



Examensarbete inom Hortonomprogrammet 2005: 19
ISSN 1403-0993

**Rotningsstimulerande effekt och kemisk analys av
vattenbaserad extraktion av
vedartade och örtartade skott av *Salix smithiana* Willd.**

*Effect on rooting by- and analysis of water based extracts of woody and
herbaceous shoots of *Salix smithiana* Willd.*



av

Annelie Anderberg & Åsa Nilsson

Handledare:
Hans Lindqvist
Karl-Erik Gustavsson
Examinator:
Håkan Asp

ABSTRACT	4
<hr/>	
SAMMANFATTNING	5
<hr/>	
1. INLEDNING	6
<hr/>	
1.1. SYFTE SALIXVATTEN	6
2. BAKGRUND	6
<hr/>	
2.1. SALIX SOM KULTURVÄXT	6
2.2. UTVINNANDE AV AKTIVA ÄMNEN UR SALIX	7
2.3. TIDIGARE ANALYSER	8
2.4. ROTNINGSPROCESSEN	8
2.5. LONICERA XYLOSTEUM L.	9
3. MATERIAL OCH METOD	9
<hr/>	
3.1. EXTRAKTION FRÅN VINTERKVIST FÖR ROTNINGSFÖRSÖK OCH KEMISK ANALYS	9
3.1.1. ODLINGSFÖRSÖK	9
3.2. DELFÖRSÖK 1, VINTERSTICKLINGAR	9
3.3. EXTRAKTION FRÅN NYA SKOTT FÖR ROTNINGSFÖRSÖK OCH KEMISK ANALYS	10
3.4. DELFÖRSÖK 2, ÖRTARTADE STICKLINGAR	10
3.5. DELFÖRSÖK 3, ÖRTARTADE STICKLINGAR	10
3.6. BEREDNING, SALIXVATTEN AV VINTERKVIST	11
3.6.1. METODBESKRIVNING FÖR DETEKTION AV ÄMNEN I SALIXVATTEN	11
3.7. HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY)	11
3.7.1. TYPER AV SPE (SOLID PHASE EXTRACTION)-KOLONNER SOM ANVÄNTS	11
3.8. POLYMERKOLONN ENV+, ISOLUTE®	11
3.9. JONBYTARKOLONN SAX, ISOLUTE®	11
3.10. ESTERHYDROLYS	12
3.11. SALIXVATTNETS INNEHÅLL	12
3.12. IDENTIFIERING AV ÄMNEN I SALIXVATTEN	14
3.13. ÄMNEN SOM ANVÄNDES SOM REFERENSER	14
3.14. STATISTISK METOD	14
4. RESULTAT	15
<hr/>	
4.1. DELFÖRSÖK 1, VINTERSTICKLINGAR	15
4.2. IAKTTAGNA SKILLNADER I ROTKARAKTÄRERNA	15
4.3. DELFÖRSÖK 2, ÖRTARTADE STICKLINGAR	16
4.4. DELFÖRSÖK 3, ÖRTARTADE STICKLINGAR	17
4.5. IDENTIFIERADE ÄMNEN I SALIXVATTEN	18
4.5.1. D-SALICIN	18
4.5.2. CATECHIN	18
4.5.3. SALIGENIN	19

4.5.4. ELLAGSYRA	19
4.5.5. OKÄNT ÄMNE	19
4.6. KROMATOGRAM	20
4.7. BRIX- SOCKERHALT	21
4.8. PH-VÄRDE	21
4.9. LEDNINGSFÖRMÅGA	21
5. DISKUSSION	22
<hr/>	
REFERENSER	25
<hr/>	
BILAGA 1	28
<hr/>	
BILAGA 2	29
<hr/>	
BILAGA 3	30
<hr/>	
BILAGA 4	31
<hr/>	
BILAGA 5	32
<hr/>	
BILAGA 6	33
<hr/>	
BILAGA 7	36
<hr/>	

ABSTRACT

Cuttings of *Lonicera xylosteum* L. were treated with willow extract to study the response in rooting capacity. The extracts were prepared by mixing chopped pieces of *Salix x smithiana* Willd. with water in a warring blender. The investigation comprised 2 types of salix extracts based on differences and dynamics between twigs in winter dormancy and twigs with new shoots.

To explore the rooting response, three tests were made. First, cuttings were treated with extract from salix in comparison with a control treated with water. Secondly, a rooting test was made with cuttings treated with extract from salix, IBA and the combination IBA + extract from salix. Finally a rooting test were made to assure that the extracts analyzed in the laboratory were complete and not missing any fraction important to rooting capacity that might have stayed in a column.

Culturing tests showed that salix extract from winter twigs gave more roots than a control but the roots were not longer. The combination with IBA and salix extract (50/50, IBA 2500 ppm) gave white, thin, well divided roots while plain IBA solution (5000 ppm) gave short yellowish roots.

The culturing test also showed that there is a difference between extract from winter twigs and extract from new shoots.

Chemical analyses on the salix extract were made by HPLC – DAD combined with a fluorescence detector.

Ester hydrolyses was performed on all samples. Detection was then possible and certain chemical substances were distinct.

The following substances were found in salix extract: D-Salicin, Catechin, Ellagic acid and Saligenin. D-Salicin was found only in extract from winter twigs. One of the main substances in the salix extract revealed by the HPLC – DAD analysis could not be identified.

Further experimentation would be interesting. Primarily, the combination IBA and salix extract should be tested on cuttings from plants normally difficult to root such as birch, beech walnut etc.

Substances in salix extract which could be interesting are salicin, saligenin and their metabolites.

Increased knowledge in this area could be very important and useful in future horticulture.

SAMMANFATTNING

Sticklingar av *Lonicera xylosteum* L. behandlades med extrakt av pil för att studera effekten på rottningsförmågan. Extraktet framställdes av klippta bitar av *Salix x smithiana* Willd. mixade med vatten. Undersökningen omfattade 2 typer av salixextrakt baserade på skillnad och dynamik mellan kvist i vinter vila och kvist med nya skott.

För att utvärdera rottningsresponsen gjordes tre jämförande rottningsförsök med sticklingar behandlade med salixextrakt. Försöket utvärderades mot en kontroll med sticklingar behandlade med vatten. Kompletterande rottningsförsök gjordes med sticklingar behandlade med salixextrakt, IBA och med kombinationen IBA + salixextrakt. Ett slutgiltigt odlingsförsök gjordes för att säkerställa att kemiska analyser gjordes på ett extrakt med full verkan och att ingen viktig beståndsdel som påverkar rotningen fastnat i någon kolonn.

Odlingsförsök visar att salixextrakt från vinterkvist ger fler rötter men att rötterna inte är längre. Kombinationen med IBA och salixvatten (50/50, IBA 2500 ppm) ger vita, tunna, välförgrenade rötter medan ren IBA-lösning (5000 ppm) ger korta gulaktiga rötter.

Odlingsförsöken visar också att det finns en skillnad mellan extrakt från vinterkvist och extrakt från nya skott.

Kemiska analyser av salixextraktet gjordes i HPLC – DAD kombinerad med fluorescence detektor.

Esterhydrolysis utfördes på alla prov. Detektion var därefter möjlig och vissa kemiska ämnen kunde säkerställas.

Ämnen i salixextrakt som påträffades var D-Salicin, Catechin, Ellagsyra och Saligenin. D-Salicin hittades endast i extrakt från vinterkvist. Ett av ämnena i salixextrakten med tydligt utslag i HPLC – DAD analysen kunde inte identifieras.

Att utveckla försöket skulle vara intressant. Främst skulle kombinationen IBA och salixextrakt prövas på sticklingar som vanligtvis är svåra att rota som björk, bok, valnöt etc.

Ämnen i salixextraktet som kan visa sig intressanta i sammanhanget kan antas vara salicin, saligenin och metaboliter från dessa.

Ökad kunskap kring dessa frågor kan visa sig vara viktiga och användbara i framtida hortikultur.

1. INLEDNING

I detta arbete behandlas hur salixvatten, extraherat från *Salix x smithiana*, påverkar rottingsförmågan i vedartade och örtartade sticklingar av *Lonicera xylosteum* L. Salixvattnet som undersökts har varit av 2 olika typer, berett av vinterkvistar och av nya skott. Kemisk analys av salixvatten har utförts för att identifiera ämnen som kan ha en aktiv funktion i rottningsprocessen.

1.1. Syfte salixvatten

Syftet med examensarbetet var att undersöka om salixvatten har någon rottningsstimulerande effekt. Aktiva ämnen i växtextraktet har eftersökts.

2. BAKGRUND

2.1. *Salix* som kulturväxt

Ordet salix är besläktat med ordet för salt, på latin- sal och på grekiska- hals, ordroten är sal som betyder solkig, smutsig grå, germanska salwa- smutsgrå/mörkfärgad. Natursalt är inte vitt som salt ses i handeln (Corneliuson, 1997). I äldre tid ansågs namnet salix komma av salire, springa fram – med avseende på de hithörande arternas snabba tillväxt (Henriksson, 1911). Sedan förhistorisk tid har pilkvistar använts till allt från cricketträ, stängsel och de finaste korgverk. Båtar tillverkade av pilverk som täckts av skinn var värdefulla i mänsklighetens tidiga historia, då de lätt kunde bäras av en person mellan vattenlederna (Bean, 1980). Barken från videbusken var före 1900 enda källan till det salicylsyresalt som ingår i smärtstillande aspirin-tabletter (Corneliuson, 1997).

Som trolldomsväxt är salix känd sedan gammalt, en gammal bok skildras videts roll i folktron:

Videna (*Salix Tourn.*), av det tyska Weide, som syftar på grenarnas böjlighet, tillhöra de växter, som fordom voro på en gång avskydda och eftersökta. Det senare i följd av deras förmåga att skydda för sjukdomar och trolleri. Från feber troddes man kunna befria sig genom att i ett i en videstam för ändamålet borrar hål under några trollformler driva in sjukdomen och sedan väl igenplugga hålet. Om ett nyfött barn befanns hava något kroppsslyte, gick man till väga på samma sätt, som angivits vid rönnen i fråga om barnsjukdomar. Så snart klykan på videstammen växt igen, skulle lytet vara försvunnet, för så vitt man hade gått riktigt till väga. För det första bad, som tillagades åt ett barn, skulle vattnet vara kokat på videbark, på det att barnet skulle för framtiden vara befriat från trolldom.

Om en kvinna önskade lära sig trolldom, stämde hon en natt möte med en häxa vid en videbuske. Där förestavade häxan för sin blivande »ämbetsyster» en trollformel, som började med orden: »Här sitter jag under videt och avsvärjer gud och alla helgon», varpå den blivande häxan skrev sitt namn med blod i en bok och var så färdig.

Henriksson, *Växterna i de gamlas föreställningar, seder och bruk* (1911)

Till största delen representeras salixsläktet av snabbväxande relativt kortlivade träd, det är denna genotyp som vanligtvis förekommer i odling och då som energiskog. Salixens rotsläende växtsätt gör dem värdefulla som erosionsskydd (Burnie et al. 1999).

Salix x smithiana Willd. som används i försöket är en representant av släktet som ofta nyttjas som energiskog. *Salix x smithiana* (*S. caprea* L. x *S. viminalis* L.) blev funnen första gången 1829 (Krüssman, 1986).

Släktet innehåller även många extremer, knäckepilen *Salix fragilis* L. som lätt tappar sina grenar, kinesisk jättepil *S. magnifica* Hemsl. med mycket stora blad och alpiner som *S. serpyllifolia* Scop. med väldigt små blad, *S. alba* L. och *S. nigra* Marsh. som används som timmer och krypande varianter som *S. herbacea* L. Släktet är väl utbredd på norra halvklotet.

På södra halvklotet i de tropiska och subtropiska områdena förekommer en sektion benämnd *Humboldtiana* (Bean, 1980).

Salix är en dioik lignos (Burnie et al. 1999). En intressant aspekt är att *salix* till största delen är insektspollinerad, många sorter är därmed värdefulla som biväxter, fröna mognar snabbt och gror lätt (Bean, 1980). De flesta *salix*sorter sticklingsförokas lätt med få undantag (Bean, 1980).

Inbäddade i innerbarken kan latent rotprimordier i *salix* vara sovande i flera år. Dessa kan ses om barken tas av som knölar på veden, motsvarande knölar på veden finns inbuktningar på barken. Latenta rötter finns i stor mängd hos lättrotade växtslag, positionen där dessa latent rötter utvecklar sig är densamma som för nybildade adventivrötter (Hartmann et al. 2002).

2.2. Utvinnande av aktiva ämnen ur *salix*

Äldre litteratur beskriver försök där *salix* har haft en god effekt på rotbildning. Metoderna för att utvinna dessa rotningbefrämjande egenskaper varierar. Ett par metoder beskrivs av Grace (1944) metod 1 var 50 *salix*sticklingar, 5 cm långa som ställdes i vatten tills rötter utvecklades, vattnet filtrerades och var sedan färdigt för användning.

Den andra metoden som beskrivs var sand som fått egenskaper överförda från *salix* genom att 15 *salix*sticklingar rotats i vit kvartssand i en kruka därefter har sticklingarna tagits bort och sanden var användningsklar.

Kawase (1969) beskriver en tredje metod där 30 frystorkade *salix*kvistar centrifugerades med 10 ml destillerat vatten.

Preparat kan vidare beredas enligt Gesto et al.(1977), 500 g *salix* som klipptes i bitar och centrifugerades med 1000 ml destillerat vatten, *salix*mixen skakades därefter 24 timmar i 4°C.

Ytterligare en metod för beredning av *salix*vatten har prövats av Diagneault & Chong (1985, a), frystorkad pulveriserad *salix* blandades i destillerat vatten. Olika koncentrationer analyserades och i den mest mättade formen har 75 mg frystorkad pulveriserad *salix* använts per ml destillerat vatten.

Birgitta Nordström, (pers. kom.), har under flera år i sin undervisning testat olika ämnen och behandlingar som kan ha rotningstimulerande effekt, däribland *salix*vatten. *Prunus laurocerasus* är det växtslag som företrädesvis har testats men även *Taxus*, *Thuja* och *Chamaecyparis*. Behandling med *salix*vatten har gett varierande, men positiv effekt.

Diagneault & Chong (1985, b) anser efter försök att *salix*vatten definitivt kan användas som rotningstimulerande ämne för vissa växtarter.

2.3. Tidigare analyser

Analyser av frystorkad respektive färsk bladvävnad från *S. purpurea* L. har gjorts av Julkunen-Tiitto och Sorsa (2001), extraktioner har skett i metanol, aceton och butanol syra. Metanolextraktion användes för analys av flavanoider och salicylater, för lösliga kondenserade tanniner gjordes extraktioner i aceton. Undersökningen gjordes med avsikt att studera effekten av frystorkning på t.ex. flavanoider. Analyserna gjordes med hjälp av HPLC-DAD för kvantifiering och med HPLC-MS för identifiering av komponenterna. Ämnen som identifierades var bl.a. salicin och catechin.

Kawase (1969) har använt papperskromatografi för undersökning av ämnen i salix.

2.4. Rotningsprocessen

Auxinimpulsen i rottingsinduktionen är viktig men ännu viktigare är att nedbrytningen av hormonet längre fram i processen fungerar. Svårrotade växtslag saknar dessa nedbrytare i olika hög grad beroende på (o)förmågan att bilda adventivrötter. Co-faktorer i rottingsprocessen är ofta fenoler med nedbrytande egenskaper, exempel på ämnen är IAA-oxidase, *ortodifenoler* och borat (borsyra).

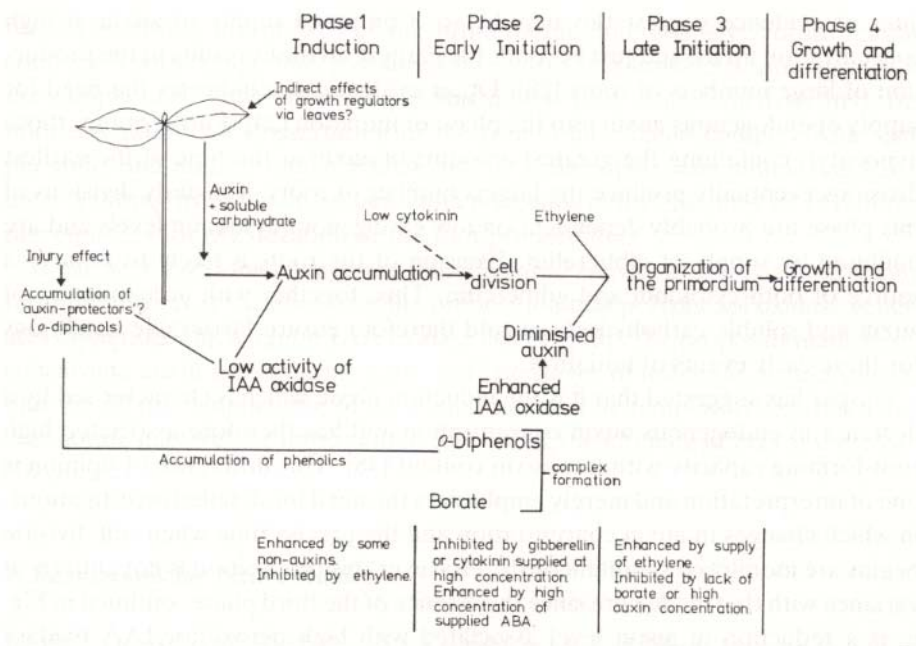


Fig.1: Beskriver hur fenoler, IAA, oxidase/ peroxidase, borat och växthormoner i de 4 faserna samverkar för adventivrotutveckling (från: Jackson 1986)

Boratkomplex med *o*-difenoler stimulerar en större IAA-oxidase aktivitet som reducerar IAA nivå till optimal för rotbildning (Hartmann et al. 2002).

En annan förklaring varför vissa sticklingar är svåra att rota är närvaron av inhibitorer som blockerar rotinitiationen. Undersökningar har visat att denna/dessa inhibitor/inhibitorer är vattenlösliga (Hess 2000).

År 1935 upptäcks hur auxin - stimulerar adventivrotbildning på sticklingar, stimulerar stamtillväxt, inhiberar laterala knoppar, påverkar blad- och fruktfall och aktiverar kambieceller. Auxin kan också inducera genaktivitet. Genom upprepade försök har det visat sig att auxin krävs för att rotbildning skall ske, antingen naturligt endogent i växten eller applicerat (Hartmann et al. 2002). IAA – Indole-3-aceticacid (Indol-3-ättiksyra) är det naturligt förekommande ämnet i växter som har en tydlig auxinkaraktär. Finns även syntetiskt framställt. IBA – Indole-3-butyricacid (Indol-3-smörsyra) ett syntetiskt ämne som är mer effektivt än IAA, både den naturliga och syntetiska formen, för rotbildning.

IBA används vanligtvis såväl vid vävnadsförökning som vid sticklingsförökning (Hartmann et al. 2002).

Andra viktiga faktorer som påverkar adventivrotbildning är tidpunkten på året för insamling av sticklingsmaterial, genus hos växtmaterialet, tillgänglig näring, bevattning och jordvolym (Houle & Babeux 1997).

2.5. *Lonicera xylosteum* L.

Sticklingsmaterialet i odlingsförsöken var av *Lonicera xylosteum* L., från familjen *Caprifoliaceae* (Worldagroforestry, Internet 2005). Sorten valdes då rotningsprocenten vanligtvis är ca 70 % och inte 100 % för att behandlingarna skulle vara utslagsgivande (Nordström, pers. kom.).

3. MATERIAL OCH METOD

3.1. Extraktion från vinterkvist för rotningsförsök och kemisk analys

Försöken inleddes med att *Salix x smithiana* klipptes från befintlig häck i Alnarps trädgårdslaboratorium. Kvistar klipptes i januari av typ och kvalitet enligt gängse praxis (Nordström, pers. kom.). Kvistarna klipptes till mindre bitar och mixades tillsammans med kranvatten tills en homogen grön gröt bildats. Salixmixen förvarades över natten i kyl 4°C. Viktigt var att förvaringen skedde i mörker då många ämnen i växtextrakt är ljuskänsliga.

Samma dag ställdes 33 spön av *S.x smithiana* i en plastspann med vatten för drivning i växthus 16°C. Dessa användes senare när nya skott bildats, för att bereda salixvatten gjort av örtartad salix.

3.1.1. Odlingsförsök

3.2. Delförsök 1, vintersticklingar

Lonicera xylosteum plantor köptes in från Björkhaga plantskola, växtmaterialet kommer från samma klon. Från plantorna klipptes 60 vintersticklingar. Längden på sticklingarna var 20-25 cm. 2 olika behandlingar gjordes med 30 sticklingar i varje led.

- Kontroll (ingen behandling).
- Salixvatten från vinterkvist.

Quick-dip metoden användes, där ca 2 cm av sticklingarnas basaländar doppades ett par sekunder i rotningsmedium (Kroin, 1992). Sand uppblandat med torv användes som substrat. Sticklingarna sattes i plastbrätten och placerades i dimkammare i växthus 20°C.

10 veckor senare avlästes sticklingarna. Då räknades döda/levande sticklingar, antal rötter på varje enskild stickling, de 3 längsta rötterna mättes i cm.

3.3. Extraktion från nya skott för rotningsförsök och kemisk analys

Efter 45 dagar skördades nya skott från de drivna spöna av *S. x smithiana* som stått på drivning för tillverkning av salixvatten, gjord av nya och gröna skott. De nya skotten som användes drogs av från de ursprungliga spöna. Bladen på de nya skotten drogs av och endast de bladlösa skotten användes till salixgröten. De bladlösa skotten mixades tillsammans med kranvatten till en grön gröt. Salixgröten förvarades över natten i mörker i kyl 4°C.

3.4. Delförsök 2, örtartade sticklingar

Vid försöksstarten den 8 februari 2005 krukades moderplantor av *Lonicera xylosteum* in. Krukorna placerades i växthus 20°C.

Från de inkrukade moderplantorna *L. xylosteum* som hunnit växa till, togs örtartade sticklingar. Alla klipptes lika, med 3 bladpar. De 2 översta paren fick behålla sina blad medan det understa bladparet plockades bort. 4 olika behandlingar gjordes med 20 sticklingar i varje led.

- Kontroll.
- IBA 0,5 %, (5000 ppm)
- Salixvatten från nya skott.
- En lösning med hälften IBA 0,5 % (2500 ppm) och hälften med salixvatten från nya skott.

Quick-dip metoden användes i de fall där rotningsmedium brukades. Substratet som användes var lite torv i botten i plastbrättarna och därefter fylldes sand på. Sticklingarna placerades i dimkammare i växthus 20°C.

4 veckor senare avlästes sticklingarna. Då räknades döda/levande sticklingar, antal rötter på varje enskild stickling, de 3 längsta rötterna mättes i cm.

3.5. Delförsök 3, örtartade sticklingar

Från de rotade vintersticklingarna av *L. xylosteum* i delförsök 1, togs örtartade sticklingar. Alla klipptes lika, precis som i delförsök 2, med 3 bladpar. De 2 översta bladparen fick vara kvar medan det understa plockades bort. 10 olika behandlingar gjordes med 9 sticklingar i varje led.

- Kontroll.
- Råextrakt från salixvatten av vinterkvist.
- Råextrakt från salixvatten av nya skott.
- IBA 0,5 %.
- Eluat från ENV+ kolonn från salixvatten av vinterkvist. (ENV+ kolonn är ett namn på kolonntyp, ingen känd förkortning)
- Eluat från ENV+ kolonn från salixvatten av nya skott.
- Ämnen som inte bundits in av ENV+ kolonn från salixvatten av vinterkvist.
- Ämnen som inte bundits in av ENV+ kolonn från salixvatten av nya skott.
- Lösning med hälften IBA 0,5 % och hälften salixvatten av vinterkvist.
- Lösning med hälften IBA 0,5 % och hälften salixvatten av nya skott.

Quick-dip metoden användes i de fall där rottningsmedium brukades. Substratet var, liksom i delförsök 3, lite torv i botten i plastbrättarna och därefter fylldes sand på. Sticklingarna placerades i dimkammare i växthus 20°C.

3.6. Beredning, salixvatten av vinterkvist

Efter att salixmixen hade stått och dragit över natten portionerades den upp inför kommande analys och användning. 10 st. 50 ml rör fylldes till 2/3 med salixgröt av vinterkvist. Rören centrifugerades i 10 min. i 4°C och 10 000 varv. Vätskan sparades och centrifugerades därefter ännu en gång i 10 min. 4°C och 10 000 varv. Salixvattnet räckte till 29 rör med 2 ml i varje, dessa frystes in i -80°C. Resterande salixgröt som inte centrifugerats frystes också in.

3.6.1. Metodbeskrivning för detektion av ämnen i salixvatten

3.7. HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Analys av salixvatten gjordes med hjälp av Reversed Phase kromatografi.

HPLC system autosampler 465, pump 422 och diode array detector 440 från Kontron instruments.

Fluorescence HPLC monitor RF-535 från Shimadzu (se bilaga 1, Beskrivning av hur HPLC fungerar).

Injektionsvolym 20 µl.

Elueringsmedel (mobilfas) 15 mM NH₄H₂PO₄, 27 % CH₃CN ställd till pH 4,2 med 1 M H₃PO₄

Kolonn Gemini 5µ C₁₈ 110A storlek 250* 4,6 med förfilter safeguard från Phenomenex.

3.7.1. Typer av SPE (solid phase extraction)-kolonner som använts

3.8. Polymerkolonn ENV+, ISOLUTE®

ENV+ kolonnen ekvilibrerades med 2*6 ml MeOH och sköljdes ur med 4*6 ml Millipore Ultra Pure vatten. Härfter var kolonnen färdig att användas och salixextrakt påfördes.

Beroende på vilken uppkoncentrering av extraktet som krävs elueras kolonnen med MeOH. Om ingen koncentrering av extraktet krävs är elueringsmängden av MeOH lika med extraktmängden.

Extraktet som användes i försöket var uppkoncentrerat på ENV+ kolonn 5 gånger dvs. 12 ml extrakt eluerades med 2,4 ml MeOH (se bilaga 2, beskrivning av polymerkolonn). Eluat från ENV+ kolonn hydrolyserades med 50 % NaOH-lösning i 30 min respektive 1h. (se bilaga 2, polymerkolonn).

3.9. Jonbytarkolonn SAX, ISOLUTE®

SAX-kolonn ekvilibrerades med 2*5 ml MeOH och sköljdes ur med 2*5 ml Millipore Ultra Pure vatten. Prov från hydrolys med pH kring 7 påfördes, tvättades ur med 2*1 ml Millipore Ultra Pure vatten och eluerades med 1,5 ml MeOH/ myrsyra, eluatet härifrån kördes i HPLC (se bilaga 2, jonbytarkolonn).

3.10. Esterhydrolysis

Avspjälkning av estrar till syror och alkoholer sker genom att basisk eller sur vattenlösning tillsättes till estern. Esterhydrolysis i basisk lösning kallas även saponifiering (McMurry, 1998).

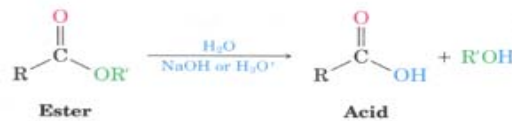


Fig.2: Schematisk reaktionsväg av esterhydrolysis (McMurry, 1998).

Eluat från ENV+ kolonn blandades med 50 % NaOH i förhållandena 1:4 (1,2 ml eluat och 4,8 ml 50 % NaOH). Hydrolysen stod under omrörning i 30 min respektive 1h. (se bilaga 3, metodutveckling och teknik).

3.11. Salixvattnets innehåll

För att möjliggöra analys i HPLC prövades flera metoder. Råextrakt från nya skott av salix och från vinterkvist behandlades separat, men med identiskt behandling.

Det centrifugerade råextraktet kördes i HPLC men inga tydliga toppar registrerades. Filtrering genom mikrofilter av råextrakt gav inte heller användbara toppar. Att trycka råextrakt genom ENV+ kolonn prövades för att fånga upp eventuella längre kolledjor dessa eluerades med MeOH. Eluatet är en uppkoncentrering av ämnet som körts genom kolonnen. Graden av uppkoncentrering är beroende på mängden elueringsmedel i förhållande till mängden råextrakt.

Angående salixvattnet krävdes uppkoncentrering beroende på råextraktets låga innehåll av detekterbara ämnen. Analys av eluat gav ingen användbar data.

Ytterligare uppkoncentrering gjordes därefter genom att torka eluatet med kvävgas, den torkade substansen löstes i MeOH. Olika grader av uppkoncentrering gjordes men ingen gav tillfredställande resultat.

Råextraktet prövades genom att tryckas genom anjonbytare SAX kolonn som binder in fenoliska substanser med syrakaraktär. Myrsyra (MeOH: HCOOH 100:2) användes som elueringsämne. Eluat kördes i HPLC, men inte heller uppkoncentreringar från denna typ av kolonn gav tydliga toppar.

En slutsats att eventuella syror i salixvatten föreligger i esterform eller är glukosidbundna kunde dras. För att möjliggöra en syradetektion krävdes att avspjälkning gjordes av eventuella glykosid respektive esterbindningar. En metod för detta är hydrolysis. Esterhydrolysis, både basisk (Venema et al. 1996) och sur (Gesto et al. 1977) användes.

Venema et al. 1996 föreslår en metod för detektion av acetylsalicylsyra och salicylsyra i frukt och grönt genom hydrolysis med 25 % NaOH lösning, delar av detta exempel användes. 2 ml salixvatten av respektive typ esterhydrolyseras i separata försöksled. Till de 2 ml salixvatten tillsattes 8 ml 25 % NaOH, hydrolysen stod under omrörning i 1 timme, därefter togs ett första prov som trycktes genom SAX kolonn och därefter kördes eluatet på HPLC.

Resterande hydrolysvätska tilläts reagera över natten i skak (100 skak/min) 4°C. Nytt prov togs från hydrolysen, trycktes genom SAX kolonn och analyserades. Proven från 25 % NaOH hydrolysis visade inte användbara mätvärde.

Nya esterhydrolyser prövades med 2 olika baskoncentrationer, 5 % NaOH och 50 % NaOH i MeOH-vattenlösning (50:50 MeOH: H₂O). Råextrakt från nya skott av salix och från vinterkvist behandlades fortfarande separat, men med identisk bearbetning. 12 ml av salixvattnet trycktes genom en ENV+ kolonn och eluerades med 2,4 ml MeOH (härigenom koncentrerades salixvattnet 5 gånger). Eluatmängden delades därefter, 1,2 ml eluat blandades med 4,8 ml 5 % NaOH-lösning och 1,2 ml eluat blandades med 4,8 ml 50 % NaOH-lösning. Respektive hydrolyser bestående av salixvatten och NaOH hade totalmängden 6 ml.

Hydrolysen avbröts vid bestämda tidpunkter dvs. efter 30 min, 1 h och 1,5 h. Prov (1,5 ml) som togs vid de bestämda tidsintervallerna, pH-ställdes till ca 7 och trycktes genom SAX kolonn som eluerades med 1,5 ml MeOH: HCOOH 100:2. Proven visade tydligast kromatogram i HPLC vid 30 min hydrolysis i 50 % NaOH-lösning, med avtagande toppar vid längre hydrolystider. En uppkoncentrering (5 gånger) av proven gjordes genom indunstning, detta förstärkte topparna ytterligare. Utifrån denna hydrolysomgång (30 min, 50 % NaOH lösning) hämtades analysvärden för den slutgiltiga utvärderingen av respektive salixvatten.

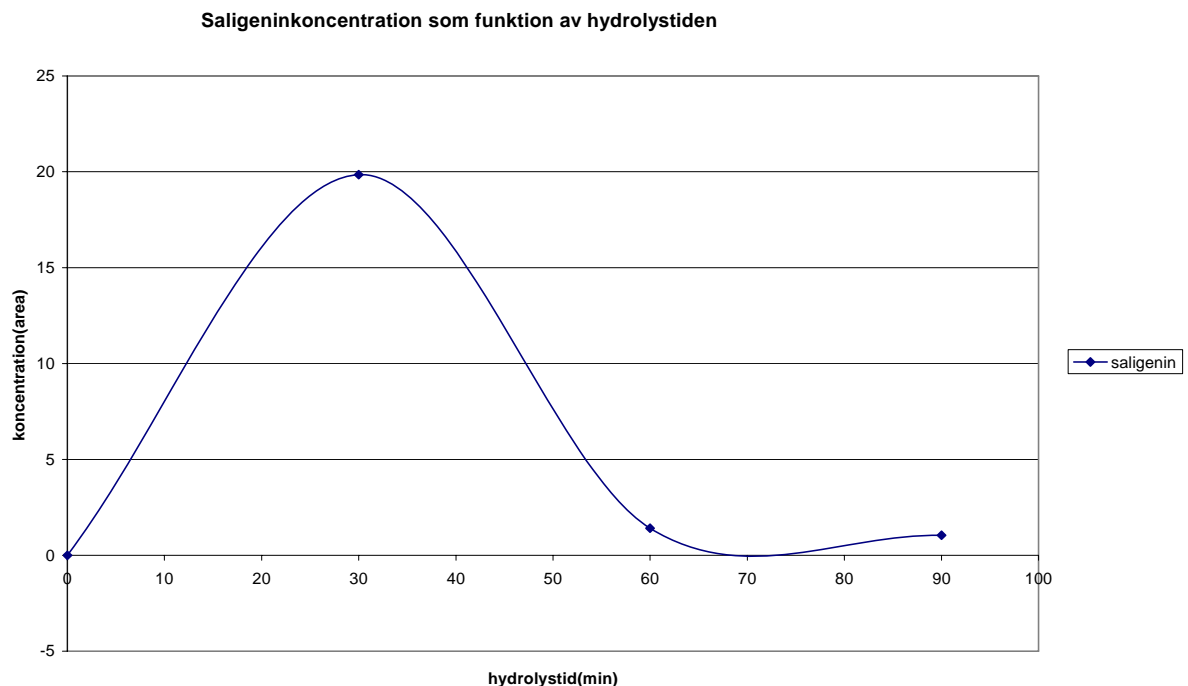


Fig.3: Koncentration av Saligenin i salixextrakt som funktion av hydrolystid

Ny hydrolysis enligt ovan beskriven metod gjordes med 25 % NaOH lösning i 50:50, MeOH: H₂O lösning. Prov togs vid 30 min, 1h och 1,5 h men inga tillfredställande resultat registrerades.

Sur hydrolysis (Gesto et al. 1977) gjordes, 4 ml salixvatten av respektive typ trycktes genom ENV+ kolonn, eluerades med 0,8 ml MeOH. Till eluatet tillsattes 3,2 ml vatten, pH ställdes till 2,5. Prov togs från lösningen efter 2 h och efter 20 h. Proven pH ställdes till 7, trycktes genom SAX kolonn och testades, tydliga toppar kunde registreras på kromatogram efter uppkoncentrering av eluat.

3.12. Identifiering av ämnen i salixvatten

Ämnesförslag från litteratur följdes upp med analys i HPLC för att ta reda på ämnens våglängdsmaximum i absorbans och fluorescens. Ämnets polaritet bestämmer tiden det tar för substansen att passera kolonnen, R_t , retentionstiden.

Tillsammans med spektraldata ger R_t en ganska god uppfattning av vilket ämne det rör sig om. Därutöver ger fluorescensdetektorn speciell karaktärsinformation.

Härav kan ämnen identifieras med stor sannolikhet, standardämnenas karaktäristik jämförs med salixvattnets ämnesformulering.

3.13. Ämnen som användes som referenser

Alla kemikalier levererade från Sigma-aldrich.

Acetylsalicylsyra

Salicylsyra

D-salicin

Bensoesyra

Saligenin

Tryptofan

IAA

Catechin

Rutinhydrat 95 %

(-)- Epicatechin

2,5-Dihydroxybensoesyra 98 %

Klorogensyra

Ferulasyra

p-Kumarinsyra

Kaffesyra

Protocatechinsyra

Quercetin dihydrat

4-Hydroxybensoesyra

3.14. Statistisk metod

Statistisk metod som användes var ANOVA, Tukey's test. Diagram är utförda i Origin.

Då behandlingen inte kan anses inverka på överlevnadsgraden har döda sticklingar borträknats.

4. RESULTAT

4.1. Delförsök 1, vintersticklingar

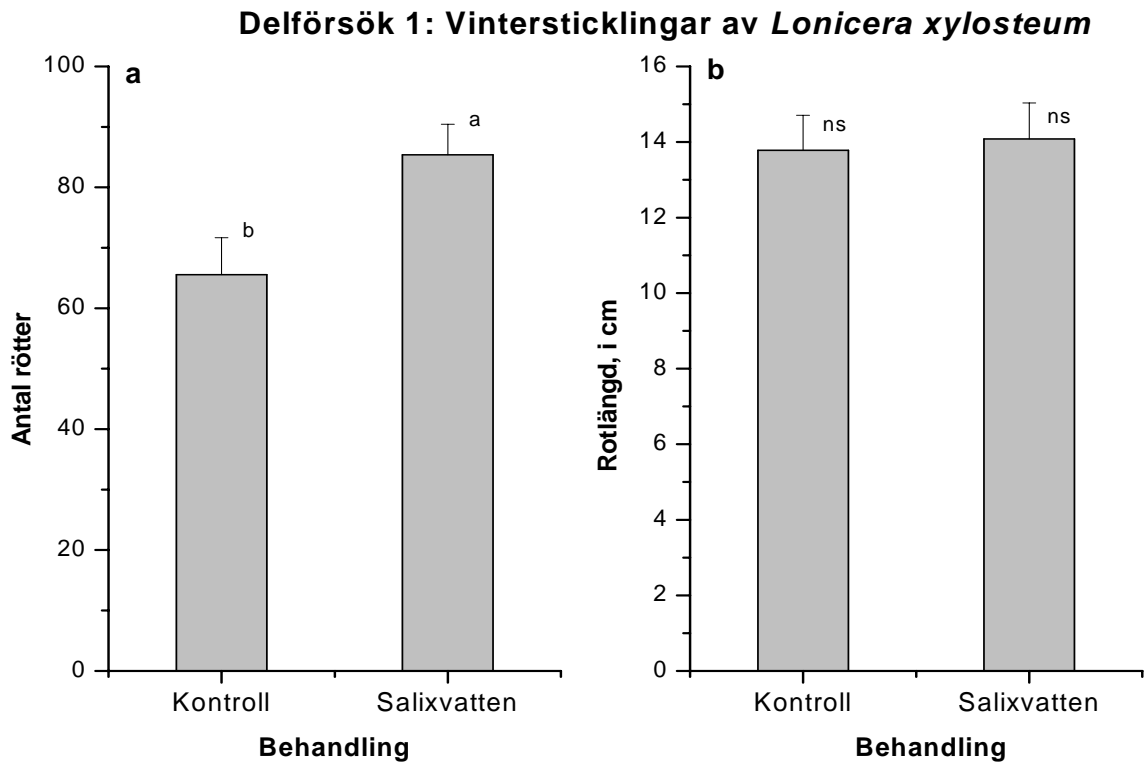


Fig.4: Antal rötter (a) och rotlängd (b) hos sticklingar av *Lonicera xylosteum* doppade i salixvatten från vinterkvist. Sticklingarna behandlades enligt "Quick-dip" metoden (doppade några sekunder). Sticklingarna odlades i dimkammare vid 20°C i 10 veckor. Resultaten är analyserade med ANOVA, Tukeys HSD test användes för separation av behandling på 5 % nivån. Felstaplar representerar standardfel av medelvärde. Olika bokstäver representerar signifikant skillnad.

4.2. Iakttagna skillnader i rotkaraktärerna

Rötterna hos de behandlade sticklingarna är jämnt fördelade på sticklingsdel under jord medan kontrollens rötter var arrangerade etagevis. Salixvattnet gav fler rötter medan rotlängden inte påverkades, bild se bilaga 4.

4.3. Delförsök 2, örtartade sticklingar

Delförsök 2: Örtartade sticklingar av *Lonicera xylosteum*

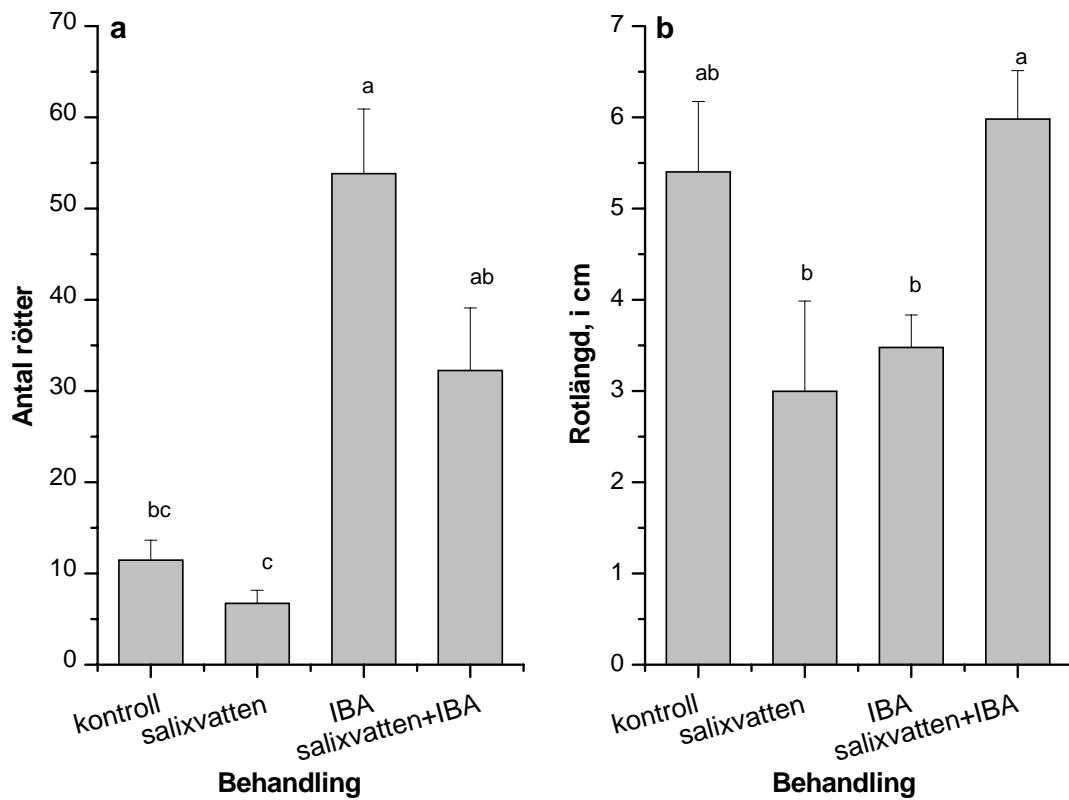


Fig.5: Antal rötter (a) och rotlängd (b) hos sticklingar av *Lonicera xylosteum* doppade i IBA (5000 ppm), salixvatten från nya skott och kombinationen IBA (2500 ppm) och salixvatten från nya skott. Sticklingarna behandlades enligt "Quick-dip" metoden (doppade några sekunder). Sticklingarna odlades i dimkammare vid 20°C i 4 veckor. Resultaten är analyserade med ANOVA, Tukeys HSD test användes för separation av behandling på 5 % nivån. Felstaplar representerar standardfel av medelvärde. Olika bokstäver representerar signifikant skillnad.

Vad som kan nämnas i samband med detta diagram (fig.5) var att de olika rotkvalitéerna skiljde sig åt beroende på behandling. Med kontrollen som normal gav IBA behandlingen grova och förhållandevis korta gula rötter medan salixvatten gav mycket kallusbildning och tunna vita rötter, om rötter alls bildats. I kallusbildningen kunde rottdifferentiering anas. Med längre rotningstid skulle troligtvis fler rötter ha utvecklats.

Kombinationen salixvatten och IBA gav vita, tunna och välförgrenade rötter. Ett stort antal gröna skott från ytan för rotbildningen kunde iaktas från ledet som behandlats med kombinationen, bild se bilaga 5.

4.4. Delförsök 3, örtartade sticklingar

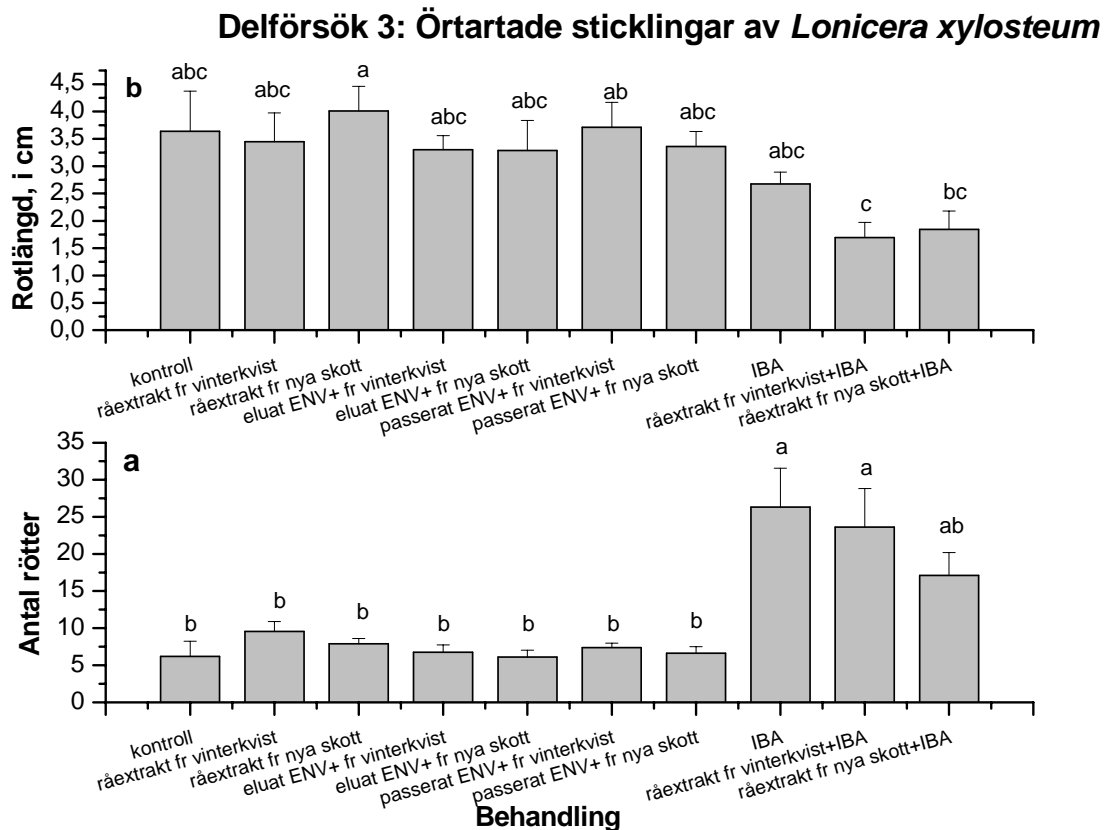


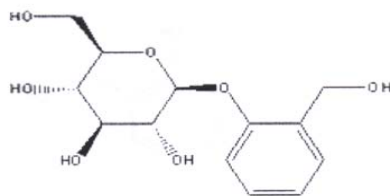
Fig.6: Antal rötter (a) och rotlängd (b) på sticklingar av *Lonicera xylosteum*. Sticklingarna behandlades enligt "Quick-dip" metoden (doppade några sekunder). Första leden doppades i salixvatten från vinterkvist och salixvatten från nya skott. Behandling med eluat från ENV+ kolonn gjordes (ursprunget till eluatet var från båda typerna av salixvatten). Behandling gjordes också i det salixvatten (båda typerna) som passerat ENV+ kolonn (ej fångats upp). Respektive typer av salixvatten i kombination med IBA (2500 ppm) prövades. Enbart IBA (5000 ppm) och som normal en kontroll. Sticklingarna odlades i dimkammare vid 20°C i 4 veckor. Resultaten är analyserade med ANOVA, Tukeys HSD test användes för separation av behandling på 5 % nivån. Felstaplar representerar standardfel av medelvärde. Olika bokstäver representerar signifikant skillnad.

Diagram, fig.6 är resultat från ett försök för att pröva att de laborativt undersökta salixvattnen inte förlorat någon viktig beståndsdel i sin rottningsstimulerande effekt i förhållande till råextraktet.

Eluat från ENV+ bestod av längre kolledjor sorterade ur salixvattnet.

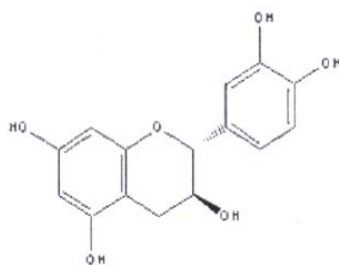
Ämnen som passerat ENV+ kolonn kan t.ex. vara viktiga sockerarter, fria syror, fenoler etc. bild se bilaga 6.

4.5. Identifierade ämnen i salixvatten



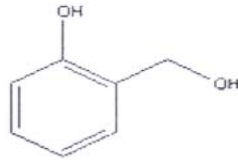
4.5.1. D-Salicin

Beräknat innehåll i salixvatten från vinterkvist var 0,306 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se bilaga 7 a. D-Salicin detekterades endast i salixvatten av vinterkvist. Karaktäristiskt för salix är innehållet av fenoliska glukosider såsom salicin (Julkunen-Tiitto & Meier, 1991). Den vanligaste typen av salicylat funnen i pil är salicin (Ruuhola & Julkunen-Tiitto, 2003). Retentionstid för D-Salicin är: 8.6 min i kromatogrammet över basisk hydrolys av vinterkvist i 30 min. med 50 % NaOH-lösning.



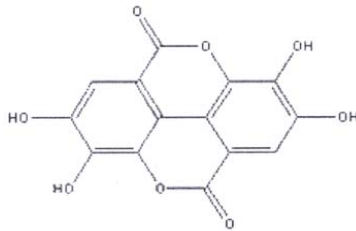
4.5.2. Catechin

Beräknat innehåll i salixvatten från vinterkvist var 0,411 $\mu\text{g}/\text{ml}$ och i salixvatten från nya skott var innehållet 2,262 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se bilaga 7 b. Catechin är ett tanninderivat vanligt förekommande i druvor, bär, ormbunkar och grönt te. Catechin har visat sig vara intressant ur hälsoaspekt (micro.magnet, Internet 2005). Retentionstid för Catechin är ca 9.0 min i kromatogrammen



4.5.3. Saligenin

Beräknat innehåll i salixvatten från vinterkvist var 0,342 µg /ml och i salixvatten från nya skott var innehållet 0,993 µg /ml. Se bilaga 7 c. Nedbrytningsprodukt från Salicin, tidigare använd som bedövningsmedel i samband med mindre kirurgiska ingrepp (Botanical Dermatology Database BoDD, Internet 2005). Retentionstid för Saligenin i vinterkvist är 10.64 min i kromatogrammen.



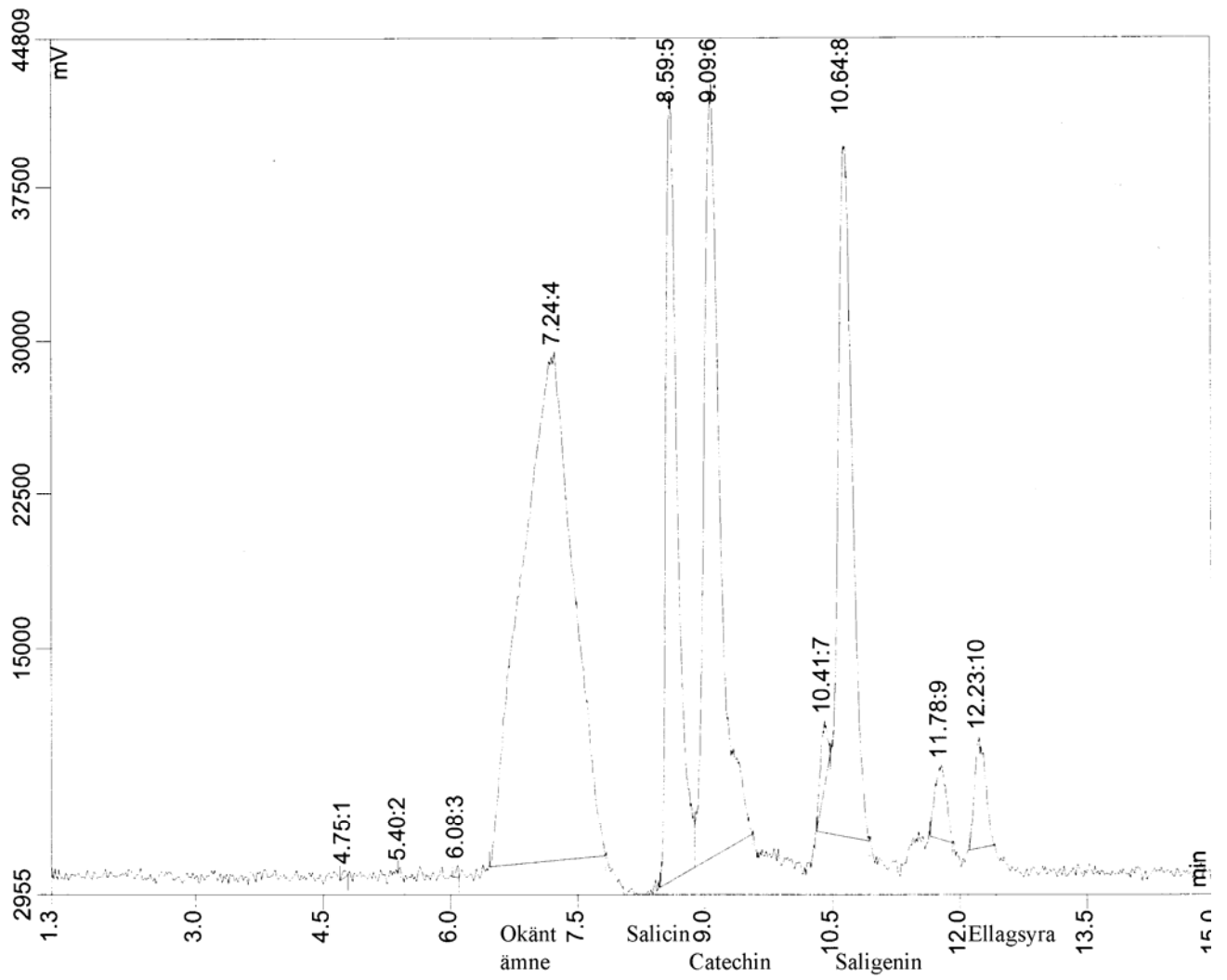
4.5.4. Ellagsyra

Då standardämnet inte fanns tillgängligt kan ingen kurva upprättas och innehållet i salixvattnet inte beräknas. Ellagsyra reglerar tillväxt och frömodnad, skyddar växten från mikrobiella infektioner, insektsangrepp och förgiftning av tungmetaller. Förekommer i bl.a. hallon, jordgubbar, svarta vinbär och valnötter. Hälsöfrämjande för människan (micro.magnet, Internet 2005). Retentionstid för Ellagsyra i kromatogrammen är ca 12.0 min.

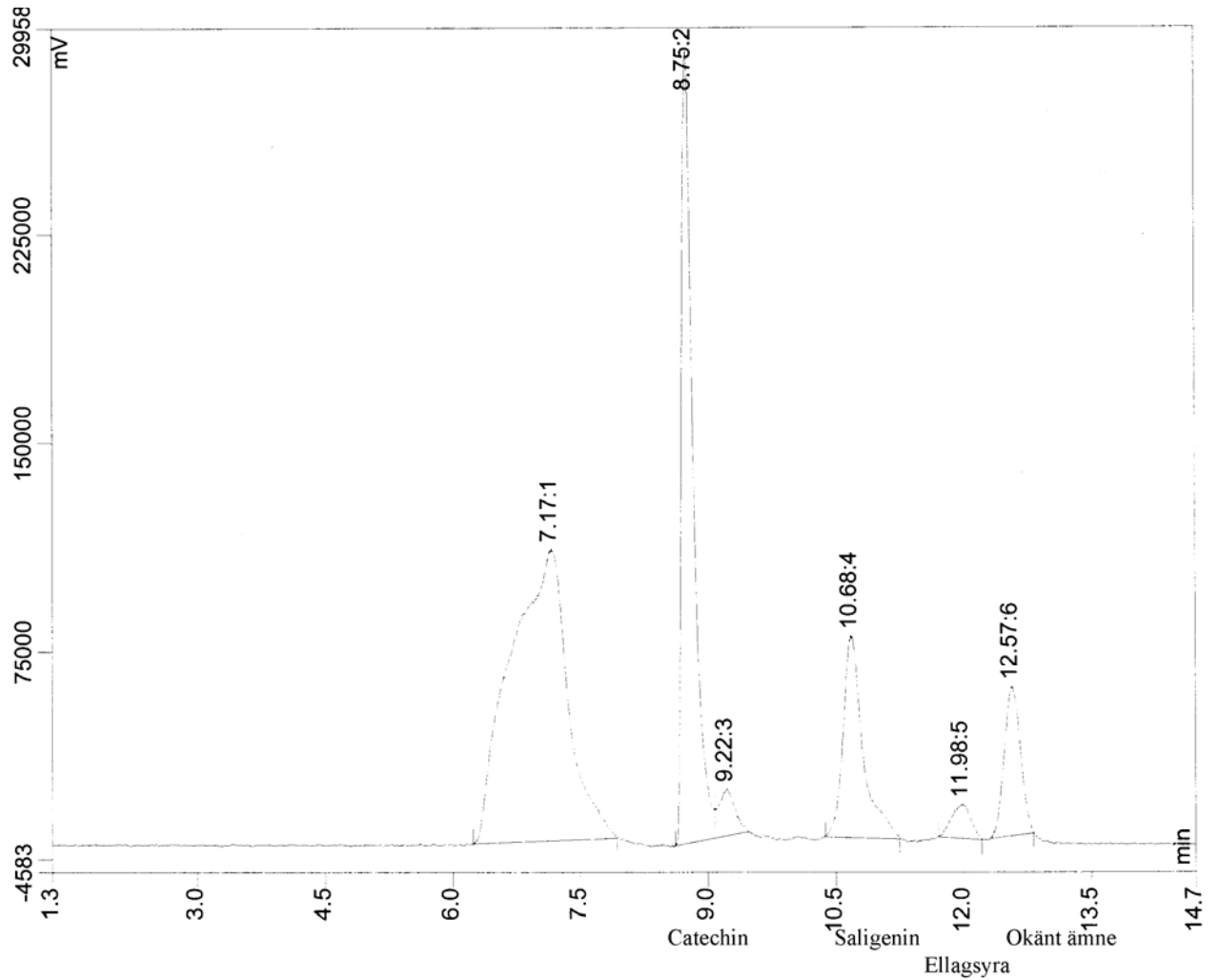
4.5.5. Okänt ämne

Ett okänt ämne med absorbansmaximum vid 260 nm. kunde registreras, men ej namnges. Retentionstid för det okända ämnet i vinterkvist är ca 7.2 min i kromatogrammet.

4.6. Kromatogram



Vinterkvistextrakt basisk hydrolys 30 minuter. Fluorescens detektor (kanal 3)



Extrakt från grön kvist, basisk hydrolys 30 minuter. Fluorescens detektor (kanal 3)

4.7. BRIX- sockerhalt

Sockerhalten i salixvatten varierar över årstiderna. I salixvatten berett från vinterkvist, var sockerinnehållet 0,8 % och i salixvatten från nya skott var sockerinnehållet 1,3 %.

4.8. pH-värde

Salixvattnets pH-värde varierar, vinterkvistens pH var 7,02 och i extrakt av nya skott var pH-värdet 6,13.

4.9. Ledningsförmåga

Ledningsförmågan i salixvatten från vinterkvist var 0,798 mS/ cm och i salixvatten från nya skott var den 3,78 mS/ cm detta betyder att salthalten är väsentligt högre i extrakt från nya skott.

5. DISKUSSION

Det finns många olika sätt för att bereda salixvatten, en metod som resulterade i ett extrakt med högre ämneskoncentration skulle vara önskvärt för analysändamål. Ett högkoncentrerat extrakt kunde ge ytterligare karaktärsspecifika toppar (fler ämnen) som i en låg koncentration inte går att urskilja utan framstår som ett ”brus” i kromatogrammet.

Metoden för beredning av extraktet som brukades i försöket gav ett godtyckligt vatteninnehåll, effekten av spädningen kan ge efterverkan också vad gäller rottingsstimulans.

Kawase anser t.ex. att det för rottingsändamål bästa salixextraktet tillreds av frystorkade, därefter pulveriserade salixkvistar (Kawase, 1981).

Flera ämnen skulle kunna säkerställas med extraktion i metanol istället för i vatten, då metanol effektivt löser ämnen ur växtvävnader. För odlingsändamål kan alkohol evaporeras bort och ersättas med vatten då den växttoxiska effekten inte kan bortses.

Intressant att pröva vore om vatten med detergent skulle lösa ämnen effektivare ur salix.

Det har visat sig att ämnesinnehållet i salixvatten varierar i förhållande till årstider, t.ex. fanns D-salicin endast i extraktet av vinterkvist. Det kan antas att extraktets förmåga att stimulera rotbildning också varierar. Härav skulle ämnen som är aktiva i rottingsprocessen urskiljas och en ökad förståelse för växtfysiologiska skeenden uppnås. Drömmen om rhizocalin finns ännu levande bland oss (Kawase, 1969). Detta hypotetiska ämne, rhizocalin, anses vara ämnet som behövs för att ackumulerade växthormoner i sticklingsbasen skall bilda rötter. Forskare har föreslagit att rhizocalinet består av vitamin B, vitamin H, boron, organiska eller oorganiska kväveföreningar eller något annat (Kawase, 1981).

Ytterligare en byggsten i rottingsprocessen som kan vara intressant är socker (sockerarter) som är nödvändigt för rottingsbildningen i hänseende till uppbyggande av protein i förloppet från DNA via RNA (Bhattecharya, 2002).

Statistiskt visas att salixvatten från örtartade skott inte hade samma rotstimulerande effekt som salixvatten från vinterkvist, statistiken pekar till och med på att det örtartade salixvattnet hämmar rotbildningen, istället bildar behandlade sticklingar mycket kallas som vanligtvis bildas av impulser från cytokinin. Rot och skottbildning regleras av ett förhållande mellan hormonerna auxin och cytokinin (Evert et al. 1999). Cytokinin har relativt stor andel i hormonbalansen hos växter som har svårt att bilda rötter (Hartman et al. 2002). Vanligtvis har varken lonicera eller salix svårt att bilda rötter.

Kawase anser att salix har den optimala hormonbalansen för rotbildning och att salixextrakt innehåller stora mängder endogena co-faktorer möjliga att föra över till andra växter (Kawase, 1981).

Iakttagelser i odlingförsöket visar att salixvatten från vinterkvist gav ett stort antal finförgrenade vita rötter medan rotlängden inte skilde sig från kontrollen. Den opåverkade rotlängden och det höga antalet rötter som var resultatet av behandling med salixvatten är en iakttagelse som bekräftas i artiklar av Kawase (1969) och Grace (1944).

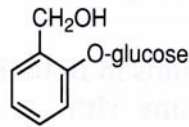
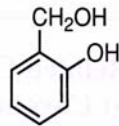
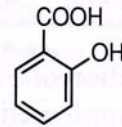


Fig.7: Salicin



Saligenin



Salicylsyra

Bekant är sedan länge att salix innehåller salicylsyra. Detektion som gjordes visade inte något innehåll av salicylsyra i något av de respektive extrakten. Salicylsyra är en metabolit av salicin och saligenin. Halten av saligenin var 3 gånger högre i salixvatten från nya skott än från vinterkvist, medan D-salicin inte förekom i extraktet från nya skott.

Acetylsalicylsyra som kemiskt sett är väldigt lik salicylsyra har i försök visat sig rottningsfrämjande (Khalafalla & Hattori, 2000).

Catechinhalten i extrakt från nya skott var 5 gånger högre än i extrakt från vinterkvist.

I analyserna av extraktet eftersöktes auxin (IAA) och på samma sätt söktes tryptofan som är ett förstadium (en syntesväg) till IAA (Lehninger et al. 2000). Tryptofan är en aminosyra som primärt används i proteinsyntesen.

Uppgifter från litteratur anger att auxininnehåll i salixvatten endast registrerats från april till juni (Gesto et al. 1977). Andra, analyser av salix uppger att ingen IAA påträffats (Vázquez et al. 1968). Detta bekräftar varför vår analys av vinterkvistextraktet saknar IAA-innehåll. IAA kunde förväntas förekomma i extraktet av nya skott enligt Gesto et al (1977) då plantorna lurats igång men detta kunde ej registreras.

Vid hydrolysen av salixextraktet måste processen stoppas vid precisa tillfällen då reaktionerna sker i okänd hastighet. Esterhydrolyser är svåra. Ingen IAA hittades trots upprepade försök, avsaknaden kan ha orsakats av allt för lång hydrolyt som ökar risken för oxidativ nedbrytning av fri IAA (Hoenicke et al. 2001).

Statistiken från odlingsförsöken påvisar endera att rotinducerande ämne saknas i salixextrakt från nya skott eller att något förekommande ämne menligt inverkar på rottningsinduktionen.

Ett odlingsförsök med behandling i olika koncentrationer av salixvatten från olika årstider kunde ge intressant information. Fler växtslag skulle prövas då olika behandlingsresultat kan förväntas eftersom olika arter har individuella krav.

Intressant vore även att testa växter som inte kan rotinduceras med hjälp av IBA. Charles Hess, lär enligt Macdonald, (2002) t.ex. rotat sticklingar av *Betula alleghanensis* med en kombination av extrakt från salix och IBA.

I delförsök 2 vill vi poängtera att kombinationen IBA (2500 ppm) och extrakt från nya skott gav många, vita, välförgrenade och långa rötter. Försöksledet uppvisar en planta med friskt utseende, speciellt avvikande från andra försöksled var de nya gröna skott som utgick från rotbildningsytan.

Kawase (1981) menar att kombinationen (salixextrakt + växthormon) ger stora potentialer för att svårrotade sticklingar som bok, björk, körsbär och valnöt etc. genom en enkel quickdip-behandling skall stimuleras till rotbildning. Också för relativt lättrotade sticklingar kunde en

behandling med kombinationen underlätta hanteringen i plantskolorna då bortfallet skulle bli mindre.

I delförsök 3 gav behandling med IBA gula, korta och kraftiga rötter medan salixvatten gav vita och tunna rötter. Stor rotyta betyder ökat upptag av näringsämnen och vatten. Tunna, fina rötter ger en stor totalyta och verkar därför gynnsamt för växten i förhållande till de IBA behandlade sticklingarnas grövre rötter. Kombinationen IBA+ salixvatten borde ha haft ett jämförande försöksled med hälften vatten/hälften IBA. Tanken på utspädd IBA stör resultatet. Den eventuella synergieffekten salixvatten/ IBA kan inte påvisas utan jämförelsen med kombinationen vatten/IBA.

Frågan är om Quick-dip är det bästa sättet att överföra salixvattnets rottningsstimulerande egenskaper, andra metoder finns beskrivna t.ex. kan sticklingar stå och dra i extrakt under ett dygn eller t.o.m. flera (Gesto et al. 1977). En jämförelse mellan dessa metoder vore intressant att utvärdera.

En bättre anpassad HPLC-metod t.ex. ett binärt system (med 2 mobilfaser) kunde utarbetas för att få en bättre separation och upplösning av substanser i början av kromatogrammet. Mobilfasen kan ställas till högre pH, närmare neutralt, då indoler såsom IAA borde kunna ge bättre signal.

För att påträffa fler substanser måste även andra våglängder prövas.

Otvetydigt är att rotbildningen påverkas av salixvatten, mer ingående undersökningar kunde resultera i en metod där svårrotade sticklingar utan IBA respons kunde förmås bilda rötter efter behandling med salixextrakt.

Avslutningsvis kan sägas att modern litteratur verkar enig om att rottningsprocessen bestäms av samverkan mellan olika ämnen, och att det är svårt att hitta det enskilt aktiva ämnet (rhizocalin), troligtvis är det flera ämnen eller ämneskomplex, socker, stärkelse, syre och enzymer som inverkar och att dessa varierar art för art.

REFERENSER

- Bean W.J., 1980: *Trees and Shrubs hardy in the British Isles*. 8th edition. London. Great Britain. S. 248 - 250.
- Bhattacharya S., 2002: *An insight Into Biochemical Basis of root formation on Cuttings: a Review*[©]. The International Plant Propagators Society. Vol. 52. S. 594 - 598.
- Budi Muljoni R.A., Darsono F.L., Scheffer J.J.C., Verpoorte R., 2001: *Assay of 2, 3-dihydroxybenzoic acid and related compounds in plant materials by high-performance liquid chromatography*. Journal of chromatography A. 927. S. 39 - 45.
- Burnie G., Forrester S., Greig D., Harmony M., Hobley S., Jackson G., Lavarach P., Ledgett M., Macoby S., Molyneaux B., Moodie D., Moore J., Newman D., North T., Pienaar K., Purdy G., Ryan S., Schien G., och Silk J., 1999: *Botanica*. 3th edition. Random House. Australia. S. 809 - 811.
- Chamarro J., Östin A., Sandberg G., 2001: *Metabolism of indole-3-acetic acid by orange (Citrus sinensis) flavedo tissue during fruit development*. London, United Kingdom. Phytochemistry. Vol. 57. S. 179 - 187.
- Corneliuson J., 1997: *Växternas namn. Vetenskapliga växtnamns etymologi. Språkligt ursprung och kulturell bakgrund*. Stockholm. S. 485.
- Diagneault L. & Chong, C., 1985 a: *Characterization of the root-promoting activity in willow extracts*. Rockhamton Queensland, Australia. The International Plant Propagators Society. Vol. 42. S. 509 - 518
- Diagneault L. & Chong, C., 1985 b: *Rooting cuttings of thirteen woody ornamental species in response to willow extract and auxin*. Quebec, Canada. The plant propagator. Vol. 31. S. 12 - 14.
- Evert R. F., Eichhorn S. E., Raven P.H., 1999: *Biology of Plants*. 6th edition. New York, USA. S. 680 - 681.
- Gesto M.D.V., Vázquez A., Vieitez E., 1977: *Rooting Substances in Water Extracts of Castanea sativa and Salix viminalis*. Plant Physiology 40. Santiago de Compostela, Spain. S. 265 - 268.
- Grace N.H., 1944: *Liberation of growth stimulating materials by rooting salix cuttings*. Ottawa, Canada. Canadian Journal of Research. Vol. 23. S. 85 - 93.
- Harbourne J.B., 1973: *Phytochemical methods*. Norfolk, Great Britain. S. 198.
- Hartmann H.T., Kester D.E., Davies T.F., Geneve R.L. 2002: *Plant Propagation Principles and Practices*. 7th edition. New Jersey. USA. S. 300.
- Henriksson J., 1911: *Växterna i de gamlas föreställningar, seder och bruk*. P.Palmquiists aktiebolag, Stockholm. S. 131.

- Hoenicke K., Simat T.J., Steinhart H., Köhler H.J., Schwab A., 2001: *Determination of Free and Conjugated Indole-3-Acetic Acid, Tryptophan, and Tryptophan Metabolites in Grape Must and Wine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 49. S. 5494 - 5501.
- Hess, C., 2000: *Rooting Cofactors: Past, Present, and Future*. Gisborne New Zealand. The International Plant Propagators' Society. S. 598 - 600.
- Houle, G. & Babeux, P., 1997: *The effects of collection date, IBA, plant gender, nutrient availability, and rooting volume on adventitious root and lateral shoot formation by Salix planifolia stem cuttings from the Ungava Bay area (Quebec, Canada)* Canadian Journal Botany. Vol. 76. S. 1687 - 1692.
- Jackson M.B., 1986: *New root formation in plants and cuttings*. Dordrecht, The Netherlands. S. 213. (Fig. 2).
- Julkunen-Tiitto R. & Sorsa S., 2001: *Testing the effects of drying methods on willow flavonoids, tannins, and salicylates*. New York, USA. Journal of chemical ecology. Vol. 27. S. 779 – 789.
- Julkunen-Tiitto R. & Meier B., 1991: *Variation in Growth and Secondary Phenolics Among Field-Cultivated Clones of Salix myrsinifolia*. New York, USA. Planta Medica. Vol. 58. S. 77 - 80.
- Kawase M., 1969: *Root-promoting Substances in Salix alba*. Ohio, USA. Physiologia plantarum. Vol. 23. S. 159 - 170.
- Kawase M., 1981: A “dream” chemical to aid propagation of woody plants. Ohio, USA. Ohio Report. Vol. 4. S. 8 -10.
- Khalafalla M.M. & Hattori K., 2000: *Ethylene inhibitors enhance in vitro root formation on faba bean shoots regenerated on medium containing thidiazuron*. Netherlands. Plant Growth Regulation Vol. 32. S. 59 - 63.
- Kroin, J., 1992: *Advances Using Indole-3-butyric Acid (IBA) Dissolved in Water for – Rooting Cuttings, Transplanting, and Grafting*. Ballina, N.S.W., Australia. The International Plant Propagators' Society. S. 489 - 492.
- Krüssman G., 1986: *Manual of Cultivated Broad-Leaved Trees & Shrubs*. Hong Kong, England. S. 298.
- Lehninger, A., Nelson D.L., Cox M. M., 2000: *Principles of Biochemistry*. 3rd edition. New York, USA. S. 843.
- Luo, W., Ang, C.Y.W., Schmitt T.C., 1998: *Determination of Salicin and Related Compounds in Botanical Dietary Supplements by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection*. Gaithersburg, USA. Journal of Association of Analytical Chemists. Vol. 81. S. 757 - 762.
- Macdonald, B., 2002: *Practical woody Plant Propagation for nursery growers*. 7th edition Portland. Oregon. USA. S. 338.

- McMurry, J., 1998: *Fundamentals of Organic Chemistry*. 4th edition. Pacific Grove, California, USA. S. 331.
- Norberg, T., 2002: *Organisk kemi*. Kompendium: KE0002:2, SLU. S. 24 - 25.
- Nordström, B., universitetsadjunkt, 2005: muntl. (7.6.2005)
- Ruuhola, T., Julkunen-Tiitto, R., 2003: *Trade off between synthesis of salicylates and growth of micropropagated Salix petandra*. Journal of Chemical Ecology. Vol. 29. S. 1565 - 1588.
- Vázquez A., Méndez J., Gesto M.D.V., Seoane E., Vieitez E., 1968: *Growth substances isolated from woody cuttings of Salix viminalis L. and Ficus carica L.* Phytochemistry. Vol.7. S. 161 - 167.
- Venema D.P., Hollman P.C.H., Janssen K.P.L.T.M., Katan M.B., 1996: *Determination of Acetylsalicylic Acid and Salicylic Acid in Foods, Using HPLC with Fluorescence Detection*. J. Agric. Food Chem. 44. Wageningen, The Netherlands. S. 1762 - 1767.
- Waters 474 Scanning Fluorescence Detector, operator's guide 1996: Milford, MA 01757, USA. Kap. 1.

Internetadresser 10/6 2005

- D-salicin: <http://www.emdbiosciences.com/product/559302>
- Catechin : <http://www.herbs-tech.com/product/catechin.asp>
<http://micro.magnet.fsu.edu/phytochemicals/pages/catechinhydrate.html>
- Ellagsyra : <http://micro.magnet.fsu.edu/phytochemicals/pages/ellagicacid.html>
<http://www.red-raspberry.org/Health/EllagicAcid.htm>
- Saligenin : <http://www.biosite.dk/leksikon/salicin.htm>
- Molekylmodeller : chemfinder.cambridgesoft
- Salix* : <http://bodd.cf.ac.uk/BotDermFolder/BotDermS/SALI.html>
- Lonicera xylosteum* : <http://www.worldagroforestry.org/Sites/TreeDBS/Botanic/SpeciesInfo.cfm?SpID=7273>

BILAGA 1

Beskrivning av hur HPLC och detektorer fungerar

HPLC kromatografering utnyttjar att ämnena i ett extrakt har olika fördelningsjämvikt mellan en fast stationär fas och en mobil vätskefas. En HPLC utrustning består av en pump, injektor, kolonn och detektor. Även flaskor med elueringsmedel (mobilfas) och en styrenhet som förser pumpen med rätt mobilfasblandning används. Den mobila fasen pumpas till injektorn, provlösningen injiceras, vidare trycks provet (framför mobilfasen) in i kolonnen där provkomponenterna separeras och vidare till detektorn där komponenterna detekteras. Från detektorn går signalen till en dator med integrator.

Det går att använda HPLC utrustning både för analytiska och preparativa ändamål. Isokratisk eluering heter det om en och samma mobilfas används under hela kromatograferingen och om flera mobilfaser blandas (vanligtvis 2) och sammansättningen kontinuerligt ändras heter det gradienteluering.

Kolonnen på HPLC utgörs oftast av ett rostfritt stålrör som är fyllt med en stationär fas av finkorniga sfäriska partiklar (4-10 μm diametern), dessa har mycket stor yta i förhållande till sin massa (200-300 m^2g^{-1}). Ju mindre partiklar som finns, desto bättre separation fås vid kromatografering. Dock kan inte partiklarna göras för små eftersom flödesmotståndet då blir för stort. HPLC kallas även för högtrycks-vätskekromatografi.

Detektorer

För UV-absorberande substanser vid detektering används photodetector. Absorbtionen mäts kontinuerligt när den mobila fasen passerar en kvartscell. En speciell slags UV-detektor, Diode Array-detektorn (DAD) registrerar absorbansen inom ett särskilt våglängdområde. En dator lagrar mätresultaten under analysen. Det går sedan att studera kromatograferingen vid olika våglängder och tillgång till ett UV-spektrum för de analyserade substanserna erhålls dessutom.

RI-detektorer mäter ändringen i brytningsindex hos den mobila fasen. Dessa används för analys av substanser som inte är UV-absorberande (Norberg, 2002).

Fluorescens detektor

Vissa ämnen, ofta i biologiska system, har en fluorescerande verkan när atomer eller molekyler exciteras från ett tillstånd till ett annat. Fluorescensen uppstår när en exciterad elektron faller tillbaka i sin ursprungliga orbital, en för ämnet karaktäristisk emissionssignal bildas då som nyttjas för mätning. Excitation kan ske när ämnet utsätts för hög energi eller intensivt ljus. I en fluorescensmätare används ljus för att stimulera excitation. I detta fall användes båggljuslampa med xenon vilken ger ett spektrum med vid och låg intensitet.

Mätningen av fluorescensen sker genom att mäta emissionsvåglängder som samlas upp av en fotocell där signaler kan mätas med minimal inverkan och störning från excitationimpulsen.

Fluorescencedetektorer används för att detektera metaller, organiska ämne och andra ämnen i biologiska system (Waters 474 Scanning Fluorescence Detector, 1996).

BILAGA 2

Solid Phase Extraktions (SPE) kolonner

Polymerkolonn

För molekyler som har hydrofob karaktär eller där delar av molekylen är hydrofoba dvs. kolkedjor kan ENV+ kolonn användas.

Jonbytarkolonn

SAX kolonn (Strong Anion X-changer) används för analys av laddade substanser. Laddade grupper på ytan av den stationära fasen kan binda in substanser i den mobila fasen som har motsatt laddning. Kolonner med negativt laddade partiklar kallas katjonbytare och de med positivt laddade kallas anjonbytare. Genom att öka saltkoncentrationen eller ändra pH i den mobila fasen kan de bundna substanserna frigöras från kolonnen och elueras ut (Norberg, 2002).

BILAGA 3

Metodutveckling och teknik

Utveckling av metod och programvara för detektion av ämnen skedde parallellt med ett uppbyggande av en samling över tänkbara referensämnen. De standarder som förväntades finnas i salixvatten kördes genom HPLC för att erhålla spektraldata och retentionstider för respektive ämne. Standardämnena löstes i 1/5 metanol och resten Millipore Ultra Pure vatten. HPLC är en vanlig metod vid analys av växtvävnader (Chamarro et al. 2001), (Luo et al. 1998), (Julkunen-Tiitto & Sorsa 2001).

Urvalet av standarder gjordes enligt äldre litteratur där en del av referensämnena tidigare påträffats i salixvatten, med hjälp av HPLC och andra detektions metoder.

Olika programfiler och mobilfasvätskor prövades för att nå den bästa och tydligaste ämnesbeskrivning i form av våglängder.

Slutligen visade det sig att en programfil benämnd mp5 (isokratisk körning) var det bästa alternativet med 2 olika våglängder 219 och 279 nm, fluorescencemätning och med flödesgradient.

De 3 olika mobilfasvätskor som prövades var 1 % myrsyra, fosforsyra, ammoniumfosfat 15 mM + metanol lösning med pH 3,8, vilka inte gav tillfredställande resultat. En mobilfas med inblandning av acetonitril gav god separation och tydlig karaktäristik på topparna (Budi et al. 2001). Den vätska som befanns vara bäst var en svagt buffrande lösning med ammoniumfosfat 15 mM, acetonitril och Millipore vatten.

Undersökning av olika pH på mobilfasvätskan prövades, pH 3,0 pH 3,8 pH 4,2 och pH 4,5. Värdet på pH 4,2 befanns ge tydligast resultat, detta kan bero på att pKa-värdet för syrorna som analyserats ligger nära detta område.

ENV+ kolonn användes för att fånga upp längre kolkedjor och anjonbytare SAX kolonn användes för att fenoliska substanser med syrakaraktär som IAA och tryptofan skulle bindas in.

Kombinationen med mobilfasblandning ställd till pH 4,2 och den utvalda programfilen gav tydligaste resultat.

HPLC metoder som prövats

1. pump A. 1 % HCOOH, pump B. metanol, binär gradient
2. pump A. 50 mM H₃PO₄, pump B. metanol, binär gradient
3. pump A. 50 mM H₃PO₄, pump B. acetonitril, binär gradient
4. 15 mM NH₄H₂PO₄ 27 % acetonitril, isokratiskt vid olika pH.

BILAGA 4



Vedartade sticklingar av *L. xylosteum* kontroll respektive behandling med salixvatten

BILAGA 5



Örtartade sticklingar av *L. xylosteum* kontroll, behandling med IBA, salixvatten och salixvatten + IBA

BILAGA 6



Örtartade sticklingar från *L. xylosteum* kontroll och IBA



Örtartade sticklingar från *L. xylosteum* behandlade med extrakt från vinterkvist och med extrakt från nya skott



Örtartade sticklingar från *L. xylosteum* behandlade med eluat ENV+ från vinterkvist och med eluat ENV+ från nya skott



Örtartade sticklingar från *L. xylosteum* behandlade med extrakt från vinterkvist som passerat ENV+ och med extrakt från nya skott som passerat ENV+

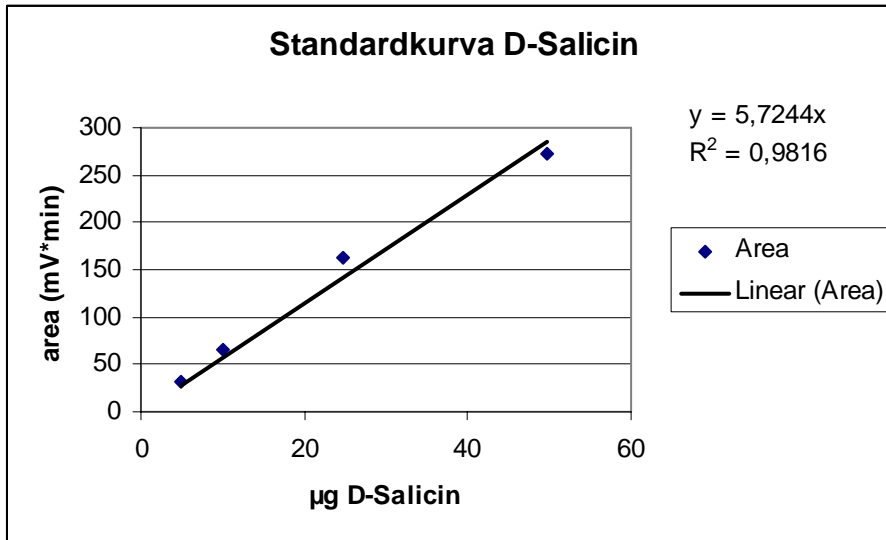


Örtartade sticklingar från *L. xylosteum* behandlade med extrakt från nya skott i kombination med IBA

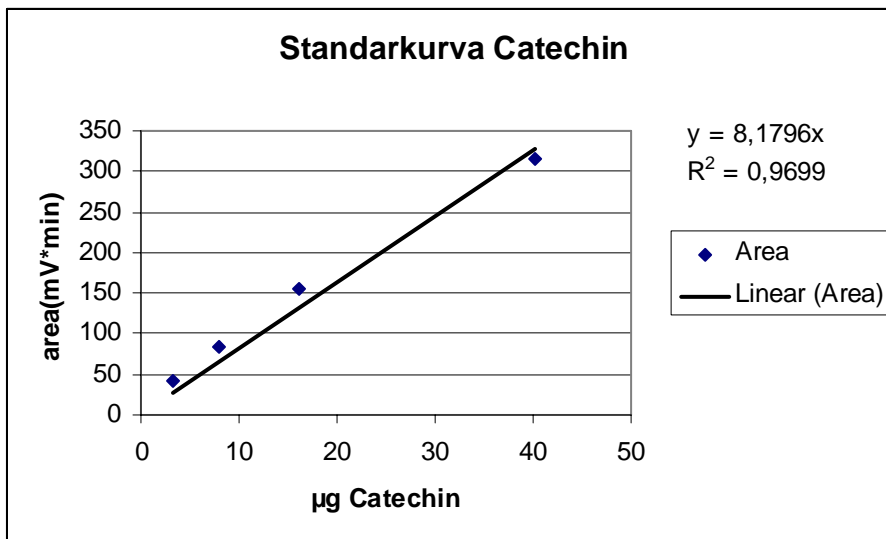
BILAGA 7

Standardkurvor

a



b



C

