مقایسه رشد و توان تولید متابولیتهای ثانویه در دودمانهای ریشه مویی تراریخت حاصل از کاسنی (*Cichorium intybus*)

بنت الهدی آذرمهر، فرح کریمی*، مسعود تقی‌زاده و سید لطیف موسوی گرگری

تهران، دانشگاه شاهد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۳

چکیده

در این پژوهش با هدف تولید و جداسازی دودمانهای ریشه‌مویی بیش تولید کننده ترکیبات ثانویه، قطعات جداکشت برگ کاسنی با آگروباکتریوم رایزوژنز سویه A4 تلقیح شد. دودمانهای حاصل از نظر رشد، محتوای فنل و فلاونوئید کل، شیکوریک اسید و کربوهیدراتهای محلول مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفتند. سنجش فنل، فلاوونوئید و کربوهیدراتهای محلول به روش اسپکتروفتومتری و سنجش شیکوریک اسید توسط HPLC انجام شد. بیشترین سرعت رشد در دودمانهای A، H، I و J مشاهده شد. دودمانهای به دست آمده از نظر فنل و فلاوونوئید کل تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند ولی از نظر محتوای شیکوریک اسید دودمان J و پس از آن دودمان F حاوی بیشترین مقدار از این ماده بودند. بیشترین مقادیر کربوهیدرات نیز در دودمانهای D، G، I و J مشاهده شد. با توجه به نتایج حاصل، به نظر می‌رسد دودمان J با بیشترین مقادیر رشد و تولید شیکوریک اسید و کربوهیدرات، برترین دودمان حاصل در این پژوهش باشد.

واژه های کلیدی: آگروباکتریوم رایزوژنز، ریشه موئی، کاسنی، متابولیت ثانویه

* نویسنده مسئول، تلفن: ۵۱۲۱۲۲۲۷-۰۲۱، پست الکترونیکی: fkarimi@shahed.ac.ir

مقدمه

کاسنی از اعضای خانواده گل‌ستاره‌ایها (Asteraceae)، گیاهی دو ساله و یکی از گونه‌های مهم گیاهان دارویی است. ریشه این گیاه حاوی ترکیبات دارویی شامل پلی-ساکاریدی به نام اینولین (inulin)، سزکوئی‌ترپن‌لاکتونها، کومارینها، فلاونوئیدها، شیکوریک اسید و ویتامینها است که دارای استفاده‌های دارویی مختلفی می‌باشند. همچنین از گیاه کاسنی به دلیل ترکیبات آنتی‌رادیکال و آنتی‌اکسیدان موجود در ریشه برای درمان ایدز (AIDS)، سرطان و دیابت استفاده می‌شود (۱۷ و ۲۲). در بسیاری از گیاهان، کشت ریشه موئی (Hairy root culture) روشی مؤثر برای تولید متابولیتهای ثانویه است. این ریشه‌ها دارای پایداری ژنتیکی و بیوشیمیایی بوده و علاوه بر رشدی سریع، توانایی سنتز ترکیبات طبیعی در سطوح قابل مقایسه با گیاه مادر نیز از دیگر ویژگیهای این نوع کشت می‌باشد (۱۵). تشکیل ریشه‌های موئی در گیاهان در واقع حاصل نوعی بیماری گیاهی است که بوسیلهٔ آگروباکتریوم رایزوژنز که یک باکتری گرم منفی است ایجاد می‌شود. وقتی که باکتری گیاه را آلوده می کند، T-DNA که بین قسمتهای TR و TL در پلاسمید Ri باکتری است به گیاه منتقل شده و در ژنوم هسته‌ای گیاه میزبان قرار می‌گیرد. به دنبال آن، میزان اکسین سلولی افزایش یافته و در نتیجه ریشه‌های مو مانند زیادی تولید می‌شود (۸).

گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مولکولهای کنشگر شیمیایی اکسیژن‌داری مانند یونهای اکسیژن و پراکسیدها هستند که نقش مهمی در ایجاد بیماریهای خطرناکی چون سرطان و بیماریهای قلبی- عروقی ایفاء می‌کنند و خنثی‌سازی اثر آنها توسط آنتی اکسیدانها و سیستمهای جاروب کننده رادیکالها صورت می‌گیرد (۴). همین طور این رادیکالها از طریق پراکسیداسیون لیپیدها و در نتیجه تخریب غشاء، تخریب پروتئینها، غیرفعال‌کردن آنزیمها، از بین بردن رنگیزه‌ها و اختلال در عملکرد DNA تنش ثانویه اکسیداتیو ایجاد می-کنند که منجر به خسارات جدی به ساختارهای سلولی و

گیاه می‌شود (۲). فنلها به دلیل ساختار و گره‌های هیدروکسیلی که دارند عموماً ترکیباتی با قدرت آنتی-اکسیدانی قوی هستند (۵). مطالعات، ارتباطی منفی بین مصرف رژیمهای غذایی سرشار از میوه و سبزی و خطر بیماریهای مزمن را در انسان نشان داده‌اند. قسمتی از عملکردهای فیزیولوژیکی میوه‌ها و سبزیها در رژیم غذایی انسان، مربوط به فراوانی ذخائر پلی‌فنلی آنهاست (۴). به علاوه پاسخهای دفاعی گیاه منجر به بیوسنتز و تجمع انواع ترکیبات ثانویه گیاهی می‌گردد. حمله پاتوژنها یا زخمی شدن گیاه منجر به القاء پاسخهای دفاعی و به دنبال آن بیوسنتز ترکیبات ثانویه همچون فنل و فلاونوئیدها می‌گردد (۱). شیکوریک اسید که به نام دی‌کافئوئیل‌تارتاریک‌اسید نیز شناخته می‌شود به دلیل توانایی در مهار آنزیم HIV integrase و همچنین تحریک ترشح انسولین و جذب گلوکز، مورد مطالعه قرار گرفته است(۱۱). گسترش نگران-کننده سندروم نقص ایمنی اکتسابی (AIDS)، کشف عوامل درمانی برای جلوگیری از تکثیر ویروس مسبب نقص ایمنی انسانی (HIV-1) را ضروری می‌سازد. درک پیشرفته از چگونگی چرخه سلولی ویروس این امکان را فراهم ساخته که اهداف خاصی به منظور قطع چرخه سلولی ویروس تعریف گردد. یکی از اهداف، آنزیم integrase ویروسی است که مسئول ورود و ادغام DNA ویروسی با DNA سلول میزبان است. این ورود DNA برای ایجاد آلودگی ویروسی لازم است. بنابراین عواملی که بتوانند از این فرآیند ممانعت به عمل آورند به عنوان عوامل ضد ایدز شناخته می‌شوند. شیکوریک اسید یکی از قویترین مهارکننده‌های HIV-1 integrase بوده و دارای فعالیت ضدایدزی است (۱۲). اینولین نیز (به عنوان عمده‌ترین کربوهیدرات محلول موجود در کاسنی) دارای اثرات مفید دارویی از جمله جهت مصرف افراد دیابتی، متابولیسم لیپیدها، دخالت در جذب بیشتر کلسیم و منیزیم و تعیین میزان فیلتراسیون گلومرولی (Glomelural filtration rate) است (۱۹).

با توجه به افزایش جمعیت کره زمین و عدم کفایت وسعت زمینهای کشاورزی برای کشت انواع گیاهان به منظور تامین مواد اولیه دارویی، کشت ریشه‌های مویی می-تواند به عنوان یک روش جایگزین به کار رود. به این منظور بهتر است تلقیح قطعات جداکشت با سویه‌های آگروباکتریوم رایزوژنز بارها صورت گرفته و دودمانهایی از ریشه مویی با صفات برتر غربال شوند. در این مطالعه، دودمانهای ریشه‌ای حاصل از تلقیح قطعات جداکشت کاسنی با *A.rhizogenese* سویه A4 از نظر سرعت رشد و توان تولید فنل، فلاونوئید، شیکوریک اسید و کربوهیدرات با هم مقایسه شده‌اند و بر این اساس بهترین دودمان به دست آمده معرفی شده است. قبلا پژوهشی با هدف مشابه روی کاسنی صورت نگرفته و این اولین گزارش می‌باشد.

مواد و روشها

کشت ریشه موئی: قطعات جداکشت برگ از گیاهچه های چهار هفته‌ای حاصل از کشت بذر کاسنی در شرایط سترون درون شیشه‌ای (*in vitro*) تهیه شد و با *Agrobacterium rhizogenes* سویه A4 تلقیح گردید. قطعات جدا کشت تلقیح شده در محیط کشت MS فاقد هورمون کشت داده شدند. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد، قطعات جدا کشت به محیط کشت MS فاقد هورمون حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم ۲۵۰mg L^{-1} منتقل و در شرایط تاریکی در دمای اتاق نگهداری شدند. اولین ریشه‌ها پس از ۱۵ روز مشاهده شد. هر یک از ریشه‌های حاصل که در واقع از یک سلول منشا گرفته بود به عنوان یک دودمان مستقل (root line) بطور جداگانه در محیط کشت نیم MS مایع، حاوی سفوتاکسیم ۲۵۰mg L^{-1} کشت داده شد و در شیکر انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد. ریشه‌های موئی هر دو هفته یک بار واکشت و توزین شدند. در نهایت یازده دودمان ریشه‌ای، شامل A, B, C, D, E, F, G, H, J, I, K از نظر سرعت رشد (افزایش وزن

نسبت به زمان) و محتوای متابولیتهای ثانویه مورد مقایسه قرار گرفتند.

استخراج ژنوم و آنالیز PCR : استخراج DNA از ریشه-های حاصل از تلقیح با باکتری و ریشه‌های غیر ترانسفورم کاسنی بر اساس روش Khan و همکاران (۲۰۰۷) صورت گرفت (۱۴). پلاسمید *A.rhizogenes* سویه A4 نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. آزمون PCR با استفاده از پرایمر طراحی شده برای ژن *rol*B بر روی DNA استخراج شده انجام شد (جدول۱).

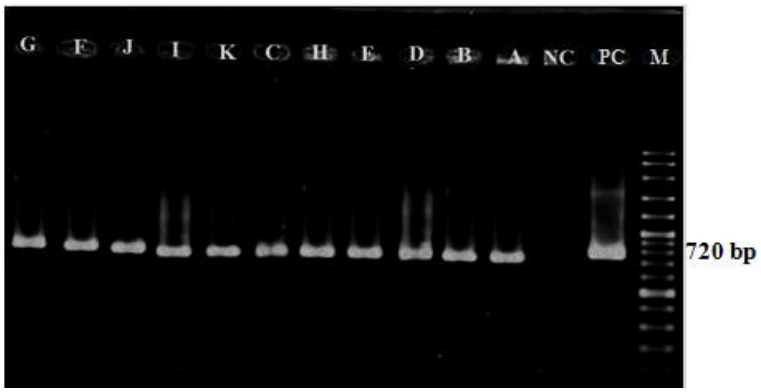
جدول ۱- آغازگر رفت و برگشت طراحی شده برای تکثیر ژن *rol*B

Forward	5′-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCACGA-3′
Reverse	5′-TAGGCTTCTTTCATTCGGTTTACTGCAGC-3′

برنامه PCR جهت تکثیر ژن به صورت زیر بود: مرحله اول به مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد جهت باز شدن ابتدایی دو رشته DNA، مرحله دوم ۳۵ سیکل با برنامه؛ ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه و مرحله سوم ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه. به منظور بررسی نتایج، محصول PCR، بر روی ژل آگارز ۱ درصد برده شد (۲۳).

تهیه عصاره پلی فنلی و اندازه‌گیری فنل و فلاوونوئید کل: برای استخراج پلی‌فنلها ۲ گرم از بافت ریشه در ۳۰mL اتانول ۷۰ درصد (pH =۳/۲ با فرمیک اسید) به خوبی سائیده و در طول شب خیسانده شد. عصاره به دست آمده برای سنجش فنل و فلاونوئید کل مورد استفاده قرار گرفت. برای سنجش فنل کل، ۱۲۵میکرولیترعصاره پلی‌فنلی، ۰/۵ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر و ۱۲۵ میکرولیتر معرف فولین- سیاکولتا مخلوط وبعد از گذشت ۶ دقیقه ۱/۲۵ میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات ۷ درصد به مخلوط حاصل افزوده شد و در نهایت حجم محلول با آب مقطر به ۳ میلی لیتر رسید. محلول به مدت ۹۰ دقیقه در تاریکی نگهداری و سپس جذب آنها در طول موج ۷۶۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد و مقدار فنل کل در هر نمونه با کمک معادله حاصل از منحنی استاندارد گالیک اسید محاسبه شد. برای سنجش فلاونوئید کل ۰/۲۵ میلی لیتر عصاره پلی فنلی، ۷۵ میکرولیتر سدیم نیترات ۵ درصد، ۷۵ میکرولیتر محلول تازه تهیه شده آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد و ۰/۵ میلی لیتر محلول سدیم هیدروکساید ۱مولار با هم مخلوط شد و سرانجام حجم نهایی محلول با استفاده از آب دو بار تقطیر به ۲/۵ میلی‌لیتر رسانده شد. بعد از ۵ دقیقه جذب آنها در طول موج ۵۱۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. سنجش همه نمونه‌ها با سه تکرار مستقل انجام شد و مقدار فلاونوئید کل در هر نمونه با کمک معادله حاصل از منحنی استاندارد کوئرستین محاسبه شد (۶).

سنجش شیکوریک اسید توسط HPLC : سنجش شیکوریک اسید به روش Llorach و همکاران (۲۰۰۸) انجام شد (۱۳). بدین منظور از دستگاه HPLC (Knauer GmbH, Germany) و ستونی با مشخصات (۴mm ID× C_{18}:۱۲۵ mm) استفاده شد. سرعت جریان حلال ۰/۸ میلی لیتر در دقیقه و فاز متحرک شامل آب اسیدی شده با ۰/۵ درصد فرمیک اسید (حلال A) و متانول (حلال B) بود که بصورت گرادیان برنامه‌ریزی شد. برنامه گرادیان با ۵ درصد حلال B شروع شد و طی ۲۵ دقیقه به ۴۰ درصد حلال B در دقیقه رسید و به مدت ۵ دقیقه بصورت ایزوکراتیک ادامه یافت. طول موج دستگاه روی nm λ=۳۳۶ تنظیم شد. برای هر تزریق از ۲۰ میکرولیتر عصاره پلی‌فنلی استفاده شد. محتوای شیکوریک اسید در دودمانهای مختلف ریشه موئی، بر اساس سطح زیر منحنی به دست آمده و با استفاده از منحنی استاندارد رسم شده به وسیله شیکوریک اسید استاندارد (Sigma) محاسبه گردید.



شکل۱. نتیجه آزمون PCR برای ژن *rol*B در دودمانهای ریشه مویی. M: مارکر وزن مولکولی، PC: کنترل مثبت (ژنوم باکتری)، NC: کنترل منفی (ریشه گیاهچه حاصل از کشت بذر کاسنی)، A–K: دودمانهای مختلف ریشه موئی

سنجش کربوهیدراتها: سنجش قندهای محلول به روش فنل- سولفوریک اسید انجام شد. ۰/۱ گرم از بافت ریشه در یک میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد به خوبی سائیده و به مدت یک دقیقه با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. عمل استخراج با همین روش سه بار دیگر تکرار و هر بار مایع رویی به یکدیگر افزوده و کاملاً خشک گردید. باقیمانده حاصل از تبخیر در آب مقطر نیمه گرم حل شد و به یک میلی‌لیتر از هر نمونه به لوله آزمایش منتقل و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول فنل ۵ درصد به آنها اضافه و به مدت ۱ دقیقه ورتکس شد. از یک میلی‌لیتر آب مقطر به عنوان شاهد استفاده شد. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به آرامی به سطح هر لوله اضافه شده تا حرارت لازم برای پیشرفت واکنش را فراهم سازد. بعد از ۳۰ دقیقه جذب هر یک از نمونه‌ها در طول موج ۴۸۵ نانومتر به دست آمد و مقدار کربوهیدرات در هر نمونه با کمک معادله حاصل از منحنی استاندارد غلظتهای معین گلوکز محاسبه شد (۲۱). سنجش همه نمونه‌ها با سه تکرار مستقل انجام گرفت.

نتایج

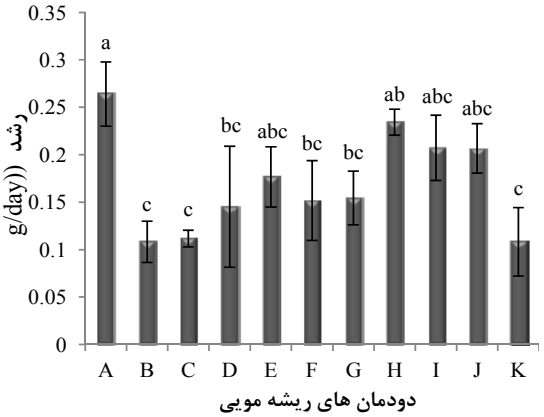
الکتروفورز محصول PCR ژنوم دودمانهای ریشه مویی، تکثیر قطعه‌ای به طول ۷۲۰bp که مؤید حضور ژن *rol*B بود را نشان داد. این باند تنها در کنترل مثبت (DNA باکتری) و ریشه‌های تراریخت مشاهده شد در حالی که محصول PCR حاصل از ژنوم ریشه‌های شاهد فاقد قطعه ۷۲۰bp بود(شکل ۱).

شکل۲ مراحل ایجاد ریشه‌های موئی روی قطعات جداکشت، انتقال آنها به محیط کشت مایع و رشد و استقرار آنها در محیط مایع را نشان می‌دهد. بیشترین رشد در دودمان A مشاهده شد که با دودمانهای E، H، I و J تفاوت معنی‌داری نداشت و کمترین رشد مربوط به دودمانهای B، C و K بود. دودمان A رشدی برابر ۰/۲۶۴ گرم در روز و دودمانهای B، C و K حدود ۰/۱ گرم در روز رشد داشتند (شکل ۳). بیشترین و کمترین محتوای فنل کل به ترتیب در دودمانهای ریشه مویی B و K مشاهده شد (شکل۴). دودمانهای A، B و J از نظر محتوای فلاونوئید کل بافت تفاوت معنی‌داری را نسبت به هم نشان ندادند و دارای بیشترین مقدار فلاونوئید کل نسبت به سایر دودمانها بودند. دودمان K نیز کمترین مقدار را نسبت به سایرین نشان داد (شکل۵).

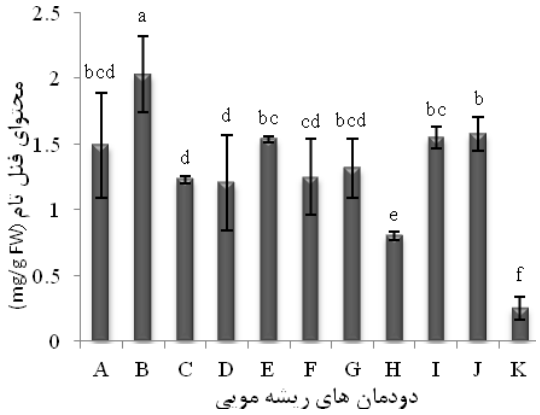
ج ب الف

شکل۲. القاء و رشد ریشه‌های موئی حاصل از تلقیح قطعات جداکشت

برگ کاسنی با آگروباکتریوم رایزوژنز سویه A4. الف) ایجاد اولیه ریشه‌ها از محل جراحتهای ایجاد شده بر سطح برگهای تلقیح شده در محیط جامد ب) انتقال ریشه‌ها به محیط مایع ج) ازدیاد ریشه‌ها بعد از گذشت یک ماه از انتقال به محیط مایع

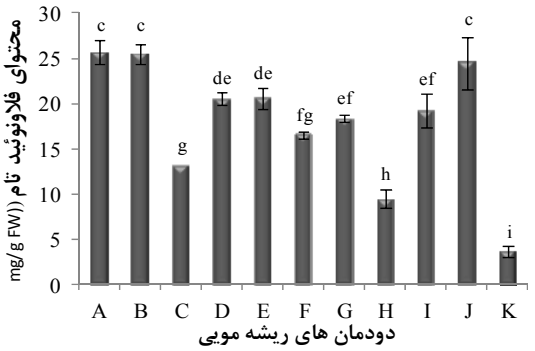


شکل ۳. مقایسه رشد دودمانهای ریشه مویای حاصل از تلقیح قطعات جدا کشت با آگروباکتریوم رایزوژنز سویه A4. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین میانگینها می‌باشد ($p\leq0.05$) .



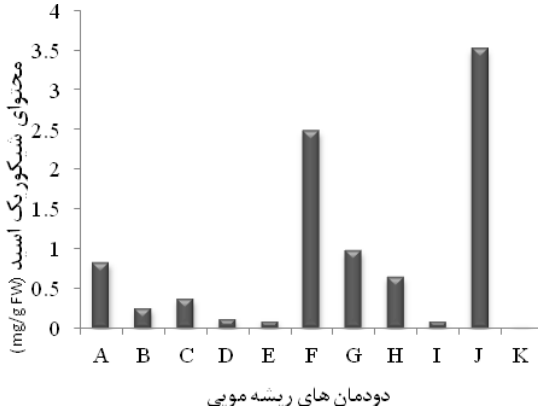
شکل۴. محتوای فنل کل بافت در دودمانهای ریشه مویای حاصل از آگروباکتریوم رایزوژنز سویه A4. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین میانگینها می‌باشد ($p\leq0.05$).

زمان بازداری ترکیب استاندارد شیکوریک اسید تهیه شده از شرکت سیگما با استفاده از کروماتوگرام HPLC، ۰/۵ ± ۲۸ به دست آمد (شکل ۶). محتوای شیکوریک اسید بافت ریشه در دودمان J بیشترین و در دودمان K کمترین مقدار را نسبت به سایر دودمانها داشت (شکل۷).



شکل ۵. محتوای فلاونوئید کل بافت در دودمانهای ریشه مویی حاصل از سویه A4. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین میانگینها می‌باشد ($p\leq0.05$).

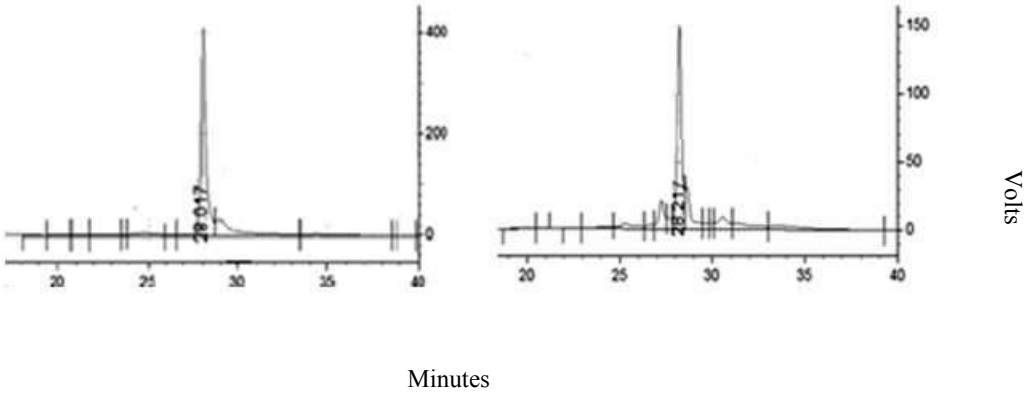
محتوای کربوهیدرات بافت ریشه در دودمانهای G، I و J نسبت به دودمانهای A، B، C، E و F به طور معنی‌داری بیشتر بود (شکل۸).



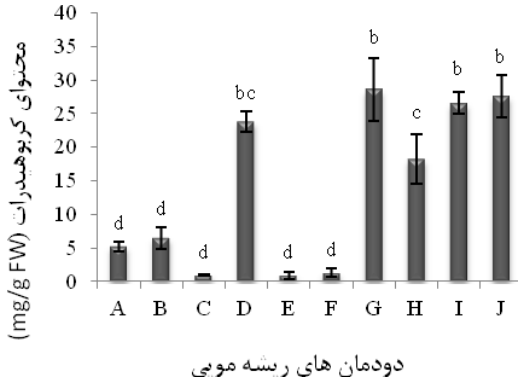
شکل۷. محتوای شیکوریک اسید بافت در دودمانهای ریشه مویی حاصل از آگروباکتریوم رایزوژنز سویه A4. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین میانگینها می‌باشد ($p\leq0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

ریشه موئی که در اثر آلودگی گیاه با باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز ایجاد می‌شود، سرعت رشد بالا و پایداری ژنتیکی زیادی دارد. همین طور به عنوان منبعی برای تولید متابولیتهای ثانویه در مقادیری قابل مقایسه با بیوسنتز این ترکیبات در ریشه گیاهان به شمار می‌رود (۸).



شکل۶. کروماتوگرام HPLC شیکوریک اسید (RT=28 ± 0.5). سمت چپ کروماتوگرام استاندارد و سمت راست کروماتوگرام عصاره فنلی یکی از نمونه‌های ریشه مویی را نشان می‌دهد.



شکل۸. محتوای کربوهیدراتهای محلول بافت در دودمانهای ریشه - مویی حاصل از آگروباکتریوم رایزوژنز سویه A4. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین میانگینها می‌باشد ($p\leq0.05$).

باتوجه به عدم قطعیت در تعداد کپی و مکان ورود T-DNA به ژنوم گیاه میزبان و همچنین برهمکنش آنها با ژنهای اطراف، ریشه‌های موئی ایجاد شده اغلب الگوهای متفاوتی از تجمع متابولیتهای ثانویه را نشان می‌دهند. در سال ۱۹۸۹ Mano و همکاران چهل و پنج دودمان ریشه‌ای به دست آمده از تلقیح گیاه *Duboisia leichhardtii* را بررسی و تفاوتهای قابل ملاحظه‌ای را از نظر میزان رشد و مقدار آلکالوئیدها در دودمانهای مختلف مشاهده کردند (۱۸). در سال ۱۹۹۴Hook از تلقیح آگروباکتریوم رایزوژنز سویه 9402 در گیاه *Leontopodium alpinum* Cass. پنج دودمان ریشه‌ای متفاوت را به دست آورد و آنها را از نظر میزان رشد و اسانسهای روغنی با هم مقایسه نمود. دودمانهای انتخاب شده از نظر فاکتورهای بررسی شده تفاوت معنی‌داری را با هم نشان دادند. او علت تفاوت بین مقادیر پایین متابولیتهای اندازه‌گیری شده در بعضی دودمانها نسبت به محتوای بالای این متابولیتها در سایر دودمانهای به دست آمده را ترانسفورماسیون ضعیف بیان کرد (۷). در این پژوهش نیز یازده دودمان ریشه مویی به دست آمد که از نظر سرعت رشد و مقادیر متابولیتهای مورد بررسی تفاوتهای معنی‌داری را با هم نشان دادند که ناشی از تصادفی بودن جایگیری T-DNA در ژنوم گیاه میزبان و همین طور تعداد کپی انتقال یافته و برهمکنش آنها با ژنهای اطراف آن است. انتقال ترکیب مناسبی از ژنهای *rol* از باکتری به گیاه برای تشکیل ریشه‌های موئی لازم است و انتقال تنها یکی از این ژنها نمی‌تواند همه ویژگیهای سندرم ریشه موئی را نشان دهد (۲۰). از مهم ترین دلایل اهمیت فلاونوئیدها و فنلهای اسیدی، عملکرد آنها در مکانیسمهای دفاعی می‌باشد. شرایط تنشی همچون اشعه UV، جراحت و آلودگی میکروبی سبب افزایش بیوسنتز ترکیبات فنلی می‌شود. بنابراین فاکتورهای محیطی تاثیر به سزایی در محتوای فلاونوئیدها و فنلهای اسیدی دارند. مشاهده شده که تجمع فلاوانولهایی همچون

کامپفرول و مشتقات گلیکوزیدی آن با جراحتی در روزنه افزایش می‌یابد. این فلاونوئیدها کمک به سزایی در جلوگیری از عفونتهای میکروبی می‌کنند. در بین ترکیبات فنلی هیدروکسی کومارینها، هیدروکسی سینامیک اسید و فلاونولها بیشترین نقش دفاعی را در جراحتها دارند. همچنین بیان آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) نیز در اثر زخم و جراحت افزایش یافته و منجر به سنتز محصولات فنلی بیشتری می‌شود. از آنجا که استفاده از آگروباکتریوم به منظور تلقیح و ایجاد ریشه موئی خود می‌تواند به عنوان نوعی عامل پاتوژن برای گیاه عمل کند، به نظر می‌رسد که گیاه با به کارگیری سیستم دفاعی خود اقدام به مقابله با باکتری می‌کند و در پی آن مقادیر فنل و فلاونوئید تولید شده بالا می‌رود (۳ و ۲۴). با توجه به دانستن اینکه شش اپرون در سمت چپ ناحیه T-DNA وجود دارد (ژنهای *Vir*) که عملکرد آنها برای انتقال ژنوم باکتری به ژنوم گیاه الزامی است. نواحی *Vir*A و *Vir* G با هم پروتئینی را رمزگذاری می‌کنند که رونویسی از سایر ژنهای *Vir* را فعال نموده و به دنبال آن انتقال ژن صورت می‌گیرد. عوامل فعال کننده ناحیه *Vir*A شامل pH اسیدی، ترکیبات فنلی مانند استوسیرینگون (Asetosringon) (۲۴) و گروههای مشخصی از منوساکاریدها می‌باشند. این مونوساکاریدها با ترکیبات فنلی به صورت سینرژیک (تشدید کننده) عمل می‌کنند (۳). بنابراین احتمال می‌رود ازدیاد تولید ترکیبات فنلی توسط گیاه که به منظور دفاع در مقابل عامل پاتوژن صورت می‌گیرد خود به عنوان عاملی برای تلقیح بهتر عمل کند و از آنجا که ریشه موئی ایجاد شده دارای پایداری ژنتیکی است تولید مداوم ترکیبات فنلی را در بر خواهد داشت. در این مطالعه مشاهده شد که دودمانهای مختلف ریشه موئی مقادیر متفاوتی از فنل و فلاونوئید تولید نمودند که می‌تواند ناشی از تفاوت در مکان جایگیری T-DNA در ژنوم سلول تراریخت منشاء هر یک از دودمانها باشد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ توسط Heimler و همکاران انجام شد مقادیر تعدادی از فنلها و فلاونوئیدهای موجود در عصاره فنلی گیاه کاسنی بررسی شد و آنها طبق نتایج به دست آمده، شیکوریک اسید را به عنوان فنل شاخص کاسنی معرفی کردند (۶). بررسیهای Lee در سال ۲۰۱۰ نشان داد که در دو تیره Asteraceae و Lamiaceae، شیکوریک‌اسید از عمده‌ترین مشتقات کافئیک اسید می‌باشد (۹). در مطالعه انجام شده توسط Lee و همکاران مقدار فنل کل و شیکوریک اسید در برگ و ساقه دو واریته ریحان (*Ocimum basilicum*) شامل Sweet basil و Thai basil سنجیده شد. مقدار فنل کل در Sweet basil ۵/۲۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ و ۲/۴۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر ساقه و در Thai basil ۶/۰۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ و ۲/۳۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر ساقه بود. محتوای شیکوریک اسید نیز در Sweet basil و Thai basil به ترتیب ۰/۵۱۸ و ۰/۸۸۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ و ۰/۰۰۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر ساقه در نمونه Thai basil بود. ساقه sweet basil فاقد شیکوریک اسید بود (۱۰). طبق نتایج حاصل از پژوهش حاضر، مقدار فنل کل در دودمانهای مختلف بین ۱/۲۴۱ تا ۳/۶۰۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر (۲۰/۵۴ و ۵۰/۸۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و محتوای شیکوریک اسید بین۰/۰۵۴ تا ۳/۱۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر (۰/۷۰۵ و ۴۱/۵۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) متغیر بود. نسبت شیکوریک اسید به فنل کل در مطالعه‌ی Lee و همکاران در برگ Sweet basil و Thai basil به ترتیب ۰/۰۱ و ۰/۱۵ و در ساقه صفر و ۰/۰۰۱ می‌باشد و در مقایسه با مقدار به دست آمده در این پژوهش که بیشترین وکمترین مقدار آن به ترتیب ۱/۷۱ و ۰/۰۱۵ می‌باشد، کمتر است. به عبارت دیگر دودمانهای ریشه مویی کاسنی در این پژوهش، حاوی مقادیر زیادتری از شیکوریک اسید نسبت به کل فنل تولید شده در ریشه‌های موئی این گیاه در مقایسه با همین تناسب در *Ocimu basilicum* می باشند (۱۰).

شیکوریک اسید در واقع نوعی هیدروکسی سینامیک اسید و از مشتقات آن محسوب می شود، از آنجا که سنتز این

نوع فنل در پاسخ به آلودگیها و جراحتها بیش از سایر فنلها صورت می‌گیرد، در پاسخ به پاتوژن آگروباکتریوم رایزوژنز و جراحت ایجاد شده در روش تلقیح، وجود مقادیر قابل توجهی از شیکوریک اسید قابل انتظار است. فلاونوئیدها (به خصوص فلاونولها) نیز نقش به سزایی در پاسخ به جراحات میکروبی دارند. آلودگی با آگروباکتریوم به روشی که در این پژوهش انجام شد شاخص یک جراحت میکروبی است و بنابراین تمایل بیشتر مسیر بیوسنتزی به سمت تولید بیشتر فلاوونوئیدها نسبت به فنلها می‌تواند ناشی از نوع پاسخ دفاعی به این نوع جراحات باشد.

اینولین از دسته کربوهیدراتهای محلولی است که به فراوانی در ریشه گیاه کاسنی دیده می‌شود. از این‌رو سنجش کل کربوهیدراتهای محلول در آب می‌تواند به عنوان نماینده‌ای از مقدار اینولین در بافت باشد. به همین منظور دودمانهای ریشه مویی به دست آمده در این پژوهش از نظر مقدار کربوهیدراتهای محلول مورد مقایسه قرار گرفتند. در تحقیقی که در سال ۲۰۰۷ توسط Kumari و همکاران انجام شد مقدار اینولین در بافتهای مختلف (ریشه و برگ در شرایط *in vitro* و *in vivo* و کالوس) گیاه کاسنی اندازه‌گیری شد. بیشترین مقدار تقریباً برابر با ۱۰۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در ریشه در شرایط *in vitro* گزارش شد (۱۶). دراین تحقیق دودمانهای مختلفی به‌دست آمد که مقادیر بالایی از کربوهیدرات را نسبت به گزارشهای آمده در منابع داشتند. احتمالاً نوع ترانسفورماسیون این ریشه‌ها به گونه‌ای بوده که باعث بیان بالا و افزایش عملکرد آنزیمهای دخیل در متابولیسم کربوهیدراتها و در نهایت افزایش تولید آنها شده است. از آنجا که دودمانهای به دست آمده ریشه موئی دارای ثبات ژنتیکی می‌باشند با کنترل و ثابت نگه داشتن عوامل محیطی دیگر و واکشت مداوم ریشه‌ها در دراز مدت و یا با انتقال ریشه‌ها به بیوراکتور می‌توان تولید کربوهیدرات و سایر متابولیتها را در حد تولید تجاری آنها گسترش داد.

منابع

۱. شبانی لیلا، احسانپور علی‌اکبر (۱۳۸۸) القاء آنزیمهای آنتی اکسیدان، ترکیبات فنولیک و فلاونوئید در کشت در شیشه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) با استفاده از متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید، مجله زیست‌شناسی ایران، جلد۲۲، شماره۴، ص: ۶۹۱-۷۰۳

۲. نصیبی فاطمه، منوچهری کلانتری خسرو، یعقوبی محمد مهدی (۱۳۹۰) مقایسه اثر پیش تیمار سدیم نیترو پروساید و آرژینین بر برخی پاسخهای فیزیولوژیکی گیاه تحت تنش کم‌آبی (*Lycopersicun esculentum*)گوجه فرنگی، مجله زیست شناسی ایران، جلد۲۴، شماره۶، ص: ۸۳۳-۸۴۷

3. Ankenbauer, R. G. and Nester, E. W. (1990) Sugar-mediated induction of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes: structural specificityand activities of monosaccharides. Journal of bacteriology 172: 6442-6446.

4. Conforti, F., Sosa, S, Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G. A., Uzunov, D., Tubaro, A and Menichini, F. (2009) The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: The role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. Food Chemistry 112:587–594.

5. Degl'innoocenti, E., Pardossi, A., Tattini, M and Guidi L. (2008) Phenolic compounds and antioxidant power in minimally processed salad. Journal of Food Biochemistry 32:642–653.

6. Heimler, D., Isolani, L., Vignolini P and Romani A. (2009) Polyphenol content and antiradical activity of *Cichorium intybus* L. from biodynamic and conventional farming. Food Chemistry 114: 765–770.

7. Hook, I. (1994). Secondary metabolites in hairy root cultures of *Leontopodium alpinum Cass.*(Edelweiss). Plant cell, tissue and organ culture 38: 321-326.

8. Hu, Z. B. and Du, M. (2006) Hairy root and its application in plant genetic engineering. Journal of Integrative Plant Biology 48: 121-127.

9. Lee, J. (2010) Caffeic acid derivatives in dried *Lamiaceae* and *Echinacea purpurea* products. Journal of Functional Foods 2: 158-162.

10. Lee, J. and C. F. Scagel. (2009) Chicoric acid found in basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves, Food Chemistry 115: 650-656.

11. Lee, J. and C. F. Scagel. (2010) Chicoric acid levels in commercial basil (*Ocimum basilicum*) and Echinacea purpurea products, Journal of functional foods 2: 77-84.

12. Lee, S. U., Shin C. G., Lee, C. K and Lee, Y. S. (2007) Caffeoylglycolic and caffeoylamino acid derivatives, halfmers of L-chicoric acid, as new HIV-1 integrase inhibitor, European journal of medicinal chemistry 42: 1309-1315.

13. Llorach, R., Martínez-Sánchez, A., Tomas-Barberan, F., Gil, M and Ferreres F. (2008) Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole, Food Chemistry 108: 1028-1038.

14. Khan, S., Qureshi, M. I., Kamaluddin., Alam, T and Abdin, M. Z. (2007) Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD andrestriction digestion. Afr. J. Biotechnol 6: 175-178.

15. Kim, J. S., Lee, S.Y. and Park, S.U. (2009) An efficient protocol for Peanut (*Arachis hypogaea* L.) transformation mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. Romanian Biotechnological Letters 14: 4641-464.

16. Kumari, B. D. R., Velayutham, P and Anitha, S. (2007) A comparitive study on inulin and esculin content of *in vitro* and *in vivo* Plants of Chicory (*Cichorium intybus* L. Cv. Lucknow Local). Advances in Biological Research 1: 22-25.

17. Malarz, J., Stojakowska, A. and Kisiel, W. (2002) Sesquiterpene lactones in a hairy root culture of *Cichorium intybus*.Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung, Tubingen 57c, 994-997.

18. Mano, Y., Ohkawa, H. Yamada, Y. (1989) Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Duboisia leichhardtii* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Science 59: 191-201.

19. Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S., Lee, Y. C. (2005) Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. Analytical biochemistry, Volume 339(1):69-72.

20. Park, K., de Oliveira, R., and Brod, F. (2007) Drying Operational Parameters Influence on Chicory Roots Drying and Inulin Extraction. Food and Bioproducts Processing 85: 184-192.

21. Schmülling, T., Schell, J and Spena ,A. (1988) Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. The EMBO journal 7: 2621-2629.

22. Velayutham, P., Ranjithakumari, B. D. and Baskaran, P. (2006) An efficient *in vitro* plant regeneration system for *Cichorium intybus* L., an important medicinal plant. Journal of Agricultural Technology 2: 287-298.

23. Wang, B., Zhang, G., Zhu, L., Chen, L., Zhang, Y. (2006) Genetic transformation of *Echinacea purpurea* with *Agrobacterium rhizogenes* and bioactive ingredient analysis in transformed cultures, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 53: 101-104.

24. Winans, S. C. (1992) Two-way chemical signaling in Agrobacterium-plant interactions. Microbiology and Molecular Biology Reviews 56: 12-31.

Comparative study of growth and secondary metabolite production ability in transformed hairy roots from *Cichorium intybus*

Azarmehr B., Karimi F., Taghizade M. and Mousavi Gargari S.L.
Biology Dept., Faculty of Sciences, Shahed University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Cichory (*Cichorium intybus*) roots contain medicinally important compounds such as phenols (mainly cichoric acid), Flavonoids and inulin. Here, we obtained and established 11 different hairy root lines of chichory by inoculation of plant sterile leaf explants with the soil bacterium *Agrobacterium rhizogenes*, A4 strain. Phenolic compounds, total flavonoids and carbohydrates were determined by spectrophotometer, and chicoric acid was determined by HPLC. The highest growth rates were observed in A, H, J and I root lines. Total phenol and flavonoid contents had no significant difference between the obtained root lines but cichoric acid in J and then in F lines were more than the other lines. The highest levels of carbohydrates were observed in D, G, J and I root lines. According to the results, The J root line was the best one for growth rate, cichoric acid and carbohydrate production.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, *Cichorium intybus*, hairy root culture, secondary metabolite