مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال سوم، شماره چهارم، بهار و تابستان ۱۳۹۲ (۷۶-۶۹)

Crop Biotech.
Spring & Summer (2013) 4: 69-76

تأثیر سویه‌های مختلف *اگروباکتریوم رایزوژنز* بر میزان بیوسنتز ترکیبات فنولی و کلروژنیک‌اسید در ریشه‌های موئین گیاه کاسنی

سارا کبیرنتاج[۱]، الناز قطبی راوندی[۲]*، فرخنده رضانژاد[۳] و بهزاد شاهین کلیبر[۴]

۱، کارشناس‌ارشد بیوتکنولوژی‌کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲، کارشناس‌ارشد زیست‌شناسی سلولی تکوینی گیاهی، بخش زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۳، دانشیار بخش زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۴، کارشناس‌ارشد بیوتکنولوژی‌کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۸ـ تاریخ تصویب: ۹۲/۶/۴)

The Effect of Different Strains of *Agrobacterium rhizogenes* on Production of Chlorogenic Acid and Phenolic Compounds in Hairy Root Cultures of *Cichorium intybus* L.

S. KABIRNATAJ[1], E. GHOTBI RAVANDI[2]*, F. REZANEZHAD[3] AND B. SHAHIN KALEYBAR[4]

1, M.Sc. of Agricultural Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran; 2, M.Sc. of Plant Cellular Developmental Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran; 3, Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran; 4, M.Sc. of Agricultural Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

(Received: January 28, 2013 - Accepted: August 26, 2013)

چکیده

استفاده از *Agrobacterium rhizogenes* جهت ایجاد کشت ریشه‌های موئین، روشی مناسب برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه به خصوص ترکیبات دارویی به‌روش *in vitro* در گونه‌های گیاهی مختلف می‌باشد. سیستم‌های ریشه‌موئین دارای رشد بسیار سریع بوده و به‌دلیل داشتن انشعابات و تارهای کشنده فراوان و همچنین میزان بیشتر سنتز متابولیت‌ها در هر واحد بیوماس (زیست‌توده)، دارای ظرفیت بیوسنتزی مشابه و یا بیشتر از ریشه‌های طبیعی برای متابولیت‌های ثانویه هستند. در این تحقیق ریشه‌های موئین در ریزنمونه‌های لپه‌ای به‌دست‌آمده از گیاهچه‌های ۸ روزه درون شیشه‌ای کاسنی توسط سویه‌های A4، A13 و 15834 به‌روش سوسپانسیونی القاء شد. میزان ترکیبات فنولی کل و کلروژنیک‌اسید در کلون‌های ریشه موئین رشد یافته و ریشه‌های غیرتراریخته (شاهد) اندازه‌گیری شد. نتایج حاکی از عدم تولید کلروژنیک‌اسید در تمامی کلون‌های بررسی شده، افزایش معنی‌دار میزان ترکیبات فنولی کل در کلون‌های القاءشده توسط سویه‌های A4 و A13 و کاهش این ترکیبات در اثر القاء توسط سویه 15834 می‌باشد. نتایج این مطالعه تأییدکننده تأثیر چشمگیر سویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنز در تولید ترکیبات فنولی می‌باشد، به نحوی‌که با انتخاب سویه مناسب می‌توان تولید این ترکیبات را در کشت‌های ریشه موئین افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: اگروباکتریوم رایزوژنز، ترکیبات فنولی کل، کشت‌های ریشه موئین، کلروژنیک‌اسید

Abstract

Using *Agrobacterium rhizogenes* to induce hairy root cultures is a useful method to increase the production of secondary metabolites especially medicinal compounds in vitro in various plant species. Hairy root cultures are fast growing and highly branching and due to the higher amount of metabolites synthesized per unit of biomass, possess the same or greater biosynthetic potential for secondary metabolite production compared to the normal roots. In this research the amounts of total phenolics and chlorogenic acid were determined in hairy root clones induced in cotyledonary leaves of *Cichorium intybus* by A4, A13 and 15834 strains of *A. rhizogenes*, as well as in the control (untransformed) roots. The results obtained indicated that the absence of chlorogenic acid in all the studied clones led to a significant increase in total phenolics in hairy root clones induced by A4 and A13 but a significant decrease in the 15834-induced hairy root. This study revealed the role of bacterial strains in biosynthesis of phenolic compounds, and therefore, selection and application of the best strain of *A. rhizogenes* could be regarded as an important strategy for increasing phenolic compounds production in hairy root cultures of *C. intybus*.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, Chlorogenic acid, Hairy root cultures, Total phenolics.

نویسنده مسئول: الناز قطبی راوندی

E-mail: elnaz.ghotbi@gmail.com

مقدمه

کاسنی با نام علمی *Cichorium intubys* L. یکی از مهمترین گیاهان خانواده Asteraceae می‌باشد که به علت دارابودن ترکیبات دارویی فراوان در ریشه و برگ، در طب سنتی و مدرن و همچنین به‌دلیل ارزش علوفه‌ای آن در زراعت کاربرد زیادی دارد (Bais *et al.*, 2001). کاسنی علوفه‌ای، گیاه بسیار با ارزشی محسوب می‌شود زیرا این گیاه به شرایط نامساعد طبیعی مانند خشکی (Kemp *et al.*, 2002)، حاصلخیزی پایین خاک و بیماری‌ها و آفات (به‌دلیل وجود کافئیک‌اسید و آلکالوئیدها در برگ‌ها) بسیار مقاوم است (Ge. 2006) همچنین این گیاه به‌دلیل عملکرد بالا و پایابودن آن برای مصرف دام‌ها و ماکیان مورد استفاده قرار می‌گیرد.

توانایی *A. rhizogenes* در القاء ریشه‌های موئین در گستره‌ای از گیاهان میزبان، سیستم مناسبی را جهت مطالعه تولید متابولیت‌های ثانویه فراهم آورده است. سهولت به‌دست آوردن ریشه‌های موئین و قابلیت سنتز مداوم ترکیبات شیمیایی مختلف، سبب برتری آن‌ها به‌عنوان منبع تولید متابولیت‌های ثانویه گردیده است. به‌طور معمول ریشه‌های موئین قادر به تولید همان ترکیبات شناخته‌شده در ریشه‌های گیاه والد بدون کمترین کاهشی نسبت به غلظت مشاهده‌شده در کشت‌های سوسپانسیون سلولی یا کالوس می‌باشند (Vivanco *et al.*, 2002). این حقیقت که تولید متابولیت‌های ثانویه معمولاً در بافت‌های تمایزیافته زیادتر بوده و از لحاظ ژنتیکی نیز از ثبات بیشتری برخوردار می‌باشد، ریشه‌های موئین را به تکنیکی جایگزین برای استفاده از کشت‌های سوسپانسیون سلولی جهت تولید متابولیت‌های ثانویه تبدیل کرده است. پتانسیل ریشه‌های موئین در مطالعه ترکیبات زیست‌فعال گیاهی توسط گروه‌های تحقیقاتی متعددی تأیید گردیده است. کشت‌های ریشه‌موئین قابلیت تولید آلکالوئیدهای تروپانی، نیکوتین، ترپنوئیدها، پلی‌استیلن‌ها، تیوفن‌ها ، شیکونین‌ها و غیره را نیز نشان داده‌اند (Vivanco *et al.*, 2002).

ترکیبات فنولی در برگیرنده دامنه گسترده‌ای از موادی هستند که دارای حلقه‌ی آروماتیکی حامل یک استخلاف هیدروکسیلی بوده و درحالی‌که تعداد زیادی از چنین ترکیباتی در جانوران موجودند، اغلب آن‌ها دارای منشاء گیاهی هستند (Brielmann *et al.*, 1999). تمامی پلی‌فنول‌های گیاهی توسط فنیل‌آلانین، آنزیم شیکیمات و از طریق مسیر شیکیمیک‌اسید تولید می‌گردند (Brielmann *et al.*, 1999). گزارش شده که ترکیبات فنولی بسیار سودمند بوده و به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌ها و حفاظت در مقابل بیماری‌های قلبی ـ عروقی و برخی سرطان‌ها عمل می‌کنند (Crozier *et al.*, 2006). همچنین این ترکیبات ممانعت‌کننده تجزیه ناشی از پیری اجزای سلولی بوده و قادر به مهار رادیکال‌های آزاد مخرب می‌باشند (Crozier *et al.*, 2006).

فنول‌های غیرفلاونوئیدی که ارزش تغذیه‌ای دارند را می‌توان در سه دسته اسیدهای فنولیک، ترانس‌سینامیک اسیدها و استیلبن‌ها قرار داد. کافئیک، فرولیک و اسیدهای کوماریک از جمله ترانس سینامیک‌اسیدها هستند. کانجوگه‌های کوینیک‌اسید و کافئیک‌اسید مانند ۳-۴ و ۵-O کافئویل کوینیک‌اسید در سبزیجات و میوه‌ها یافت می‌شوند. به ترکیب ۵-O-کافئویل کوینیک‌اسید، کلروژنیک‌اسید (CGA) گفته می‌شود (Crozier *et al.*, 2006). این ترکیب بسیار ارزشمند، دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدموتاژنی، ضدباکتریایی، ضدویروسی، ضدروماتیسمی و اثرات تسکین‌دهند درد، تب‌بری، تنظیم‌کنندگی فشارخون، ضدعفونی‌کنندگی دستگاه گوارشی و کاهش‌دهنده تشنج است (Mares *et al.*, 2005; David *et al.*, 2006). همچنین تأثیر این ماده در کنترل و درمان آلرژی، تورم، آسم، ایدز، یرقان، ورم مفاصل، اسهال، سرطان سینه، هپاتیت B و دیابت نوع دوم به اثبات رسیده است (Kim and Yang. 2001; Lepelley *et al.*, 2007; Marques and Farah, 2009; Wang *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2005). کلروژنیک‌اسید علاوه بر پزشکی دارای کاربردهای گسترده‌ای در صنایع نیز می‌باشد. با وجود فواید متعدد این ماده، اثرات جانبی و سمیت کمی نیز توسط Farah and Donangelo (2006) گزارش شده است.

منابع تجاری رایج کلروژنیک‌اسید شامل عصاره گیاهان *Lonicera japonica*، *Eucommia ulmoides*، *Nicotiana tabacum* و *Cichorium intybus* است که این منابع محدود و گران‌قیمت هستند (Chen *et al.*, 2001). به‌علت تولید تجاری محدود و ارزش دارویی این ماده، استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی به‌منظور افزایش میزان کلروژنیک‌اسید در محصولات غذایی و گیاهان تشویق شده است (Niggeweg *et al.*, 2004). با توجه به ارزش دارویی و تغذیه‌ای بالای ترکیبات فنولی و به‌خصوص کلروژنیک‌اسید و از طرفی اهمیت استفاده از کشت‌های ریشه موئین جهت تولید متابولیت‌های ثانویه و تأثیر چشمگیر سویه‌های القاءگر این کشت‌ها بر کمیت و کیفیت تولید ترکیبات ثانویه، در این مطالعه توانایی تولید ترکیبات فنولی

به‌ویژه کلروژنیک‌اسید در کشت‌های ریشه‌موئین به‌دست‌آمده از سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز در گیاه دارویی کاسنی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذر کاسنی (*Cichorium intybus* L.) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. بذرهای کاسنی پس از استریل‌شدن با الکل ۷۰٪ به‌مدت یک دقیقه و وایتکس ۵٪ به‌مدت ۳۰ دقیقه و سه بار شستشو با آب‌مقطر استریل، روی محیط کشت MS (Murashige and Skoog. 1962) جامد قرار گرفتند.

القاء ریشه‌های‌موئین

در این تحقیق جهت هم‌کشتی از سویه‌های A4، A13 و 15834 اگروباکتریوم رایزوژنز استفاده شد. به‌منظور تهیه سوسپانسیون تلقیح، سویه‌های باکتری به‌صورت جداگانه در ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپسین (به استثنای سویه A13، به‌دلیل حساسیت این سویه به آنتی‌بیوتیک) در دمای ۲۷°C بر روی شیکر ۱۸۰rpm به‌مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سوسپانسیون باکتری با OD برابر با ۰/۵ در دمای ۴°C و ۴۵۰۰ دور در دقیقه رسوب داده شد و رسوب باکتری در ۲۰ میلی‌لیتر محیط MS مایع نیم‌غلظت با pH حدود ۵/۷ حاوی ۱۰۰ میکرومولار استوسیرینگون به آرامی حل شده و از این سوسپانسیون به‌منظور تلقیح استفاده شد. ریزنمونه‌های لپه‌ای به‌دست‌آمده از گیاهچه‌های ۸ روزه درون‌شیشه‌ای کاسنی در سوسپانسیون تلقیح به‌مدت ۲ دقیقه غوطه‌ور شده و پس از خشک‌شدن روی کاغذ صافی استریل روی محیط کشت گیاهی MS حاوی ۳ درصد ساکارز و ۰/۸٪ آگار و pH ۵/۷ کشت گردیدند. پتری‌دیش‌های حاوی ریزنمونه‌های گیاهی در تاریکی، به‌مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۲۵±۲ °C انکوبه شدند.

باکتری‌زدایی از ریزنمونه‌ها

پس از گذشت ۴۸ ساعت از زمان تلقیح، زمانی که باکتری‌ها به اندازه کافی رشد نمودند، باکتری‌زدایی از کشت‌ها توسط غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم انجام شد.

تثبیت کشت‌های ریشه‌موئین

به‌منظور تثبیت کشت‌های ریشه موئین، ریشه‌های در حال رشد هنگامی که به طول حدود ۱۰-۵ سانتی‌متر رسیدند، از ریزنمونه‌ها جدا گشته و به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS مایع حاوی ۳٪ ساکارز با pH حدود ۵/۷ منتقل شده و در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد روی شیکر چرخشی با سرعت ۹۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. پس از گذشت یک ماه ریشه‌ها از محیط کشت خارج شده و پس از شستشو با آب‌مقطر در آون در دمای ۴۰°C تا رسیدن به وزن ثابت نگهداری شدند. کلون‌های خشک‌شده برای اندازه‌گیری ترکیبات فنولی مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج DNA ژنومی از ریشه‌های شاهد و موئین کاسنی

DNA ژنومی از ریشه‌های معمولی و موئین کاسنی با استفاده از کیت استخراج DNA [1] بر طبق روش ذکرشده در کیت استخراج شد. استخراج DNA ژنومی از طریق انجام الکتروفورز افقی بر روی ژل آگارز ۱٪ تأیید گردید و خلوص آن به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین گردید.

آزمون PCR

برای تأیید ماهیت تراریختگی ریشه‌های موئین آزمون PCR با کمک آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*B و به روش ارائه‌شده توسط Dehghan *et al.*, (2012) انجام گرفت. توالی پرایمرهای رفت و برگشت مورد استفاده برای تکثیر قطعه‌ای از ژن *rol*B به‌صورت زیر بود:

آغازگر رفت

5'GCTCTTGCAGTGCTAGATTT 3'

آغازگر برگشت

5' GAAGGTGCAAGCTACCTCTC 3'

تکثیر این قطعه با استفاده از واکنش PCR با حجم نهایی ۲۰ µl برای هر مخلوط واکنش انجام شد. مواد لازم برای انجام واکنش طبق جدول ۱ با یکدیگر مخلوط شده و در نهایت ۲ میکرولیتر DNA ژنومی استخراج‌شده از کلون‌های ریشه‌موئین به هر مخلوط واکنش افزوده شد. برای نمونه شاهد منفی، DNA ریشه‌های غیرتراریخته (معمولی) گیاه و برای نمونه شاهد مثبت، یک کلنی از کشت جامد و تازه *A. rhizogenes* به‌عنوان DNA ژنومی به مخلوط اضافه گشت. سپس برنامه PCR ذکرشده در جدول ۲ اجرا شد. برای مشاهده باند حاصل از تکثیر DNA به‌وسیله PCR از روش الکتروفورز افقی استفاده شد.

1. Qiagene, DNeasy Plant Mini Kit, Germany

جدول ۱- اجزاء مخلوط واکنش PCR در حجم 20 µl

زمان	حرارت (°C)	مرحله	تعداد چرخه
۱ دقیقه	۹۵	Initial Denaturation	۱
۳۰ ثانیه	۹۴	Denaturation	۳۰
۴۵ ثانیه	۵۵	Annealing	
۴۵ ثانیه	۷۲	Extension	
۷ دقیقه	۷۲	Final Extension	۱

جدول ۲- برنامه چرخه‌ای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

مواد مورد نیاز	مقدار مصرف در هر واکنش (µl)
بافر PCR (10x)	2
دزوکسی نوکلئوتیدتری فسفات (mM10 از هریک)	0.4
کلرید منیزیوم (mM50)	0.9
آغازگر1و2 (10 pmol/µl از هر یک)	1+1
DNA پلیمراز تک (5 u/µl)	0.2
DNA ژنومی	50-100 نانوگرم
آب مقطر دیونیزه استریل	به حجم 20 رسانده شود

استخراج و اندازه‌گیری ترکیبات فنولی کل

اندازه‌گیری محتوای ترکیبات فنولی کل کلون‌های ریشه‌موئین و ریشه‌های شاهد (غیرتراریخته) با استفاده از روش فولین- سیاکالتیو[1] انجام شد (Sonald and Laima. 2001). ۰/۰۱ گرم از بافت‌های خشک و پودرشده نمونه‌های موردنظر را وزن کرده، مقادیر وزن‌شده را در ۱ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد سائیده و مخلوط حاصل به‌مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شد. پس از سانتریفیوژ در ۶۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول‌رویی برداشته و به آن ۰/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه و حجم محلول با آب‌مقطر به ۲/۵ میلی‌لیتر رسانده شد. به محلول حاصل ۰/۲۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۵۰ درصد و ۰/۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵ درصد اضافه و پس از یک ساعت نگهداری در تاریکی شدت جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد. به‌منظور محاسبه غلظت ترکیبات فنولی، از منحنی استاندارد گالیک‌اسید استفاده شد. در این مقایسه از ریشه‌های گیاهچه‌های ۸ روزه به‌عنوان نمونه شاهد استفاده شد. اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولی کل با ۳ تکرار انجام گرفت.

استخراج و اندازه‌گیری کلروژنیک‌اسید با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

از روش Li *et al.*, (2005) با اندکی تغییر، جهت استخراج کلروژنیک‌اسید استفاده شد. ۰/۱ گرم از بافت‌خشک و پودرشده ریشه گیاهان ۸ روزه (شاهد) و کلون‌های ریشه موئین را وزن کرده و در ۵ میلی‌لیتر اتانول خالص می‌سائیم. مخلوط حاصل به‌مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شد. پس از ۲۴ ساعت مخلوط به‌دست‌آمده، به‌مدت یک ساعت تحت تیمار امواج فراصوت[2] قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ در ۱۴۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۳۰ دقیقه و فیلترکردن محلول رویی توسط ستون C18، مقادیر مساوی از عصاره‌های به‌دست‌آمده را پس از انتقال به لوله‌های جدید، در انکوباتور قرار می‌دهیم تا اتانول آن تبخیر شود. عصاره باقیمانده در ۲۰۰ میکرولیتر اتانول حل و آماده تزریق به دستگاه شد. اندازه‌گیری میزان CGA در نمونه‌های ذکرشده با ۳ تکرار انجام گرفت. اندازه‌گیری کلروژنیک‌اسید توسط دستگاه HPLC ساخت شرکت Merck Hitachi با آشکارساز UV- visible انجام شد. ستون مورداستفاده برای جداسازی CGA ستون C18 (RP18) بود. فاز متحرک آب – اتیل استات – استیک‌اسید با نسبت (۹۵/۶ : ۴/۱ : ۰/۳) با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و طول‌موج ۲۸۰ نانومتر برای آنالیز نمونه‌های استاندارد و گیاهی مورد استفاده قرار گرفت (Shahrzad and Bitsch. 1996) حجم تزریق ۲۵ میکرولیتر بود.

آنالیز آماری

این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار برای اندازه‌گیری ترکیبات فنولی کل و کلروژنیک‌اسید انجام شد. کلیه داده‌ها با نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند. جهت این امر از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن استفاده شد. نمودارها با ذکر خطای استاندارد و گروه‌بندی آزمون دانکن با استفاده از نرم‌افزار Excel 2010 رسم شدند.

نتایج و بحث

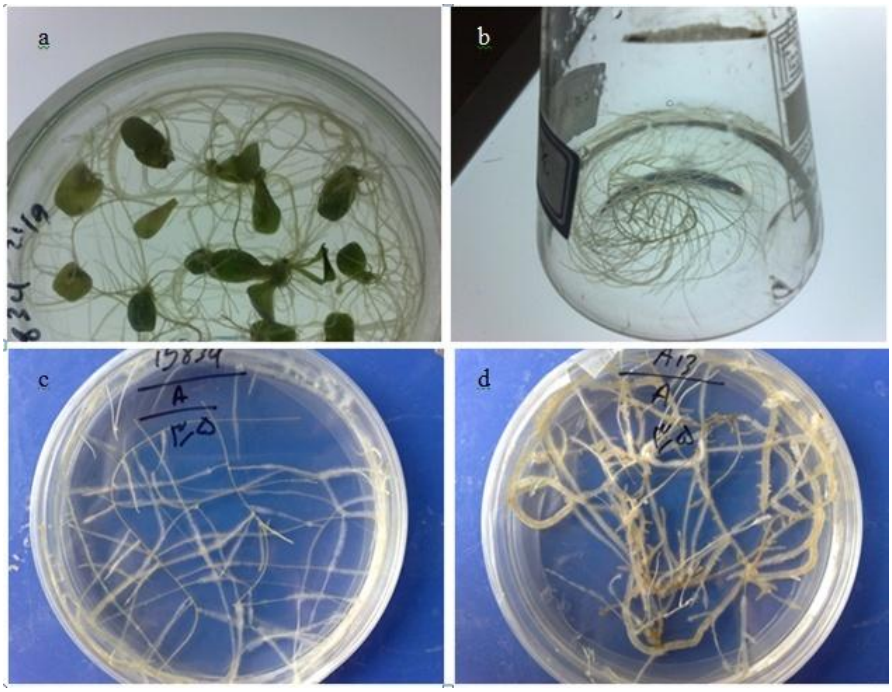
القای ریشه‌های‌موئین در برگ‌های لپه‌ای گیاهچه‌های درون شیشه ۸ روزه کاسنی

اولین ریشه‌های موئین پس از گذشت ۸ روز از زمان تلقیح از محل رگبرگ میانی ریزنمونه‌های لپه‌ای تلقیح‌شده خارج شدند و این روند تا حدود چهار هفته پس از تلقیح ادامه یافت

1. Folin-Ciocalteau

2. Ultrasound treatment

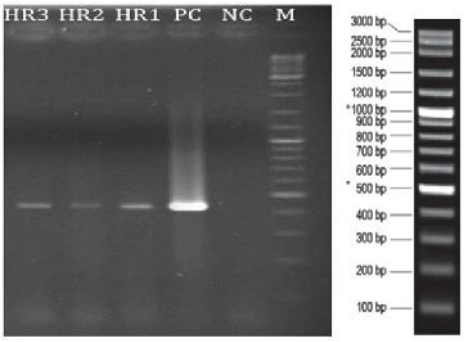
(شکل ۱). در بررسی‌های انجام شده تفاوت رشد قابل ملاحظه‌ای در بین کلون‌های حاصل از نژادهای مختلف باکتری و نیز کلون‌های حاصل از تلقیح یک نژاد ملاحظه شد. دلیل این تنوع سوماکلونال قابل ملاحظه هنوز مشخص نگردیده است و فقط دلایلی همچون حضور دزهای مختلفی از T-DNA باکتری در سلول‌های تراریخته اولیه هر کلون و یا بیان متفاوت ژن‌های T-DNA باکتری در سلول‌های کلون‌های مختلف، توسط محققین بیان گردیده است، همچنین محققین دریافته‌اند که با توجه به محل ورود T-DNA به ژنوم سلول گیاهی، الگوهای متفاوتی در تجمع متابولیت‌های ثانویه مشاهده می‌شود Mano *et al*., (1989)، ۴۵ کلون از ریشه‌های موئین گیاه *Duboisia leichhardtii* F. را بررسی کردند و دریافتند که تنوع قابل ملاحظه‌ای در سرعت رشد، تجمع متابولیت‌های ثانویه و بازدهی کلون‌ها وجود دارد.



شکل ۱- ریشه‌های موئین القاءشده در ریزنمونه‌های لپه‌ای توسط سویه (a) 15834. یک کلون ریشه‌موئین تثبیت‌شده در محیط مایع MS (b). ریشه‌های موئین حاصل از سویه‌های مختلف با فنوتیپ متفاوت (c) و (d).

بررسی ماهیت تراریختگی ریشه‌های موئین

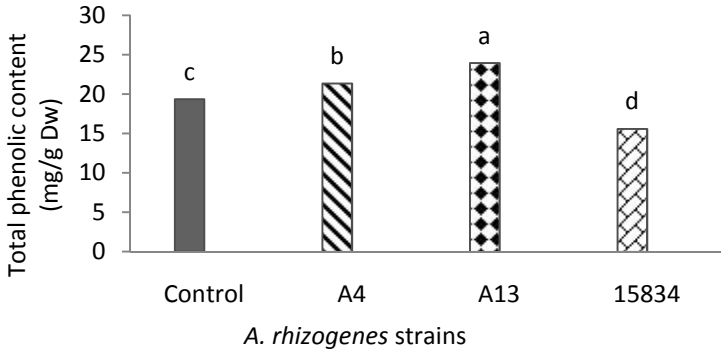
بررسی ماهیت تراریختگی ریشه‌های‌موئین را می‌توان با ردیابی ژن‌های موجود بر روی T-DNA این باکتری که مهمترین آن‌ها ژن‌های *rolA*، *rolB* و *rolC* هستند انجام داد. همان‌گونه که انتظار می‌رفت، در این بررسی ریشه‌های موئین، در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با کمک آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*B، قطعاتی به طول ۴۳۰ bp تولید کردند که حضور آن‌ها روی ژل نشان‌دهنده وجود این توالی و در نتیجه انتقال توالی T-DNA به ژنوم سلول گیاهی می‌باشد، این قطعات در نمایه ژل الکتروفورزی ریشه‌های غیرتراریخته دیده نشدند که این امر حاکی از عدم‌حضور این ژن‌ها در گیاهان غیرتراریخته می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲- نمایه الکتروفورزی باند حاصل از واکنش PCR (قطعه ۴۳۰ جفت بازی) از ژن *rol*B، روی ژل آگارز یک درصد. M. سایز مارکر۱۰۰، NC. شاهد منفی (ریشه‌های طبیعی گیاه)، PC. شاهد مثبت (حاوی کلنی از کشت جامد اگروباکتریوم رایزوژنز)، HR1-HR3 کلون‌های ریشه‌موئین.

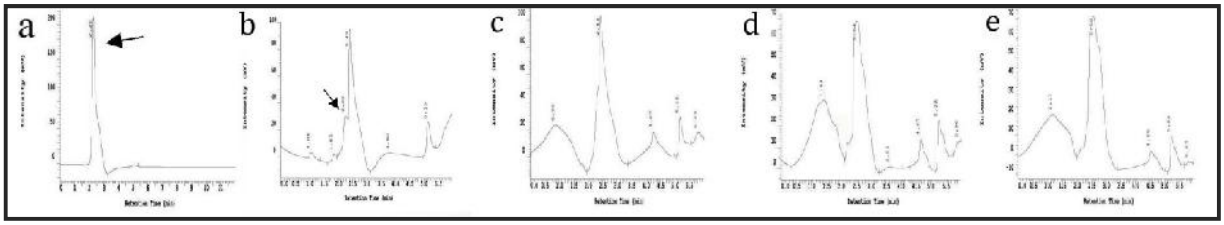
ترکیبات فنولی کل و کلروژنیک‌اسید

میزان ترکیبات فنولی کل در ریشه‌های موئین نسبت به نمونه شاهد براساس سویه باکتریایی استفاده‌شده جهت القاء ریشه‌های‌موئین، دچار تغییرات معنی‌داری شد (شکل۳).



شکل ۳- اثر تراریزش با اگروباکتریوم رایزوژنز بر میزان ترکیبات فنولی کل ریشه
(داده‌ها با ضریب اطمینان ۹۵٪ مورد مقایسه قرار گرفتند.)

بیشترین میزان فنول مربوط به کشت‌های به‌دست‌آمده از سویه A13 (۲۴ mg/g DW) بود، درحالی‌که کشت‌های حاصله از سویه 15834 کمترین مقدار (۱۵/۶ mg/g DW) فنول را، حتی پایین‌تر از نمونه‌های شاهد نشان دادند. میزان کلروژنیک‌اسید در ریشه‌های‌موئین کاهش معنی‌داری را نسبت به نمونه‌های شاهد نشان داد. میزان CGA در ریشه‌های شاهد ۰/۱۲ میلی‌گرم بر گرم ماده‌خشک بود و در ریشه‌های موئین اثری از این ترکیب دیده نشد (شکل ۴).



شکل ۴- اثر تراریزش با اگروباکتریوم رایزوژنز بر میزان کلروژنیک‌اسید ریشه. نمایه HPLC مربوط به نمونه استاندارد کلروژنیک‌اسید با غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر (a)، ریشه گیاه شاهد (b) و کلون‌های ریشه‌موئین القاءشده توسط سویه A13 (c)، A4 (d) و 15834 (e). پیک‌های نشان‌داده شده با پیکان مربوط به ترکیب کلروژنیک‌اسید می‌باشد.

کشت‌های ریشه‌موئین با توجه به رشد سریع در شرایط عاری از هورمون و توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه به اندازه و یا حتی بیشتر از ریشه‌های طبیعی، اهمیت ویژه‌ای در تولید درون‌شیشه متابولیت‌های ثانویه دارند. در این تحقیق افزایش تولید کلروژنیک و یا حداقل تولید برابر با ریشه‌های طبیعی کاسنی موردانتظار بود. با این وجود نه تنها افزایشی دیده نشد، بلکه نتایج به‌دست‌آمده حاکی از عدم‌وجود کلروژنیک‌اسید در ریشه‌های‌موئین بود. تاکنون مطالعات زیادی به‌منظور درک اثرات ژن‌های *rol* روی نمو گیاهی انجام گردیده، اما نتایج این مطالعات به‌علت اثرات چندگانه این ژن‌ها بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان ضد و نقیض بوده است (Bulgakov *et al.*, 2005). به دنبال متأثرنمودن مسیرهای سیگنالینگ توسط ژن‌های سرطان‌زای باکتریایی منتقل‌شده به سلول‌های گیاهی، تنظیمات مسیرهای متابولیسمی اولیه و ثانویه با تغییرات چشمگیری همراه می‌شود. این تغییرات قادر به رفع محدودیت‌های موجود در بعضی از مسیرهای بیوسنتزی ترکیبات ثانویه و در نتیجه تولید بیشتر فراورده‌های مربوطه بوده، که اکثر گزارشات نیز به طور غیرمستقیم مؤید این امر می‌باشند. بسته به گونه و ژنوتیپ گیاهان تراریخته، این تغییرات می‌تواند آن‌قدر قوی باشد که حتی مانند مورد گزارش‌شده در رابطه با *Panax ginseng* به تولید ترکیبات پلی‌استیلنی جدید در ریشه‌های موئین منتهی گردد (Kwon *et al.*, 1997) و یا مانند شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*) به تولید دو ترکیب فلاونوئیدی

جدید در ریشه‌های موئین منجر شود (Asada *et al.*, 1998). بدیهی است که تغییرات به اینجا ختم نخواهد شد و ممکن است تراریزش سبب بلوکه‌شدن و مهار تولید ترکیب یا ترکیبات خاص از طریق کاهش یا خاموشی بیان‌ژن یا ژن‌های مربوطه گردد. از سوی دیگر ممکن است با تغییرات گسترده بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی ایجادشده، پیش‌ساز یا پیش‌سازهای موردنیاز برای سنتز این ترکیبات به سمت مسیرهای ثانویه دیگر سوق داده شوند. در این حالت کاهش تولید ترکیب خاصی دور از انتظار نخواهد بود. گزارشات بسیار کمی در رابطه با کاهش و یا عدم‌تولید ترکیب یا ترکیبات خاص در اثر تراریزش با اگروباکتریوم رایزوژنز موجود است. در این راستا گزارشی وجود دارد که کشت‌های سلولی تراریخته با ژن *rol*C در گیاهان *Eritrichium sericeum* و *Lithospermum erythrorhizon* کاهش تولید ۳-۲ برابری متابولیت‌های کافئیک‌اسید را نسبت به کشت‌های غیرتراریخته نشان می‌دادند (Bulgakov *et al.*, 2005). پروتئین فسفاتازها فعال‌کننده سنتز ترکیبات مختلف از جمله کافئیک‌اسیدها می‌باشند و از آنجا که ژن *rol*C روی پروتئین فسفاتازها تأثیر مستقیم دارد، سبب مهار آن‌ها و کاهش تولید این ترکیبات شده است. کلروژنیک‌اسید نیز استری از کافئیک‌اسید و کوینیک‌اسید می‌باشد، بنابراین می‌تواند دستخوش اثرات ضد و نقیض ژن *rol*C یا سایر ژن‌های سرطان‌زای T-DNA پلاسمید Ri واقع شود، بنابراین عدم‌تولید کلروژنیک‌اسید در ریشه‌موئین‌های کاسنی می‌تواند ناشی از تأثیر گروهی یا جداگانه ژن‌های واردشده از اگروباکتریوم باشد.

نتایج مربوط به میزان ترکیبات فنولی کل در ریشه‌های موئین حاکی از افزایش معنی‌دار این ترکیبات در ریشه‌های موئین القاءشده توسط سویه‌های A4 و A13 و کاهش این ترکیبات در ریشه‌های موئین القاءشده توسط سویه 15834 می‌باشد. در بررسی‌های انجام گرفته توسط Sevon *et al.*, (1998)، تفاوت رشد قابل ملاحظه‌ای در بین کلون‌های ریشه‌موئین بذرالبنج مصری حاصل از سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز و نیز مقدار آلکالوئید تولیدی توسط کلون‌های مختلف گزارش شد. دلیل لیت تفاوت را می توان به علت حضور مقادیر متفاوتی از T-DNA باکتری در سلول‌های تراریخته اولیه هر کلون و یا بیان متفاوت ژن‌های T-DNA باکتری در سلول‌های کلون‌های مختلف دانست. همچنین محققین دریافته‌اند که با توجه به محل ورود T-DNA به ژنوم سلول گیاهی، الگوهای متفاوتی در تجمع متابولیت‌های ثانویه مشاهده می‌شود. Mano *et al.*, (1989)، ۴۵ کلون از ریشه‌های موئین گیاه *Duboisia leichhardtii* F. را بررسی کردند و دریافتند که تنوع قابل ملاحظه‌ای در سرعت رشد، تجمع متابولیت‌های ثانویه و بازدهی کلون‌ها وجود دارد. با توجه به گزارشات فوق به‌نظر می‌رسد که میزان تجمع متابولیت‌های ثانویه از یک سویه به سویه دیگر و همچنین از یک کلون به کلون دیگر متفاوت است و با توجه به نوع سویه القاءکننده ریشه‌های موئین و سایر عوامل دخیل، میزان سنتز این ترکیبات تغییر می‌کند.

REFERENCES

Asada Y, Li W, Yoshikawa T (1998). Isoprenylated flavonoids from hairy root cultures of *Glycyrrhiza glabra*. Phytochem. 47: 389-392.

Bais H, Ravishankar G (2001) *Cichorium intybus* L cultivation, processing, utility, value addition and biotechnology, with an emphasis on current status and future prospects. J. Sci. Food Agr. 81: 467-484.

Brielmann HL, Setzer WN, Kaufman PB, Kirakosyan A, Cseke LJ (1999). Phytochemicals: The Chemical Components of Plants In: Kaufman PB, Cseke LJ, Warber S, Duke JA, Brielmann HL (eds). Natural Products of Plants. CRS Press. USA. pp: 1250-1318.

Bulgakov VP, Veselova MV, Tchernoded GK, Kiselev KV, Fedoreyev SA, Zhuravlev YN (2005). Inhibitory effect of the *Agrobacterium rhizogenes rol*C gene on rabdosiin and rosmarinic acid production in *Eritrichium sericeum* and *Lithospermum erythrorhizon* transformed cell cultures. Planta. 221: 471-478.

Chen Y, Yu Q, Luo X, Liu H (2001). Extraction and HPLC characterisation of chlorogenic acid from tobacco residuals. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 6497-6502.

Crozier A, Ashihara H, Clifford MN (Eds) (2006) Plant secondary metabolites occurrence, structure and role in the human diet. Blackwell Publishing. London. pp: 2-4.

David dos Santos M, Almeida MC, Lopes NP, Petto de Souza CE (2006). Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenicacid. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 29(11): 2236-2240.

Dehghan E, Hakkinen ST, Oksman-Caldentey KM, ShahriariAhmadi F (2012). Production of tropane alkaloids in diploid and tetraploid plants and in vitro hairy root cultures of Egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). Plant Cell Tissue Organ Culture. 110: 35-44.

Farah A, Donangelo,CM (2006). Phenolic compounds in coffee. Brazilian Journal of Plant Physiology. 18: 23-36.

Ge JD (2006) The Effect of CTK on Chicory OG02 Growth and Forage Quality. M Sc thesis, Yang Zhou University of China, Yang Zhou, P. R. China.

Kemp DR, Michalk DL, Goodacre M (2002) Productivity of pasture legumes and chicory in central New South Wales. Aust. J. Exp. Agric. 42: 15-25.

Kim T, Yang K (2001). Antioxidative effects of *Cichorium intybus* root extract on LDL (Low density lipoprotein) oxidation. Arch. Pharmacal. Res. 24(5): 431-436.

Kwon BM, Ro SH, Kim MK, Nam JY, Jung HJ, Lee IR, Kim YK, Bok SH (1997). Polyacetylene analogues, isolated from hairy roots of *Panax ginseng*, inhibit acyl-CoA: cholesterol acyltransferase. Planta Med. 63: 552-553.

Lepelley M, Cheminade G, Tremillon N, Simkin A (2007). Chlorogenic acid synthesis in coffee: An analysis of CGA content and real-time RT-PCR expression of HCT, HQT, C3H1 and CCoAOMT91 genes during grain development in *C. canephora*. Plant Sci. 172: 978-996.

Li H, Chen B, Yao SZ (2005). Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmodies* Oliv. Ultrason Sonochem. 12: 295-300.

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

Mares D, Romagnoli C, Tosi B, Andreotti E, Chillemi G, Poli F (2005). Chicory extracts from *Cichorium intybus* L. as potential antifungals. *Mycopathologia*. 160: 85-92.

Marques V, Farah A (2009). Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chem*. 113: 1370-1376.

Murashige T, Skooge F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum. 15: 473-497.

Niggeweg R, Michael A, Martin C (2004). Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. Nat. Biotechnol. 22(6): 746-754.

Sevon N, Hiltunen R, OksmanCaldentey KM (1998). Somaclonal variation in *Agrobacterium* transformed roots and protoplast-derived hairy root clones of *Hyoscyamus muticus*. Planta Med. 64: 37-41.

Shahrzad S, Bitsch L (1996). Determination of some pharmacologically active phenolic acids in juices by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr*. 741(2): 223–231.

Sonald SF, Laima SK (2001). Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. *Plant Agric*. 1: 1-5.

Velayutham P, Ranjithakumari BD, Baskaran P (2007) An efficient *in vitro* plant regeneration system for *Cichorium intybus* L.-an important medicinal plant. J. Agr. Technol. 2(2): 287-298.

Vivanco JM, Guimaraes RL, Flores HE (2002) Underground Plant Metabolism: The biosynthetic potential of roots. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi V (eds) Plant roots: The hidden half, 3rd ed. Marcel Dekker, Inc, New York. pp 1045-1064.

Wang G, Shi L, Ren Y, Liu Q, Liu H, Zhang R (2009). Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid *in vivo* and *in vitro*. Antivir. Res. 83: 186-190.

Yang HGUX, MengF, Zhang J (2005). *In vitro* induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujube* Mill. cv. Zhanhua. Plant Cell Rep. 24: 671-676.