- 38. Wójciak-Kosior, M.; Sowa, I.; Dresler, S.; Kováčik, J.; Staniak, M.; Sawicki, J.; Zielińska, S.; Świeboda, R.; Strzemski, M.; Kocjan, R. Polyaniline based material as a new SPE sorbent for pre-treatment of *Chelidonium majus* extracts before chromatographic analysis of alkaloids. Talanta 2019, 194, 32–37.
- 39. Wang, C.; Lu, J.; Zhang, S.; Wang, P.; Hou, J.; Qian, J. Effects of Pb stress on nutrient uptake and secondary metabolism in submerged macrophyte *Vallisneria natans*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 2011, 74 (5), 1297–1303. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.03.005
- 40.Polish Pharmacopoeia V; Polish Pharmaceutical Society: Warsaw, Poland, 1999; pp. 56–57. (In Polish)
- 41. Jana, S.; Choudhuri, M.A. Glucolate metabolizm of three submerged aquatic angiosperms during aging. Aquat. Bot. 1981, 12, 345–354. http://dx.doi.org/10.1016/0304-3770(82)90026-2
- 42.Heath, R.L.; Packer, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 1968, 125, 189–198. https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1.
- 43.Golan, K.; Rubinowska, K.; Gorska-Drabik, E. Physiological and biochemical responses of fern *Nephrolepis biserrata* (Sw.) Schott. to *Coccus hesperidum* L. Infestation. Acta Biol. Cracov. Bot. 2013, 55(1), 93–98. https://doi.org/10.2478/abcsb2013-0007.
- 44.Małolepsza, A.; Urbanek, H.; Polit, J. Some biochemical reactions of strawberry plants to infection with *Botrytis cinerea* and salicylic acid treatment. Acta Agrobot. 1994, 47 (2), 73–81. https://doi.org/10.5586/aa.1994.014.
- 45.Nakano, Y.; Asada, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 1981, 22, 867–880. https://doi.org/ 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232.
- 46.Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J. Sci. Technol. 2004, 26(2), 211-219.
- 47.Lichtenthaler, H.K.; Wellburn, A.R. Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. Biochem. Soc. Trans. 1983, 603, 591–592.
- 48.Bates, L.; Waldren, R.; Teare, J. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil 1973, 39, 205–207. http://dx.doi.org/10.1007/BF00018060

# SUPPLEMENTARY MATERIALS

# Effect of soil-applied metabolic modulators on the accumulation of specialized metabolites in *Chelidonium majus* L.

Maria Stasińska-Jakubas <sup>1</sup>, Sławomir Dresler <sup>2,3</sup>, Maciej Strzemski <sup>2</sup>, Katarzyna Rubinowska<sup>1</sup>, and Barbara Hawrylak-Nowak <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Botany and Plant Physiology, Faculty of Environmental Biology,

University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 15, 20-950 Lublin, Poland;

<sup>2</sup> Department of Analytical Chemistry, Medical University of Lublin, Chodźki 4a, 20-093 Lublin, Poland;

<sup>3</sup> Department of Plant Physiology and Biophysics, Institute of Biological Science, Maria Curie-Skłodowska University, 20-033, Lublin, Poland.

\* Correspondence: <u>barbara.nowak@up.lublin.pl</u>



**Fig. S1.** Sample HPLC chromatogram (A), spectrochromatogram (B) and DAD spectra of the chromatographic peaks (C) obtained during the separation of alkaloids from *H. perforatum* methanolic leaf extracts – protopine (1), allocryptopine (2), chelidonine (3), coptisine (4), berberine (5), and chelerythrine (6).



**Fig. S2.** Effect of soil application of ChL – chitosan lactate, Se – sodium selenite, and SA – salicylic acid on the biomass of *C. majus* shoots after 10 day of the elicitor exposure. Control plants were treated with distilled water. Means ( $\pm$  SD; n = 10) marked with different letters differ statistically significantly (p < 0.05, NIR-Fischer test).



**Fig. S3.** Effect of soil application of ChL – chitosan lactate, Se – sodium selenite, and SA – salicylic acid on selected parameters of chlorophyll *a* fluorescence in *C. majus* on the 4<sup>th</sup> (a) and 10<sup>th</sup> (b) day of the elicitor exposure. Control plants were treated with distilled water. Means ( $\pm$  SD; n = 10) for individual parameters marked with different letters differ statistically significantly (p < 0.05, NIR-Fischer test).



**Fig. S4.** Effect of soil application of ChL – chitosan lactate, Se – selenite, and SA – salicylic acid on the concentration of photosynthetic pigments in *C. majus* on the 4<sup>th</sup> (a) and 10<sup>th</sup> (b) day of the elicitor exposure. Control plants were treated with distilled water. Means ( $\pm$  SD; n = 4) for individual pigments marked with different letters differ statistically significantly (p < 0.05, NIR-Fischer test).

Oświadczenia doktoranta oraz współautorów

Lublin, 03.06.2025 r.

mgr inż. Maria Stasińska-Jakubas Katedra Botaniki i Fizjologii Roślin Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin maria.jakubas@up.lublin.pl

> Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

# Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracach:

(P1) Stasińska-Jakubas M., Hawrylak-Nowak B. 2022. Protective, biostimulating, and eliciting effects of chitosan and its derivatives on crop plants. Molecules 27, 2801.

Mój wkład w publikację obejmował: współtworzenie koncepcji pracy, opracowanie pierwszej wersji manuskryptu, opracowanie graficzne schematów, udział w odpowiedziach na recenzje.

**(P2)** Stasińska-Jakubas M., Hawrylak-Nowak B., Dresler S., Wójciak M., Rubinowska K. 2023. Application of chitosan lactate, selenite, and salicylic acid as an approach to induce biological responses and enhance secondary metabolism in *Melissa officinalis* L. Industrial Crops and Products 205, 117571.

Mój wkład w publikację obejmował: udział w opracowaniu koncepcji pracy, przeprowadzenie doświadczeń wegetacyjnych oraz większości analiz laboratoryjnych, analizę statystyczną i interpretację wyników, opracowanie pierwszej wersji manuskryptu, udział w odpowiedziach na recenzje.

**(P3)** Stasińska-Jakubas M., Dresler S., Strzemski M., Rubinowska K., Hawrylak-Nowak B. 2024. Differentiated response of *Hypericum perforatum* to foliar application of selected metabolic modulators: Elicitation potential of chitosan, selenium, and salicylic acid mediated by redox imbalance. Phytochemistry, 227, 114231.

Mój wkład w publikację obejmował: udział w opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowanie oraz przeprowadzenie badań, porządkowanie danych, analizę statystyczną i interpretację wyników, wizualizację danych, opracowanie pierwszej wersji manuskryptu, analizę formalną oraz udział w odpowiedziach na recenzje. **(P4)** Stasińska-Jakubas M., Dresler S., Strzemski M., Rubinowska K., Hawrylak-Nowak B. Effect of soil-applied metabolic modulators on the accumulation of specialized metabolites in *Chelidonium majus* L. (publikacja w trakcie procesu redakcyjnego)

Mój wkład w publikację obejmował: udział w opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowanie i przeprowadzenie badań wegetacyjnych oraz większości oznaczeń laboratoryjnych, opracowanie danych i ich analizę statystyczną, wizualizację danych, opis i interpretację wyników badań, opracowanie pierwszej wersji manuskryptu.

maria Marinero - Jonnesas

Czytelny podpis
dr hab. Barbara Hawrylak-Nowak, prof. uczelni Katedra Botaniki i Fizjologii Roślin Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin barbara.nowak@up.lublin.pl

> Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

#### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracach:

**(P1)** Stasińska-Jakubas M., Hawrylak-Nowak B. 2022. Protective, biostimulating, and eliciting effects of chitosan and its derivatives on crop plants. Molecules 27, 2801.

Mój wkład w publikację obejmował: udział w opracowaniu koncepcji pracy, analizę formalną oraz redakcję i edycję manuskryptu, pełnienie funkcji autora korespondencyjnego, udział w odpowiedziach na recenzje.

**(P2)** Stasińska-Jakubas M., Hawrylak-Nowak B., Dresler S., Wójciak M., Rubinowska K. 2023. Application of chitosan lactate, selenite, and salicylic acid as an approach to induce biological responses and enhance secondary metabolism in *Melissa officinalis* L. Industrial Crops and Products 205, 117571.

Mój wkład w publikację obejmował: udział w opracowaniu koncepcji pracy, opracowaniu założeń metodologicznych, udział w planowaniu i prowadzeniu eksperymentu, współtworzenie pierwszej wersji manuskryptu, analizę formalną i nadzór merytoryczny, pełnienie funkcji autora korespondencyjnego, udział w odpowiedziach na recenzje.

**(P3)** Stasińska-Jakubas M., Dresler S., Strzemski M., Rubinowska K., Hawrylak-Nowak B. 2024. Differentiated response of *Hypericum perforatum* to foliar application of selected metabolic modulators: Elicitation potential of chitosan, selenium, and salicylic acid mediated by redox imbalance. Phytochemistry, 227, 114231.

Mój wkład w publikację obejmował: udział w opracowaniu koncepcji pracy, opracowanie metodologii, udział w przeprowadzeniu badań, nadzór merytoryczny, współtworzenie oryginalnej wersji manuskryptu, pełnienie funkcji autora korespondencyjnego, udział w odpowiedziach na recenzje. **(P4)** Stasińska-Jakubas M., Dresler S., Strzemski M., Rubinowska K., Hawrylak-Nowak B. Effect of soil-applied metabolic modulators on the accumulation of specialized metabolites in *Chelidonium majus* L. (publikacja w trakcie procesu redakcyjnego)

Mój wkład w publikację obejmował: udział w opracowaniu koncepcji pracy oraz założeń metodologicznych, udział w prowadzeniu badań, zarządzanie doświadczeniem, nadzór merytoryczny, udział w wizualizacji danych, udział w edycji publikacji.

Berbere Verrytel Nociele Czytelny podpis

Lublin, 02.06.2025 r.

prof. dr hab. Sławomir Dresler Zakład Chemii Analitycznej Uniwersytet Medyczny w Lublinie ul. Chodźki 4a (Collegium Pharmaceuticum) 20-093 Lublin slawomir.dresler@umlub.pl

> Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

#### Oświadczenie o współautorstwie

#### Niniejszym oświadczam, że w pracach:

(P2) Stasińska-Jakubas M., Hawrylak-Nowak B., Dresler S., Wójciak M., Rubinowska K. 2023. Application of chitosan lactate, selenite, and salicylic acid as an approach to induce biological responses and enhance secondary metabolism in *Melissa officinalis* L. Industrial Crops and Products 205, 117571.

Mój wkład w publikację obejmował: udział w opracowaniu założeń metodologicznych, udział w przeprowadzeniu analizy jakościowej i ilościowej ekstraktów roślinnych oraz udział w redakcji i edycji tekstu manuskryptu.

**(P3)** Stasińska-Jakubas M., Dresler S., Strzemski M., Rubinowska K., Hawrylak-Nowak B. 2024. Differentiated response of *Hypericum perforatum* to foliar application of selected metabolic modulators: Elicitation potential of chitosan, selenium, and salicylic acid mediated by redox imbalance. Phytochemistry, 227, 114231.

Mój wkład w publikację obejmował: udział w opracowaniu koncepcji pracy i opracowaniu założeń metodologicznych, udział w przeprowadzeniu analizy jakościowej i ilościowej ekstraktów roślinnych oraz udział w redakcji i edycji tekstu manuskryptu.

**(P4)** Stasińska-Jakubas M., Dresler S., Strzemski M., Rubinowska K., Hawrylak-Nowak B. Effect of soil-applied metabolic modulators on the accumulation of specialized metabolites in *Chelidonium majus* L. (publikacja w trakcie procesu redakcyjnego)

Mój wkład w publikację obejmował: udział w opracowaniu koncepcji pracy i jej metodologii, walidację danych, udział w analizach zawartości metabolitów wtórnych, nadzór merytoryczny oraz udział w redakcji i edycji manuskryptu.

Stewarmir Dres

Czytelny podpis

Lublin, 02.06.2025 r.

dr hab. Maciej Strzemski, prof. uczelni Zakład Chemii Analitycznej Uniwersytet Medyczny w Lublinie ul. Chodźki 4a (Collegium Pharmaceuticum) 20-093 Lublin maciej.strzemski@umlub.pl

> Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

#### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracach:

**(P3)** Stasińska-Jakubas M., Dresler S., Strzemski M., Rubinowska K., Hawrylak-Nowak B. 2024. Differentiated response of *Hypericum perforatum* to foliar application of selected metabolic modulators: Elicitation potential of chitosan, selenium, and salicylic acid mediated by redox imbalance. Phytochemistry 227, 114231.

Mój wkład w publikację obejmował: udział w opracowaniu założeń metodologicznych, udział w przeprowadzeniu analizy jakościowej i ilościowej ekstraktów roślinnych, walidację danych, udział w wizualizacji danych oraz redakcji i edycji manuskryptu.

**(P4)** Stasińska-Jakubas M., Dresler S., Strzemski M., Rubinowska K., Hawrylak-Nowak B. Effect of soil-applied metabolic modulators on the accumulation of specialized metabolites in *Chelidonium majus* L. (publikacja w trakcie procesu redakcyjnego)

Mój wkład w publikację obejmował: udział w opracowaniu założeń metodologicznych, udział w analizie jakościowej i ilościowej ekstraktów roślinnych oraz walidacji danych.

Mairej Arecusti Czytelny podpis

Lublin, 03.06.2025 r.

dr inż. Katarzyna Rubinowska Katedra Botaniki i Fizjologii Roślin Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin katarzyna.rubinowska@up.lublin.pl

> **Rada Dyscypliny** Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

#### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracach:

(P2) Stasińska-Jakubas M., Hawrylak-Nowak B., Dresler S., Wójciak M., Rubinowska K. 2023. Application of chitosan lactate, selenite, and salicylic acid as an approach to induce biological responses and enhance secondary metabolism in Melissa officinalis L. Industrial Crops and Products 205, 117571.

Mój wkład w publikację obejmował: udział w opracowaniu założeń metodologicznych, oznaczenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz udział w redakcji i edycji tekstu manuskryptu.

(P3) Stasińska-Jakubas M., Dresler S., Strzemski M., Rubinowska K., Hawrylak-Nowak B. 2024. Differentiated response of Hypericum perforatum to foliar application of selected metabolic modulators: Elicitation potential of chitosan, selenium, and salicylic acid mediated by redox imbalance. Phytochemistry, 227, 114231.

Mój wkład w publikację obejmował: udział w opracowaniu założeń metodologicznych oraz oznaczenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych.

(P4) Stasińska-Jakubas M., Dresler S., Strzemski M., Rubinowska K., Hawrylak-Nowak B. Effect of soil-applied metabolic modulators on the accumulation of specialized metabolites in Chelidonium majus L. (publikacja w trakcie procesu redakcyjnego)

Mój wkład w publikację obejmował: udział w opracowaniu założeń metodologicznych oraz oznaczenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych.

Vatomyno Rubinociclie Czytelny podpis

Lublin, 02.06.2025 r.

prof. dr hab. Magdalena Wójciak Zakład Chemii Analitycznej Uniwersytet Medyczny w Lublinie ul. Chodźki 4a (Collegium Pharmaceuticum) 20-093 Lublin magdalena.wojciak@umlub.pl

> **Rada Dyscypliny** Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

#### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

(P2) Stasińska-Jakubas M., Hawrylak-Nowak B., Dresler S., Wójciak M., Rubinowska K. 2023. Application of chitosan lactate, selenite, and salicylic acid as an approach to induce biological responses and enhance secondary metabolism in Melissa officinalis L. Industrial Crops and Products 205, 117571.

Mój wkład w publikację obejmował: udział w opracowaniu założeń metodologicznych, przeprowadzeniu analiz ilościowych i jakościowych ekstraktów roślinnych oraz redakcji i edycji tekstu manuskryptu.

Magshelene Wojciek Czytelny podpis

# Aneks – Życiorys naukowy

### Wykształcenie

#### 2021-2025 Szkoła Doktorska Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie Kształcenie w dyscyplinie: nauki biologiczne Tytuł rozprawy doktorskiej: "Egzogenna aktywacja szlaków biosyntezy metabolitów wtórnych oraz modulacia procesów fizjologicznych u wybranych gatunków roślin leczniczych" Promotor: dr hab. Barbara Hawrylak-Nowak, prof. uczelni Promotor pomocniczy: prof. dr hab. Sławomir Dresler Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, 2020-2021 Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie Kierunek: Zielarstwo i fitoprodukty Tytuł pracy magisterskiej: "Porównanie efektywności dwóch form chitozanu w elicytacji wybranych związków fenolowych u Plectranthus amboinicus" Promotor: dr hab. Barbara Hawrylak-Nowak, prof. uczelni 2016-2020 Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

#### Kierunek: Zielarstwo i terapie roślinne

Włochy

Tytuł pracy inżynierskiej: "Wpływ zasolenia jako elicytora abiotycznego na zawartość wybranych związków fenolowych, zdolność antyoksydacyjną i parametry fizjologiczne *Melissa officinalis* L.

Promotor: dr hab. Barbara Hawrylak-Nowak, prof. uczelni

## Staże naukowe i mobilności zagraniczne

30.10.2023 - 08.12.2023	zagraniczny staż naukowy
	Department of Plant Physiology and Metabolomics,
	Agricultural Institute, Centre for Agricultural Research,
	HUN-REN, Martonvásár, Węgry
03.06.2024 - 7.06.2024	mobilność zagraniczna w ramach programu Erasmus+
	University of Molise: "Ecosystem monitoring and adaptive
	management under climate change scenarios", Molise,

24.06.2024 - 28.06.2024	mobilność zagraniczna w ramach programu Erasmus+
	Uniwersytet Mendla w Lednicach: "Sustainable Horticulture
	of the 21st century ('From theory to practice')", Czechy
22.06.2024 - 26.07.2024	mobilność zagraniczna w ramach programu Erasmus+
	Samsun Ondokuz Mayıs University: "Blended Intensive
	Programme for Sustainable Agriculture", Samsun, Turcja
10.02.2025 - 21.02.2025	krajowy staż naukowy
	Katedra Fizjologii Roślin i Biofizyki,
	Wydział Biologii i Biotechnologii,
	Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

### Nagrody i wyróżnienia

- wyróżniająca się praca inżynierska: "Wpływ zasolenia jako elicytora abiotycznego na zawartość wybranych związków fenolowych, zdolność antyoksydacyjną i parametry fizjologiczne *Melissa officinalis* L."
- wyróżniająca się praca magisterska: "Porównanie efektywności dwóch form chitozanu w elicytacji wybranych związków fenolowych u *Plectranthus amboinicus*"
- GRAND PRIX: Popularyzator społeczności edoktorant.pl oraz WYRÓŻNIENIE (drugie miejsce): artykuł popularnonaukowy (dziedzina nauk ścisłych i przyrodniczych + dziedzina nauk weterynaryjnych)
- 4) wyróżnienie podczas konferencji: Outstanding oral presentation award during 3rd International PhD Student's Conference at the University of Life Sciences in Lublin ENVIRONMENT-PLANT-ANIMAL-PRODUCT, presentation entitled: "Foliar application of elicitors as an approach to improve secondary metabolism in *Hypericum perforatum* L."
- 5) wyróżnienie podczas konferencji: 1st Award in the best short talk competition at XXIX Conference "New Aspects on chemistry and application of chitin and its derivatives"; presentation entitled: "Differentiated metabolic response of lemon balm and St. John's Wort to the foliar application of chitosan"

## Aktywność publikacyjna

- Hawrylak-Nowak B., Dresler S., Stasińska-Jakubas M., Wójciak M., Sowa I., Matraszek-Gawron R. 2021. NaCl-induced elicitation alters physiology and increases accumulation of phenolic compounds in *Melissa officinalis* L. International Journal of Molecular Sciences 22(13), 6844.
- Stasińska-Jakubas M., Hawrylak-Nowak B. 2022. Protective, biostimulating, and eliciting effects of chitosan and its derivatives on crop plants. Molecules 27, 2801.
- Stasińska-Jakubas M., Hawrylak-Nowak B., Wójciak M., Dresler S. 2023. Comparative effects of two forms of chitosan on selected phytochemical properties of *Plectranthus amboinicus* (Lour.). Molecules 28(1), 376.
- 4) Stasińska-Jakubas M., Hawrylak-Nowak B., Dresler S., Wójciak M., Rubinowska K. 2023. Application of chitosan lactate, selenite, and salicylic acid as an approach to induce biological responses and enhance secondary metabolism in *Melissa officinalis* L. Industrial Crops and Products 205, 117571.
- 5) Stasińska-Jakubas M., Dresler S., Strzemski M., Rubinowska K., Hawrylak-Nowak B. 2024. Differentiated response of *Hypericum perforatum* to foliar application of selected metabolic modulators: Elicitation potential of chitosan, selenium, and salicylic acid mediated by redox imbalance. Phytochemistry 227, 114231.
- Hawrylak-Nowak B., Stasińska-Jakubas M. 2025. Chitozan jako wielofunkcyjny składnik preparatów kosmetycznych oraz kosmeceutycznych. W: "Surowce naturalne w farmakologii i kosmetologii", Denisow B., Chwil M. (red.), Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, Lublin (w trakcie procesu wydawniczego).

## Udział w konferencjach naukowych

#### Referaty wygłoszone na konferencjach międzynarodowych

 Stasińska-Jakubas M., Hawrylak-Nowak B. Foliar application of elicitors as an approach to improve secondary metabolism in *Hypericum perforatum* L. 3rd International PhD Student's Conference at the University of Life Sciences in Lublin ENVIRONMENT-PLANT-ANIMAL-PRODUCT, 24-26.04.2024, Lublin, Polska.  Stasińska-Jakubas M., Hawrylak-Nowak B. 2024. Differentiated metabolic response of lemon balm and St. John's Wort to the foliar application of chitosan. XXIX Conference "New Aspects on chemistry and application of chitin and its derivatives", 18-20.09.2024, Olsztyn, Polska.

### Referaty wygłoszone na konferencjach krajowych

- Stasińska-Jakubas M., Hawrylak-Nowak B. 2022. "Wpływ chitozanu jako elicytora biotycznego na zawartość wybranych związków fenolowych u *Plectranthus amboinicus*", V Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Pierwotne i wtórne metabolity roślin i grzybów", 27.01.2022, Lublin.
- Stasińska-Jakubas M., Hawrylak-Nowak B. "Wpływ biofortyfikacji w selen na wybrane aspekty metabolizmu wtórnego roślin", V Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Rośliny w naukach medycznych i przyrodniczych", 27.05.2022, Lublin.
- Stasińska-Jakubas M., Hawrylak-Nowak B. Elicytacja jako metoda stymulowania akumulacji związków biologicznie aktywnych w melisie lekarskiej (*Melissa officinalis* L.). II Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Bioaktywne związki pochodzenia naturalnego", 09-10.10.2023, Trzebnica.
- Stasińska-Jakubas M., Hawrylak-Nowak B. Wpływ zasolenia jako elicytora abiotycznego na wybrane wskaźniki fitochemiczne *Melissa officinalis* L. III Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Pierwotne i wtórne metabolity roślin i grzybów", 15.12.2023, Lublin.

## Postery zaprezentowane na konferencjach międzynarodowych

- Stasińska-Jakubas M., Hawrylak-Nowak B. Chitosan as an effective elicitor of health-promoting plant secondary metabolites. 1st International PhD Student's Conference at the University of Life Sciences in Lublin, Poland: ENVIRONMENT-PLANT-ANIMAL-PRODUCT, 26.04.2022, Lublin, Polska.
- 2) Stasińska-Jakubas M., Hawrylak-Nowak B. Improving the phytochemical properties of *Melissa officinalis* L. by elicitation. 2nd International PhD Student's Conference at the University of Life Sciences in Lublin ENVIRONMENT-PLANT-ANIMAL-PRODUCT, 19-20.04.2023, Lublin, Polska.

3) Stasińska-Jakubas M., Hawrylak-Nowak B. Metabolic response of *Melissa officinalis* and *Hypericum perforatum* to the foliar application of salicylic acid. 4th International PhD Students' Conference: ENVIRONMENT-PLANT-ANIMAL-PRODUCT together with the Information campaign on the Lublin Digital Union – digital solutions and artificial intelligence in medical, natural and technical sciences, 09.04.2025, Lublin, Polska.

## Postery zaprezentowane na konferencjach krajowych

- Stasińska-Jakubas M., Hawrylak-Nowak B. Chitozan jako wielofunkcyjny składnik preparatów kosmetycznych oraz kosmeceutycznych. II Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Naturalne surowce lecznicze i kosmetyczne", 18-19.03.2025, Lublin (on-line).
- Stasińska-Jakubas M., Hawrylak-Nowak B. Wpływ doglebowej aplikacji modulatorów metabolicznych na akumulację metabolitów wtórnych u *Chelidonium majus* L. Konferencja Naukowa "Wyzwania współczesnego ogrodnictwa", 04-06.06.2025, Lublin, Polska.

## Aktywność popularyzatorska

- udział w XVIII edycji Lubelskiego Festiwalu Nauki; współprowadzenie warsztatów laboratoryjnych: "Kolorowy świat roślin – barwniki roślinne", 16.09.2023, Lublin
- 2) współprowadzenie warsztatów praktycznych: "Znaczenie zjawisk osmotycznych dla organizmów żywych – od teorii do praktyki" organizowanych przez pracowników Zakładu Fizjologii i Biochemii Roślin dla uczniów Katolickiego Liceum Ogólnokształcącego im. C. K. Norwida w Garwolinie, 09.02.2023, Lublin
- udział w XIX edycji Lubelskiego Festiwalu Nauki; prowadzenie warsztatów laboratoryjnych: "Znaczenie zjawisk osmotycznych dla organizmów żywych – od teorii do praktyki", 19.09.2023, Lublin
- prowadzenie warsztatów laboratoryjnych na temat barwników roślinnych dla uczniów z klasy III o profilu biologiczno-chemicznym, uczęszczających do II LO im. Krzysztofa Kamila Baczyńskiego w Świdniku, 15.02.2024, Lublin

- udział w XX edycji Lubelskiego Festiwalu Nauki, prowadzenie warsztatów laboratoryjnych: "Znaczenie zjawisk osmotycznych dla organizmów żywych – od teorii do praktyki", 17.09.2024, Lublin
- 6) udział w XIV edycji Nocy Biologów, prowadzenie warsztatów laboratoryjnych:
  "Znaczenie zjawisk osmotycznych dla organizmów żywych od teorii do praktyki", 10.01.2025, Lublin
- 7) prowadzenie warsztatów laboratoryjnych na temat wpływu czynników środowiskowych na proces fotosyntezy dla uczniów V Liceum Ogólnokształcącego im. Marii Skłodowskiej- Curie, 23.05.2025, Lublin

## Aktywność organizacyjna

- członek komitetu organizacyjnego 2nd International PhD Student's Conference at the University of Life Sciences in Lublin ENVIRONMENT-PLANT-ANIMAL-PRODUCT, 19-20.04.2023, Lublin, Polska
- członek komitetu organizacyjnego 3rd International PhD Student's Conference at the University of Life Sciences in Lublin ENVIRONMENT-PLANT-ANIMAL-PRODUCT, 24-26.04.2024, Lublin, Polska
- członek komitetu organizacyjnego II Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej "Naturalne surowce lecznicze i kosmetyczne", 18-19.03.2025, Lublin (on-line)
- 4) członek komitetu organizacyjnego 4th International PhD Students' Conference ENVIRONMENT-PLANT-ANIMAL-PRODUCT together with the Information campaign on the Lublin Digital Union – digital solutions and artificial intelligence in medical, natural and technical sciences, 09.04.2025, Lublin, Polska
- członek Rady Samorządu Doktorantów Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie w roku akademickim 2023/2024 oraz 2024/2025
- 6) przedstawiciel doktorantów z Wydziału Biologii Środowiskowej w Komisji
  Dyscyplinarnej dla Doktorantów w roku akademickim 2024/2025

## Członkostwo w towarzystwach naukowych

1) członek nadzwyczajny Polskiego Towarzystwa Chitynowego (od 2024 r.)

# Wskaźniki bibliometryczne na dzień 02.06.2025 r. według bazy Scopus

Liczba prac indeksowanych w bazie: 5 Liczba cytowań opublikowanych prac: 120 Liczba cytowań opublikowanych prac bez autocytowań: 114 Indeks Hirscha: 3