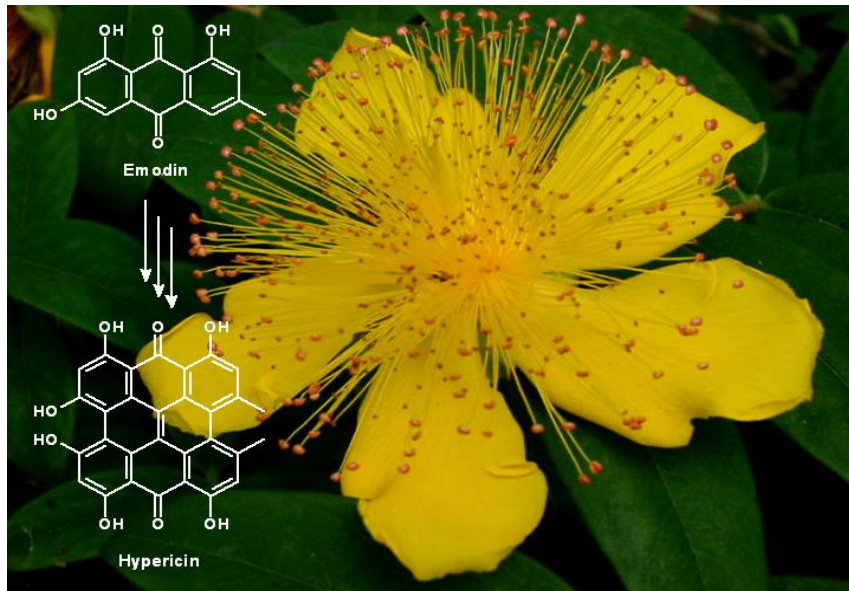


**Πανεπιστήμιο Κρήτης  
Σχολή Θετικών Επιστημών  
Τμήμα Βιολογίας**

«ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ – ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ  
ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ

**Ποιοτικός και ποσοτικός χαρακτηρισμός υπερικινών από άγριους  
πληθυσμούς ειδών του γένους *Hypericum* στην Κρήτη σε σχέση με  
την ανάπτυξη τους και την υψομετρική διαβάθμιση**



**Μεταπτυχιακή Εργασία**

**Μαρίνα Ξενοφώντος**

Επιβλέπων: Αν. Καθ. Κυριάκος Κοτζαμπάσης  
Εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογία  
(Σε συνεργασία με το Τμήμα Βοτανικής του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας)

Δεύτερος επιβλέπων: PD Dr. Dieter Dörnemann (Πανεπιστήμιο Marburg,  
Γερμανία)

**Ηράκλειο 2005**

Εισαγωγή .....	2
1. Το γένος <i>Hypericum</i> .....	2
1.1 <i>Hypericum perforatum</i> .....	3
1.2 <i>Hypericum perforatum</i> .....	4
1.3 <i>Hypericum triquetrifolium</i> .....	5
1.4 <i>Hypericum empetrifolium</i> .....	6
2. Υπερικίνες.....	7
2.1 Ιστολογικός εντοπισμός υπερικινών .....	9
2.2 Λειτουργία Υπερικινών .....	11
2.3 Ιατρικές ιδιότητες των υπερικινών .....	12
2.4 Μεταβλητότητα της Υπερικίνης.....	13
Υλικά και μέθοδοι.....	18
1. Φυτικό υλικό .....	18
2. Εκχύλιση Υπερικινών .....	19
3. HPLC - Χρωματογραφική ανάλυση υπερικινών .....	20
4. Ποσοτικός προσδιορισμός των υπερικινών .....	21
5. Στατιστική ανάλυση.....	21
Αποτελέσματα.....	22
1. Χρωματογραφία – Ποσοτικός και Ποιοτικός έλεγχος Υπερικινών.....	22
1.1 HPLC .....	22
1.2 Πρότυπες καμπύλες .....	23
1.3 <i>Hypericum species</i> .....	24
1.3.1 <i>Hypericum empetrifolium</i> .....	24
1.3.2 <i>Hypericum perforatum</i> .....	32
1.3.3 <i>Hypericum triquetrifolium</i> .....	38
1.3.4 <i>Hypericum perforatum</i> .....	46
1.4 Συγκεντρώσεις υπερικινών σε επίπεδο φυτού .....	54
Συζήτηση.....	65
Βιβλιογραφία .....	71

# Εισαγωγή

## 1. Το γένος *Hypericum*

Το γένος *Hypericum* ανήκει στην ομοταξία *Guttiferae*, τάξη *Guttiferales*, οικογένεια *Hypericaceae*, υποοικογένεια *Hypericoidea*. Περιλαμβάνει περισσότερα από 450 είδη (Robson, 2001). Τα φυτά του γένους *Hypericum* είναι ετήσια ή πολυετή, βότανα ή θάμνοι με χαρακτηριστικά χρυσοκίτρινα ερμαφρόδιτα άνθη. Διαθέτουν διαφανείς αδένες με αιθέρια έλαια και μερικές φορές κόκκινους αδένες που περιέχουν υπερικίνες.

Αξιοσημείωτη είναι η ευρεία κατανομή του γένους και στα δύο ημισφαίρια, όπου απαντάται σε ζεστές εύκρατες, σε υπο-τροπικές και σε ορεινές τροπικές περιοχές. Οι πληθυσμοί του φύονται σε ποικίλα ενδιαιτήματα, από απότομες βραχώδεις παραθαλάσσιες πλαγιές μέχρι υγροβιότοπους, καθώς επίσης και κοντά σε καλλιέργειες.

Το γένος *Hypericum* είναι ευρέως εξαπλωμένο στην Ευρώπη και την Ασία. Στη Μεσόγειο παρατηρούνται διάσπαρτοι πληθυσμοί με αντιπροσωπευτικότερο είδος το *H.perforatum*, το οποίο έχει ευρέως ερευνηθεί για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες. Στην Ελλάδα έχουν καταγραφεί συνολικά 32 είδη (Πιπερόπουλος, 1997) και στην Κρήτη 12, εκ των οποίων 5 είναι ενδημικά. Τα είδη αυτά διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη μορφολογία των διαφόρων τμημάτων του φυτού (βλαστός, άνθη, φύλλα) και παρουσιάζουν σημαντικές γενετικές διαφορές (Robson, 1986) καθώς παρατηρούνται και διαφοροποιήσεις στα επιμέρους αναπτυξιακά και οντογενετικά στάδια του φυτού.

Τα είδη που βρίσκονται στην Κρήτη έχουν ευρεία κατανομή και είναι τα ακόλουθα: *H.perforatum*, *H.perfoliatum*, *H.triquentrifolium*, *H.empetrifolium*, *H.aegypticum*, *H.hircinum*, *H.jovis* (ενδημικό), *H.aciferum* (ενδημικό), *H.amblycalyx* (ενδημικό), *H.kelleri* (ενδημικό) και *H.trichocaulon* (ενδημικό). Προκαταρκτικές μελέτες για την παρουσία υπερικινών διενεργήθηκαν σε επτά από τα είδη του γένους *Hypericum* που απαντώνται στην Κρήτη (Πίνακας 1). Τα είδη που μελετήθηκαν είναι: *H.perforatum*, *H.perfoliatum*, *H.triquentrifolium*, *H.empetrifolium*, *H.aegypticum*, *H.jovis* (ενδημικό), *H.amblycalyx* (ενδημικό) (Σταυρόπουλος, Η. 2004).

Πίνακας 1. Γεωγραφική κατανομή του γένους *Hypericum* στην Κρήτη – Επίπεδα υπερικινών (±) υψηλά/χαμηλά

<i>Είδος</i>	<i>Περιοχή</i>	<i>Κατάσταση</i>	<i>Υπερικίνες</i>
<i>H. perforatum</i>	Δυτικά, Κεντρικά	Αυτοφυές	+
<i>H. perfoliatum</i>	Δυτικά, Κεντρικά, Ανατολικά	Αυτοφυές	+
<i>H. triquentrifolium</i>	Δυτικά, Κεντρικά, Ανατολικά	Αυτοφυές	+
<i>H. empetrifolium</i>	Δυτικά, Κεντρικά, Ανατολικά	Αυτοφυές	+
<i>H. jovis</i>	Κεντρικά	Ενδημικό	-
<i>H. aegypticum</i>	Δυτικά, Ανατολικά	Αυτοφυές	-
<i>H. amblycalyx</i>	Ανατολικά	Ενδημικό	-

Οι υπερικίνες απαντώνται αποκλειστικά σε κάποια από τα είδη του γένους *Hypericum* (Πίνακας 1). Η παρούσα μελέτη εστιάστηκε στα είδη *H.perforatum*, *H.perfoliatum*, *H.triquentrifolium*, και *H.empetrifolium*, όπου τα επίπεδα της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης που παρατηρήθηκαν ήταν αρκετά υψηλά σε σύγκριση με τα υπόλοιπα.

### 1.1 *Hypericum perforatum*

Το *Hypericum perforatum* είναι ποώδες πολυετές φυτό, ύψους συνήθως 10-110 cm. Το στέλεχος (βλαστός) του φυτού είναι όρθιο, κυλινδρικό, πολύκλαδο, με μικρά επιμήκη έως ωοειδή φύλλα που φέρουν διαφανείς αδένες και διατάσσονται αντιτακτά. Τα άνθη του είναι αμφιγονικά, χρυσοκίτρινα, διαμέτρου 18-22 mm., ακτινόμορφα, συνήθως πενταμερή, σε ταξιανθίες φόβης (Burnie, 1995). Τα σέπαλα είναι στενά, πολύ μικρότερα των πετάλων και συχνά φέρουν στην επιφάνειά τους πόρους ή αδένες (με τη μορφή μαύρων στιγμάτων) που περιέχουν πλήθος δευτερογενών μεταβολιτών. Οι στήμονες είναι πολυάριθμοι (σπάνια λιγότεροι από 10) και τοποθετημένοι σε 3 ή 5 δέσμες. Τα καρπόφυλλα είναι συμφυή 3 ή 5 και η ωοθήκη επιφυής, τρίχωρη ή πεντάχωρη με πολλές σπερματικές βλάστες. Ο καρπός είναι τύπου κάψας (Wilson et al., 1993). Σύμφωνα με τις περισσότερες βιβλιογραφικές αναφορές, η περίοδος άνθησης εκτείνεται από τον Ιούνιο έως το Ιούλιο. Συνήθως το

υπέργειο τμήμα του φυτού συλλέγεται, όταν το φυτό βρίσκεται σε πλήρη άνθιση (από Ιούλιο έως Αύγουστο).

Το *Hypericum perforatum* αφθονεί σε ξηρούς κυρίως βιότοπους, καλλιεργούμενα εδάφη, λόφους, κοντά σε θάμνους, στις άκρες των δρόμων και στα όρια των δασών κοντά σε ρυάκια. Η γεωγραφική του εξάπλωση εντοπίζεται σ' όλη την Ευρώπη, τη δυτική Ασία και τη βόρειο Αφρική, αν και θεωρείται κοσμοπολίτικο είδος. Το φυτό καλλιεργείται τα τελευταία χρόνια στην Ευρώπη, στη νότια και βόρεια Αμερική, στην Αυστραλία και την Κίνα και μελετάται κυρίως για τις βιολογικές του δράσεις στην ιατρική και τη δυνατότητα αξιοποίησης του ως φαρμακευτικό είδος.



Εικόνα 1. Άνθος, βλαστός και ολόκληρο το φυτό *H.perforatum*

## 1.2 *Hypericum perforatum*

Το *H. Perfoliatum* είναι ένα πολυετές βότανο ύψους 15-80 cm, σχεδόν πάντα με λείο βλαστό και φέρει μαύρους αδένες στα φύλλα, σέπαλα, πέταλα και ανθήρες. Το στέλεχος (βλαστός) του φυτού είναι όρθιο, κυλινδρικό, με μεγάλα τριγωνικά-λογχοειδή έως ωοειδή φύλλα που φέρουν διαφανείς αδένες και διατάσσονται αντιτακτά. Τα άνθη του είναι αμφιγονικά, χρυσοκίτρινα με κόκκινη-χρoιά, διαμέτρου 9-14 mm., ακτινόμορφα, με διαφανή στίγματα, γραμμωτούς υποεπιφανειακούς αδένες. Οι στήμονες είναι πολυάριθμοι, μήκους 6-9 mm και ανθήρες μήκους 4-7 mm. Τα καρπόφυλλα είναι συμφυή 3 ή 5 και η ωοθήκη επιφυής, τρίχωρη ή πεντάχωρη με πολλές σπερματικές βλάστες. Ο καρπός είναι τύπου κάψας επιμήκης (Wilson et al., 1993). Το είδος εξαπλώνεται στις θερμές εύκρατες περιοχές σε όλο τον κόσμο, με

έντονη παρουσία στο χώρο της Μεσογείου και της Μέσης Ανατολής. Φύεται συνήθως σε σκιερά ενδιαιτήματα (π.χ. μεταξύ των βράχων). Σύμφωνα με τις περισσότερες βιβλιογραφικές αναφορές, η περίοδος άνθησης εκτείνεται από τον Απρίλιο έως τον Ιούνιο.



Εικόνα 2. Φύλλα και άνθη του είδους *H.perfoliatum*.

### **1.3 *Hypericum triquetrifolium***

Το *H. triquetrifolium* είναι ένα πολυετές βότανο ύψους 15-55 cm, με χαρακτηριστική πλατιά ταξιανθία. Έχει λείο βλαστό με υποεπιφανειακούς και μερικές φορές επιφανειακούς μαύρους αδένες, οι οποίοι επίσης απαντώνται στους μίσχους των φύλλων, στους ανθήρες και μερικές φορές στα σέπαλα και πέταλα (Robson, 1986). Το στέλεχος (βλαστός) του φυτού είναι όρθιο, κυλινδρικό, με διακλάδωση που σχηματίζει πυραμίδα, με μικρά τριγωνικά-λογχοειδή έως στενά-ωοειδή φύλλα που φέρουν διαφανείς αδένες και διατάσσονται αντιακτά. Τα άνθη είναι πολυάριθμα αμφιγονικά, χρυσοκίτρινα, διαμέτρου 5-7 mm., ακτινόμορφα, συνήθως πενταμερή. Οι στήμονες είναι πολυάριθμοι, μήκους 2,5-5 mm και ανθήρες μήκους 1,5-2 mm που φέρουν μαύρους αδένες. Τα σέπαλα είναι στενά, πολύ μικρότερα των πετάλων και δεν φέρουν στην επιφάνεια πόρους ή αδένες. Ο καρπός είναι ωώδεις τύπου κάψας. Το είδος εξαπλώνεται στις θερμές εύκρατες περιοχές σε

όλο τον κόσμο, με έντονη παρουσία στο χώρο της Μεσογείου και της Μέσης Ανατολής. Φύεται συνήθως σε ξηρά, βραχώδη ενδιαιτήματα και κατά μήκος καλλιεργούμενων εκτάσεων. Σύμφωνα με τις περισσότερες βιβλιογραφικές αναφορές, η περίοδος άνθησης εκτείνεται από τον Μάιο έως το Σεπτέμβριο.

#### **1.4 *Hypericum empetrifolium***

Το *H. empetrifolium* είναι πολυετής θάμνος που φθάνει σε ύψος 10-60 cm, με μίσχους και φύλλα σαν σπείρες με μαύρους περιθωριακούς αδένες. Τα άνθη είναι κίτρινα και μερικές φορές έχουν κόκκινη-χρoιά, φέρουν διαφανείς αδενικές γραμμώσεις και μερικές φορές στίγματα. Οι στήμονες είναι πολυάριθμοι, μήκους 4-8 mm και ανθήρες και που φέρουν πορτοκαλιούς αδένες. Ο καρπός είναι ωώδεις τύπου κάψας. Το φύλλωμά του παρουσιάζει χαρακτηριστικές προσαρμογές στο μεσογειακό κλίμα, έχει γυριστά άκρα, για να προστατεύονται από την ξηρασία. Αναπτύσσεται σε ενδιαιτήματα με φρύγανα, βραχώδεις περιοχές, ενώ η κατανομή του εμφανίζει ευρεία υψομετρική διαβάθμιση (200-1200 m), με πληθυσμιακή πυκνότητα στα χαμηλά υψόμετρα αλλά και στην αλπική ζώνη. Στην Κρήτη είναι ευρέως κατανεμημένο με υψομετρική διαβάθμιση από 0-1500 m. Το είδος εξαπλώνεται στις θερμές εύκρατες περιοχές σε όλο τον κόσμο, με έντονη παρουσία στο χώρο της Μεσογείου και της Μέσης Ανατολής. Σύμφωνα με τις περισσότερες βιβλιογραφικές αναφορές, η περίοδος άνθησης εκτείνεται από τον Απρίλιο έως το Ιούνιο.



Εικόνα 3. Ολόκληρο το φυτό και άνθος του είδους *H.empetrifolium*

## 2. Υπερικίνες

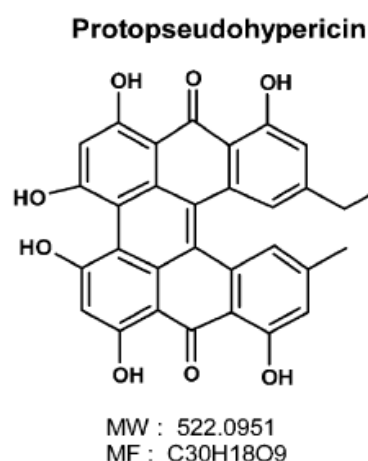
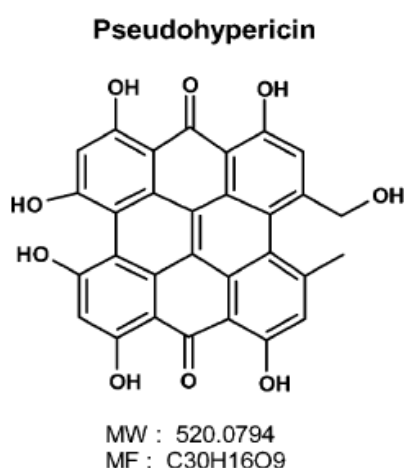
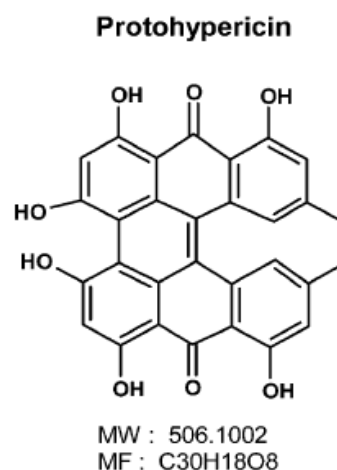
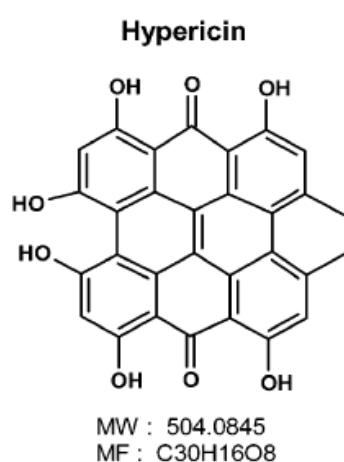
Οι σημαντικότεροι δευτερογενείς μεταβολίτες στο γένος *Hypericum* είναι οι υπερικίνες (hypericin) και οι ψευδοϋπερικίνες (pseudohypericin), οι οποίες είναι κόκκινες χρωστικές ουσίες. Οι υπερικίνες είναι πολυκυκλικές οργανικές ενώσεις (dianthraquinones) (Εικόνες 4 και 5) και απομονώνονται από διάφορα είδη του γένους *Hypericum*. Ο μοριακός τύπος τους είναι  $C_{30}H_{16}O_8$  (M.B. 504.0845) και το πλήρες χημικό τους όνομα εξαϋδροξύλιο (Hexahydroxyl-2,2') διμεθυλνοαφθοδιανθρόνη (Dimethylnaphthodianthrone 4,5,7,4',5',7'). Οι υπερικίνες είναι διαλυτές σε DMSO, μεθανόλη, αιθανόλη, pyridine, acetonitril και αλκαλικά υδατικά διαλύματα. Σε γενικές γραμμές απορροφούν στο ορατό, αλλά οι ακριβείς οπτικές τους ιδιότητες ποικίλουν ανάλογα με το διαλύτη. Η μέγιστη απορρόφηση εμφανίζεται στα 590 nm όταν διαλύεται σε διμεθυλοξείδιο του θείου (dimethyl sulfoxide) (DMSO), που είναι ο πιο συνιστώμενος διαλύτης, και ο μέγιστος φθορισμός περίπου στα 600nm. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των συνολικών υπερικινών γίνεται φασματομετρικά (Cellarova et al. 1994), ενώ η απομόνωση και ο προσδιορισμός των επιμέρους συστατικών (πρωτοψευδοϋπερικίνη, ψευδοϋπερικίνη, πρωτοϋπερικίνη και υπερικίνη) γίνεται με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσεως HPLC (Buter et al., 1998).

Οι ψευδοϋπερικίνες διαφέρουν από της υπερικίνες σε ένα άτομο άνθρακα, όπου μια ομάδα υδροξύλιου αντικαθιστά ένα άτομο υδρογόνου, καθιστώντας την ένωση ελαφρώς πιο πολική. Σε εκχυλίσματα των φυτών του γένους περιέχονται οι άμεσες πρόδρομες ενώσεις πρωτοϋπερικίνη (protohypericin) και πρωτοψευδοϋπερικίνη (protopseudohypericin), οι οποίες μετατρέπονται σε υπερικίνες και ψευδοϋπερικίνες αντίστοιχα. Η βιοσύνθεση της υπερικίνης περιλαμβάνει την αρχική συμπύκνωση του emodine και anthrone emodine, ακολουθούμενη από αφυδάτωση για να διαμορφώσει την ένωση dianthrone emodine, η οποία ακολούθως υποβάλλεται σε διαδοχικές φαινολικές οξειδώσεις (Osmark et al., 1998).

Οι υπερικίνες και ψευδοϋπερικίνες παράγονται από emodinanthrone, πιθανώς μέσω της οξείδωσης φαινολών που οξειδώνεται περαιτέρω στις υπερικίνες (Briskin, 2000). Υπάρχουν επίσης σε μορφές προδρόμων ουσιών, σαν πρωτοϋπερικίνες και πρωτοψευδοϋπερικίνες, οι οποίες υπό την επίδραση ακτινοβολίας φωτός ορατού φάσματος μετατρέπονται πολύ αποτελεσματικά σε υπερικίνες και ψευδοϋπερικίνες, αντίστοιχα.



Οι υπερικίνες απαντώνται αποκλειστικά στα είδη του γένους *Hypericum* (Κίτανον, 2001) και ως εκ τούτου αποτελούν σημαντικό παράγοντα στην συστηματική βοτανική (ταξινόμηση φυτών). Επίσης προσδίδουν φαρμακευτικές ιδιότητες στο φυτό και λειτουργούν ως αμυντικοί προστατευτικοί παράγοντες απέναντι στους φυτικούς οργανισμούς (Robson, 1977).



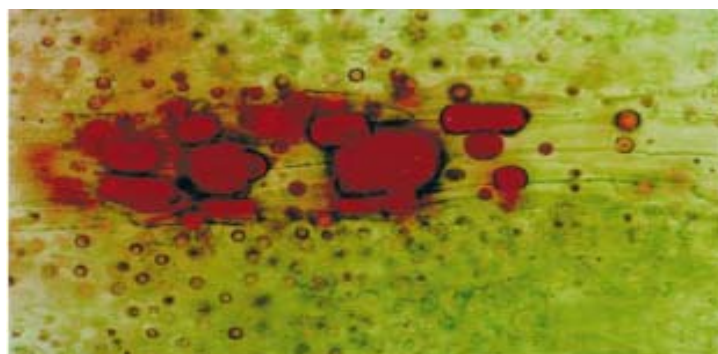
Εικόνες 4 και 5. Μοριακή δομή των τεσσάρων ναφθοδιαθρόνων και των πρόδρομων ενώσεών τους: (4) υπερικίνη (A, R=CH<sub>3</sub>), και πρωτοϋπερικίνη (5) ψευδοϋπερικίνη (A, R=CH<sub>2</sub>OH) πρωτοψευδοϋπερικίνη.

Ένα σημαντικό στοιχείο στην εξέλιξη των φυτών (και όχι μόνο) είναι η ικανότητα επιβίωσης τους σε πολυάριθμες προκλήσεις από το περιβάλλον και από άλλους οργανισμούς. Τα φυτά παράγουν ένα εντυπωσιακά ευρύ φάσμα χημικών ουσιών, μερικές εκ των οποίων ταξινομήθηκαν ως δευτερεύοντες μεταβολίτες και καθορίζονται από γενετικούς παράγοντες, οι οποίοι ρυθμίζονται από το αναπτυξιακό στάδιο των φυτών και από το περιβάλλον τους (Ellis 1997).

## 2.1 Ιστολογικός εντοπισμός υπερικίνων

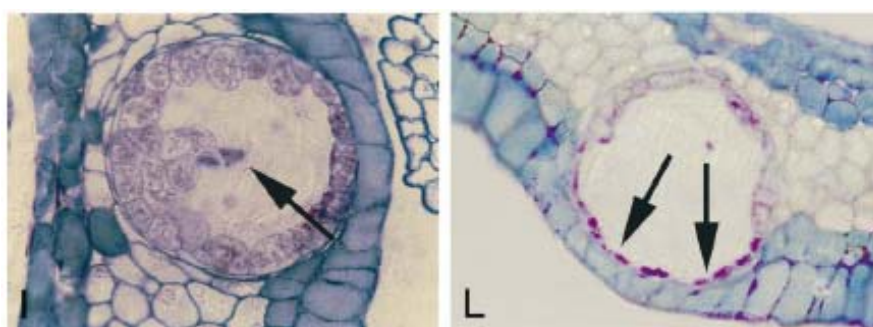
Το γένος *Hypericum* χαρακτηρίζεται από την παρουσία διαφορετικών τύπων εκκριτικών δομών συμπεριλαμβανομένων των διαφανών αδένων, των μαύρων κονδύλων και των εκκριτικών καναλιών (Baroni et al, 1998; Ciccarelli et al., 2001). Όλες αυτές οι δομές δεν είναι παρούσες σε όλα τα είδη του γένους (Ciccarelli et al., 2001), και η παρουσία ή/και η συχνότητα τους ποικίλλουν μεταξύ των οργάνων των φυτών (Robson, 1981).

Οι εκκριτικές δομές, που είναι περιοχές της σύνθεσης ή/και της συσσώρευσης των βιολογικά ενεργών ουσιών (υπερικίνων), είναι σημαντικές για τη διάκριση μεταξύ των ταξινομικών ομάδων (Robson, 1977, Piovani et al., 2004). Η παρουσία διαφορετικών εσωτερικών μορφών των εκκριτικών κοιλοτήτων ποικίλλει μορφολογικά και οντογενετικά. Η συχνότητα και η ποικιλομορφία τους είναι στοιχεία της έντονης εκκριτικής δραστηριότητας των ειδών. Οι σφαιροειδείς διαφανείς αδένες είναι χαρακτηριστικό των φύλλων, κάνοντας αυτά τα όργανα να φαίνονται διάτρητα. Στα σέπαλα και τα πέταλα υπάρχουν στενόμακροι διαφανείς αδένες, εν τούτοις λιγότεροι απ' ό,τι στα φύλλα. Η υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη, εμφανίζεται στους μαύρους αδένες, που αναφέρονται ως μαύροι κόνδυλοι (Εικόνα 6). Αυτοί οι αδένες βρίσκονται κυρίως στους στήμονες τα σέπαλα και τα πέταλα των λουλουδιών (Piovani, 2004), καθώς επίσης και στα φύλλα/βλαστούς (Baroni et al., 1998). Η παρουσία των μαύρων αδένων σε ένα όργανο θεωρείται ακριβής δείκτης της παρουσίας της υπερικίνης και πιθανώς και της ψευδοϋπερικίνης (Robson, 1981).



Εικόνα 6. (Ciccarelli et al., 2001) Διαφανείς αδένες εκκριτικά κανάλια από το είδος *H.perforatum* (εγκάρσια τομή νεαρών πετάλων).

Στο *H. perforatum* είναι χαρακτηριστική η παρουσία διαφορετικών τύπων εσωτερικών εκκριτικών κοιλιοτήτων: διαφανείς αδένες και τρεις τύποι διαφορετικών εκκριτικών καναλιών με διαφορετικές μορφές οντογένεσης. Η συχνότητα και η ποικιλομορφία αυτών των εκκριτικών δομών είναι στοιχεία της έντονης εκκριτικής δραστηριότητας των ειδών. Η κατανομή των διαφανών αδένων και των εκκριτικών καναλιών ποικίλει μεταξύ των διαφορετικών οργάνων και δεν εμφανίζονται πάντα την ίδια περίοδο (Ciccarelli et al., 2001).



Εικόνα 7. (Ciccarelli et al., 2001) Διαφανείς αδένες και εκκριτικά κανάλια του είδους *Hypericum perforatum* L.

Το μέγεθος, ο αριθμός και το χημικό περιεχόμενο τέτοιων αδενικών δομών (glandular) (Εικόνα 7) στα φυτά μπορούν να επηρεαστούν από ποικίλους περιβαλλοντικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένης της διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών, της ποιότητας του φωτός καθώς και της έντασης του φωτισμού (Poutaraud et al., 2001). Οι Briskin και Gawienowski (2001) μελέτησαν τις επιδράσεις διαφορετικών επιπέδων φωτισμού στη φυτοχημική παραγωγή υπερικίνης στο *H. perforatum*, ρυθμίζοντας την ένταση του φωτός μεταξύ 100 και 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι η αύξηση της έντασης του φωτός αύξησε τη βιομάζα των βλαστών και τον αριθμό των αδένων στα φύλλα. Ως εκ τούτου, η αυξανόμενη ένταση του φωτισμού οδήγησε επίσης σε αύξηση των επιπέδων της υπερικίνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ειδικότερα, αύξηση της έντασης του φωτός οδήγησε σε αύξηση της υπερικίνης στα φύλλα, πιθανώς λόγω της αυξανόμενης ποσότητας άνθρακα που είναι διαθέσιμη για τη βιοσύνθεση αυτών των ουσιών.

## 2.2 Λειτουργία Υπερικινών

Η λειτουργία των υπερικινών στο γένος *Hypericum* δεν είναι πλήρως κατανοητή. Ίσως λειτουργούν ως αλλοχημικές ουσίες (allochemicals), αποτρεπτικοί διεγέρτες, οι οποίοι συμβάλουν στο αμυντικό σύστημα των φυτών για την αντιμετώπιση των ξενιστών εντόμων και άλλων παράσιτων. Η άποψη αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι μόνο ελάχιστα έντομα έχουν αναπτύξει συμπεριφορές προσαρμογής, σε φυσικές, ή βιοχημικές ουσίες που τους επιτρέπουν να τρέφονται με την υπερικίνη (Giese 1980). Ο εντοπισμός των υπερικινών σε αδένες θεωρείται ότι έχει αναπτυχθεί προκειμένου να αποφύγει το φυτό πιθανή αυτοτοξικότητα (Ciccarelli et al., 2001), δεδομένου ότι πρόκειται για φωτοτοξικές ουσίες, των οποίων επιπλέον η σύσταση ανταποκρίνεται σε αυτή των ουσιών που συμμετέχουν στον χημικό αμυντικό μηχανισμό των φυτών, για την προστασία τους απέναντι σε φυτοφάγους οργανισμούς και τα παθογόνα φυτών (Sirvent et al., 2002).

Οι Sirvent και Gibson (2002) προκειμένου να καθορίσουν εάν οι υπερικίνες μπορούν να συμπεριληφθούν ως συστατικά μιας επαγόμενης αμυντικής προσαρμογής των φυτών μελέτησαν τις επιδράσεις εξωγενών προστιθέμενων χημικών επαγωγέων (elicitors), των σαλικικών οξέων (salicylic οξύ) (SA) και του μεθυλικού εστέρα (jasmonate) (Me<sub>j</sub>A, jasmonate methyl ester) (Me<sub>j</sub>A, jasmonate) στην παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών στο *H.perforatum*. Επίσης μελέτησαν την επίδραση του παθογόνου μύκητα *Colletotrichum gloeosporioides*, ο οποίος προκαλεί την ασθένεια της ανθράκωσης σε πολλά φυτά, ως βιοτικού διεγέρτη (elicitor). Τα αποτελέσματα τους έδειξαν ότι οι βλαστοί του *H.perforatum* που εκτέθηκαν σε Me<sub>j</sub>A και SA, όσο και ο φυτικός ιστός που προσβλήθηκε από τα σπόρια *C.gloeosporioides* παράγαγαν υψηλότερα επίπεδα υπερικίνης συγκριτικά με τα επίπεδα ελέγχου του *H.perforatum* στηρίζοντας την υπόθεση ότι οι υπερικίνες περιλαμβάνονται στον αμυντικό μηχανισμό των φυτών. Οι αυξήσεις της υπερικίνης σε περιβαλλοντικό στρες υποδηλώνουν ότι μερικά μόρια μετατοπιστήκαν στη βιοσύνθεση δευτερογενών χημικών ουσιών, και εντοπίζονται στο αμυντικό σύστημα των φυτών του είδους *H.perforatum*.

## 2.3 Ιατρικές ιδιότητες των υπερικινών

Το *Hypericum perforatum* L. χαρακτηρίζεται για τις βιολογικές του ιδιότητες, ιδίως των παραγώγων της υπερικίνης και χρησιμοποιείται στη παραδοσιακή ιατρική. Τα τελευταία χρόνια η φαρμακευτική χρήση της υπερικίνης διερευνήθηκε και σήμερα χρησιμοποιείται ως αντιϊική ουσία (Lavie et al., 1989), αντιμικροβιακή (Kirakosyan et al., 2004) και αντικαρκινική (Agonistis et al., 2002), ενώ αναδείχτηκε και η καταπραϋντική της δράση, και χρησιμοποιείται ως αντικαταθλιπτική ουσία (Lopez-Bazzocchi et al., 1991).

Το *H. perforatum*, είναι ευρέως γνωστό για τις φαρμακευτικές ιδιότητες που παρουσιάζει η υπερικίνη. Τα βιοχημικά συστατικά της υπερικίνης ελέγχονται ποιοτικά και ποσοτικά παγκοσμίως, όπου η υπερικίνη διερευνάται σε καλλιεργούμενα είδη καθώς επίσης και σε άγριους πληθυσμούς. Τα βιοχημικά συστατικά της υπερικίνης του *H.perforatum* ποικίλλουν πολύ τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά, επηρεάζοντας κατά συνέπεια την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια των προϊόντων που βασίζονται στο είδος. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην συστηματική διερεύνηση των ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτηριστικών της υπερικίνης, τόσο στο *H.perforatum* όσο και σε άλλα είδη του γένους *Hypericum*.

Οι υπερικίνες παρουσιάζουν φωτεινό φθορισμό, και έχουν ισχυρές φωτοαλλεργιογόνες ιδιότητες (Ehrenberg et al., 1998). Η βιολογική δράση των υπερικινών στο *H.perforatum* είναι πιθανώς αποτέλεσμα αυτών των φωτοδυναμικών τους ιδιοτήτων με αντιρετροϊκή ιοκτόνο και αντικαρκινική δράση (Redmond και Gamlin 1999), (Lavie et al., 1995).

Η φωτοδυναμική αντιογκολογική (αντικαρκινική) θεραπεία (antitumoural) (PDT) αποτελείται από μια συστηματική διαχείριση της φωτοαλλεργιογόνου δράσης της υπερικίνης σε όγκους (Agonistis et al 2002). Η ανακάλυψη της *in vitro* και *in vivo* αντιρετροϊκής δράσης των υπερικινών, έχει τεράστιο ενδιαφέρον κυρίως για τη δυνατότητα της στη θεραπεία του AIDS (ο HIV είναι ρετροϊός, δηλαδή RNA ιός με την ικανότητα να μεταγραφεί το RNA του σε DNA και να ενσωματώνεται έτσι στο πυρηνικό DNA των κυττάρων) (Agostinis et al., 2002).

## 2.4 Διαφοροποίηση στα επίπεδα των Υπερικινών

Η συγκέντρωση της υπερικίνης επηρεάζεται από βιοτικούς και αβιοτικούς και παράγοντες. Έτσι η συγκέντρωση των υπερικινών επηρεάζεται τόσο από το αναπτυξιακό στάδιο και τα μέρη του φυτού (φύλλο, μίσχος και άνθη), όσο και το χρόνο συγκομιδής καθώς και τις διαδικασίες ξήρανσης και αποθήκευσης τους. Άλλοι σημαντικοί βιοτικοί παράγοντες (πέραν του αναπτυξιακού σταδίου και του μέρους του φυτού) που έχουν αναφερθεί να επηρεάζουν τα επίπεδα υπερικίνης στα φυτά είναι ο βιότυπος τους, η γενετική ιδιοσυστασία τους, η ανάπτυξη σε σχέση με τις εποχές του έτους (phenology) (Maggi et al., 2004) και η έκθεση σε παθογόνα ή ζιζανιοκτόνα. Μεταξύ των αβιοτικών παραγόντων που επηρεάζουν τα επίπεδα της υπερικίνης περιλαμβάνονται η τοποθεσία ανάπτυξης των φυτών (Pieta et al. 2001; Constantine και Karchesy 1998), η έκθεση στο φωτισμό και η ποιότητα του φωτισμού (UV-B ακτινοβολία) (Routarauad, 2000), αυξημένα επίπεδα διοξειδίου του άνθρακα CO<sub>2</sub> (Zobayed et al., 2003), τα θρεπτικά συστατικά (Briskin και Gawienowski 2001), το στρες στην ξηρασία (Gray et al., 2003), τα τοξικά μέταλλα (Murch et al., 2002) και οι κλιματολογικές συνθήκες (Fox et al., 1999). Οι περισσότεροι από τους προαναφερθέντες παράγοντες, βιοτικοί και αβιοτικοί έχουν μελετηθεί ευρέως στο είδος *H.perforatum*.

Ο Gray et al., (2003) μελέτησαν την επίδραση της καταπόνησης της ξηρασίας στη συγκέντρωση των επιμέρους υπερικινών στα άνθη και φύλλα του είδους *H.perforatum* L. Η ξηρασία στα φυτά μπορεί να έχει αλληπάλλληλες επιπτώσεις στο περιεχόμενο των υπερικινών με διάφορους τρόπους. Η καταπόνηση του φυτού από ξηρασία έχει επιπτώσεις στην απόκτηση και τη κατανομή του άνθρακα, καθώς και στη λήψη των θρεπτικών συστατικών και τη μεταφορά τους. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι η εκτεταμένη περίοδος ξηρασίας ήταν ευεργετική στην αύξηση της συγκέντρωσης της υπερικίνης στα άνθη και τα φύλλα. Το είδος *H.perforatum* την περίοδο ξηρασίας στην διάρκεια της ανθοφορίας είχε αυξημένες συγκεντρώσεις υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης και στα δύο επιμέρους όργανα, άνθη και φύλλα. Η περίοδος της συγκομιδής είναι ο κυρίαρχος παράγοντας που καθορίζει τη φυτοχημική συγκέντρωση στα όργανα του *H. perforatum* L.

Έχει εξακριβωθεί ότι η καλλιέργεια του φυτού *H. perforatum* σε υψηλότερη ένταση φωτός οδηγεί σε αυξημένη συγκέντρωση υπερικίνης στα φύλλα (Briskin et

al., 2001). Οι Briskin et al., (2001), υπέθεσαν ότι η υψηλή φωτοσυνθετική δραστηριότητα σε συνθήκες υψηλής έντασης του φωτός οδηγεί σε αυξημένη αφομοίωση άνθρακα και ενισχύει τη συγκέντρωση της υπερικίνης στους ιστούς φύλλων. Μελέτες του φυτού σε καλλιέργεια *in vitro* έχουν δείξει ότι η φωτοσύνθεση είναι λιγότερο σημαντική από τη σακχαρόζη, αφού η δεύτερη είναι η σημαντικότερη πηγή άνθρακα που απαιτείται για τον μεταβολισμό (Mosaleeyanon et al., 2005).

Οι Briskin και Gawienowski (2001) μελέτησαν την επίδραση της μείωσης του αζώτου στο ριζικό σύστημα και της έντασης του φωτός στα επίπεδα υπερικίνης σε φύλλα του είδους *H.perforatum*. Αύξησαν τον τεχνητό φωτισμό στα φυτά και μείωσαν τις ποσότητες του αζώτου. Τα αποτελέσματα τους έδειξαν ότι με την αύξηση της έντασης του φωτός αυξήθηκε ο αριθμός αδένων και ακολούθως η περιεκτικότητα της υπερικίνης στα φύλλα. Η αύξηση της έντασης του φωτισμού στα φυτά οδήγησε σε μια συνεχή αύξηση στο επίπεδο υπερικίνης στα φύλλα. Η ένταση του φωτός ασκεί μια παράλληλη επίδραση επάνω στην ανάπτυξη/αύξηση των αδένων και του συνολικού επιπέδου των υπερικινών στο *H.perforatum*. Η επίδραση αυτή θα μπορούσε να ερμηνευθεί από την αύξηση του άνθρακα που είναι διαθέσιμος για τη βιοσύνθεση αυτών των ενώσεων. Επιπλέον, ο αυξανόμενος αριθμός των αδένων στα φύλλα θα μπορούσε να ερμηνευθεί ως μια πρόσθετη φωτομορφογενετική (photomorphogenic) επίδραση του φωτός στην ανάπτυξη των αδένων.

Οι Zobayed et al., (2005) μελέτησαν τη δυνατότητα αύξησης της συγκέντρωσης των υπερικινών και ψευδοϋπερικινών με την έκθεση των φυτών σε αυξημένα επίπεδα διοξειδίου του άνθρακα (CO<sub>2</sub>). Διαπίστωσαν, ότι η περιεκτικότητα της υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης ήταν χαμηλότερη στους ιστούς των φυτών με αυξημένο CO<sub>2</sub> απ' ότι σε αυτά που μελετήθηκαν κάτω από φυσικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι Zobayed και Saxena (2005) μελέτησαν ότι το είδος *H. perforatum* (σε ελεγχόμενο περιβάλλον) σε αυξανόμενα επίπεδα φωτοσυνθετικού μηχανισμού (net photosynthetic photon flux (PPF)) και αυξημένα επίπεδα του διοξειδίου του άνθρακα (CO<sub>2</sub> = 1500 μmol<sup>-1</sup>). Τα αποτελέσματα τους έδειξαν ότι και οι δύο περιβαλλοντικοί παράγοντες συμβάλουν σε αύξηση των επιπέδων της υπερικίνης. Επίσης, βρήκαν ότι τα επίπεδα της υπερικίνης σε βλαστούς/φύλλα συνδέονται άμεσα με τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Σε αντίθεση με την πρώτη μελέτη των Zobayed et al., (2003), οι Zobayed και Saxena (2005) απέδειξαν ότι αυξημένα επίπεδα CO<sub>2</sub> έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων των δευτερογενών μεταβολιτών.

Οι Murch et al., (2003) μελέτησαν τις επιδράσεις της περιβαλλοντικής ρύπανσης με τον κοινό ανόργανο ρύπο, νικέλιο (Ni), στη σύνθεση και τη συσσώρευση των υπερικινών στο είδος *H.perforatum* L. Τα αποτελέσματα τους έδειξαν ότι οι μειωμένες συγκεντρώσεις της υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης οφείλονται στις αυξήσεις του νικελίου (Ni).

Οι Tekelova et al., (2000) μελέτησαν το στάδιο ανάπτυξης στα άνθη και το περιεχόμενο συγκέντρωσης της υπερικίνης σε αυτά. Η μελέτη τους εστιάστηκε στις επιπτώσεις που μπορούν να έχουν στα επίπεδα των υπερικινών οι διαφορετικές οντογενετικές φάσεις των ανθέων στο είδος *H.perforatum*. Τα οντογενετικά στάδια που εξέτασαν ήταν αυτά των φάσεων των μπουμπουκιών και των ανθέων που μόλις άνοιξαν. Διαπίστωσαν ότι τα επίπεδα της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης αυξήθηκαν ραγδαία, την περίοδο της ανθοφορίας του φυτού μόλις τα άνθη άρχιζαν να ανοίγουν. Κατά την διάρκεια του αναπτυξιακού σταδίου της ανθοφορίας αυτές οι ενεργές βιοχημικές ουσίες συσσωρεύονται κυρίως στα άνθη.

Οι Kosuth et al. (2003) ερεύνησαν τα επίπεδα της υπερικίνης στο αναπτυξιακό στάδιο του είδους *H.perforatum*. Η δυνατότητα για τη σύνθεση των υπερικινών μελετήθηκε στο είδος *H.perforatum in vitro*. Διαπίστωσαν ότι, οι υπερικίνες, στους αδένες εμφανίζονται στα φύλλα του φυτού στα αρχικά στάδια βλαστικής ανάπτυξης ενώ κατά τη διάρκεια της ανθοφορίας οι αδένες επεκτείνονται σχεδόν σε όλα τα μέρη του άνθους και στους βλαστούς/φύλλα. Τα αποτελέσματα τους έδειξαν ότι τα επίπεδα της υπερικίνης που παρουσιάζονται κυρίως στα άνθη ήταν μέγιστα κατά την διάρκεια της ανθοφορίας.

Οι Southwell και Bourke (2000) μελέτησαν την εποχιακή περιοδικότητα στην περιεκτικότητα των υπερικινών στο είδος *H.perforatum* L. Εξέτασαν τη συνολική περιεκτικότητα της υπερικίνης σε περίοδο 22 μηνών στο βλαστικό (vegetative) στάδιο και στο στάδιο ανθοφορίας των φυτών. Τα αποτελέσματα τους έδειξαν ότι την περίοδο της άνοιξης (στάδιο ανθοφορίας), η συγκέντρωση των υπερικινών αυξήθηκε ραγδαία με κορύφωση στις αρχές του καλοκαιριού. Τα συνολικά επίπεδα υπερικίνης έπειτα μειώθηκαν καθώς τα άνθη χάθηκαν και ξεκινούσε η περίοδος της καρποφορίας. Κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου υπήρξε μια συνεχής μείωση της υπερικίνης η οποία έφτασε στα κατώτατα επίπεδα συγκέντρωσης τον χειμώνα.

Οι Buter et al., (1997) μελέτησαν την επίδραση της γεωγραφικής διαφοροποίησης των φυτών (βιότυποι) στο περιεχόμενο της υπερικίνης σε διάφορα



είδη του γένους *Hypericum*. Στόχος της μελέτης τους ήταν η εξακρίβωση της επίδρασης των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων σε παραμέτρους της παραγωγής της υπερικίνης. Χρησιμοποίησαν οκτώ διαφορετικές γενετικά, σειρές τις οποίες διατηρούσαν με αγενή πολλαπλασιασμό (κλωνική αναπαραγωγή) τις οποίες καλλιέργησαν σε τρεις διαφορετικές τοποθεσίες, με διαφορετικά εδαφολογικά χαρακτηριστικά και διαφορετικές κλιματικές συνθήκες. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι ο γονότυπος των φυτών επηρεάζει σημαντικά τόσο την ανάπτυξη των φυτών όσο και τις συγκεντρώσεις των υπερικινών. Επίσης βρήκαν ότι το ύψος (γενετικά προσδιοριζόμενος χαρακτήρας των φυτών), καθώς και η αλληλεπίδραση γονότυπου – τοποθεσίας ασκεί σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη των ανθέων, τη συνολική παραγωγή/ανάπτυξη των φυτών καθώς επίσης και στα επίπεδα συγκέντρωσης των υπερικινών και ψευδοϋπερικινών. Επομένως, επιλέγοντας τον καταλληλότερο γονότυπο (elite genotype) για την αναπαραγωγή και την ανάλογη τοποθεσία είναι δυνατόν να αναπτύξουμε φυτά με επιθυμητά επίπεδα συγκέντρωσης υπερικίνης.

Οι Sirvent et al., (2003) μελέτησαν τις επιπτώσεις που έχουν οι φυτοφάγοι οργανισμοί, καθώς επίσης και τις επιπτώσεις από την προσβολή παθογόνων οργανισμών στην συγκέντρωση της υπερικίνης στο είδος *H.perforatum*. Για να διερευνήσουν αν οι υπερικίνες είναι μέρος του ειδικού αμυντικού συστήματος των φυτών απέναντι στους φυτοφάγους οργανισμούς (herbivore-specific), χρησιμοποίησαν in vitro ποιοτική ανάλυση με εξειδικευμένους (specialist) και μη εξειδικευμένους (generalist) φυτοφάγους οργανισμούς για την αποτίμηση των επιπτώσεων στα επίπεδα της υπερικίνης στα φυτά. Τα φυτά εκτέθηκαν στον εξειδικευμένο φυτοφάγο *Ghrysolina quadrigena*, καθώς επίσης και στους γενικευμένους φυτοφάγους *Spilosoma virgina*, *Spilosom congrua*, και *Spodoptera exigua*. Τα αποτελέσματα τους έδειξαν ότι τα εξειδικευμένα φυτοφάγα σκαθάρια επέφεραν μικρές μεταβολές στα επίπεδα της υπερικίνης σε σύγκριση με τα γενικευμένα φυτοφάγα σκαθάρια τα οποία επέφεραν δραματικές αλλαγές (30-100%) αύξησης των επιπέδων της υπερικίνης σε σύγκριση με τα επίπεδα ελέγχου των φυτών.

Απώτερος σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση των παραγόντων που επηρεάζουν τα επίπεδα της υπερικίνης σε τέσσερα διαφορετικά είδη του γένους *Hypericum* που απαντώνται στην Κρήτη. Οι αλλαγές αυτές στα επίπεδα της υπερικίνης θα ερευνηθούν ως προς το αναπτυξιακό στάδιο των φυτών, την

κατανομή τους σε διαφορετικά υψόμετρα και τις τοποθεσίες ανάπτυξης. Τα δείγματα θα αναλυθούν ποιοτικά και ποσοτικά με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσεως (HPLC), με κύριο σκοπό την σύγκριση των τεσσάρων ειδών ως προς τα επίπεδα συγκέντρωσης της υπερικίνης. Με την ανάλυση των επιπέδων της υπερικίνης θα εξακριβωθεί εάν το είδος *H.perforatum* το οποίο έχει ερευνηθεί ευρέως, είναι ανταγωνίσιμο με ομόλογα του και έχει ψηλότερα ποσοστά υπερικίνης λόγω κλιματολογικών και εδαφολογικών συνθηκών που επικρατούν στο νησί.

# Υλικά και μέθοδοι

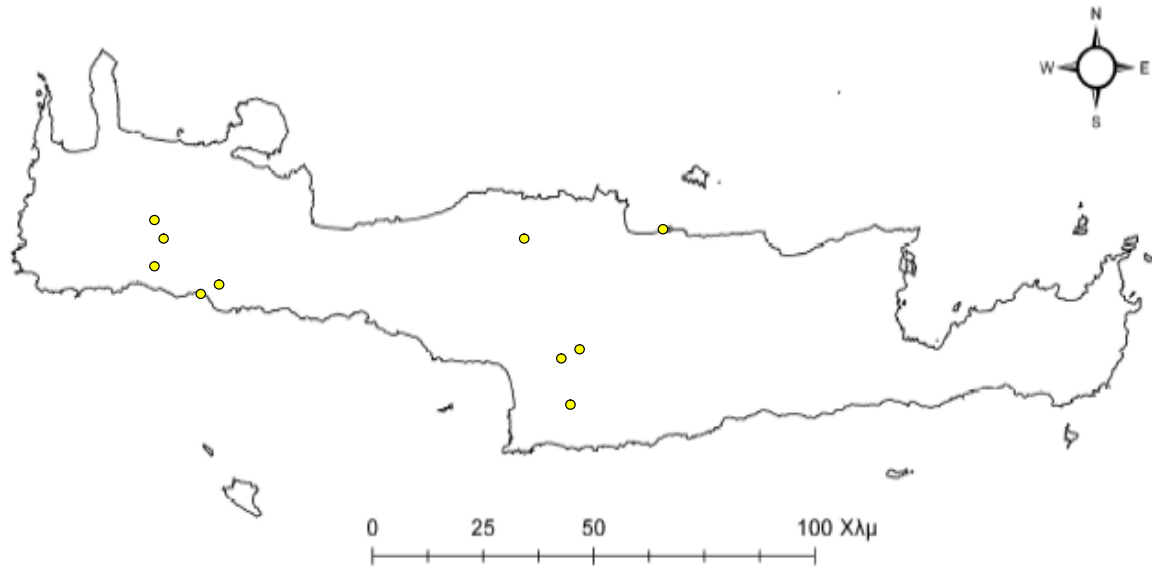
## 1. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Φυτικά δείγματα αγρίων πληθυσμών *Hypericum* spp. συλλέχθηκαν από περιοχές των νομών Ηρακλείου, Ρέθυμνου και Χανίων της Κρήτης. Οι θέσεις δειγματοληψίας βρισκόντουσαν κεντρικά, βόρεια και νότια των νομών, σε διαφορετικά υψομετρικά επίπεδα. Σκοπός αυτής της μελέτης είναι ο ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος των υπερικινών σε είδη του γένους *Hypericum* που φύονται στην Κρήτη. Προηγούμενη μελέτη των επιπέδων της συγκεντρώσεως της υπερικίνης (Ιούλιος 2004) σε όλα τα είδη του γένους *Hypericum* που φύονται στην Κρήτη έδειξε ότι υψηλότερη συγκέντρωση υπερικίνης υπάρχει στα είδη *H.perforatum*, *H. perforiatum*, *H.triquentrifolium* και *H.empetrifolium* (Σταυρόπουλος, Η. πτυχιακή Εργαστήριο Φωτοβιολογίας). Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα έγινε και η επιλογή των τεσσάρων ειδών για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης.

Η δειγματοληψία ήταν τυχαία και διαφοροποιήθηκε ως προς την υψομετρική διαβάθμιση των ειδών και των τοποθεσιών. Τα δείγματα πάρθηκαν από άγριους πληθυσμούς για τα τέσσερα διαφορετικά είδη του γένους *Hypericum*. Η δειγματοληπτική περίοδος καλύπτει το αναπτυξιακό στάδιο των φυτών.

Τα πειράματα ξεκίνησαν από το βλαστικό στάδιο (Απρίλιος) των ειδών εξαιρουμένου του *H.perforatum*. Οι δειγματοληψίες σε διαφορετικά υψομετρικά επίπεδα (βλ. Εικόνα 8) συνεχίστηκαν τους επόμενους μήνες και κάλυψαν τα στάδια της ανθοφορίας και της καρποφορίας αντίστοιχα.

Τα στάδια ανάπτυξης των φυτών διακρίνονται σε βλαστικό, ανθοφορίας και καρποφορίας, και εμφανίζονται: (α) Βλαστικό-Απρίλιος-Μάιος, (β) Ανθοφορίας-Μάιος-Ιούνιος και (γ) καρποφορίας-Ιούλιος-Αύγουστος. Το φυτικό υλικό χωρίζεται σε (α) βλαστούς-φύλλα και (β) άνθη.



Εικόνα 8. Χάρτης Κρήτης - τοποθεσίες δειγματοληψίας (το κόκκινο = *H.perforatum*; πράσινο = *H.triquentriifolium*; μωβ = *H.perfoliatum*; και κίτρινο = *H.empetrifolium*)

## 2. Εκχύλιση Υπερικινών

Μετά από τη συγκομιδή, τα φυτά αφού μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο διαιρέθηκαν σε δύο μέρη: (α) ένα ανώτερο τμήμα που περιέχει όλα τα άνθη και (β) ένα χαμηλότερο τμήμα περιλαμβάνει μόνο τους μίσχους και τα φύλλα (βλαστός/φύλλα). Τα δυο δείγματα τεμαχιστήκαν και κρατήθηκαν σε θερμοκρασία 4 °C μέχρι να αρχίσει το πειραματικό στάδιο της εκχύλισης τους. Τα πειράματα εκχύλισης ξεκινούσαν αμέσως. Ακολούθως τα άνθη και οι βλαστοί/φύλλα αποτελούμενα περίπου από 2.5-3 g φρέσκου βάρους αποξηραίνονταν για 16 ώρες περίπου σε αεριζόμενο φούρνο στους 50 °C. Τα αποξηραμένα τμήματα ζυγίζονταν, έπειτα κονιορτοποιούνταν κάτω από το ασφαλές αμυδρό πράσινο φως, τα δείγματα σε σκόνη ζυγίζονταν και καταγράφονταν οι τιμές ξηρού βάρους (DW) σε γραμμάρια (g).

Κάθε τμήμα (άνθη και βλαστός/φύλλα) εκχυλίστηκε αρχικά με 10-15 ml. χλωροφορμίου ανά γραμμάριο για την αφαίρεση της χλωροφύλλης. Η διαδικασία εκχύλισης κράτησε για 4 ώρες. Τα δείγματα αναδεδούντουσαν σθεναρά σε αναδευτήρα ταχύτητας 200rpm/min. Η διαδικασία επαναλήφθηκε πέντε φορές.

Στην συνέχεια η εκχύλιση των υπερικίνων έγινε με την προσθήκη αιθανόλης, σε αναλογία 10 ml ανά γραμμάριο ξηρού βάρους. Τα δείγματα θερμάνθηκαν για 5 περίπου λεπτά σε 70 °C και μετά τοποθετήθηκαν στον αναδευτήρα (200rpm/min) για 10 λεπτά περίπου. Τα δείγματα στη συνέχεια διηθήθηκαν με την χρήση χαρτιών φίλτρου Whatman No.1. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για 5 περίπου φορές, μέχρι που το δείγμα παρέμεινε άχρωμο. Η διαδικασία της εκχύλισης των υπερικινών έγινε κάτω από πράσινο φωτισμό. Τα δείγματα εξατμίστηκαν σε κενό αέρος και θερμοκρασία 60 °C και επαναδιαλύθηκαν σε περίπου 5 mL αιθανόλης για να αποθηκευτούν σε θερμοκρασία 4 °C σε απόλυτο σκοτάδι μέχρι την ανάλυση των υπερικινών με την χρήση της HPLC.

### **3. HPLC - Χρωματογραφική ανάλυση υπερικινών**

Η χρωματογραφική ανάλυση των υπερικινών πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Οι αναλύσεις έγιναν σε συσκευή υγρής χρωματογραφίας Shimadzu (LC- 10AD) η οποία εξοπλίστηκε με έναν SPD- M10A ανιχνευτή σειράς διόδων (diode array detector DAD) (Shimadzu SPD- M10A) και με στήλη τύπου (narrow-bore column/C18, 2.1 x 200 mm, 5μm particle size Hypersyl, Hwelett-Packard, Houston, TX). Η ποιοτική ανάλυση των επιμέρους υπερικινών, ψευδοϋπερικινών και των προδρόμων ουσιών τους, των πρώτο-ϋπερικινών και πρώτο-ψευδοϋπερικινών επιτεύχθηκε μετά από την ανάπτυξη αντίστοιχου προγράμματος για την βέλτιστη HPLC-ανάλυση τους. Το ποσό που χρησιμοποιήθηκε από το εκχύλισμα των υπερικινών ανερχόταν στα 20 μl. Οι ενώσεις διαχωρίστηκαν ισοκρατικά χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μεθανόλη:ακετονιτριλίο 0,1M ορθό-φωσφορικό οξύ σε pH 2,1 (1893:618:526 (w/w/w)). Ο ρυθμός ροής ήταν 0.45ml/l σε θερμοκρασία στηλών 40 °C. Η ανίχνευση των υπερικινών έγινε φασματοσκοπικά στα 590 nm μέσω του συστήματος diode array της HPLC. Ο χρόνος εμφάνισης (retention time  $t_R$ ) για τις πρώτο-ψευδοϋπερικίνες, ψευδοϋπερικίνες, πρωτοϋπερικίνες και τις υπερικίνες ήταν 1.4, 2.3, 4.9, 7.9 λεπτά αντίστοιχα.

#### **4. Ποσοτικός προσδιορισμός των υπερικινών**

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των υπερικινών (πρωτοψευδοϋπερικίνης, ψευδοϋπερικίνης, πρωτοϋπερικίνης και υπερικίνης) στα δείγματα καθορίστηκε με τις πρότυπες καμπύλες από σκευάσματα αυθεντικών υπερικινών και ψευδοϋπερικινών που αγοράστηκαν από την εταιρία Sigma. Οι ουσίες προσδιορίστηκαν βάσει των χρονικών ( $t_R$ ) τιμών του διαχωρισμού των ουσιών (διατήρησης) και των UV/VIS φασμάτων απορρόφησης τους με την χρήση του συστήματος diode array της HPLC. Για τις πρότυπες καμπύλες οι αυθεντικές ουσίες της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης διαλύθηκαν σε αιθανόλη σε επίπεδα 0-20 nmoles και αραιώθηκαν σε επίπεδο συγκέντρωσης που απαιτείται για τη μελέτη της γραμμικότητας. Ετοιμάστηκαν αραιώσεις των συγκεντρώσεων κάθε ουσίας σε 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16 και 20 nmoles ως λειτουργία του εμβადού του εκάστοτε μέγιστου του HPLC διαγράμματος. Για τη ψευδοϋπερικίνη χρησιμοποιήθηκε πολυωνυμική εξίσωση διαταγής 2<sup>ου</sup> βαθμού και για τις υπερικίνες χρησιμοποιήθηκε μια γραμμική εξίσωση 1<sup>ου</sup> βαθμού<sup>1</sup>. Υψηλή γραμμικότητα ( $R^2 > 0,99$ ) παρατηρήθηκε για κάθε πρότυπη καμπύλη

Ο προσδιορισμός της ποσότητας της ψευδοϋπερικίνης, υπερικίνης, καθώς επίσης και των προδρόμων τους πρωτοψευδοϋπερικίνη και πρωτοϋπερικίνη προσδιορίστηκε με βάση τις τιμές μέγιστης περιοχής των πρότυπων καμπύλων που είναι χρόνος εμφάνισης 1.4, 2.3, 4.9 και 5.9 λεπτά αντίστοιχα.

Η συγκέντρωση των υπερικινών εκφράστηκε σε mg/g ξηρού βάρους (DW), και το περιεχόμενο των υπερικινών υπολογίστηκε βάσει των εξισώσεων των πρότυπων καμπύλων, και το μοριακό τους βάρος.

#### **5. Στατιστική ανάλυση**

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με την χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS (SPSS PC έκδοσης 13.0) και με το πρόγραμμα Statistica (Statistica 6.0). Καθορίστηκε η διπλής κατεύθυνσης ανάλυση των διαφορών (ANOVA). Οι διαφορές μεταξύ των μέσων αξιολογήθηκαν με τη δοκιμή του Leven και την post-hoc δοκιμή.

---

<sup>1</sup> Pseudohypericin:  $y = (6E-14x^2 - 1E-07x + 0,1344)*520,24/1000000$

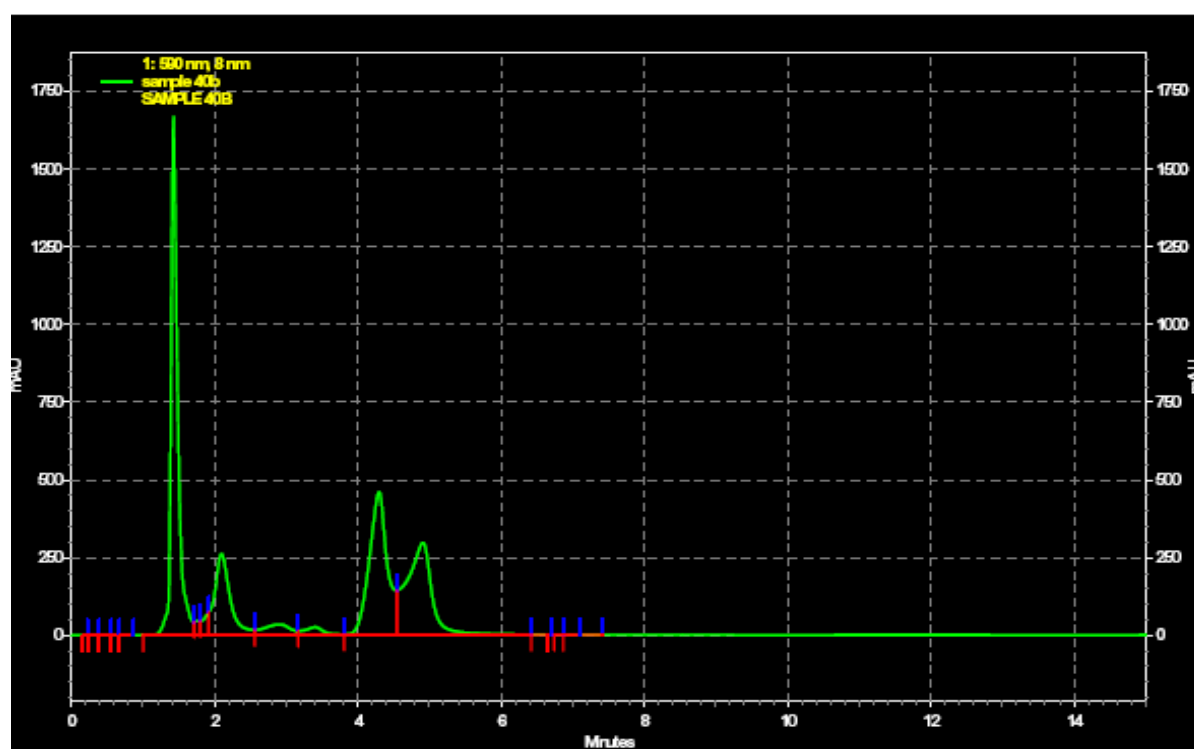
Hypericin:  $y = (7E-07x + 0,6117)*540/1000000$

## Αποτελέσματα

### 1. Ποιοτικός και Ποσοτικός Προσδιορισμός Υπερικινών

#### 1.1 HPLC

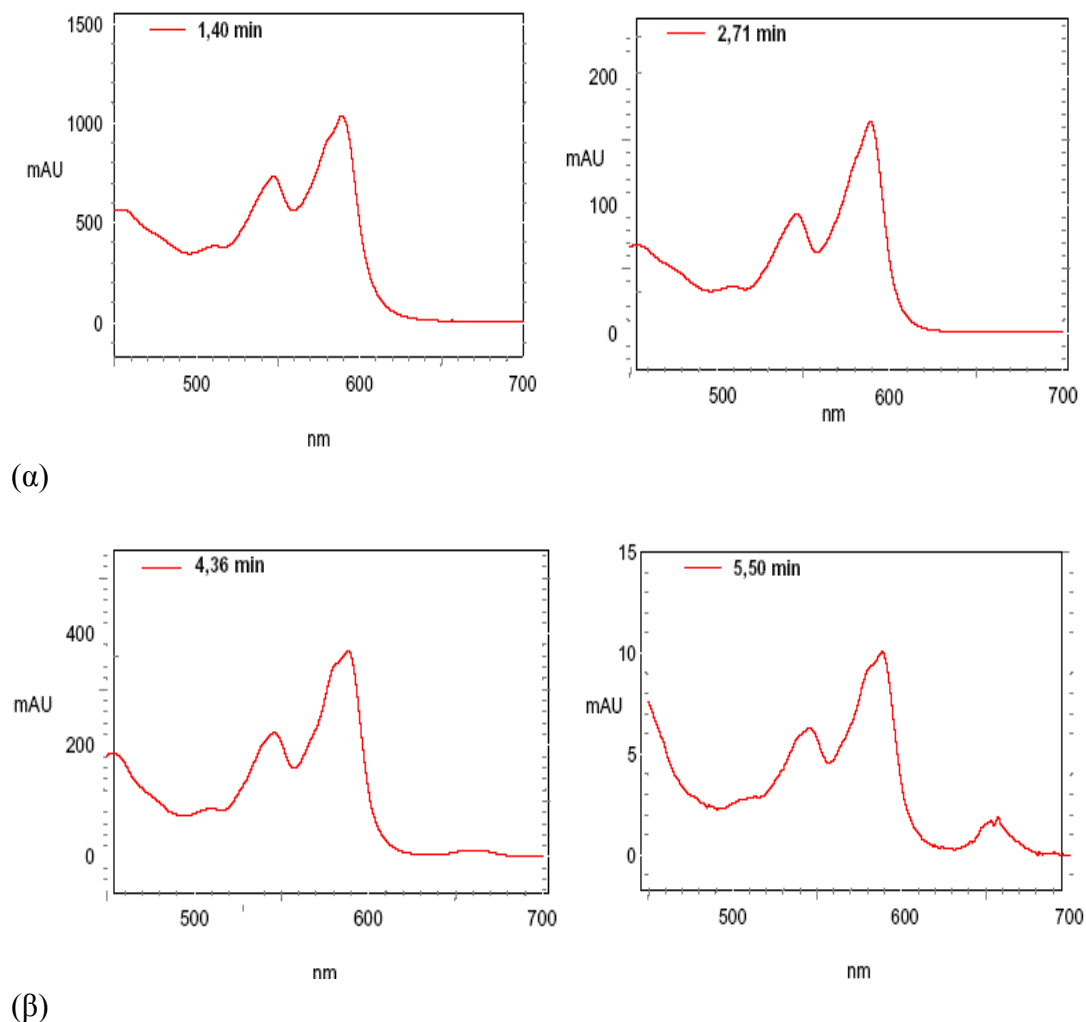
Ο ποσοτικός προσδιορισμός των τεσσάρων υπερικινών έγινε με την μέθοδο της HPLC. Το πιο κάτω γράφημα απεικονίζει το διαχωρισμό των υπερικινών που είναι βασισμένος στα UV/VIS φάσματα απορρόφησης και στον χρόνο διαχώρισής τους. Το χρωματογράμμα αντιστοιχεί στο είδος *H.perforatum* και ο χρόνος διαχωρισμού των επιμέρους υπερικινών είναι 1.40 για την πρωτοψευδοϋπερικίνη, 2.71 για την ψευδοϋπερικίνη, 4.36 για την πρωτοϋπερικίνη και 5.50 για την υπερικίνη λεπτά, αντίστοιχα.



Εικόνα 9. HPLC - Χρωματογράφημα στο είδος *H.perforatum* σε 590 nm όπου εμφανίζονται οι τέσσερις υπερικίνες: (1) πρωτοψευδοϋπερικίνη, (2) ψευδοϋπερικίνη, (3) πρωτοϋπερικίνη και (4) υπερικίνη.

Στα πιο κάτω γραφήματα απεικονίζονται τα φάσματα απορρόφησης με τη χρήση του συστήματος diode array της HPLC για προσδιορισμό των επιμέρους υπερικινών. Τα

πρώτα φάσματα αντιστοιχούν στις πρωτοψευδοϋπερικίνες και ψευδοϋπερικίνες και τα δεύτερα στις πρωτοϋπερικίνες και υπερικίνες, αντίστοιχα.



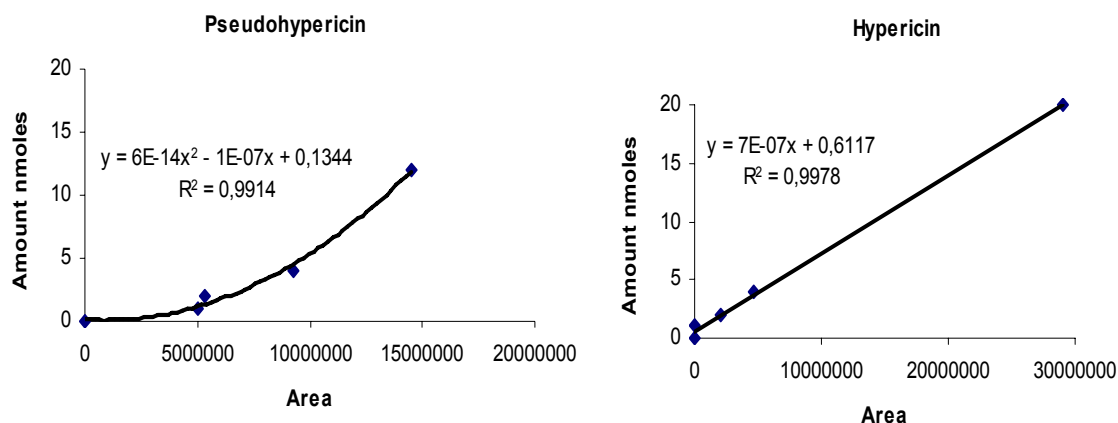
Εικόνα 10. Φάσματα υπερικινών (retention time)

## 1.2 Πρότυπες καμπύλες

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των υπερικινών καθορίστηκε με τις πρότυπες καμπύλες (Εικόνα 11) από σκευάσματα αυθεντικών υπερικινών και ψευδοϋπερικινών. Οι πρότυπες καμπύλες καταγράφουν την συγκέντρωση των υπερικινών και ψευδοϋπερικινών σε σχέση με το εμβαδόν του εκάστοτε HPLC-μεγίστου του διαγράμματος. Το επίπεδο βαθμονόμησης των πρότυπων καμπύλων



έγινε με τις συγκεντρώσεις 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 nmoles για τις υπερικίνες και τις ψευδοϋπερικίνες.



Εικόνα 11. Πρότυπες καμπύλες και εξισώσεις ποσοτικής εκτίμησης της ψευδοϋπερικίνης και υπερικίνης, αντίστοιχα.

## 1.3 *Hypericum* species

### 1.3.1 *Hypericum empetrifolium*

Σε μεγάλα υψόμετρα, η περίοδος ανθοφορίας του *H. empetrifolium* διαρκεί από τον Απρίλιο μέχρι τον Ιούλιο. Το φυτό είναι αυτοφυές στην Κρήτη και βρίσκεται διάσπαρτο σε όλο το νησί, σε υψόμετρα από 0-1500 m. Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των υπερικινών επιτεύχθηκε με ανάλυση χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης της HPLC των επιπέδων των επιμέρους υπερικινών παρουσιάζονται στον πίνακα 2. Τα επίπεδα των υπερικινών (μέσες τιμές  $\pm$  SD) της πρωτοψευδοϋπερικίνης, ψευδοϋπερικίνης, πρωτοϋπερικίνης και της υπερικίνης εξετάστηκαν ως προς το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού, από το βλαστικό στάδιο (Απρίλιος), την ανθοφορία (Απρίλιος-Μάιος) και την καρποφορία (Ιούλιος). Επιπρόσθετα, στον πιο κάτω πίνακα παρουσιάζονται τα ολικά επίπεδα της υπερικίνης, που είναι το άθροισμα των επιμέρους υπερικινών στο είδος ως προς το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού.

Πίνακας 2. Ανάλυση ναφθοδιαθρόνων και ολικής υπερικίνης (Μέσες τιμές  $\pm$  SD) του φυτού *H. empetrifolium* στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του φυτού: PPS: πρωτοψευδοϋπερικίνη, PS: ψευδοϋπερικίνη, PH: πρωτοϋπερικίνη και H: υπερικίνη

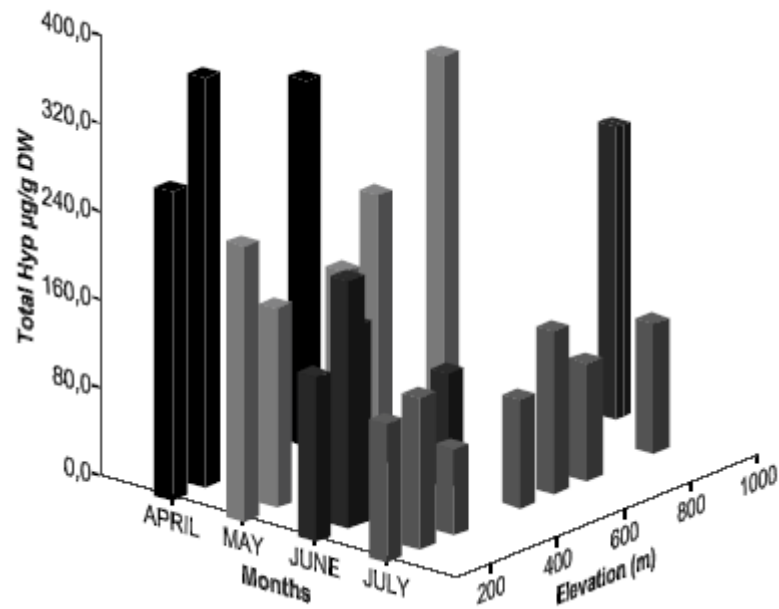
Μήνες	Όργανα	PPS $\mu\text{g/g dw}$	PS $\mu\text{g/g dw}$	PH $\mu\text{g/g dw}$	H $\mu\text{g/g dw}$	Ολικά H $\mu\text{g/g dw}$
Απρίλης	Άνθη	25,36 $\pm$ 4	34,34 $\pm$ 8	128,58 $\pm$ 22	150,88 $\pm$ 23	339,16 $\pm$ 44
Μαΐος		16,38 $\pm$ 3	18,76 $\pm$ 3	107,42 $\pm$ 31	95,32 $\pm$ 19	237,88 $\pm$ 53
Ιούνιος		14,59 $\pm$ 5	12,67 $\pm$ 6	71,46 $\pm$ 26	71,13 $\pm$ 27	169,85 $\pm$ 64
Ιούλιος		10,49 $\pm$ 3	9,91 $\pm$ 2	46,23 $\pm$ 12	46,24 $\pm$ 12	112,87 $\pm$ 30
Απρίλης	Βλαστός	21,76 $\pm$ 4	24,92 $\pm$ 5	108,16 $\pm$ 15	106,95 $\pm$ 14	261,79 $\pm$ 63
Μαΐος		14,67 $\pm$ 3	16,43 $\pm$ 4	83,35 $\pm$ 21	81,51 $\pm$ 19	195,96 $\pm$ 46
Ιούνιος		13,65 $\pm$ 3	12,25 $\pm$ 3	62,61 $\pm$ 17	65,14 $\pm$ 15	153,64 $\pm$ 35
Ιούλιος		12,92 $\pm$ 2	11,80 $\pm$ 3	56,96 $\pm$ 10	56,96 $\pm$ 10	138,63 $\pm$ 24

Τα αποτελέσματα για το είδος *H. empetrifolium* εμφανίζουν ξεκάθαρη τάση όσον αφορά το ολικά επίπεδα της υπερικίνης. Κατά την διάρκεια της ανθοφορίας (Απρίλιος – Ιούνιος) του φυτού, όπου υπήρχαν περισσότερα μπουμπούκια, έχουμε τα μεγαλύτερα ποσοστά υπερικίνης στα άνθη με τα ολικά επίπεδά να ανέρχονται σε 340  $\mu\text{g/g DW}$  (Εικόνα 12 α). Ακολούθως οι τιμές ολικής υπερικίνης μειώνονται εκθετικά με τα χαμηλότερα επίπεδα να παρατηρούνται κατά την περίοδο της καρποφορίας του φυτού (113  $\mu\text{g/g DW}$ ).

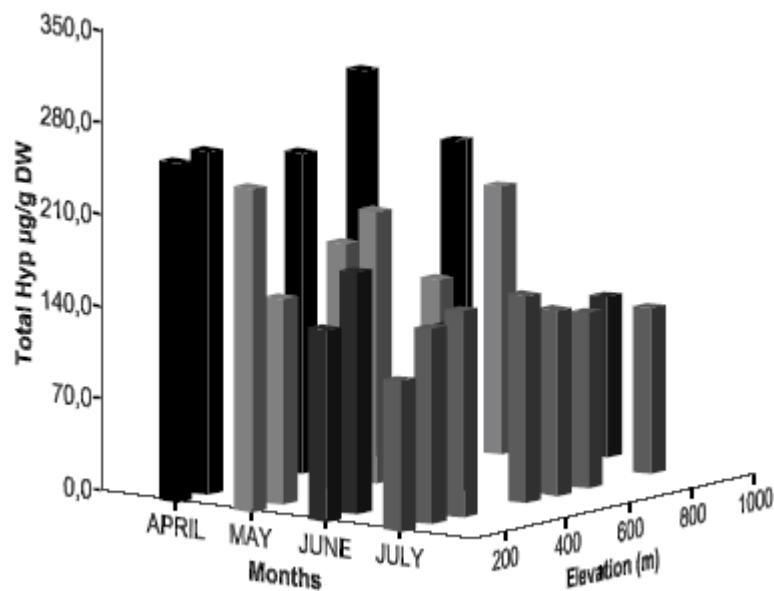
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα οι τιμές της ολικής υπερικίνης στους βλαστούς/φύλλα παρουσιάζουν την ίδια τάση με αυτή στα άνθη. Το μεγαλύτερο ποσοστό ολικής υπερικίνης στους βλαστούς/φύλλα παρατηρείται τον Απρίλιο και κυμαίνεται στα 262  $\mu\text{g/g DW}$  περίπου, ενώ ακολούθως παρατηρείται εκθετική μείωση, τάση που παρατηρείται και στα άνθη, με τα χαμηλότερα επίπεδα υπερικίνης (139  $\mu\text{g/g DW}$ ) να παρατηρούνται κατά την περίοδο καρποφορίας (Εικόνα 12 β).

Η ανάλυση των επιμέρους υπερικινών απεικονίζεται στα παρακάτω γραφήματα. Τα γραφήματα απεικονίζουν τα επίπεδα των επιμέρους υπερικινών καθώς επίσης και τα ολικά επίπεδα ως προς το αναπτυξιακό στάδιο του είδους *H. empetrifolium* και την υψομετρική διαβάθμιση του φυτού. Στην εικόνα 12 (α και β) παρουσιάζονται τα ολικά επίπεδα υπερικίνης σε άνθη και βλαστούς/φύλλα, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα παρουσιάζεται μεγιστοποίηση των επιπέδων των υπερικινών και στα δύο εξεταζόμενα μέρη του φυτού κατά την διάρκεια της ανθοφορίας. Ακολούθως παρατηρείται μια εκθετική μείωση των επιπέδων της υπερικίνης σε άνθη και βλαστούς/φύλλα τους μήνες Μάιο, Ιούνιο και

Ιούλιο. Σύμφωνα με την υψομετρική διαβάθμιση του φυτού τα επίπεδα της υπερικίνης παρουσιάζουν αυξομειώσεις. Η τάση αύξησης των επιπέδων υπερικίνης σε μεγάλα υψόμετρα οφείλεται στην περιοδικότητα της ανθοφορίας του φυτού.



(α) Άνθη

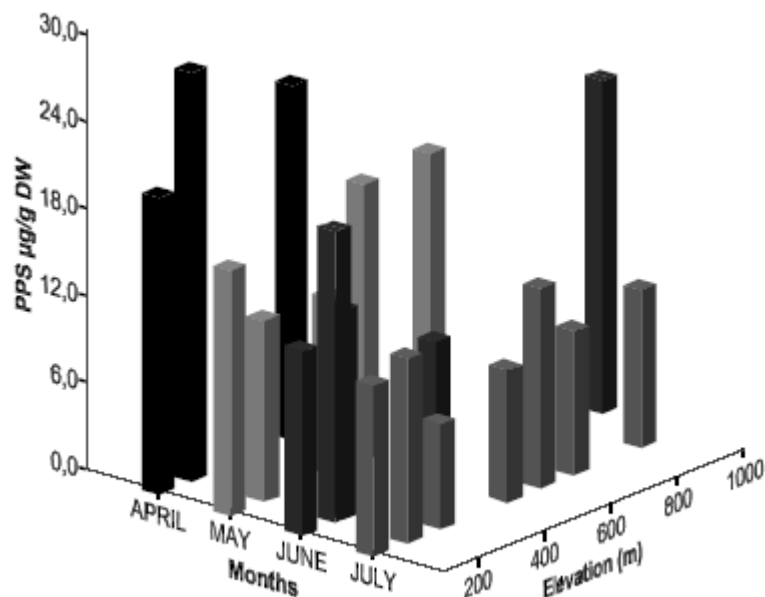


(β) Βλαστοί/φύλλα

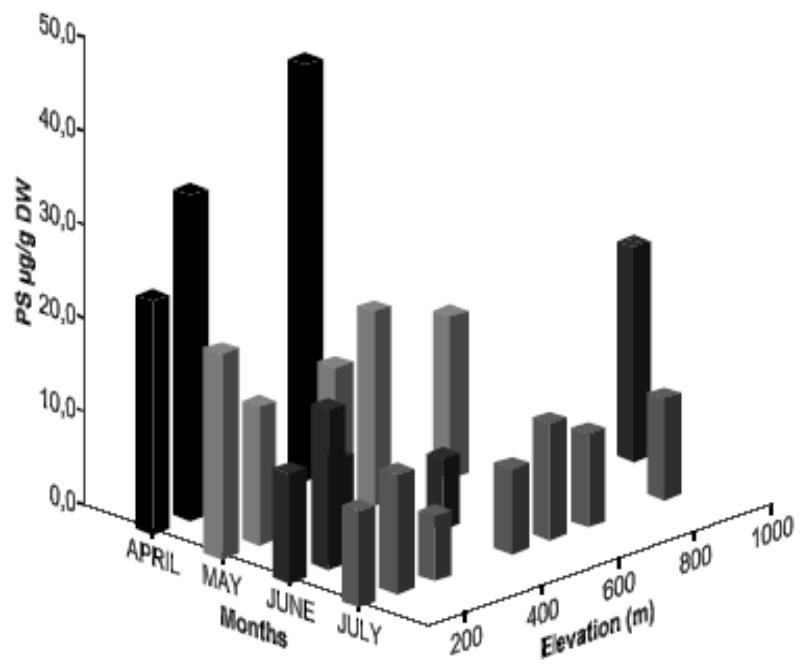
Εικόνα 12. Ολικά επίπεδα υπερικίνης κατά την διάρκεια του αναπτυξιακού σταδίου σε διαφορετικά υψόμετρα, του είδους *H. empetrifolium* (α) σε άνθη και (β) σε βλαστούς/φύλλα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της HPLC-ανάλυσης, τα ποιοτικά και ποσοτικά στοιχεία των επιμέρους υπερικινών δείχνουν ότι τα επίπεδα των πρωτοϋπερικινών και υπερικινών είναι αρκετά μεγαλύτερα από αυτά των πρωτοψευδοϋπερικινών και ψευδοϋπερικινών (Πίνακας 2 και Εικόνες 13 και 14 αντίστοιχα). Τα γραφήματα στην εικόνα 13 απεικονίζουν τις τέσσερις επιμέρους υπερικίνες στα άνθη του είδους *H. empetrifolium*, κατά την διάρκεια του αναπτυξιακού σταδίου του φυτού σε διαφορετικά υψομετρικά επίπεδα. Τα γραφήματα απεικονίζουν την μεγιστοποίηση στα επίπεδα των επιμέρους υπερικινών κατά την διάρκεια της ανθοφορίας και ακολούθως μια εκθετική μείωση των επιπέδων τους μήνες Μάιο, Ιούνιο και Ιούλιο.

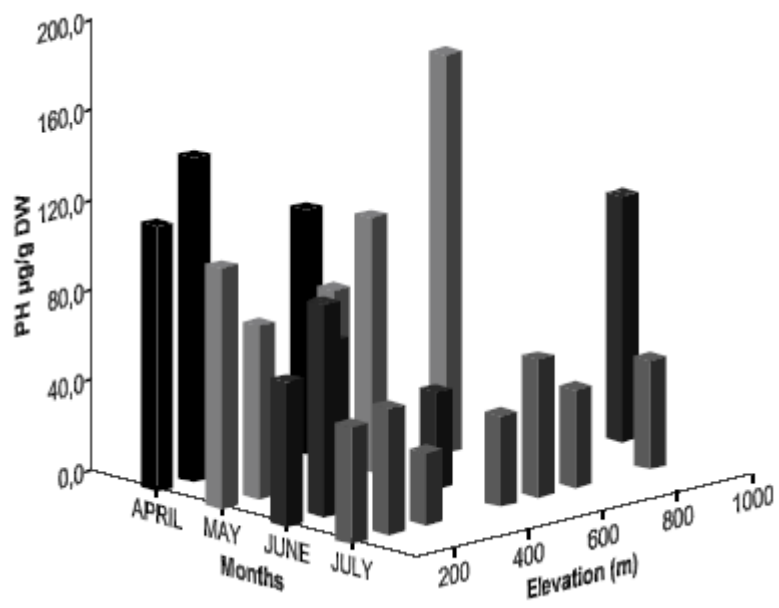
Από τα γραφήματα συμπεραίνουμε ότι τα επίπεδα των επιμέρους υπερικινών παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές κατά την διάρκεια της ανθοφορίας (Απρίλιος – Μάιος), τάση η οποία παρουσιάζεται σε όλες οι υπερικίνες ξεχωριστά. Ακολούθως παρατηρείται μια εκθετική μείωση με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις να παρατηρούνται κατά την διάρκεια της καρποφορίας.



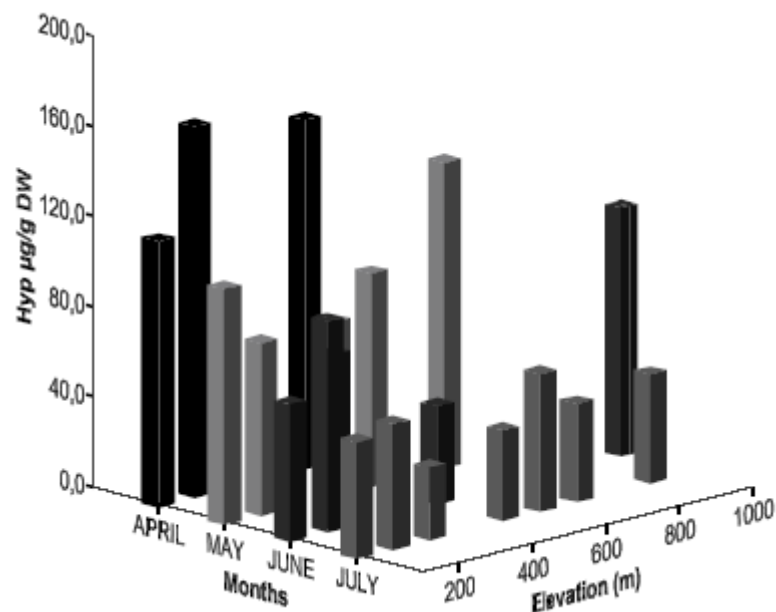
(α)



(β)



(γ)

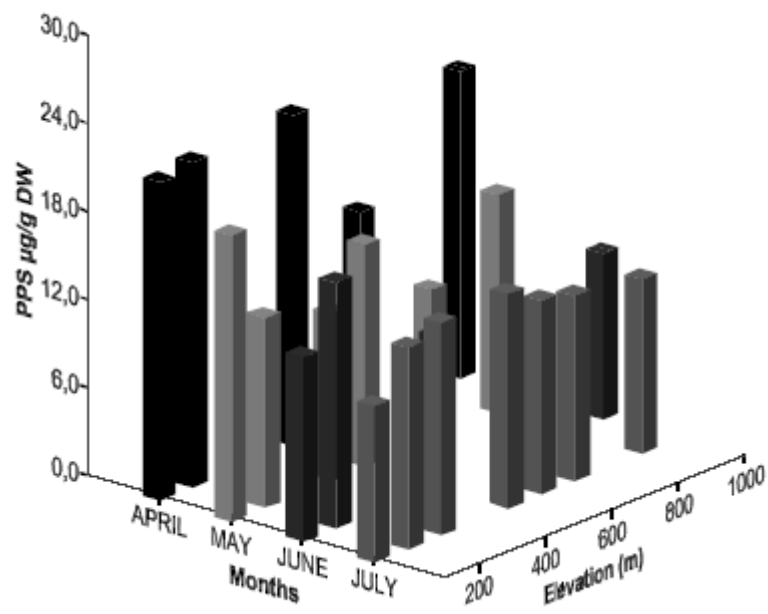


(δ)

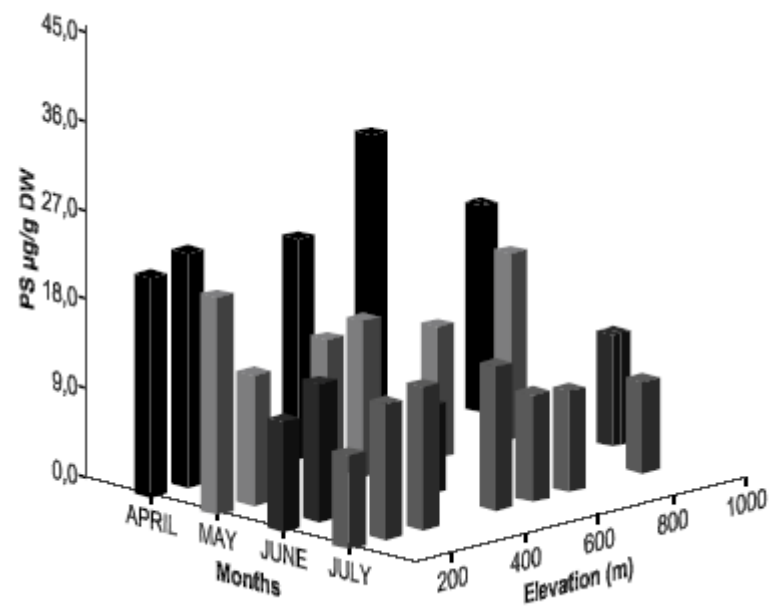
Εικόνα 13. Συγκέντρωση υπερικινών (PPS, PS, PH, H) στα άνθη του είδους *H. empetrifolium*, κατά την διάρκεια του αναπτυξιακού σταδίου του φυτού σε διαφορετικά υψόμετρα: (α) PPS πρωτοψευδοϋπερικίνη, (β) PS ψευδοϋπερικίνη, (γ) PH πρωτοϋπερικίνη, και (δ) H υπερικίνη.

Η τάση που παρουσιάζουν οι συγκεντρώσεις υπερικινών στους βλαστούς/φύλλα είναι παρόμοια με την αντίστοιχη στα άνθη. Στα πιο κάτω γραφήματα διαφαίνεται ότι τα μεγαλύτερα επίπεδα των επιμέρους υπερικινών μεγιστοποιούνται τον Απρίλιο κατά την διάρκεια της ανθοφορίας. Τα επίπεδα των επιμέρους υπερικινών μειώνονται εκθετικά τους μήνες Μάιο, Ιούνιο και Ιούλιο. Σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα των επιμέρους υπερικινών στα άνθη, τα επίπεδα των υπερικινών εδώ είναι σαφώς μικρότερα. Η διαφοροποίηση στο υψόμετρο δεν φαίνεται να παίζει κάποιο σημαντικό ρόλο στα επίπεδα των υπερικινών εκτός από τον μήνα Απρίλιο, όπου παρουσιάζεται μια μικρή εκθετική αύξηση.

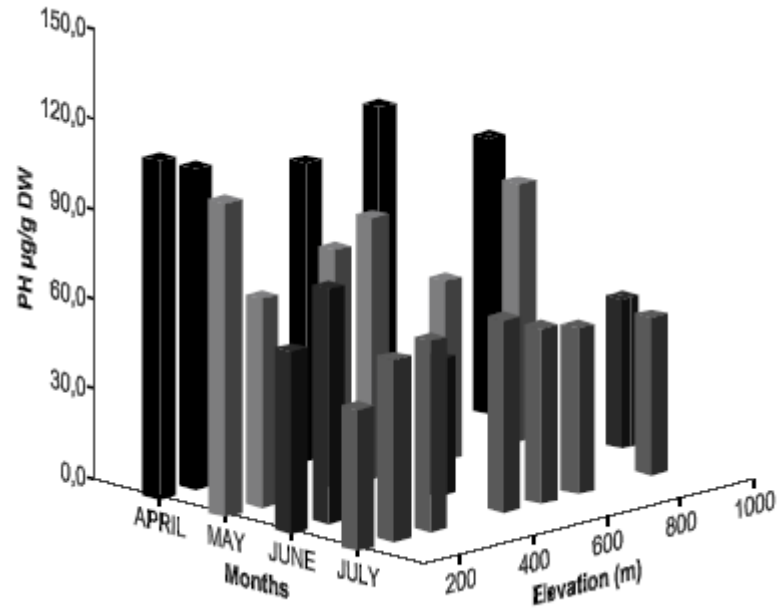
Συμπερασματικά στους βλαστούς/φύλλα διαφαίνεται ότι οι συγκεντρώσεις των πρωτοϋπερικινών και υπερικινών παρουσιάζουν αρκετά μεγαλύτερα επίπεδα σε σχέση με τα επίπεδα συγκεντρώσεων των πρωτοψευδοϋπερικινών και ψευδοϋπερικινών, με αναλογία σχεδόν τετραπλάσια.



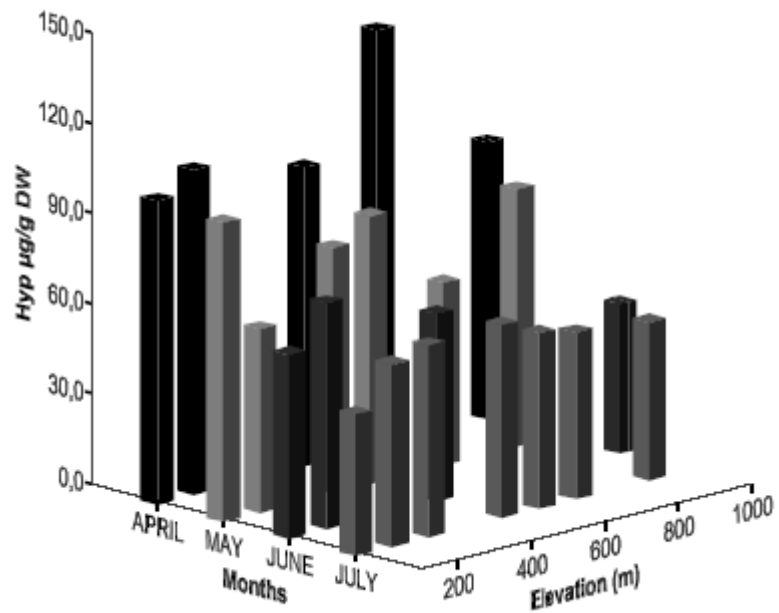
(α)



(β)



(γ)



(δ)

Εικόνα 14. Συγκέντρωση υπερικινών (PPS, PS, PH, H) σε βλαστούς/φύλλα του είδους *H.empetrifolium*, κατά την διάρκεια του αναπτυξιακού σταδίου του φυτού σε διαφορετικά υψόμετρα: (α) PPS πρωτοψευδοϋπερικήνη, (β) PS ψευδοϋπερικήνη, (γ) PH πρωτοϋπερικήνη, και (δ) H υπερικήνη.



### 1.3.2 *Hypericum perforatum*

Το *H. perforatum* παρουσιάζει την ίδια διάρκεια βιολογικού κύκλου με το *H. empetrifolium*. Ανθίζει τον Απρίλιο και διανέμεται σε υψόμετρα από 100 έως 700 m. Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται αναλυτικά οι τέσσερις επιμέρους υπερικίνες και η ολική υπερικίνη. Η HPLC-ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε ως προς το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού σε διαφορετικά υψόμετρα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τα επίπεδα ολικής υπερικίνης στα άνθη είναι περίπου διπλάσια από αυτή στους βλαστούς/φύλλα. Κατά τη διάρκεια της ανθοφορίας (Απρίλιος), τα ολικά επίπεδα της υπερικίνης στα άνθη μεγιστοποιούνται (650 μg/g DW). Αντίστοιχη τάση παρατηρείται και στα επίπεδα υπερικινών στους βλαστούς/φύλλα (379 μg/g DW). Ακολούθως τα επίπεδα των υπερικινών στα άνθη μειώνονται εκθετικά, ενώ και στους βλαστούς/φύλλα διαφαίνεται μείωση τους μήνες Μάιο και Ιούνιο, ενώ μετά παρουσιάζεται μια μικρή αύξηση τον Ιούλιο.

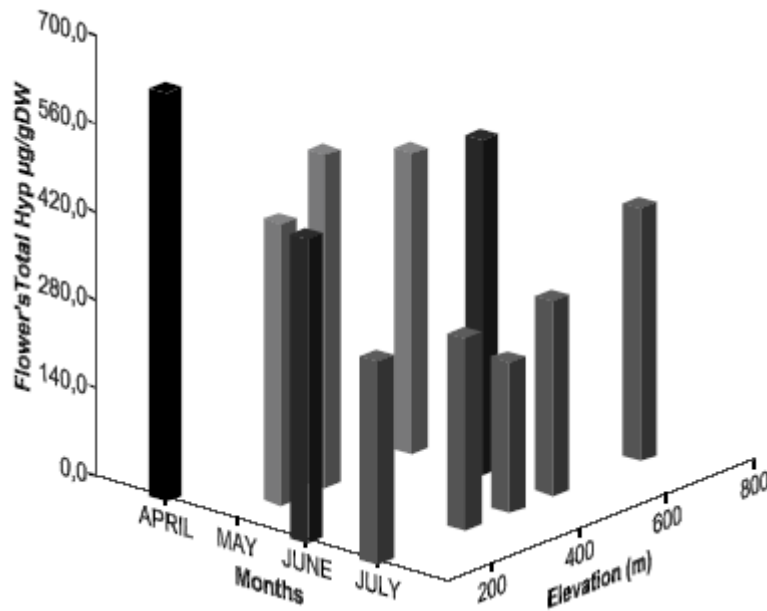
Πίνακας 3. Ανάλυση ναφθοδιαθρόνων και ολικής υπερικίνης (Μέσες τιμές ± SD) του φυτού *H. perforatum* στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια.

Μήνες	Όργανα	PPS μg/g dw	PSμg/g dw	PHμg/g dw	Hμg/g dw	Ολικά Hμg/g dw
Απρίλης	Άνθη	287,78	52,2	179,02	131,16	651,6
Μαΐος		183,12±60	24,97±13	158,35±40	176,96±20	547,97±43
Ιούνιος		113,02±8	20,60±2	233,05±60	141,76±54	508,43±34
Ιούλιος		110,83±16	41,92±21	125,70±30	150,56±45	426,02±40
Απρίλης	Βλαστός	25,91±4	33,46±7	138,98±14	131,05±18	379,39±81
Μαΐος		17,56±3	19,15±4	109,80±14	110,83±11	257,33±17
Ιούνιος		20,52±12	22,93±17	77,92±42	107,64±27	229,00±39
Ιούλιος		16,02±16	15,24±7	106,84±47	118,01±68	256,10±79

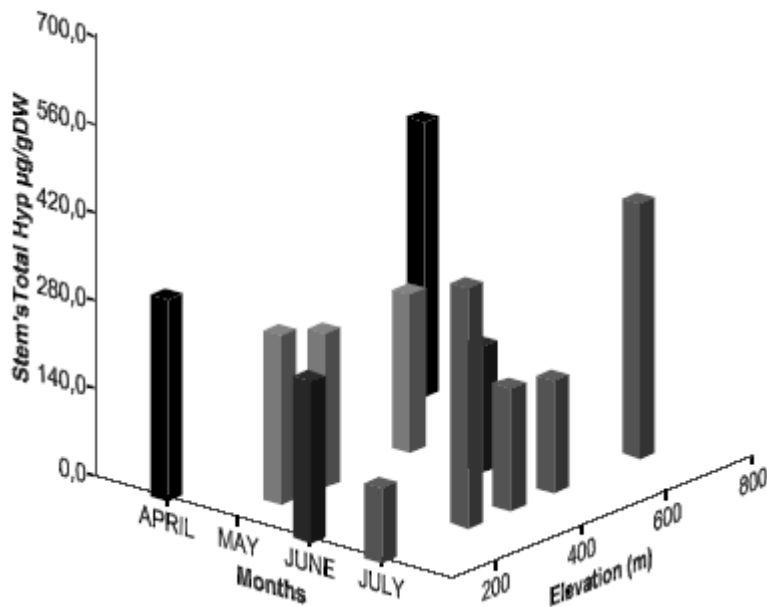
Τα χαμηλότερα επίπεδα ολικής υπερικίνης στα άνθη παρατηρούνται κατά την διάρκεια της καρποφορίας του φυτού (Ιούλιος), με τις συγκεντρώσεις να κυμαίνονται περίπου στα 426 μg/g DW. Μικρή μείωση της υπερικίνης στους βλαστούς/φύλλα εμφανίζεται τον Ιούνιο, ενώ τον Ιούλιο η συγκέντρωσή της επανέρχεται στα ίδια επίπεδα με αυτά του Μαΐου. Συμπερασματικά και εδώ παρατηρείται μια εκθετική μείωση στα επίπεδα της ολικής υπερικίνης σε άνθη και βλαστούς/φύλλα κατά την διάρκεια του αναπτυξιακού σταδίου του φυτού, από την άνθιση στην καρποφορία, όμως όχι τόσο έντονη όσο αυτή που παρατηρήθηκε στο είδος *H. empetrifolium*.

Τα ολικά επίπεδα της υπερικίνης σε άνθη και βλαστούς/φύλλα απεικονίζονται στις Εικόνες 15 (α) και (β). Από τα πιο κάτω διαγράμματα διαφαίνεται ότι τα

επίπεδα υπερικίνης στα άνθη τους μήνες Μάιο και Ιούνιο έχουν περίπου τις ίδιες συγκεντρώσεις. Τα επίπεδα συγκέντρωσης της υπερικίνης παρουσιάζουν μια μικρή τάση αύξησης του μήνες Ιούνιο-Ιούλιο σύμφωνα με την υψομετρική διαβάθμιση του φυτού.



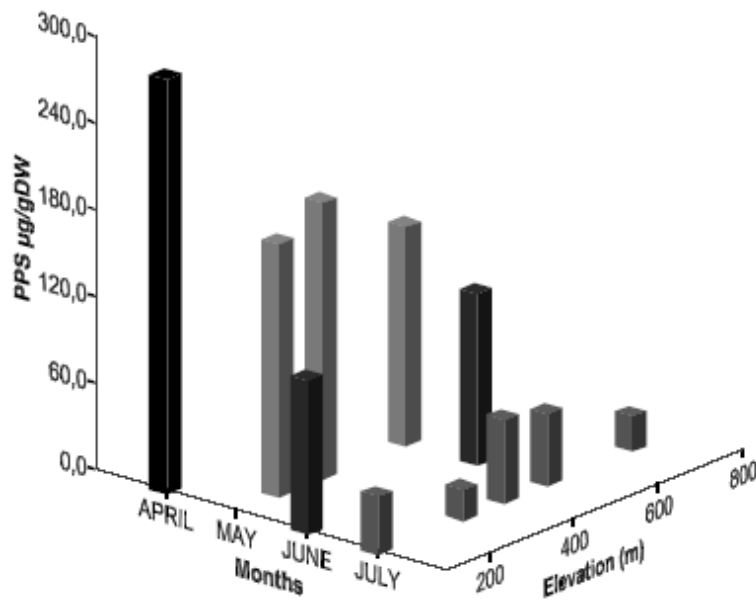
(α) Άνθη



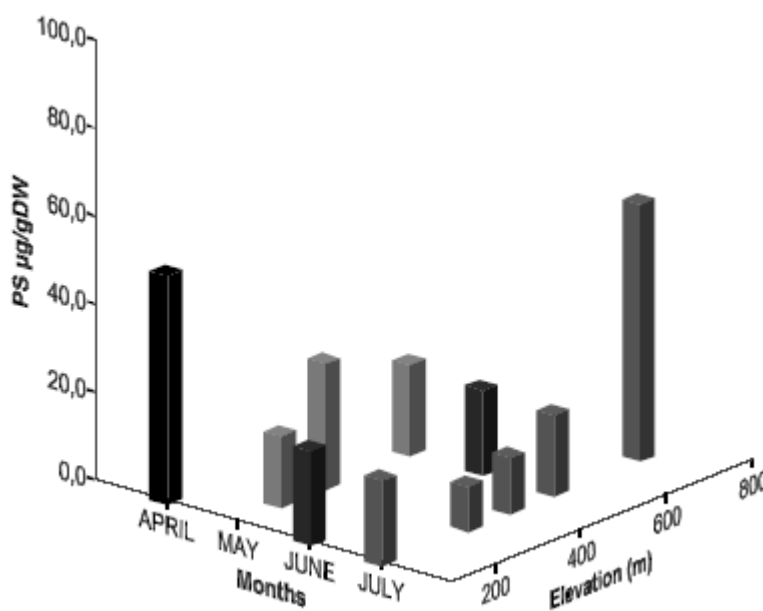
(β) Βλαστοί/φύλλα

Εικόνα 15. Ολικά επίπεδα υπερικίνης, κατά την διάρκεια του αναπτυξιακού σταδίου σε διαφορετικά υψόμετρα, του είδους *H.perfoliatum* (α) σε άνθη και (β) σε βλαστοί/φύλλα.

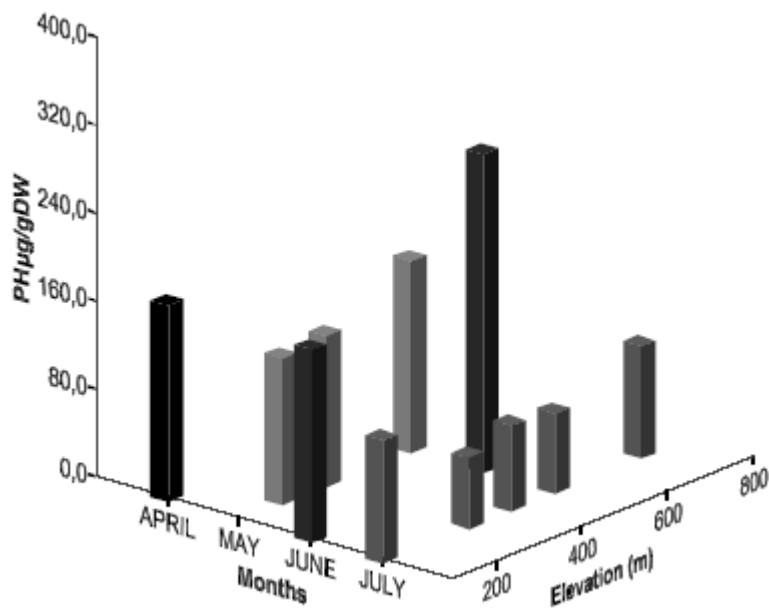
Τα ποσοτικά και ποιοτικά αποτελέσματα της HPLC-ανάλυσης για τις τέσσερις επιμέρους υπερικίνες στα άνθη και βλαστούς/φύλλα απεικονίζονται στις εικόνες 16 και 17. Οι συγκεντρώσεις των επιμέρους υπερικινών στα άνθη δείχνουν διαφορετική εικόνα σε σχέση με τις αντίστοιχες του *H. empetrifolium*. Ιδιαίτερα η συγκέντρωση της υπερικίνης σε αντίθεση με αυτή της ψευδοϋπερικίνης φθάνει στα ανώτερα επίπεδα όταν περάσουμε από άνθιση στην καρποφορία. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται ανεξαρτήτως υψομετρικής διαβάθμισης.



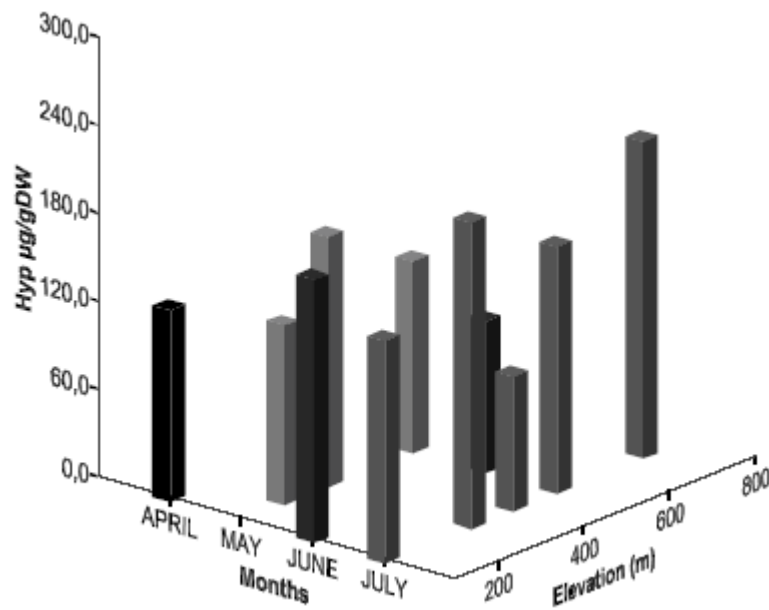
(α)



(β)



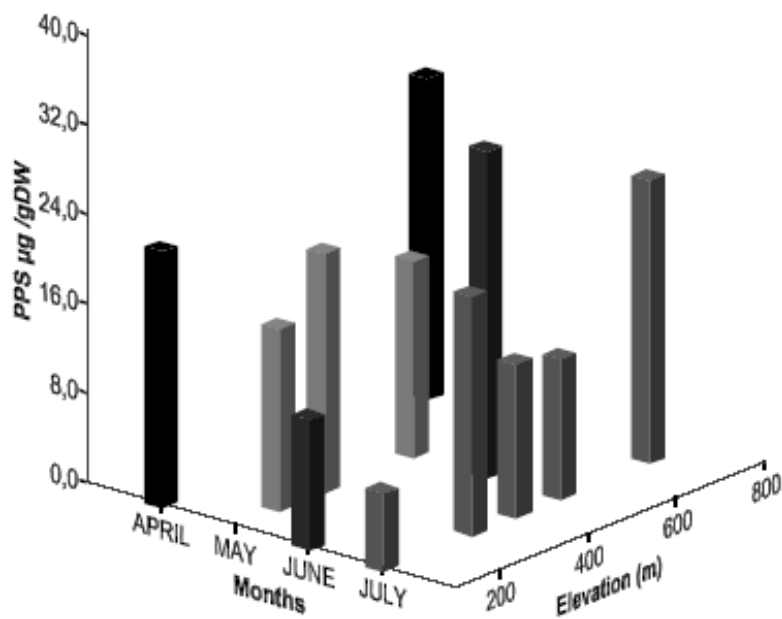
(γ)



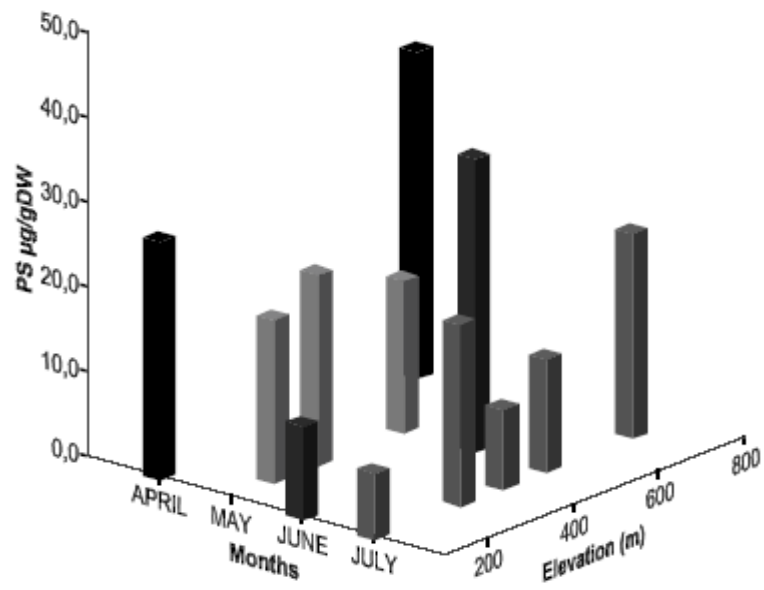
(δ)

Εικόνα 16. Συγκέντρωση υπερικινών (PPS, PS, PH, H) στα άνθη του είδους *H.perfoliatum*, κατά την διάρκεια του αναπτυξιακού σταδίου του φυτού σε διαφορετικά υψόμετρα: (α) PPS πρωτοψευδοϋπερικίνη, (β) PS ψευδοϋπερικίνη, (γ) PH πρωτοϋπερικίνη, (δ) και H υπερικίνη.

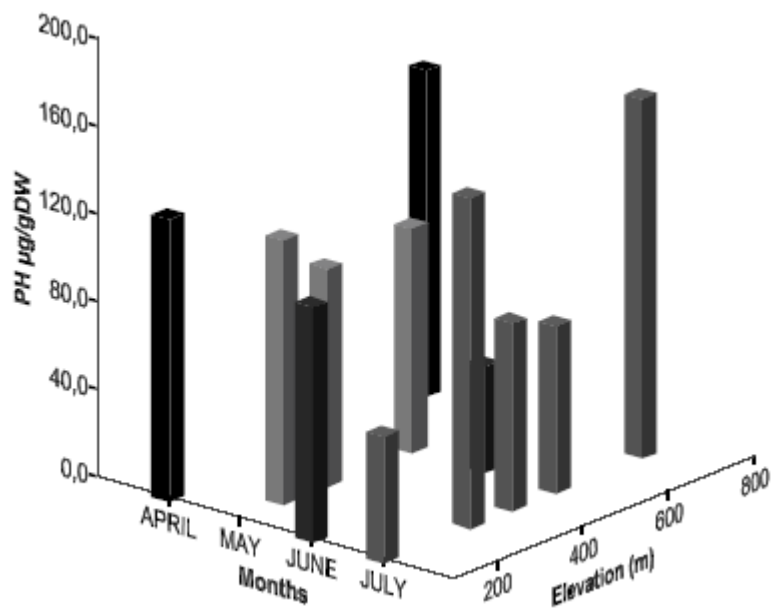
Στα παρακάτω γραφήματα απεικονίζονται τα επίπεδα των επιμέρους υπερικινών σε βλαστούς/φύλλα του είδους *H.perfoliatum*. Σε επίπεδο βλαστού/φύλλα έχουμε μια σαφέστερη μείωση του επιπέδου των τεσσάρων επιμέρους υπερικινών και ιδιαίτερα της υπερικίνης που μειώνεται στην διάρκεια του αναπτυξιακού σταδίου από την άνθιση στην καρποφορία σε αντίθεση με τις αντίστοιχες τιμές στα άνθη. Οι συγκεντρώσεις σε πρωτοψευδοϋπερικίνες και ψευδοϋπερικίνες σε βλαστούς/φύλλα ακολουθούν περιοδική αυξομειωτική τάση. Οι μέγιστες τιμές των συγκεντρώσεων, σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια του φυτού, αντιστοιχούν σε μεγάλα υψόμετρα περίπου 700 m, τα επίπεδα των πρωτοψευδοϋπερικινών και ψευδοϋπερικινών ανέρχονται στα 40-50  $\mu\text{g/g DW}$ .



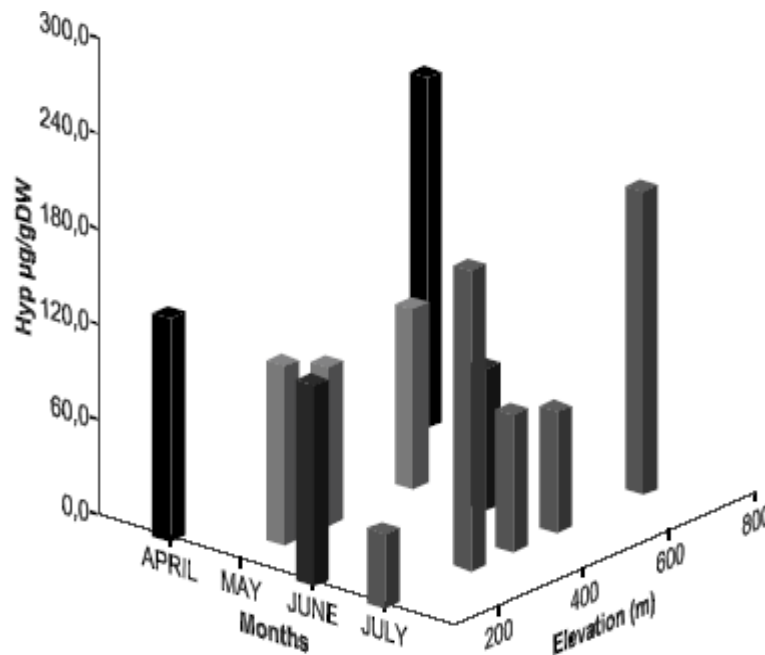
(α)



(β)



(γ)



(δ)

Εικόνα 17. Συγκέντρωση υπερικινών (PPS, PS, PH, H) σε βλαστούς/φύλλα του είδους *H.perfoliatum*, κατά την διάρκεια του αναπτυξιακού σταδίου του φυτού σε διαφορετικά υψόμετρα: (α) PPS πρωτοψευδοϋπερικίνη, (β) PS ψευδοϋπερικίνη, (γ) PH πρωτοϋπερικίνη, και (δ) H υπερικίνη.

### 1.3.3 *Hypericum triquetrifolium*

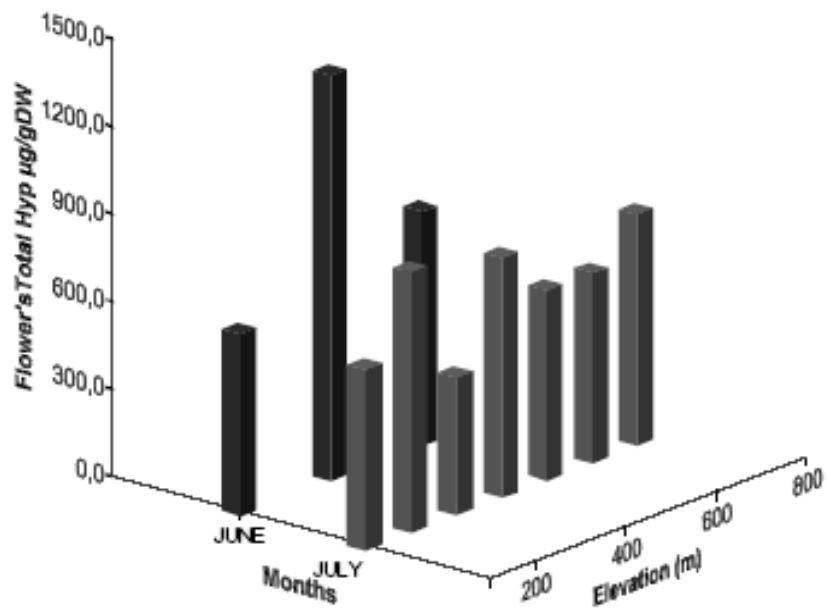
Το *H.triquetrifolium* είναι διάσπαρτο στην Κρήτη σε υψόμετρα από 0-700 m. Ανθίζει από τον Ιούνιο μέχρι το Σεπτέμβριο. Τα ποσοστά των ολικών υπερικινών στο είδος είναι αρκετά υψηλότερα σε σύγκριση με τα *H.empetrifolium* και *H. perfoliatum*. Οι ολικές συγκεντρώσεις υπερικινών στα άνθη είναι μέγιστες (1028 µg/g DW) κατά τον μήνα Ιούνιο, στη αρχή της ανθοφορίας του φυτού. Κατά την διάρκεια της αρχής της άνθισης (Ιούνιος) το φυτό διαθέτει περισσότερα μπουμπούκια και τα επίπεδα των υπερικινών μεγιστοποιούνται, ενώ τον Ιούλιο, όπου κυριαρχούν τα λουλούδια, οι τιμές αυτές μειώνονται ραγδαία (666 µg/g DW).

Πίνακας 4. Ανάλυση των επιμέρους υπερικινών και ολικής υπερικίνης (Μέσες τιμές ± SD) του φυτού *H. triquentrifolium* στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια.

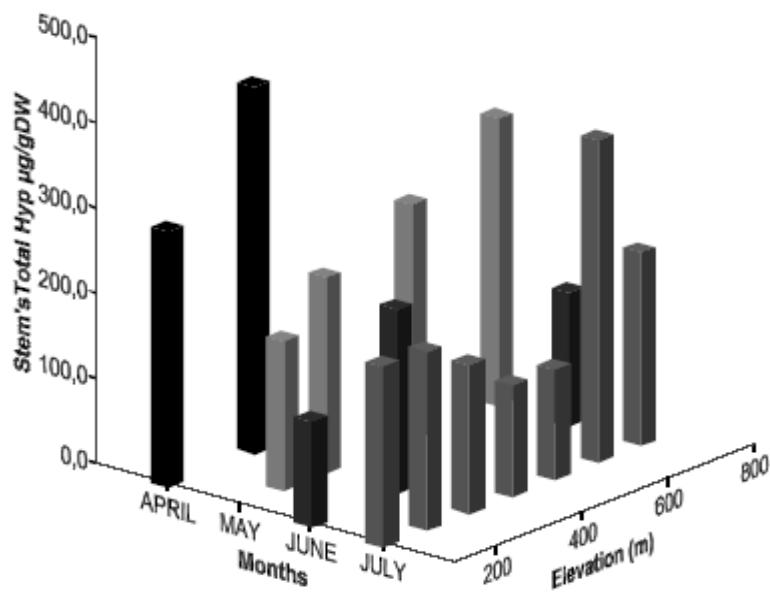
Μήνες	Όργανα	PPS μg/g dw	PSμg/g dw	PHμg/gdw	Hμg/gdw	Ολικά Hμg/g dw
Ιούνιος	Άνθη	365,98±201	38,35±20	238,09±82	386,33±152	1027,74±424
Ιούλιος		145,88±36	29,53±14	239,21±71	251,58±100	666,02±169
Απρίλης	Βλαστός	27,22±10	30,12±9	158,25±43	176,14±49	391,72±110
Μάιος		13,46±4	17,02±5	131,03±33	113,14±31	274,83±69
Ιούνιος		9,22±2	16,31±2	76,47±32	83,63±45	184,64±81
Ιούλιος		14,32±8	12,10±3	83,27±35	95,80±45	205,50±88

Οι συγκεντρώσεις των ολικών υπερικινών σε βλαστούς/φύλλα ακολουθούν εκθετική μείωση κατά τους μήνες Μάιο και Ιούνιο και εν συνεχεία παρατηρείται μια μικρή αύξηση τον Ιούλιο. Οι μέγιστες τιμές ολικής υπερικίνης αντιστοιχούν στον Απρίλιο (367 μg/g DW), την περίοδο που το φυτό βγάζει νέους βλαστούς. Οι μικρότερες συγκεντρώσεις εμφανίζονται τον Ιούνιο (179 μg/g DW), την περίοδο έναρξης της ανθοφορίας του φυτού. Το είδος *H. triquentrifolium* παρουσιάζει υψηλότερες συγκεντρώσεις υπερικινών σε σύγκριση με τα είδη *H. empetrifolium* και *H. perfoliatum*, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην φυσιολογία του φυτού, καθώς και στον βιολογικό του κύκλο. Τα δείγματα προέρχονται από διαφορετικές τοποθεσίες και αυτό ίσως να συμβάλει επιπλέον στην διαφοροποίηση των τιμών της ολικής υπερικίνης, τόσο για τα άνθη, όσο και για τους βλαστούς/φύλλα. Στα γραφήματα που ακολουθούν (Εικόνα 18 α, β) απεικονίζεται η τάση των ολικών υπερικινών σε άνθη και βλαστούς/φύλλα, ως προς το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού σε συνδυασμό με την υψομετρική διαφοροποίηση. Η υψομετρική διαφοροποίηση των υπερικινών στα άνθη δεν φαίνεται να παίζει κάποιο σημαντικό ρόλο τουλάχιστο στο επίπεδο των ολικών υπερικινών. Σε αντίθεση με τα άνθη οι βλαστοί/φύλλα παρουσιάζουν μια αυξητική τάση (ιδιαίτερα τον Μάιο) που εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού.





(α) Άνθη



(β) Βλαστοί/φύλλα

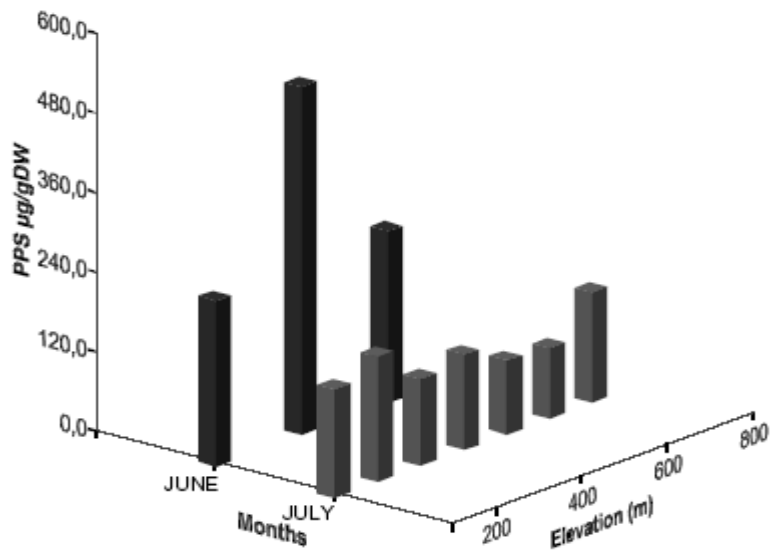
Εικόνα 18. Ολικά επίπεδα υπερικίνης, κατά την διάρκεια του αναπτυξιακού σταδίου σε διαφορετικά υψόμετρα, του είδους *H.triquentrifolium* (α) άνθη και (β) βλαστούς/φύλλα.

Οι ολικές συγκεντρώσεις των υπερικινών σε βλαστούς/φύλλα, με βάση τον υψομετρικό παράγοντα, παρουσιάζουν μια γραμμική αύξηση το Μάιο. Κατά την διάρκεια Ιουνίου – Ιουλίου παρουσιάζεται και πάλι μια περιοδική αυξομείωση. Εντούτοις καταγράφονται κάποιες μέγιστες τιμές υπερικίνης στα 600 m.

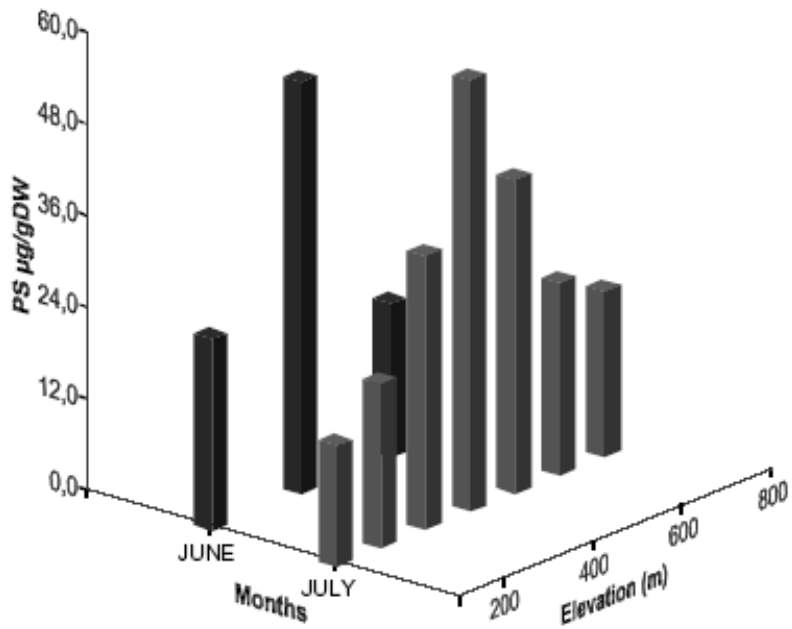
Στην Εικόνα 19 (α, β, γ, δ) παρουσιάζεται η HPLC-ανάλυση των επιμέρους υπερικινών σε άνθη του είδους *H.triquentriifolium*. Εδώ οι συγκεντρώσεις της πρωτοψευδοπερικίνης παρουσιάζουν αρκετά υψηλότερες τιμές σε σχέση με αυτές των ειδών *H. empetrifolium* και *H. perfoliatum*. Ακόμα, οι τιμές της πρωτοϋπερικίνης είναι αρκετά μεγαλύτερες (365 µg/g DW μέσες τιμές) και από αυτές της ψευδοϋπερικίνης (39 µg/g DW μέσες τιμές).

Οι συγκεντρώσεις της πρωτοψευδοϋπερικίνης κατά την περίοδο ανθοφορίας μεγιστοποιούνται (580 µg/g DW) στα 300 m, τον Ιούνιο, ενώ παρουσιάζεται ραγδαία πτώση τον Ιούλιο (150 µg/g DW). Τα επίπεδα συγκεντρώσεων παρουσιάζουν αυξομειωτική τάση σύμφωνα με τον παράγοντα υψόμετρο τον Ιούνιο, ενώ τον Ιούλιο είναι πιο σταθερές. Οι συγκεντρώσεις των ψευδοϋπερικινών μεγιστοποιούνται (50 µg/g DW) για τους μήνες Ιούνιο και Ιούλιο την περίοδο της ανθοφορίας, σε φυτά που συλλέχθηκαν από τα 400 m. Ο παράγοντας υψόμετρο έχει μια ξεκάθαρη αυξομειωτική τάση στα επίπεδα των ψευδοϋπερικινών.

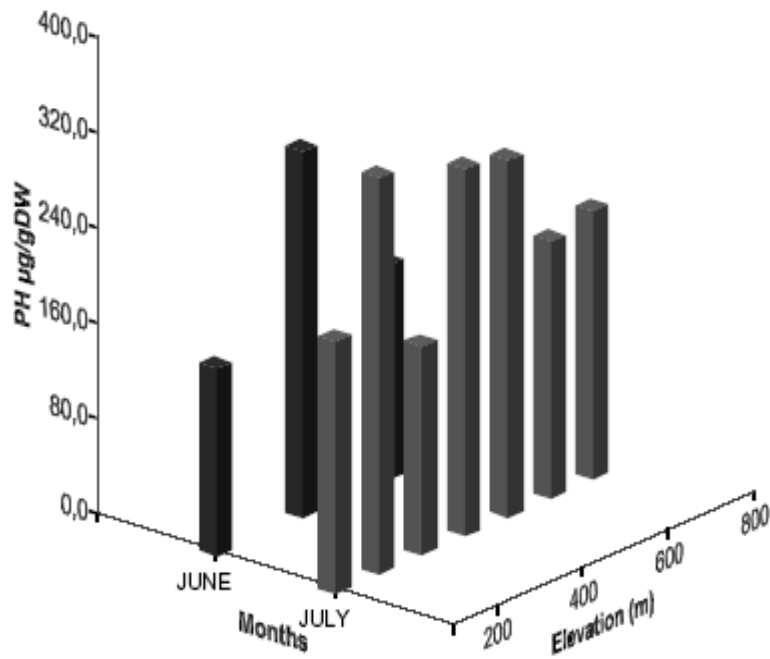
Τα επίπεδα συγκέντρωσης των πρωτοϋπερικινών μεγιστοποιούνται τον Ιούνιο, όπου τα επίπεδα ανέρχονται στα 350 µg/g DW. Η συγκέντρωση στα επίπεδα των υπερικινών μεγιστοποιείται τον Ιούνιο και ανέρχεται στα 500 µg/g DW. Στα γραφήματα απεικονίζονται μέγιστες τιμές πρωτοϋπερικίνης και υπερικίνης σε άνθη στα 300 m τον Ιούνιο, όμως τέλος Ιουλίου δεν υπάρχει κάποια σαφής εξάρτηση των εν λόγω υπερικινών από το υψόμετρο. Συμπερασματικά η επίδραση του παράγοντα υψόμετρο εξαρτάται άμεσα από το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού.



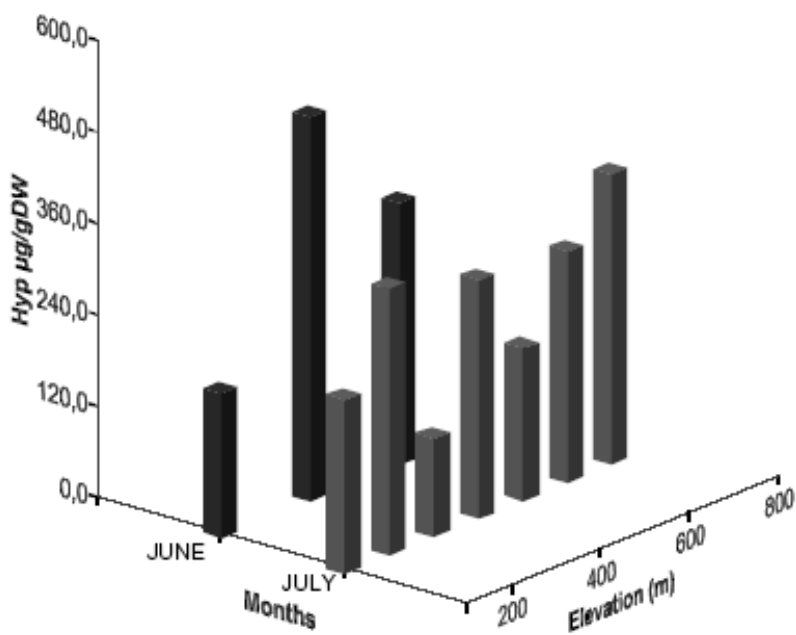
(α)



(β)



(γ)

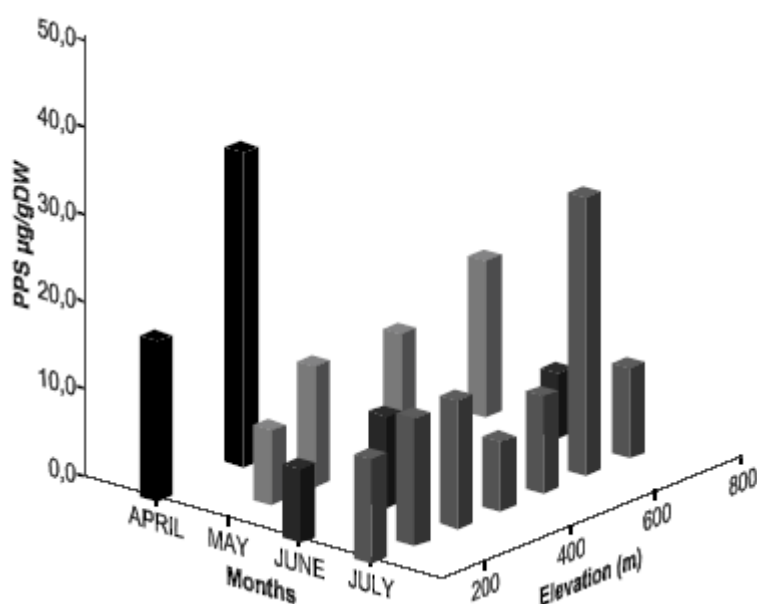


(δ)

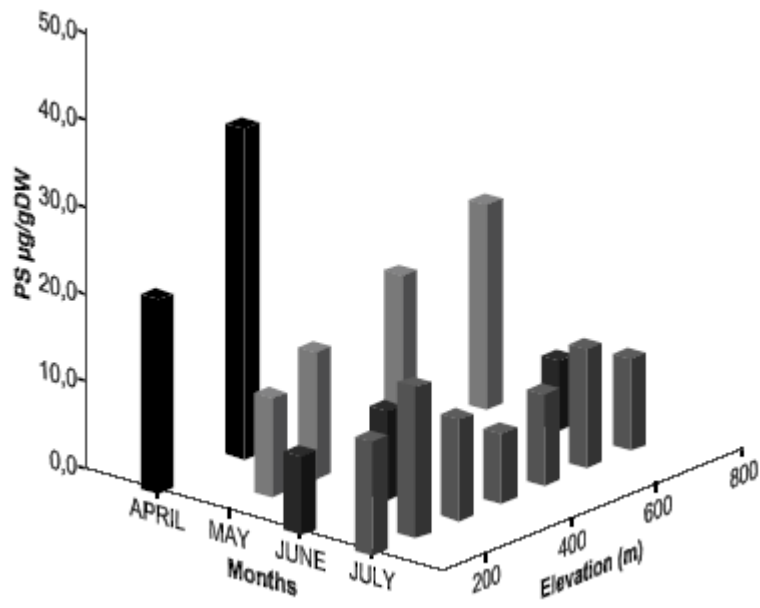
Εικόνα 19. Συγκέντρωση υπερικινών (PPS, PS, PH, H) σε άνθη του είδους *H. triquetrifolium*, κατά την διάρκεια του αναπτυξιακού σταδίου του φυτού σε διαφορετικά υψόμετρα: (α) PPS πρωτοψευδοϋπερικίνη, (β) PS ψευδοϋπερικίνη, (γ) PH πρωτοϋπερικίνη, και (δ) H υπερικίνη.

Τα αποτελέσματα της HPLC-ανάλυσης των επιμέρους υπερικινών σε βλαστούς/φύλλα για το είδος *H.triquentrifolium* απεικονίζονται στην Εικόνα 20 (α, β, γ, δ). Οι συγκεντρώσεις της πρωτοψευδοϋπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης κυμαίνονται στα 40  $\mu\text{g/g}$  DW (μέσες τιμές). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα παρατηρείται μια γραμμική αύξηση σε σχέση με το υψόμετρο, στα επίπεδα συγκέντρωσης της πρωτοψευδοϋπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης με πιο έντονη και ξεκάθαρη τάση (μέγιστες τιμές στα 600 m) αντίστοιχα κατά το μήνα Μάιο.

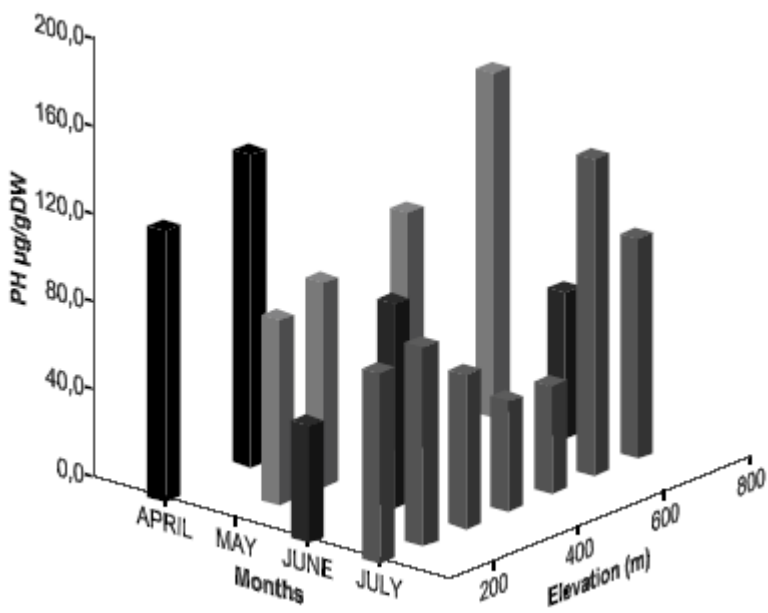
Οι συγκεντρωτικές τιμές των πρωτοϋπερικινών και των υπερικινών παρουσιάζουν την ίδια γραμμική τάση με αυτήν των πρωτοψευδοϋπερικινών και ψευδοϋπερικινών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα διαγράφεται μια γραμμική αύξηση ιδιαίτερα τον μήνα Μάιο, με μέγιστες τιμές να εμφανίζονται στα 600 m. Οι μέγιστες τιμές συγκέντρωσης της πρωτοϋπερικίνης και της υπερικίνης είναι 200  $\mu\text{g/g}$  DW και 250  $\mu\text{g/g}$  DW, αντίστοιχα. Τα επίπεδα των συγκεντρώσεων των πρωτοϋπερικινών και των υπερικινών σε βλαστούς/φύλλα του είδους *H.triquentrifolium* μεγιστοποιούνται κατά την περίοδο του βλαστικού σταδίου (Απρίλιος – Μάιος) του φυτού, ενώ ακολουθούν σταδιακή μείωση κατά την περίοδο ανθοφορίας (Ιούνιος – Ιούλιος). Σε σχέση με τις υψομετρικές διαφοροποιήσεις παρατηρείται και στις δυο περιπτώσεις γραμμική αύξηση τον Μάιο με την αύξηση του υψομέτρου ενώ τον Ιούλιο παρατηρείται μια μείωση από τα 200 μέχρι τα 400m και μια σχετική αύξηση για τα φυτά που βρίσκονται σε υψόμετρα μεγαλύτερα των 600 m.



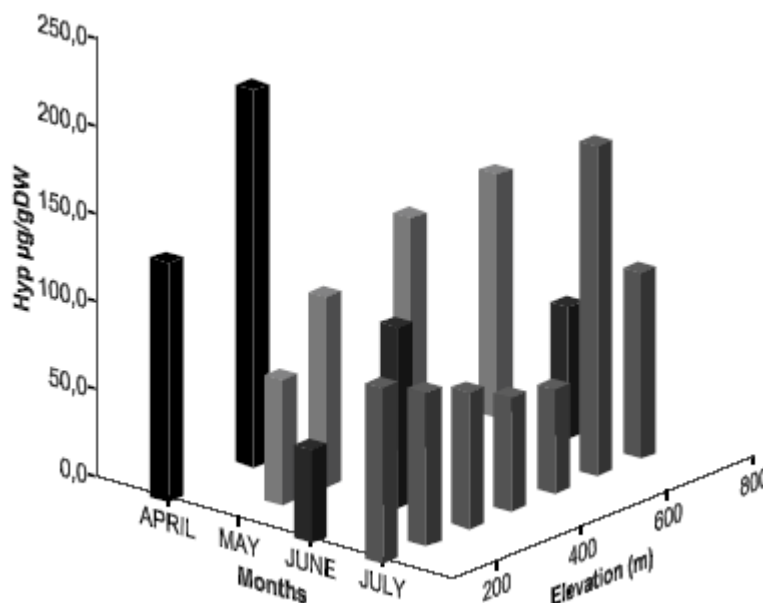
(α)



(β)



(γ)



(δ)

Εικόνα 20. Συγκέντρωση υπερικινών (PPS, PS, PH, H) σε βλαστούς/φύλλα του είδους *H. triquetrifolium*, κατά την διάρκεια του αναπτυξιακού σταδίου του φυτού σε διαφορετικά υψόμετρα: (α) PPS πρωτοψευδοϋπερικίνη, (β) PS ψευδοϋπερικίνη, (γ) PH πρωτοϋπερικίνη, και (δ) H υπερικίνη.

### 1.3.4 *Hypericum perforatum*

Το *H. perforatum* είναι ευρέως γνωστό στην Ευρώπη, Ασία, Αφρική και Αμερική για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες. Απαντάται στη Δυτική και Κεντρική Κρήτη σε συγκριμένα οικοσυστήματα, όπως καλλιεργημένη γη και σε ξηρές λόφο-πλαγιές. Το είδος *H. perforatum* έχει διερευνηθεί εκτενώς όσον αφορά τις υπερικίνες, χωρίς όμως οι ουσίες αυτές να έχουν ποσοτικοποιηθεί εκτενώς σε άγριους πληθυσμούς. Στα αποτελέσματα διακρίνουμε διαφορές στις ποσότητες της υπερικίνης ανάλογα με τα αναπτυξιακά στάδια του φυτού. Στα παρόντα πειράματα, που διεξήχθησαν στο είδος *H. perforatum*, δεν συμπεριλαμβάνεται το βλαστικό στάδιο. Κατά την διάρκεια της ανθοφορίας του φυτού (Ιούνιος) παρατηρούνται οι μέγιστες τιμές των επιπέδων της υπερικίνης. Στον πίνακα 5 φαίνονται αναλυτικά οι επιμέρους υπερικίνες, καθώς επίσης και το άθροισμα τους, σε άνθη και βλαστούς/φύλλα. Τα επίπεδα των υπερικινών στα άνθη είναι αρκετά μεγαλύτερα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα σε βλαστούς/φύλλα. Τον Ιούνιο παρατηρούνται οι μέγιστες

συγκεντρώσεις υπερικινών στα άνθη και ανέρχονται στα 3620  $\mu\text{g/g DW}$ , ενώ στους βλαστούς/φύλλα ανέρχονται στα 481  $\mu\text{g/g DW}$ . Οι συγκεντρώσεις των υπερικινών μειώνονται τον Ιούλιο τόσο στα άνθη (1272  $\mu\text{g/g DW}$ ), όσο και στους βλαστούς/φύλλα (362  $\mu\text{g/g DW}$ ). Στα άνθη παρατηρούμε ότι τα επίπεδα της πρωτοψευδοϋπερικίνης είναι μεγαλύτερα από αυτά της ψευδοϋπερικίνης. Επίσης οι συγκεντρώσεις της πρωτοϋπερικίνης είναι μεγαλύτερες από της υπερικίνης. Τα επίπεδα των υπερικινών στα άνθη είναι αρκετά μεγαλύτερα από αυτά των ψευδοϋπερικινών. Στους βλαστούς/φύλλα τα επίπεδα της πρωτοψευδοϋπερικίνης είναι μεγαλύτερα από αυτά της ψευδοϋπερικίνης, καθώς επίσης και τα επίπεδα της πρωτοϋπερικίνης υπερέχουν αυτά της υπερικίνης.

Πίνακας 5. Ανάλυση υπερικινών και ολικής υπερικίνης (Μέσες τιμές  $\pm$  SD) του φυτού *H. perforatum* στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια.

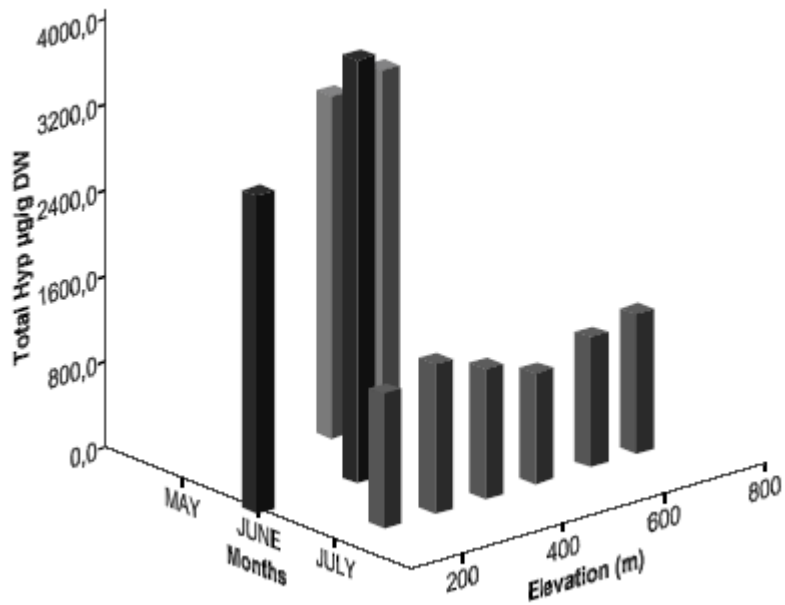
Μήνες	Όργανα	PPS $\mu\text{g/g dw}$	PS $\mu\text{g/g dw}$	PH $\mu\text{g/g dw}$	H $\mu\text{g/g dw}$	Ολική H $\mu\text{g/g dw}$
Μαΐος	Άνθη	1576,58 $\pm$ 42	14,98 $\pm$ 2	1105,17 $\pm$ 45	543,17 $\pm$ 13	3239,90 $\pm$ 71
Ιούνιος		1278,88 $\pm$ 67	122,79 $\pm$ 18	1131,14 $\pm$ 41	1087,75 $\pm$ 36	3619,89 $\pm$ 70
Ιούλιος		219,43 $\pm$ 21	74,77 $\pm$ 12	358,03 $\pm$ 24	620,31 $\pm$ 45	1272,56 $\pm$ 50
Μαΐος	Βλαστός	158,76 $\pm$ 27	19,92 $\pm$ 7	165,59 $\pm$ 22	170,047 $\pm$ 43	513,33 $\pm$ 35
Ιούνιος		91,65 $\pm$ 15	19,71 $\pm$ 7	218,64 $\pm$ 14	205,80 $\pm$ 55	534,81 $\pm$ 40
Ιούλιος		55,93 $\pm$ 12	14,29 $\pm$ 5	140,97 $\pm$ 25	153,86 $\pm$ 31	362,05 $\pm$ 32

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Μαΐου - Ιουνίου, η συνολική υπερικίνη στα άνθη είναι οκταπλάσια σε σύγκριση με τους βλαστούς/φύλλα, ενώ τον μήνα Ιούλιο γίνεται τετραπλάσια.. Στους βλαστούς/φύλλα παρατηρείται ηπιότερη μείωση στα επίπεδα υπερικίνης κατά την διάρκεια καρποφορίας σε σύγκριση με την ταχεία μείωση που παρατηρείται στα άνθη (Εικόνα 21 α, β).

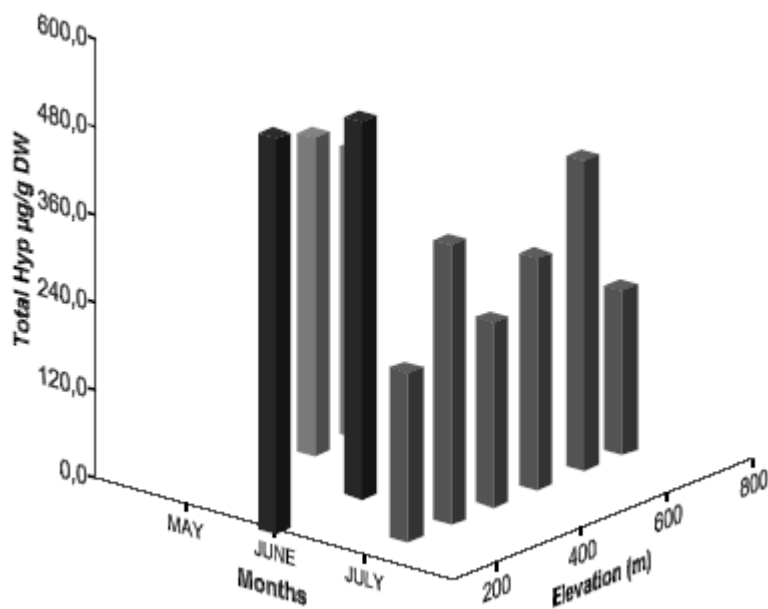
Στα πιο κάτω γραφήματα απεικονίζεται η ολική υπερικίνη σε άνθη και σε βλαστούς/φύλλα σε δύο αναπτυξιακά στάδια (ανθοφορίας και καρποφορίας) του είδους *H. perforatum*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα παρατηρείται μια μικρή αύξηση κατά την διάρκεια της ανθοφορίας ως προς την υψομετρική διαφοροποίηση του φυτού. Ακολούθως παρουσιάζεται σημαντική μείωση στα επίπεδα υπερικίνης στα άνθη την περίοδο της καρποφορίας του φυτού η οποία είναι ανεξάρτητη σε σχέση με την υψομετρική διαβάθμιση του φυτού (Εικόνα 21 α). Στους βλαστούς/φύλλα η



μείωση παρουσιάζει αυξομειώσεις σύμφωνα με τις υψομετρικές διαφοροποιήσεις του φυτού, όπου όμως παρατηρούνται υψηλά επίπεδα υπερικίνης στα 600 m.



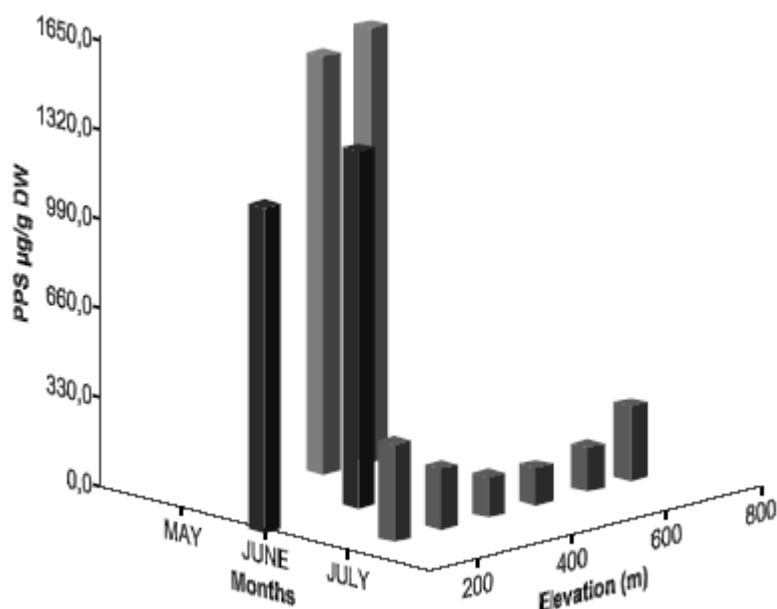
(α) Άνθη



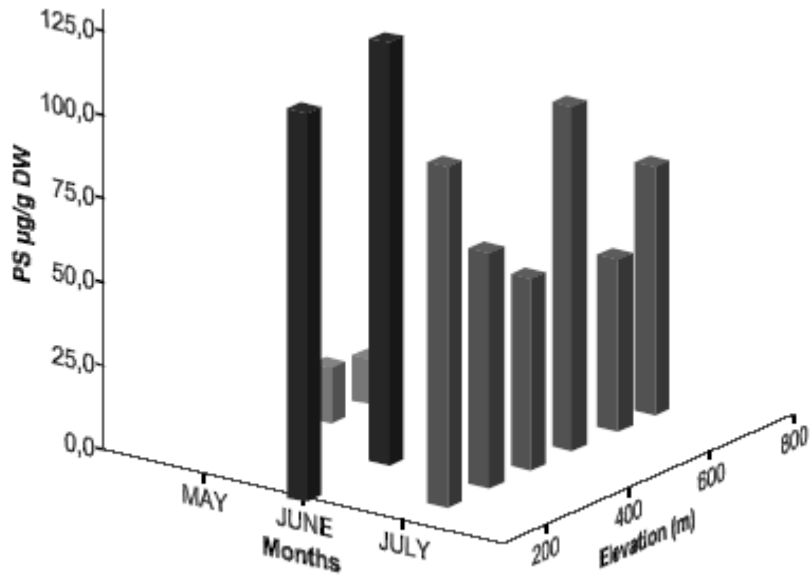
(β) Βλαστοί/φύλλα

Εικόνα 21. Ολικά επίπεδα υπερικίνης, σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια και διαφορετικά υψόμετρα, του είδους *H.perforatum* (α) άνθη και (β) βλαστούς/φύλλα.

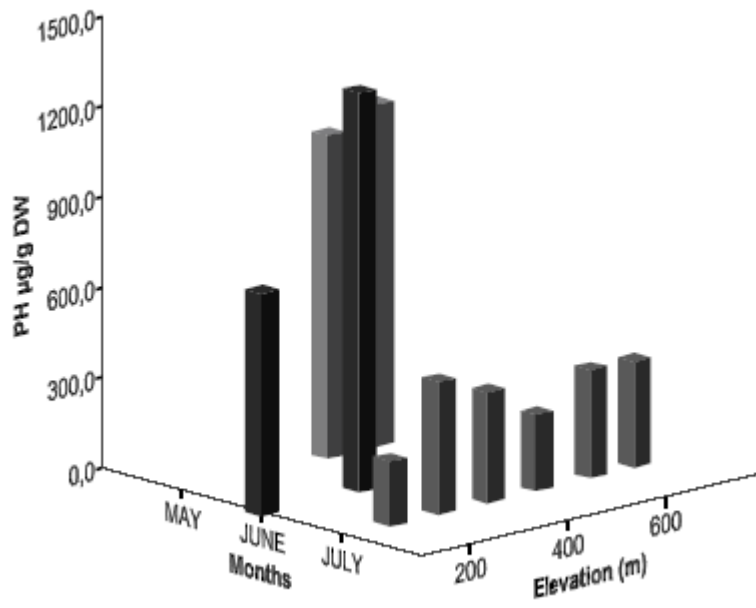
Στα γραφήματα (Εικόνα 22) απεικονίζονται τα επίπεδα των επιμέρους υπερικινών στα άνθη. Οι συγκεντρώσεις της πρωτοψευδοϋπερικίνης (Εικόνα 16 α) έχουν αρκετά υψηλές τιμές τους μήνες Μάιο και Ιούνιο (1650 και 1350  $\mu\text{g/g DW}$  αντίστοιχα), ενώ ακολουθούν ταχεία μείωση τον Ιούλιο (330  $\mu\text{g/g DW}$ ). Τους μήνες Μάιο και Ιούνιο παρατηρείται μια αυξητική τάση των συγκεντρώσεων της πρωτοψευδοϋπερικίνης ως προς την υψομετρική διαφοροποίηση του φυτού. Τα επίπεδα συγκέντρωσης της ψευδοϋπερικίνης (Εικόνα 16 β) είναι μέγιστα τον Ιούνιο (125  $\mu\text{g/g DW}$ ) και παρουσιάζουν ελαφριά μείωση τον Ιούλιο, κατά την διάρκεια του οποίου παρουσιάζονται αυξομειώσεις σύμφωνα με τις υψομετρικές διαβαθμίσεις του φυτού. Τα επίπεδα των πρωτοϋπερικινών έχουν αρκετά υψηλές τιμές τον Μάιο και τον Ιούνιο (1300  $\mu\text{g/g DW}$ ) κατά την διάρκεια της ανθοφορίας, ενώ στην συνέχεια τον Ιούλιο υπάρχει μια σημαντική μείωση την περίοδο της καρποφορίας (400  $\mu\text{g/g DW}$ ). Τα επίπεδα των υπερικινών παρουσιάζουν μέγιστες τιμές τον Ιούνιο (1200  $\mu\text{g/g DW}$ ) όταν τα φυτά είναι σε πλήρη άνθιση και μειώνονται τον Ιούλιο (600  $\mu\text{g/g DW}$ ), όπου η μείωση είναι ανεπηρέαστη από τις υψομετρικές διαβαθμίσεις. Τα επίπεδα της υπερικίνης στη συνέχεια μειώνονται ταχεία την περίοδο της καρποφορίας.



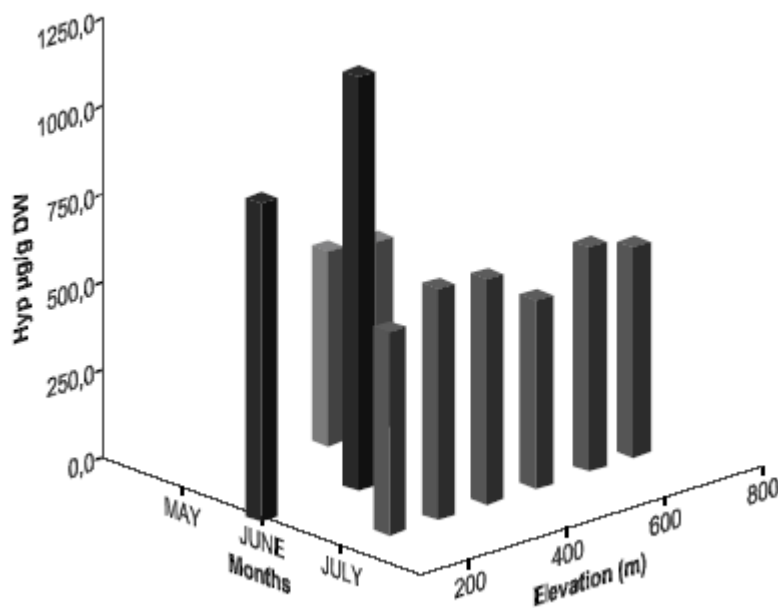
(α)



(β)



(γ)



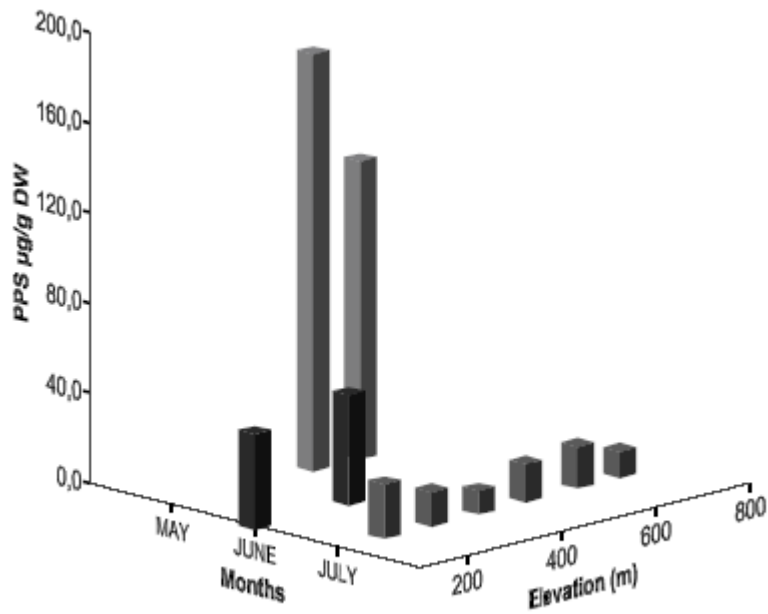
(δ)

Εικόνα 22. Συγκέντρωση υπερικινών (PPS, PS, PH, H) σε άνθη του είδους *H. triquetrifolium*, κατά την διάρκεια του αναπτυξιακού σταδίου του φυτού σε διαφορετικά υψόμετρα: (α) PPS πρωτοψευδοϋπερικίνη, (β) PS ψευδοϋπερικίνη, (γ) PH πρωτοϋπερικίνη, και (δ) H υπερικίνη.

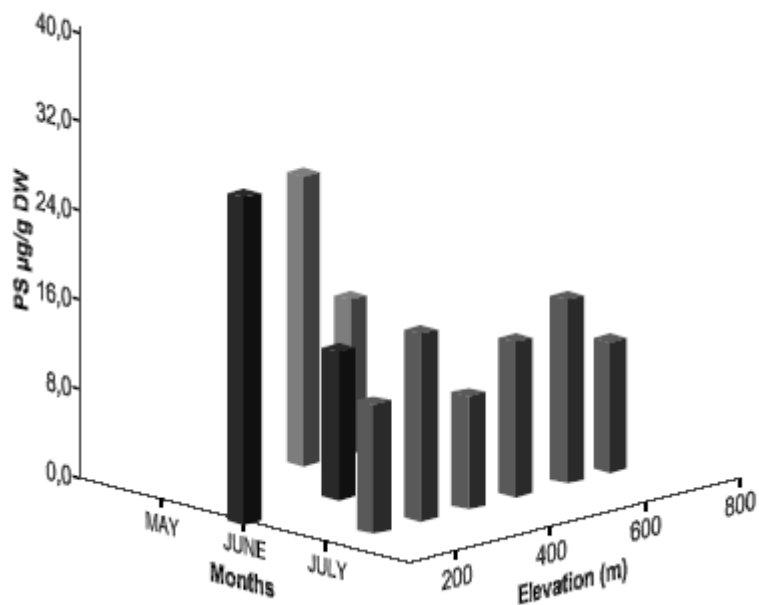
Τα επίπεδα των επιμέρους υπερικινών σε βλαστούς/φύλλα απεικονίζονται στα πιο κάτω γραφήματα (Εικόνα 23). Οι συγκεντρώσεις της πρωτοψευδοϋπερικίνης μεγιστοποιούνται τον Μάιο (200 µg/g DW), αλλά ακολούθως μειώνονται ραγδαία (40 µg/g DW). Ομοίως και οι συγκεντρώσεις της ψευδοϋπερικίνης παρουσιάζουν μέγιστες τιμές τον Μάιο-Ιούνιο (32 µg/g DW), ενώ στη συνέχεια ακολουθούν ταχεία μείωση (16 µg/g DW), όπου παρατηρείται αυξομείωση ως τις υψομετρικές διαφοροποιήσεις των φυτών.

Τα επίπεδα των πρωτοϋπερικινών έχουν αρκετά υψηλές τιμές τον Μάιο και Ιούνιο (250 µg/g DW) στην περίοδο της ανθοφορίας του φυτού, όπου στη συνέχεια τον Ιούλιο παρατηρείται σημαντική μείωση (120 µg/g DW), η οποία παρουσιάζει μικρές αυξομειώσεις σύμφωνα με τις υψομετρικές διαβαθμίσεις του φυτού, αλλά και μια τάση αύξησης μετά τα 300m. Τα επίπεδα των υπερικινών δείχνουν μέγιστες τιμές τον Ιούνιο (200 µg/g DW) στη διάρκεια πλήρης άνθισης, ενώ τον Ιούλιο υπάρχει μια

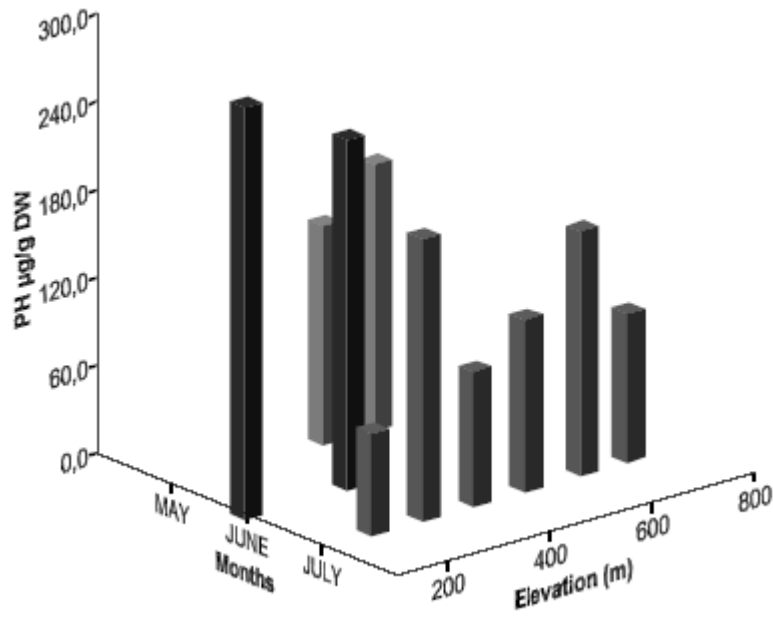
ελαφριά μείωση του επιπέδου (150  $\mu\text{g/g DW}$ ), τάση η οποία αυξάνεται εκθετικά στη συνέχεια με τις υψομετρικές διαφοροποιήσεις των φυτών (250  $\mu\text{g/g DW}$  στα 500 m).



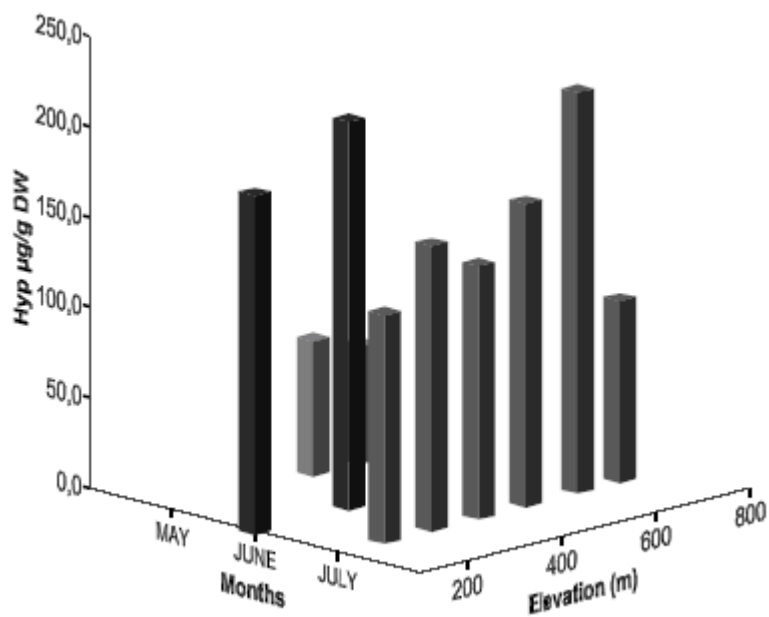
(α)



(β)



(γ)



(δ)

Εικόνα 23. Συγκέντρωση υπερικινών (PPS, PS, PH, H) σε βλαστούς/φύλλα του είδους *H. triquetrifolium*, κατά την διάρκεια του αναπτυξιακού σταδίου του φυτού σε διαφορετικά υψόμετρα: (α) PPS πρωτοψευδοϋπερικήνη, (β) PS ψευδοϋπερικήνη, (γ) PH πρωτοϋπερικήνη, και (δ) H υπερικήνη.

#### 1.4 Συγκεντρώσεις υπερικινών σε επίπεδο φυτού

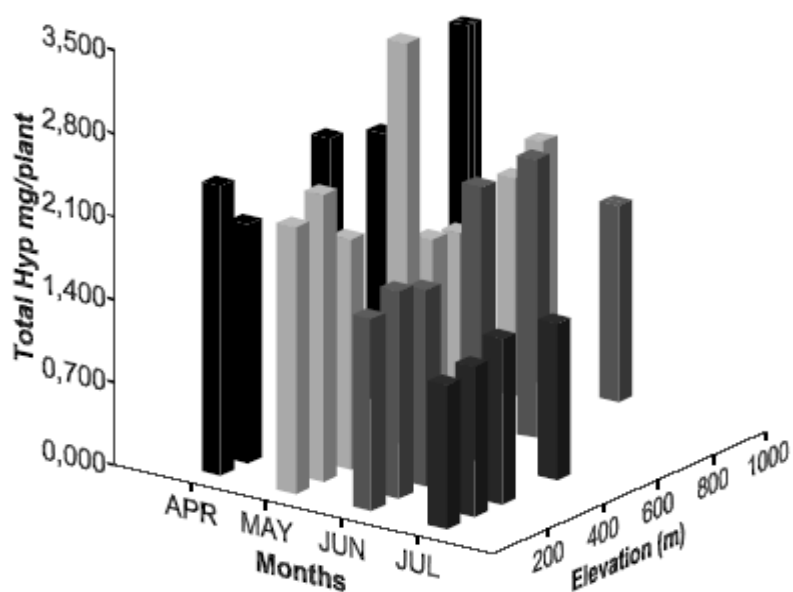
Τα ολικά επίπεδα των υπερικινών για ολόκληρο το φυτό, καθώς επίσης και για τα άνθη και βλαστούς ενός ολόκληρου φυτού για όλα τα είδη παρουσιάζονται στον πίνακα 6. Τα επίπεδα των ολικών υπερικινών στα τέσσερα είδη που εξετάστηκαν διαφοροποιούνται ως προς το αναπτυξιακό στάδιο των φυτών, ως προς τις γεωγραφικές περιοχές και ως προς την υψομετρική κατανομή των φυτών. Η HPLC ανάλυση έγινε ως προς τα όργανα των φυτών, άνθη και βλαστούς/φύλλα. Στον πίνακα 6 περιγράφονται οι ολικές υπερικίνες σε ολόκληρο το φυτό ανά ξηρό βάρος φυτού μετά από σειρά μετρήσεων. Το ξηρό βάρος ενός είδους *H.empetrifolium* είναι 9,68g εκ των οποίων τα 3g άνθη και τα 6.68g βλαστός/φύλλα. Το ξηρό βάρος του είδους *H.perfoliatum* είναι 1,96 εκ των οποίων το 0,7g άνθη και 1,26g βλαστός/φύλλα. Το ξηρό βάρος του είδους *H.triquentrifolium* εκτιμήθηκε 8,93g εκ των οποίων 3g άνθη και 5,93g βλαστός/φύλλα. Το ξηρό βάρος ενός τυπικού *H.perforatum* είναι 5,36g εκ των οποίων 0,9g άνθη και 4,46g βλαστός/φύλλα. Οι τιμές υπολογιστήκαν ως προς τις ολικές υπερικίνες.

Πίνακας 6. *Hypericum* ssp. – επίπεδα ολικών υπερικινών για ολόκληρο το φυτό και για τα επιμέρους όργανα άνθη και βλαστούς/φύλλα ενός ολόκληρου φυτού (mg).

Είδη	Μήνας	Ολόκληρο (mg/dw)	Άνθη (mg/dw)	Βλαστοί-φύλλα (mg/dw)
<i>H.empetrifolium</i>	Απρίλιος	2,70±0,8	1,07±0,7	1,62±0,4
	Μάιος	2,17±0,6	0,84±0,4	1,33±0,3
	Ιούνιος	1,86±0,7	0,58±0,3	1,04±0,2
	Ιούλιος	1,28±0,2	0,34±0,1	0,94±0,2
<i>H.triquentrifolium</i>	Απρίλιος	2,32±0,6		2,32±0,6
	Μάιος	1,51±0,4		1,51±0,4
	Ιούνιος	4,44±2,7	3,28±1,3	1,16±0,5
	Ιούλιος	3,24±1,7	2,02±1,6	1,22±0,5
<i>H.perfoliatum</i>	Απρίλιος	0,98±0,4	0,88	0,54±0,2
	Μάιος	0,58±0,1	0,30±0,1	0,32±0,0
	Ιούνιος	0,65±0,0	0,39±0,1	0,26±0,1
	Ιούλιος	0,46±0,2	0,18±0,1	0,32±0,2
<i>H.perforatum</i>	Απρίλιος			
	Μάιος	5,79±1,3	3,77±0,6	2,02±0,4
	Ιούνιος	5,54±1,2	3,20±1,3	2,34±0,2
	Ιούλιος	2,60±0,7	1,15±0,2	1,45±0,5

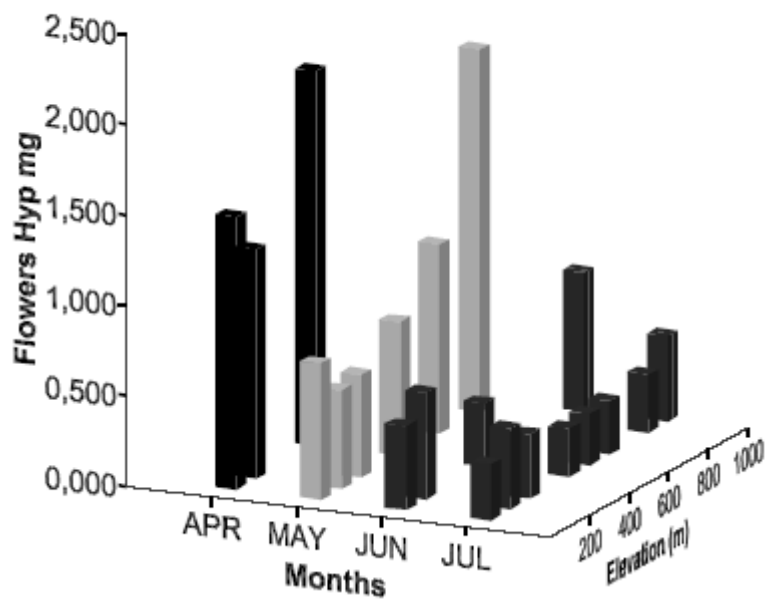
Τα αποτελέσματα στον Πίνακα 6 δείχνουν ότι οι ολικές τιμές υπερικίνης για το *H.empetrifolium* μεγιστοποιούνται τον Απρίλιο (2,70 mg/φυτό) κατά την διάρκεια της ανθοφορίας του φυτού. Τα επίπεδα υπερικίνης στα επιμέρους όργανα άνθη και βλαστούς/φύλλα ανέρχονται στα 1,07 και 1,62 mg/φυτό, αντίστοιχα. Οι ολικές υπερικίνες μειώνονται σταδιακά τους επόμενους μήνες. Κατά την διάρκεια Μαΐου, Ιουνίου και Ιουλίου οι ολικές τιμές των υπερικινών ανέρχονται στα 2.17, 1.86 και 1.28 mg/φυτό, αντίστοιχα. Η τάση αυτή που παρουσιάζεται στα επίπεδα των ολικών υπερικινών σε ολόκληρο το φυτό απεικονίζεται στην εικόνα 24 (α), όπου είναι εμφανής η σταδιακή μείωση στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του είδους. Τα αποτέλεσμα δείχνουν για το είδος *H.empetrifolium* να έχει υψηλότερες τιμές υπερικίνης στους βλαστούς/φύλλα σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια του φυτού (εικόνα 24 γ). Οι τιμές υπερικίνης στα άνθη ενός ολόκληρου φυτού του είδους *H.empetrifolium* είναι συγκριτικά χαμηλότερες σε σχέση με αυτές στους βλαστούς/φύλλα. Τα επίπεδα υπερικινών στα άνθη μεγιστοποιούνται τον Απρίλιο-Μάιο και ακολούθως παρατηρείται ραγδαία μείωση τον Ιούλιο, περίοδος καρποφορίας του φυτού (εικόνα 24 β).

Η αυξητική τάση του επιπέδου των υπερικινών τον Μάιο σε σχέση με την αύξηση του υψομέτρου ενδεχομένως να σχετίζεται με καθυστέρηση της ανάπτυξης των άνθεων, έτσι ώστε στα 800 m το μέγιστο των υπερικινών είναι τον Μάιο, ενώ στα 400 m μέτρα είναι ήδη τον Απρίλιο.

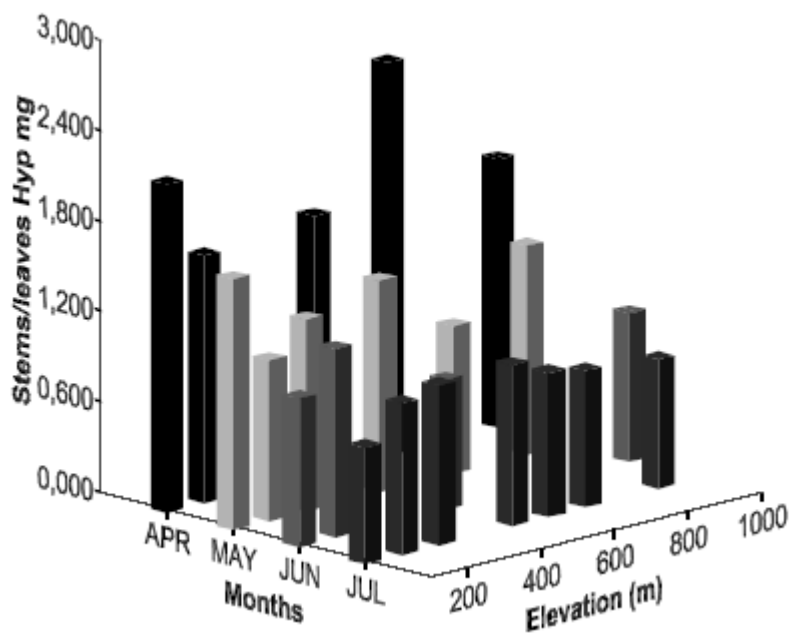


(α)





(β)

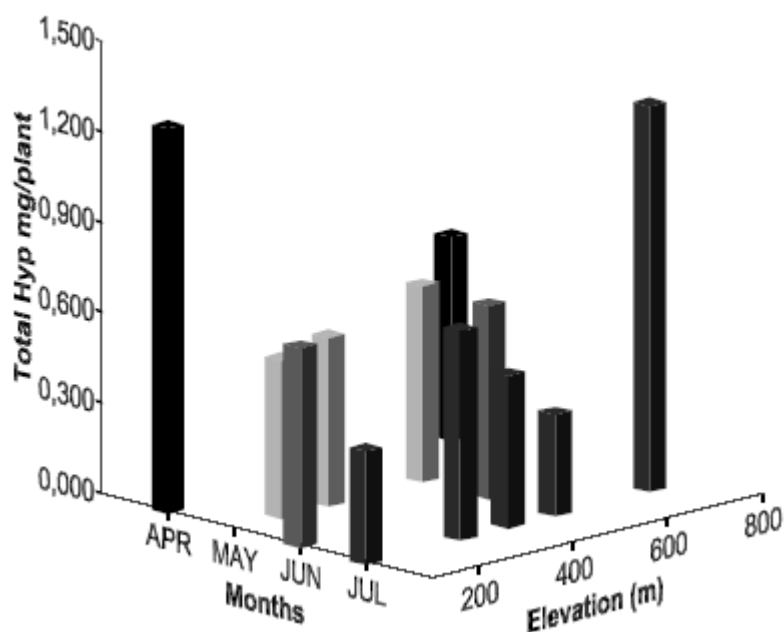


(γ)

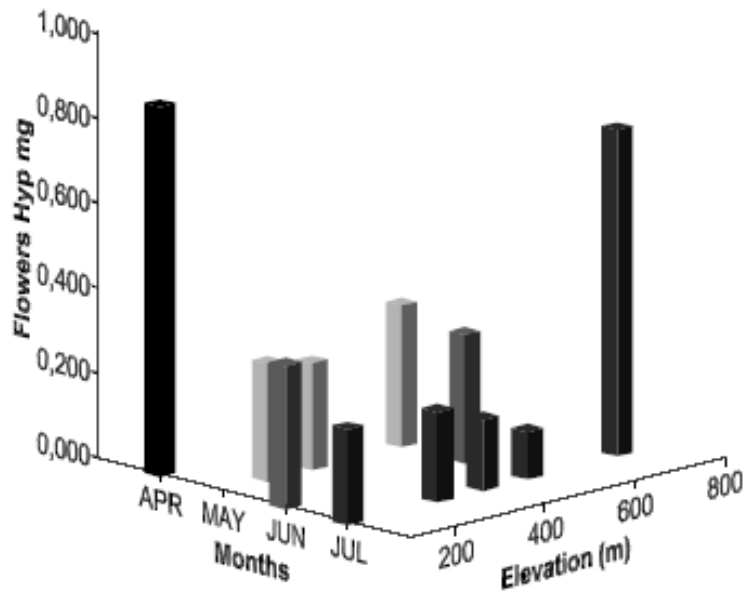
Εικόνα 24 (α, β, γ). Επίπεδα ολικών υπερικινών σε επίπεδο (α) φυτού στο είδος *H. empetrifolium* στα επιμέρους όργανα (β) άνθη και (γ) βλαστούς/φύλλα.

Τα επίπεδα υπερικινών στο *H.perfoliatum* σε ολόκληρο το φυτό παρουσιάζουν τις χαμηλότερες τιμές σε σύγκριση με τα άλλα είδη (Πίνακας 6). Οι τιμές των υπερικινών μεγιστοποιούνται τον Απρίλιο κατά την διάρκεια της ανθοφορίας 0,98 mg του φυτού. Ακολούθως οι τιμές παρουσιάζουν σημαντική μείωση κατά την διάρκεια των μηνών Μάιος, Ιούνιος και Ιούλιος, με χαμηλότερα επίπεδα υπερικινών να παρουσιάζονται στο αναπτυξιακό στάδιο της καρποφορίας. Με την αύξηση του υψομέτρου το μέγιστο των ολικών υπερικινών ανά φυτό μετατοπίζεται από τον Απρίλιο στα 0-100 m και τον Ιούλιο στα 700 m. Κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και με τις υπερικίνες στα άνθη και στους βλαστούς/φύλλα.

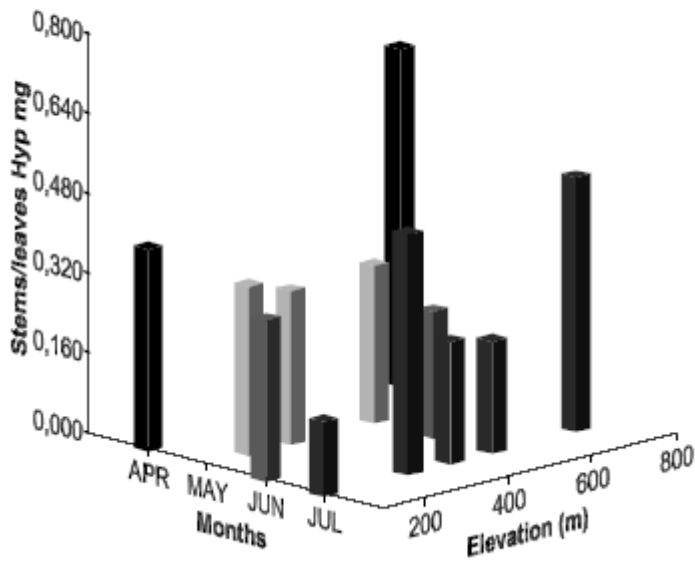
Από τα πιο κάτω γραφήματα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα επίπεδα των υπερικινών στους βλαστούς/φύλλα από ένα ολόκληρο φυτό υπερισχύουν αυτά στα άνθη (Εικόνα 25 β, γ). Το υψόμετρο δεν φαίνεται να παίζει κάποιο σημαντικό ρόλο στα επίπεδα των υπερικινών τόσο σε ολόκληρο το φυτό όσο και στα επιμέρους όργανα.



(α)



(β)

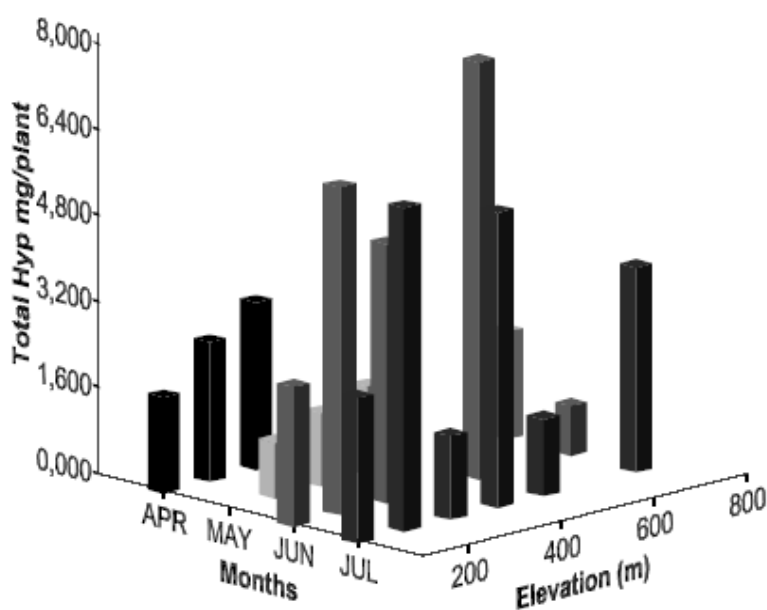


(γ)

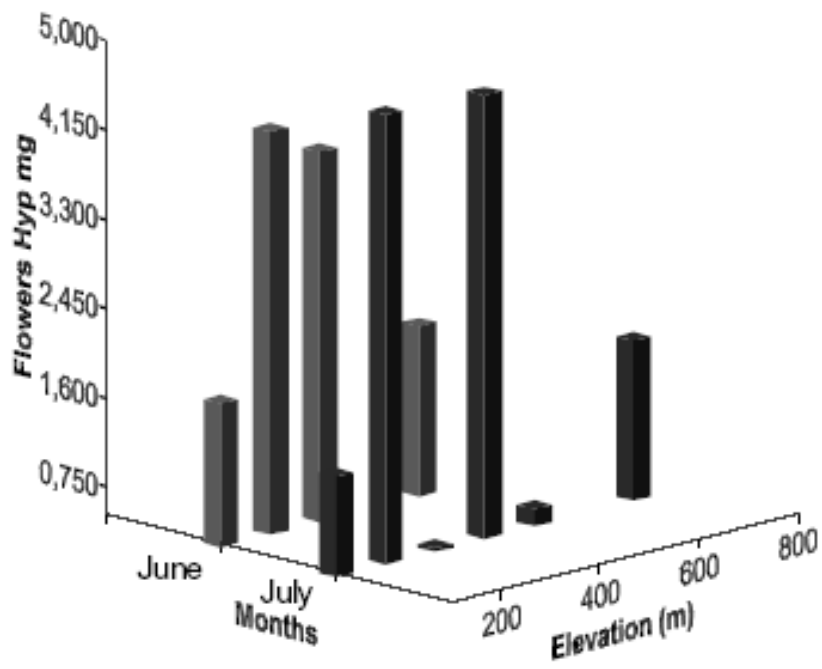
Εικόνα 25. (α, β, γ) Επίπεδα υπερικινών σε (α) ολόκληρο το φυτό στο είδος *H.perfoliatum* και στα επιμέρους όργανα (β) άνθη και (γ) βλαστούς/φύλλα.

Τα επίπεδα των ολικών υπερικινών στον *H.triquentrifolium* παρουσιάζουν μέγιστες τιμές τον Ιούνιο και ανέρχονται σε 4,44 mg/φυτού. Οι μέγιστες αυτές τιμές παρατηρούνται στην αρχή της ανθοφορίας του φυτού, οι οποίες στα επιμέρους όργανα άνθη και βλαστούς/φύλλα ανέρχονται στα 3,2 και 1,1 mg/φυτού, αντίστοιχα. Τον Ιούλιο οι ολικές τιμές των υπερικινών μειώνονται στα 3,24 mg/φυτού, και στα επιμέρους όργανα άνθη και βλαστούς/φύλλα σε 2,02 και 1,22 mg/φυτού, αντίστοιχα. Αξιοσημείωτο είναι για το είδος *H.triquentrifolium* ότι κατά την διάρκεια του βλαστικού σταδίου στους βλαστούς/φύλλα, τα επίπεδα των υπερικινών ανέρχονται στα 2,32 mg/φυτού.

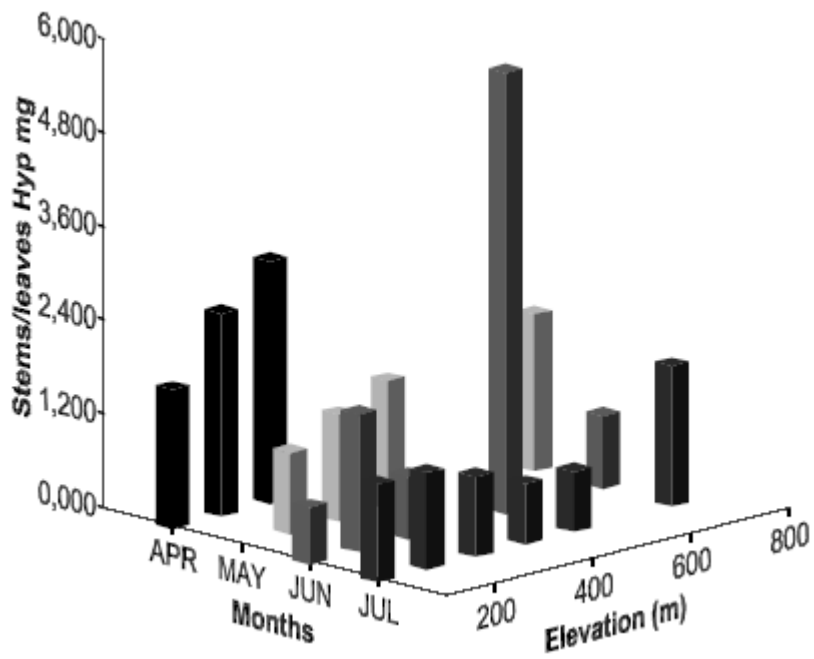
Τα επίπεδα υπερικίνης σε ολόκληρο το φυτό και για τα επιμέρους όργανα άνθη και βλαστούς/φύλλα απεικονίζονται στην Εικόνα 26 (α, β, γ). Οι τιμές της υπερικίνης μεγιστοποιούνται κατά την διάρκεια της ανθοφορίας (Ιούνιος-Ιούλιος). Με την υψομετρική διαβάθμιση των δειγμάτων, παρατηρείται ασαφής εικόνα με κάποια αυξητική τάση. Τα επίπεδα των υπερικινών στα άνθη ενός φυτού έχουν πιο σταθερή τάση αύξησης (4 mg/φυτού) σε σύγκριση με αυτήν στους βλαστούς/φύλλα, όσον αφορά το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού. Υπάρχουν όμως αυξομειώσεις στα επίπεδα των υπερικινών με βάση τις υψομετρικές διαβαθμίσεις του φυτού. Τα επίπεδα των υπερικινών στους βλαστούς/φύλλα παρουσιάζουν μια αυξητική τάση όσον αφορά την υψομετρική διαβάθμιση των φυτών. Κατά την διάρκεια του αναπτυξιακού σταδίου των φυτών παρατηρείται μια εκθετική μείωση στα επίπεδα των υπερικινών σε βλαστούς/φύλλα.



(α)



(β)

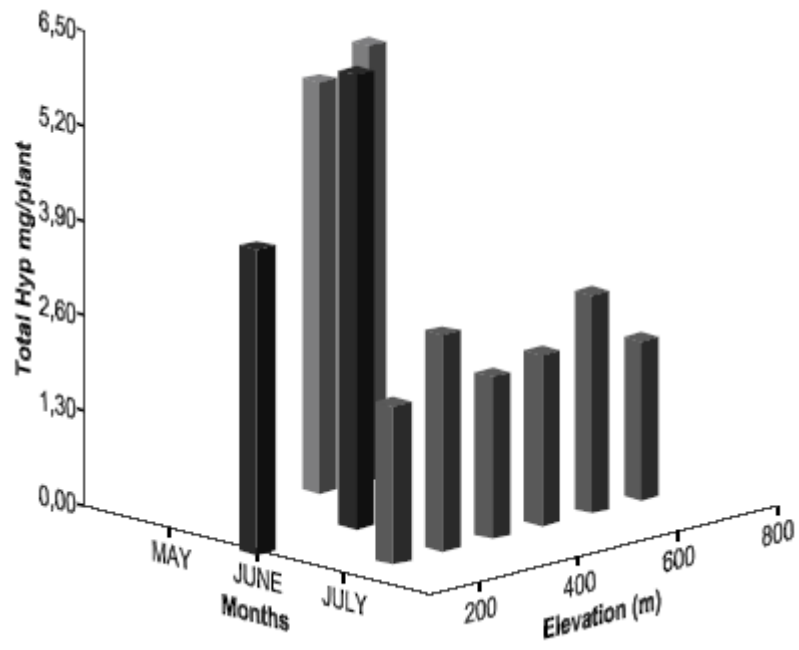


(γ)

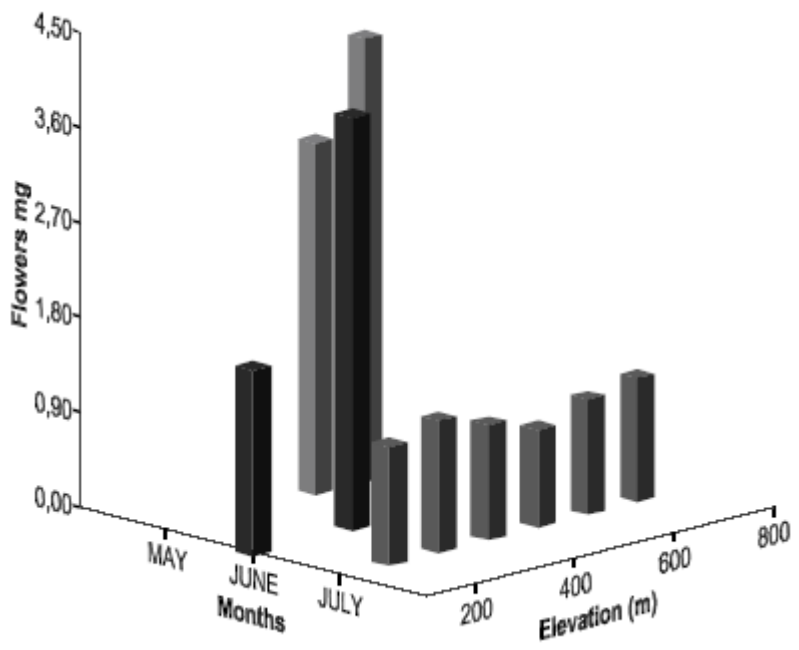
Εικόνα 26 (α, β, γ). Επίπεδα ολικών υπερικινών σε (α) επίπεδο φυτού στο είδος *H.triquentrifolium* και στα επιμέρους όργανα (β) άνθη και (γ) βλαστούς/φύλλα.

Στο είδος *H.perforatum* οι ολικές τιμές των υπερικινών ανέρχονται στα 5,79 mg/φυτό κατά την περίοδο ανθοφορίας, όπου στα επιμέρους όργανα άνθη και βλαστούς/φύλλα ανέρχονται στα 3,77 και 2,02 mg/φυτού, αντίστοιχα. Στο είδος *H.perforatum* παρατηρούμε τις ψηλότερες συγκεντρώσεις υπερικινών σε σχέση με τα υπόλοιπα τρία είδη που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία. Στα άνθη παρατηρείται το διπλάσιο επίπεδο υπερικίνης σε σύγκριση με αυτό στους βλαστούς/φύλλα. Οι μέγιστες τιμές στα επίπεδα της υπερικίνης παρατηρούνται τον Μάιο, δηλαδή στο ξεκίνημα της ανθοφορίας του φυτού. Τον Ιούνιο είναι εξίσου υψηλές οι τιμές των υπερικινών του φυτού (5,54 mg/φυτού) και των επιμέρους οργάνων ( 3,20 και 2,34 mg/φυτού αντίστοιχα). Τον Ιούλιο παρατηρείται μια ταχεία μείωση των υπερικινών (2,60 mg/φυτού) σε σύγκριση με τους προηγούμενους μήνες. Το φυτό βρίσκεται στο στάδιο της καρποφορίας και ίσως αυτό εξηγεί ένα από τους λόγους της ραγδαίας αυτής μείωσης.

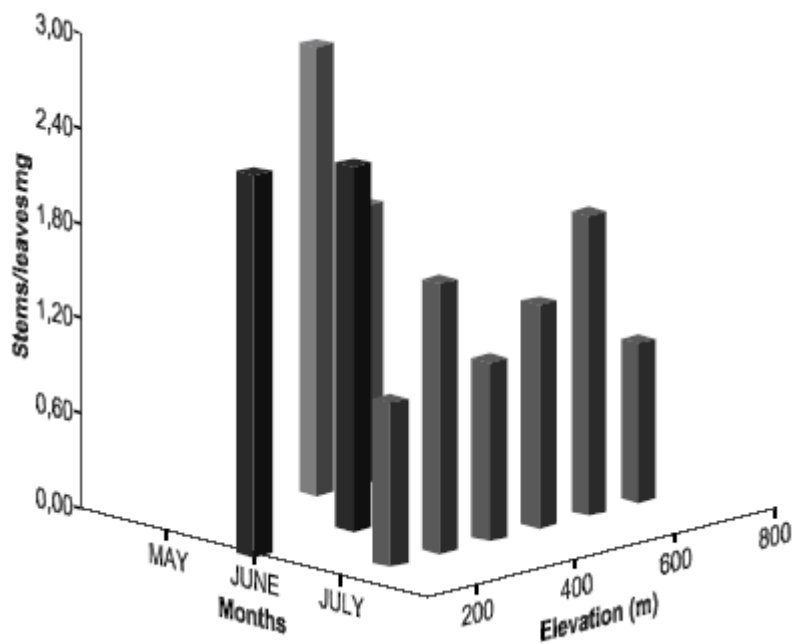
Στα πιο κάτω γραφήματα Εικόνα 27 (α, β, γ) απεικονίζονται τα επίπεδα υπερικίνης σε ολόκληρο το φυτό και στα επιμέρους όργανα άνθη και βλαστούς/φύλλα. Τα επίπεδα των υπερικινών παρουσιάζουν μέγιστο στα 5,80 mg/φυτού, κατά την περίοδο της ανθοφορίας (Μάιος-Ιούνιος). Οι τιμές των υπερικινών μειώνονται αισθητά τον Ιούλιο κατά την διάρκεια της καρποφορίας, χωρίς ουσιαστική διαφοροποίηση σε σχέση με την υψομετρική αλλαγή. Στην διάρκεια της ανθοφορίας έχουμε τα υψηλότερα ποσοστά υπερικινών και στα άνθη και στους βλαστούς/φύλλα, ενώ τα χαμηλότερα επίπεδα παρατηρούνται κατά την διάρκεια της καρποφορίας, επιπρόσθετα δεν παρατηρείται κάποια σημαντική διαφοροποίηση ως προς την υψομετρική διαβάθμιση του φυτού.



(α)



(β)



(γ)

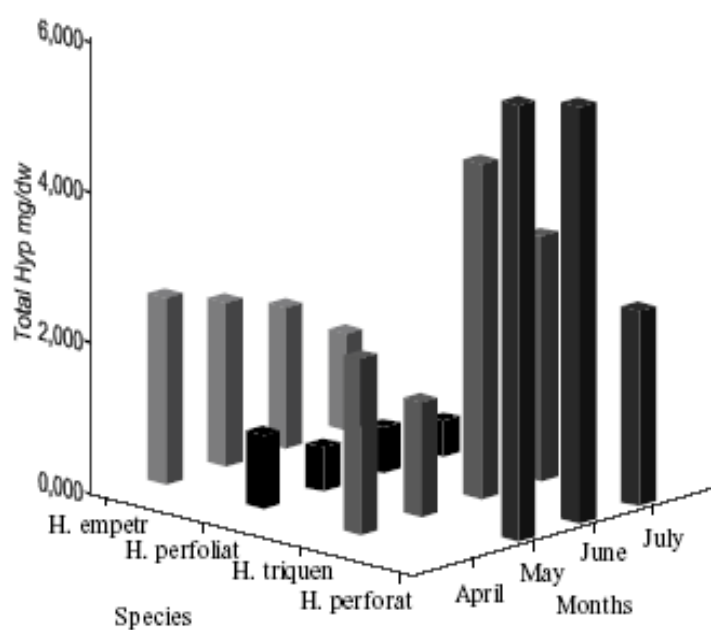
Εικόνα 27 (α, β, γ). Επίπεδα ολικών υπερικινών σε (α) επίπεδο φυτού στο είδος *H.perforatum* και στα επιμέρους όργανα (β) άνθη και (γ) βλαστούς/φύλλα.

Τα επίπεδα των ολικών υπερικινών έχουν σημαντική διαφοροποίηση ( $P < 0.005$ ) ως προς τα είδη. Τα αποτελέσματα των επιπέδων των υπερικινών στα είδη *Hypericum* του εξετάστηκαν και στα επιμέρους όργανα τους άνθη και βλαστούς/φύλλα σε επίπεδο φυτού, είναι σημαντικά σε σχέση με το αναπτυξιακό στάδιο των φυτών ( $P < 0.001$ ). Τα μεγαλύτερα επίπεδα υπερικινών παρατηρούνται κατά την διάρκεια της ανθοφορίας σε όλα τα είδη τόσο σε επίπεδο φυτού όσο και στα επιμέρους όργανα άνθη και βλαστούς/φύλλα. Επίσης παρατηρείται ταύτιση των ειδών *H.empetrifolium* με το *H.perfoliatum* και *H.triquentrifolium* με το *H.perforatum*, η οποία ίσως οφείλεται στην περιοδικότητα του αναπτυξιακού σταδίου των ειδών. Τα είδη *H.empetrifolium* και *H.perfoliatum* ανθίζουν τον Απρίλιο και παρουσιάζουν μεγιστοποίηση των υπερικινών στην αρχή της ανθοφορίας, την ίδια τάση παρουσιάζουν και τα *H.triquentrifolium* και *H.perforatum* τα οποία ανθίζουν τέλος Μαΐου και έχουν μέγιστες τιμές υπερικινών επίσης στην αρχή της ανθοφορίας. Τα δυο τελευταία έχουν όμοια υψομετρική διαβάθμιση. Στο παρακάτω γράφημα



απεικονίζονται τα τέσσερα είδη *Hypericum* κατά την διάρκεια του αναπτυξιακού τους σταδίου. Τα αποτελέσματα δείχνουν την τάση που παρατηρείται στα επίπεδα των υπερικινών στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια των φυτών. Οι τιμές των υπερικινών μεγιστοποιούνται κατά την διάρκεια της ανθοφορίας και μειώνονται σταδιακά στην καρποφορία. Την περίοδο που αρχίζει η ανθοφορία όπου υπάρχουν αρκετά μπουμπούκια ακόμη τα επίπεδα της υπερικίνης μεγιστοποιούνται σε όλα τα είδη.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα επίπεδα των ολικών υπερικινών σε επίπεδο φυτού και στα επιμέρους όργανα άνθη και βλαστούς φύλλα στα είδη *H.perforatum* και *H.triquentrifolium* είναι αρκετά υψηλές. Τα είδη *H.empetrifolium* και *H.perfoliatum* έχουν χαμηλότερα επίπεδα υπερικίνης με το *H.empetrifoliym* να έχει τα μεγαλύτερα επίπεδα.



Εικόνα 28. Συγκριτική παρουσίαση ολικών υπερικινών από διάφορα είδη *Hypericum* στη διάρκεια της ανάπτυξης τους.

## Συζήτηση

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα των υπερικινών στα φυτά του γένους *Hypericum* αποτελούν αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητών. Η διαφοροποίηση στα επίπεδα των υπερικινών έχει αυξήσει το ενδιαφέρον για την διερεύνηση των πιθανών παραγόντων που την μεταβάλλουν. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση του αναπτυξιακού σταδίου και της υψομετρικής κατανομής των φυτών στα επίπεδα της συγκέντρωσης υπερικινών σε τέσσερα είδη του γένους *Hypericum*.

Τα επίπεδα της υπερικίνης σε όλα τα είδη που μελετήθηκαν παρουσίασαν μεγαλύτερα επίπεδα από αυτά της ψευδοϋπερικίνης. Αυτό ίσως οφείλεται σε ενδογενείς ρυθμιστικούς παράγοντες, στην ηλικία των ιστών, καθώς επίσης και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Κατά την διάρκεια της ανθοφορίας σημειώθηκαν τα μεγαλύτερα επίπεδα συγκέντρωσης της υπερικίνης σε σχέση με την ψευδοϋπερικίνη. Αυτό ίσως οφείλεται στην μεριστωματική διαφοροποίηση των ανθέων η οποία αντιπροσωπεύει την μετάβαση από ανώριμα άτομα σε αναπαραγωγικά άτομα με την μεσολάβηση των φυτοχρωματικών ουσιών (Ciccarelli et al., 2001). Με βάση την σύνθεση των υπερικινών στα είδη *Hypericum* κατά την διάρκεια του αναπτυξιακού τους σταδίου, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η φυσιολογική διαδικασία της οντογένεσης, και ακολούθως η μορφολογική αλλαγή που επέρχεται σχετίζονται με τις αλλαγές του δευτερογενή μεταβολισμού (Schwob et al., 2004).

Τα μέγιστα επίπεδα ολικών υπερικινών παρατηρούνται για τα είδη *H.empetrifolium*, *H.perfoliatum*, *H.triquentrifolium*, *H.perofratum* στην περίοδο ανθοφορίας τους, όπου για τα δύο πρώτα είδη είναι Απρίλιος και για τα δυο τελευταία είναι τέλη Μαΐου. Αν και τα είδη *H.empetrifolium* και *H.perfoliatum* παρουσιάζουν τις μέγιστες τιμές υπερικινών τον Απρίλιο, την περίοδο της ανθοφορίας τους, διαφέρουν ως προς την υψομετρική τους διαβάθμιση. Αντίθετα τα είδη *H.triquentrifolium* και *H.perofratum* παρουσιάζουν ταύτιση τόσο ως προς την περίοδο ανθοφορίας όσο και ως προς την υψομετρική τους διαβάθμιση. Το γεγονός ότι την περίοδο της ανθοφορίας παρατηρούνται τα υψηλότερα επίπεδα υπερικινών σε όλα τα είδη, έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες του γένους *Hypericum* και κυρίως στο είδος *H.perforatum* (Routaroud και Girardi 2000; Gray et al., 2003; Umek et al., 1998; και Buter et al., 1997). Η έντονη μεριστωματική διαφοροποίηση που λαμβάνει χώρα στα άνθη και η οποία αντιπροσωπεύει την μετάβαση από ανώριμα άτομα σε

αναπαραγωγικά άτομα με την διαμεσολάβηση των φυτοχρωματικών ουσιών έχει προταθεί για την υψηλή συγκέντρωση υπερικινών κατά την περίοδο της ανθοφορίας (Fosket, 1994). Επομένως, με βάση την σύνθεση των υπερικινών στα είδη *Hypericum* κατά την διάρκεια του αναπτυξιακού σταδίου, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η φυσιολογική διαδικασία της οντογένεσης, και ακολούθως η μορφολογική αλλαγή που επέρχεται σχετίζονται με τις αλλαγές του δευτερογενή μεταβολισμού (Schwob et al., 2004).

Στην παρούσα μελέτη βρήκαμε ότι τα άνθη παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα υπερικινών σε σύγκριση με τους βλαστούς/φύλλα σε όλα τα είδη, εκτός από το *H. empetrifolium* όπου παρατηρείται το αντίθετο. Εξαιρώντας το *H. empetrifolium*, και *H. perforatum* για το οποία δεν υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές, τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με προγενέστερες έρευνες στο γένος *Hypericum* και κυρίως στο είδος *H. perforatum* (Pal Bais et al. 2001; Zabayed και Saxena 2003). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι το είδος *H. triquentrifolium* έχει διπλάσια επίπεδα υπερικίνης στα άνθη σε σύγκριση με τους βλαστούς/φύλλα. Σε αντίθεση οι Alali et al., (2003) που μελέτησαν το είδος *H. triquentrifolium* στην Ιορδανία βρήκαν ότι οι βλαστοί/φύλλα έχουν διπλάσια επίπεδα υπερικίνης σε σύγκριση με τα άνθη. Τα αποτελέσματα τους παρουσιάζουν κάποια ταύτιση με το είδος *H. empetrifolium* που εξετάσθηκε στην παρούσα μελέτη.

Τα είδη *H. empetrifolium* και *H. perforatum* παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα υπερικίνης σε σύγκριση με τα *H. perofratum* και *H. triquentrifolium*. Τα δυο πρώτα είδη έχουν μελετηθεί από τον Kitanov (2001) σε άγριο πληθυσμό της Βουλγαρίας. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας έδειξαν υψηλότερα επίπεδα υπερικίνης σε σύγκριση με αυτά του πληθυσμού που διερευνήθηκε στην Βουλγαρία.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης την περίοδο της ανθοφορίας τα επίπεδα των υπερικινών στα άνθη του *H. perforatum* και *H. triquentrifolium* είναι σχεδόν διπλάσια από ότι αυτή στους βλαστούς/φύλλα. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για το *H. perforatum* από τους Gray et al., (2003), Constantine και Karchesy (1998), Bergonzi et al. (2001), που βρήκαν ότι τα επίπεδα των υπερικινών στα άνθη ήταν αρκετά υψηλότερα από ότι των βλαστών/φύλλων, καθώς επίσης και οι Umek et al., (1999) και Routaroud και Girardi (2000) οι οποίοι ανέφεραν ότι τα άνθη περιέχουν 2-2,5 φορές περισσότερη υπερικίνη σε σύγκριση με τους βλαστούς/φύλλα.

Τα επίπεδα των υπερικινών στα είδη *H.empetrifolium*, *H.perfoliatum*, *H.triquentrifolium*, *H.perofratum* φαίνεται να επηρεάζονται και από το αναπτυξιακό στάδιο των φυτών. Η περίοδος της ανθοφορίας διαφέρει ανάλογα με το υψόμετρο, δηλαδή όσο πιο ψηλά είναι η τοποθεσία, ξεκινάει αργότερα χρονικά η περίοδος άνθισης. Εκτός από την μετάθεση του χρόνου ανθοφορίας στα υψηλότερα υψόμετρα, άλλοι παράγοντες που ενδεχομένως επηρεάζουν την διαφοροποίηση που παρατηρείται στα επίπεδα υπερικινών με βάση το υψόμετρο είναι: η θερμοκρασία και η ένταση του φωτισμού.

Είναι γνωστό ότι η αύξηση της θερμοκρασίας ασκεί αυξητική επίδραση στους δευτερογενείς μεταβολίτες (Dixon και Paiva, 1995). Σε πρόσφατη μελέτη στο είδος *Hypericum brasiliense* παρουσιάστηκε ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας αυξήθηκαν και τα επίπεδα των υπερικινών (Nacif de Abreu και Mazzafera, 2005). Επιπρόσθετα σύμφωνα με τα αποτελέσματα τους παρουσίασαν ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας υπήρξε συνολική αύξηση σε όλα τα συστατικά φαινόλης που αναλύθηκαν στα φυτά.

Η αυξημένη ένταση του φωτισμού παρουσιάζει αύξηση στα επίπεδα των υπερικινών (Briskin και Gawienowski, 2001; Pouraraud et al. 2000; Mosaleeyanon et al., 2005; Zobayed και Saxena, 2003). Οι Briskin και Gawienowski (2001) παρατήρησαν ότι αυξάνοντας την ένταση του φωτισμού αυξάνονται και αδένες που βρίσκονται στα φύλλα των φυτών και επομένως και τα επίπεδα των υπερικινών. Οι Mosalleanon et al., (2005) έδειξαν ότι με την αύξηση του φωτισμού στα φυτά αυξάνεται η φωτοσυνθετική δραστηριότητα και ακολούθως ο αριθμός των αδένων στα φύλλα. Οι Routarauad et al. (2000) μελέτησαν την αύξηση της φωτοπεριόδου στα φυτά. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τους όσο αυξάνεται ο χρόνος φωτισμού των φυτών τόσο αυξάνονται και τα επίπεδα των υπερικινών. Οι Zobayed και Saxena μελέτησαν σε ελεγχόμενο περιβάλλον τις αλλαγές στα επίπεδα των υπερικινών. Τα αποτελέσματα τους έδειξαν ότι κατά την διάρκεια της φωτοπεριόδου (15-16 ώρες) σε υψηλή ένταση φωτισμού τα επίπεδα των υπερικινών παρουσίαζαν την υψηλότερη αύξηση.

Αν επικεντρωθούμε τώρα στο είδος *H.perforatum* ενδεχομένως κάποια από τα αίτια της αλλαγής του επιπέδου των υπερικινών στα φυτά που εξετάστηκαν στη Κρήτη να είναι οι αβιοτικοί παράγοντες, όπως οι επιδράσεις της θερμοκρασίας, το στρες ξηρασίας καθώς επίσης και η ένταση του φωτός όπου ίσως η αυξημένη UV-B ακτινοβολία αυξάνεται με την αύξηση του υψόμετρου, και της γεωγραφικής

περιοχής; και κάποιοι από τους βιοτικούς παράγοντες όπως το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού, και ο βιότυπος του. Αυτοί οι παράγοντες μπορεί να επιδρούν άμεσα στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των υπερικινών ή έμμεσα μέσω ρύθμισης της αναπτυξιακής διαδικασίας από την άνθιση στην καρποφορία.

Τα επίπεδα των υπερικινών στον είδος *H.perforatum* στην Κρήτη, είναι μεγαλύτερα από αυτά των φυτών που μελετήθηκαν στην Αυστραλία, Αμερική, Καναδά, Γαλλία, Ιταλία και Σλοβενία (Southwell και Burke, 2000; Constantine και Karchesy, 1998; Jensen et al. 1995; Routaroud και Girardin 2004; Bergonzi et al., 2001; Umek et al., 1998). Η θερμοκρασία, η ποιότητα του εδάφους, η ένταση και ποιότητα (UV-B ακτινοβολία) του φωτισμού είναι οι πιθανότεροι λόγοι οι οποίοι συμβάλουν στα αυξημένα επίπεδα της υπερικίνης στον πληθυσμό που εξετάστηκε στην Κρήτη.

Κατά την περίοδο της ανθοφορίας (τέλη Μαΐου – μέσα Ιουνίου), περίοδος της μεγαλύτερης φωτοπεριόδου, με τις υψηλότερες θερμοκρασίες και την μεγαλύτερη ένταση του φωτισμού, παρατηρήθηκαν οι μέγιστες τιμές τόσο σε επίπεδο ολόκληρου του φυτού όσο και στα επιμέρους μέρη. Τα επίπεδα των υπερικινών στη συνέχεια παρουσίασαν μείωση κατά την διάρκεια της καρποφορίας.

Όσον αφορά την επίδραση του βιότυπου σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Jensen et al., (1995) τα επίπεδα υπερικινών στο *H.perforatum* εξετάστηκαν ως προς τους βιότυπους της Νέας Σκωτίας, της Βορειοδυτικής Αμερικής και της Αυστραλίας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τους τα επίπεδα των υπερικινών ήταν μεγαλύτερα στα φυτά με βιότυπο από την Αυστραλία. Το είδος *H.perforatum* με προέλευση την Αυστραλία είχε τριπλάσια επίπεδα υπερικίνης από αυτά της Νέας Σκωτίας και διπλάσια από αυτά της Βορειοδυτικής Αμερικής. Σε σύγκριση με τα αποτελέσματα μας το είδος *H.perforatum* στην Κρήτη παρουσίασε 4-5 φορές υψηλότερα επίπεδα υπερικίνης σε σχέση με τα επίπεδα που βρήκαν οι Jensen et al., (1995) στην Νέα Σκωτία, Καναδά.

Υπάρχουν δυο υποείδη *H.perforatum*, η ποικιλία *perforatum*, με κατανομή στην Βόρεια Ευρώπη και η ποικιλία *angustifolium* ο στενόφυλλος τύπος με κατανομή την Νότια Ευρώπη (Robson, 1986). Στην Κρήτη φύεται το είδος *H. perforatum* L. *angustifolium* που είναι στενόφυλλος τύπος. Το είδος την περίοδο της ανθοφορίας παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδα υπερικίνης (5790 μg/g dw) σε σχέση με το ομόλογο του στην Αυστραλία (3000 μg/g dw) που εξέτασαν οι Southwell και Bourke (2000). Οι Southwell και Bourke (2000) μελέτησαν τα επίπεδα της υπερικίνης κατά την

διάρκεια του αναπτυξιακού σταδίου στο είδος *H.perforatum* σε δυο διαφορετικούς βιότυπους, έναν πλατύφυλλο βιότυπο και έναν στενόφυλλο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τους τα επίπεδα της υπερικίνης αυξήθηκαν την άνοιξη και μεγιστοποιήθηκαν την αρχή του καλοκαιριού, δηλαδή την περίοδο πλήρους ανθοφορίας, ενώ άρχισαν να μειώνονται την περίοδο της καρποφορίας. Κατά την διάρκεια της ανθοφορίας μάλιστα βρήκαν πως ο στενόφυλλος βιότυπος περιέχει 75% περισσότερη υπερικίνη από τον πλατύφυλλο. Σύμφωνα με τα δικά μας αποτελέσματα τα επίπεδα της υπερικίνης παρουσιάζουν ταχεία μείωση την περίοδο της καρποφορίας, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των Southwell και Bourke (2000), οι οποίοι βρήκαν ότι ο στενόφυλλος βιότυπος παρουσίασε μικρότερη τάση μείωσης όσον αφορά την μείωση της υπερικίνης, όπου τα επίπεδα μειώθηκαν σταδιακά, κατά την διάρκεια της καρποφορίας του φυτού.

Ο γεωγραφικός παράγοντας παρουσιάζει μικρές διαφορές στα επίπεδα των υπερικινών. Ο πληθυσμός των φυτών στην παρούσα μελέτη συλλέχθηκε από διαφορετικές τοποθεσίες, από κεντρικά και δυτικά του νησιού. Τα επίπεδα των υπερικινών την περίοδο της ανθοφορίας στο είδος *H.perforatum* που φύτευται στα Χανιά παρουσιάζουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα φυτά που φύονται στο Ηράκλειο και Ρέθυμνο. Τα επίπεδα των υπερικινών στην παρούσα μελέτη είναι υψηλότερα σε σύγκριση με επίπεδα στο ομόλογο είδος που μελετήθηκε σε περιοχές της Τοσκάνης Ιταλίας από τους Bergonzi et al., (2001). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης τα επίπεδα της υπερικίνης στα δυτικά της Κρήτης είναι αρκετά μεγαλύτερα από αυτά στη Τοσκάνη. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μπορούν να συγκριθούν και με αυτά των Routaroud και Girardi (2003) οι οποίοι μελέτησαν τα επίπεδα της υπερικίνης σε πληθυσμό του είδους *H.perfortum* στην Γαλλία. Τα επίπεδα της υπερικίνης στο είδος *H.perforatum* στη δυτική Κρήτη είναι μεγαλύτερα από αυτά του πληθυσμού στην Γαλλία.

Τα επίπεδα της ολικής υπερικίνης των φυτών της Κρήτης μπορούν να συγκριθούν και με τα αποτελέσματα των Umek et al., (1998) οι οποίοι μελέτησαν τις συγκεντρώσεις της υπερικίνης στο είδος *H.perforatum* σε άτομα άγριου πληθυσμού στην Σλοβενία. Τα επίπεδα υπερικίνης που σημειώθηκαν στον πληθυσμό που εξετάστηκε στην Κρήτη είναι υψηλότερα από αυτά του πληθυσμού στην Σλοβενία.

Συμπερασματικά, δεδομένων των αποτελεσμάτων, η έρευνα γύρω από τα τέσσερα εξεταζόμενα είδη *Hypericum* της Κρήτης, θα πρέπει να συνεχιστεί ως προς την επίδραση των αβιοτικών κυρίως παραγόντων στα επίπεδα των υπερικινών. Τα

είδη *Hypericum* μπορούν να συμβάλουν σε μια βιοτεχνολογική εκμετάλλευση των ειδών δεδομένου ότι οι κλιματολογικές συνθήκες στην Κρήτη είναι από ότι φαίνεται οι ιδανικότερες για αυτούς τους δευτερογενείς μεταβολίτες. Το γεγονός μάλιστα ότι πρόκειται για αυτοφυείς πληθυσμούς που απαντώνται και σε μεγάλα υψόμετρα όπου υπάρχουν εκτάσεις ανεκμετάλλευτες, ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζουν επίπεδα υπερίκινης σαφώς υψηλότερα από αυτά άλλων πληθυσμών της Ευρώπης, Αυστραλίας και Αμερικής καθιστά τα είδη του γένους *Hypericum* στην Κρήτη πρόσφορο πρωτογενές υλικό πιθανών βιοτεχνολογικών εκμεταλλεύσεων για την απομόνωση αυτών των δευτερογενών μεταβολιτών υψηλής φαρμακευτικής αξίας.

## Βιβλιογραφία:

- Agostinis, P., Vantieghem, A., Merlevede, W., and De Witte, P.A.M (2002). "Hypericum in cancer treatment: more light on the way." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34: 221-241.
- Alali, F., Tawaha, K., and AL-Eleimat, T. (2004). "Determination of Hypericin Content in *Hypericum Triquetrifolium* Turra (Hypericaceae) growing wild in Jordan." *Natural Product Research* 18 (2): 147-151.
- Baroni, F. R., Bianchi, A., and Pinetti, A. (1998). "Anatomical and ultrastructural observations in *Hypericum perforatum* L. leaves." *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 5: 21-33.
- Bergonzi, M. C., Bilia, A.R., Gallori, S., Guerrini, D., and Vincieri, F.F (2001). "Variability in the Content of the Constituents of *Hypericum perforatum* L. and some Commercial Extracts." *Dryg Development and Industrial Pharmacy* 27((6)): 491-497.
- Briskin, D. P., and Gawienowski, M.C. (2001). "Differential effects of light and nitrogen on production of hypericins and leaf glands in *Hypericum perforatum*." *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 1075-1081.
- Buter, B., Orlacchio, C., Soldati, A., and Berger, K. (1997). "Significance of Genetic and Environmental Aspects in the Field Cultivation of *Hypericum perforatum*." *Planta Medica* 64: 431-437.
- Cellarova, E., Daxnerova, Z., Kimakova, K., and Haluskova, J. (1994). "The variability of the hypericin content in the regenerants of *Hypericum perforatum*." *Acta Biotechnologica* 14: 267-274.
- Ciccarelli, D., Andreucci, A.A., and Pagni, A.M. (2001). "The 'black nodules' of *Hypericum perforatum* L. subsp. *perforatum*: morphological, anatomical and



histological studies during the course of ontogenesis." *Journal of Plant Sciences* 49: 33-40.

Ciccarelli, D., Andreucci, A.A., and Pagni, A.M. (2001). "Translucent Glands and Secretory Canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): morphological, Anatomical and Histochemical studies during the course of Ontogenesis." *Annals of Botany* 88: 637-644.

Constantine, G. H., and Karchesy, J. (1998). "Variations in Hypericin Concentrations in *Hypericum perforatum* L. and Commercial Products." *Pharmaceutical Biology* 36(5): 365-367.

Dixon, R. A., and Paiva, N. (1995). "Stress-induced phenylpropanoid metabolism." *Plant Cell* 7: 1085-1097.

Ehrenberg, B., Anderson, J.L., and Foote, C.S. (1998). "Kinetics and yield of singlet oxygen photosensitized by hypericin in organic and biological media." *Photochemistry and Photobiology* 68: 135-140.

Ellis, B. E. (1997). *Metabolism of defence and communication*, Cambridge University Press, Cambridge.

Fosket, D. E. (1994). *Plant growth and development: a molecular approach*, Academic Press, San Diego.

Fox, L. R., Ribiero, S.P., Brown, V.K., Masters, G.J., and Clarke, I.P. (1999). "Direct and indirect effects of climate change on St. John's wort, *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae)." *Oecologia* 120: 113-122.

Gadzovska, S., Maury, S., Ounnar, S., Righezza, M., Kascakova, S., Refregiers, M., Spasenoski, M., Joseph, C., and Hagege, D. (2005). "Identification and quantification of hypericin and pseudohypericin in different *Hypericum perforatum* L. in vitro cultures." *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 591-601.

Giese, A. C. (1980). "Hypericism." *Photochemistry and Photobiology Review* 5: 229-255.

Gray, D. E., Pallardy, S.G., Garrett, H.E., and Rottinghaus, G.E. (2003). "Effects of Acute Drought Stress and Time Harvest on Phytochemistry and Dry Weight of St. John's Wort Leaves and Flowers." *Planta Medica* 69: 1024-1030.

Hagemann, I. (1987). "On subspecific taxa of *Hypericum empetrifolium* (Hypericaceae) from Crete." *Plant Systematics and Evolution* 155: 165-187.

Jensen, K. I. N., Gaul, S.O., Specht, E.G., and Doohan, D.J. (1995). "Hypericin content of Nova Scotia biotypes of *Hypericum perforatum* L." *Canadian journal of Plant Science* 75: 923-926.

Kirakosyan, A., Sirvent, T. M., Gibson, D. M., and Kaufman, P. B. (2004). "The production of hypericins and hyperforin by *in vitro* cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum*)." *Biotechnology of Applied Biochemistry* 39: 71-81.

Kitanov, G. M. (2001). "Hypericin and pseudohypericin content in some *Hypericum* species." *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 171-178.

Kosuth, J., Koperdakova, J., Tolonen, A., Hothola, A., and Cellarova, E. (2003). "The content of hypericins and phloroglucinols in *Hypericum perforatum* L. at early stage of development." *Plant Science* 165: 515-521.

Lavie, G., Mazur, Y., Lavie, A.M., Prince, D., Pascual, D., Liebes, B., Levin, B., and Meruelo, D. (1995). "Hypericin as an inactivator of infectious viruses in blood components." *Transfusion* 35: 392-400.

Lopez-Bazzocchi, I., Hudson, J.B., and Towers, G.H.N. (1991). "Antiviral activity of the photoactive plant pigment hypericin." *Photochemistry and Photobiology* 61(1-10).

- Maggi, F., Ferretti, G., Pocceschi, N., Menghini, L., and Ricciutelli, M. (2004). "Morphological, histochemical and phytochemical investigation of the genus *Hypericum* of the central Italy." *Fitoterapia* 75: 702-711.
- Mosaleeyanon, K., Zobayed, S.M.A., Afreen, F., and Kozai, T. (2005). "Relationships between net photosynthetic rate and secondary metabolite contents in St. John's wort." *Plant Science* 169: 523-531.
- Murch, S. J., Haq, K., Rupasinghe, H.P.V., and Saxena, P.K. (2003). "Nickel contamination affects growth and secondary metabolite composition of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.)." *Environmental and Experimental Botany* 49: 251-257.
- Nacif de Abreu, I., and Mazzafera, P. (2005). "Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy." *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 241-248.
- Osmark, P., Boyle, B. and Brisson, N. (1998). Sequential and structural homology between intracellular pathogenesis-related proteins and a group of latex proteins. *Plant Mol. Biol.* 38, 1243–1246.
- Pal Bais, H., Walker, T., McGrew, J.J., and Vivanco, J.M. (2001). "Factors affecting growth of cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort) and production of hypericin." *In Vitro Cell Developmental Biology - Plant* 38: 58-65.
- Petrakis, P. V., Couladis, M., and Roussis, V. (2005). "A method for detecting the biosynthetic significance of essential oil composition: The case of five Hellenic *Hypericum* L. species." *Biochemical Systematics and Ecology* (In Press): 1-26.
- Pietta, P., Gardana, C., and Pietta, A. (2000). "Comparative evaluation of St. John's wort from different Italian regions." *IL FARMACO* 56: 491-496.
- Piovan, A., Filippini, R., Caniato, R., Borsarini, A., Maleci, L.B., and Cappelletti, E.M. (2004). "Detection of Hypericins in the "red glands" of *Hypericum elodes* by ESI-MS/MS." *Phytochemistry* 65: 411-414.

- Piperopoulos, G., Lotz, R., Wixforth, A., Schmierer, T., and Zeller, K.P. (1997). "Determination of Naphthodianthrones in plant extracts from *Hypericum perforatum* L. by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry." *Journal of Chromatography B*(695): 309-316.
- Poutaraud, A., and Girardin, P. (2000). "Agronomic and chemical characterization of 39 *Hypericum perforatum* accessions between 1998 and 2000." *Plant Breeding* 123: 480-484.
- Poutaraud, A., Di Gregorio, F., Fook Tin, V.C., and Girardin, P. (2000). "Effect of Light on Hypericins Contents in Fresh Flowering Top Parts and in an Extract of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*)." *Planta Medica* 67: 254-259.
- Poutaraud, A., Di Gregorio, F., Fook Tin, V.C., and Girardin, P. (2001). "Effect of light on hypericins contents in fresh flowering top parts and in an extract of St. John's wort (*Hypericum perforatum*)." *Planta Medica* 67(a): 254-259.
- Redmond, R. W., and Gamlin, J.N. (1999). "A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules." *Photochemistry and Photobiology* 70: 391-475.
- Robson, N. K. B. (1968). Hypericum, Cambridge University Press, Cambridge.
- Robson, N. K. B. (1977). "Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae). I. Infragenerical classification." *Bulletin of British Museum (Natural History) Botany* 5: 293-355.
- Robson, N. K. B. (1981). "Studies in the genus *Hypericum* (Guttiferae). Characters of the genus." *Bulletin of British Museum (Natural History) Botany* 8: 55-226.
- Schwob, I., Bessiere, J.M., Masotti, V., and Viano, J. (2004). "Changes in essential oil composition in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle." *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 735-745.

Sirvent, T., and Gibson, D. (2002). "Induction of hypericins and hyperforin in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60: 311-320.

Sirvent, T. M., Krasnoff, S.B., and Gibson, D.M. (2003). "Induction of Hypericins and Heperforins in *Hypericum perforatum* in response to damage by herbivors." *Journal of Chemical Ecology* 29 (12): 2667-2681.

Southwell, I. A., and Bourke, C.A. (2000). "Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort)." *Phytochemistry* 56: 437-441.

Tekel'ova, D., M. Repcák, et al. (2000). "Quantitative changes of Dianthrones, Hyperforin and Flavonoids content in the flower ontogenesis of *Hypericum perforatum*." *Planta Medica* 66: 778-780.

Umek, A., Kreft, S., Karting, T., and Heydel, B. (1998). "Quantitative Phytochemical Analyses of Six *Hypericum* Species Growing in Slovenia." *Planta Medica* 65: 388-390.

Zobayed, S. and Saxena, P.K. (2003). "Production of St. John's Wort plants under controlled environment for maximizing biomass and secondary metabolites." *In Vitro Cell Developmental Biology - Plant* 40: 108-114.

Zobayed, S. M., S.J., Rupasinghe, H.P.V. and Saxena, P.K. (2003). "Elevated carbon sypply altered hypericin and hyperforin contents of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) grown in bioreactors." *Plnat Cell, Tissue and Organ Culture* 75: 143-149.