



Biochemical and Antioxidant Analysis of Caffeic Acid in Transgenic Hairy Roots of Purslane (*Portulaca oleracea* L.) Transformed with *Agrobacterium rhizogenes*

Farah Farahani

Professor, Department of Biology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran (**Corresponding author**). Abioqom2020@gmail.com

Masoumeh Ansari Bidar

Department of Biology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran. masoumehbidar@yahoo.com

Mohsen Zargar

Department of Biology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran. zmohsen2000@yahoo.com

Abstract

Objective: Purslane is used in traditional medicine in many countries. Its roots contain beneficial secondary metabolites but in very low quantities. The aim of this study was to evaluate the application of a biotechnological method to enhance the production of pharmaceutically active compounds through hairy root induction.

Materials and Methods: Disinfected purslane seeds were cultivated. Hypocotyl segments of seedlings were inoculated with *Agrobacterium rhizogenes* (strains A15 and A4). PCR (Polymerase Chain Reaction) was performed to confirm gene transfer. Inoculated hypocotyls and controls (non-inoculated) were cultured on solid Murashige and Skoog (MS, 1962) medium. Caffeic acid content in transgenic and control plants was analyzed via HPLC (High Performance Liquid Chromatography), and antioxidant activity was assessed using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay.

Findings: PCR confirmed the presence of the *rolB* gene from strains A15 and A4 in transgenic purslane compared to controls (lacking the *rol* gene). Callus formation was followed by hairy root induction. Transgenic hairy roots showed significant induction at the 5% probability level. HPLC analysis revealed 34% higher caffeic acid content in transgenic plants compared to controls. The antioxidant activity of transgenic purslane with strain A4 exhibited 86.737% inhibition at a low concentration.

Conclusion: Transgenic hairy roots of purslane can be utilized to enhance the production yield of caffeic acid alkaloids for pharmaceutical industries.

Keywords: Gene transfer, Purslane, Hairy root, Antioxidant.

Received: 2024/03/06 ; Revised: 2024/04/13 ; Accepted: 2024/05/20 ; Published online: 2024/06/22

Cite: Farahani, F., Ansari Bidar, M. & Zargar, M. (2024). Biochemical and Antioxidant Analysis of Caffeic Acid in Transgenic Hairy Roots of Purslane (*Portulaca oleracea* L.) Transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Applied Biology*, 14(2), p. 65-84.

Article type: Research Article

© the authors

Publisher: Qom Islamic Azad University





آنالیز بیوشیمیایی و آنتی اکسیدانی کافیک اسید ریشه‌های موین گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.) تراریخته با آگروباکتریوم ریزوژن

فرح فراهانی | استاد، گروه زیست‌شناسی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران. Abioqom2020@gmail.com
معصومه انصاری بیدار | گروه زیست‌شناسی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران. masoumehbidar@yahoo.com
محسن زرگر | گروه زیست‌شناسی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران. zmohsen2000@yahoo.com

چکیده

هدف: خرفه در طب سنتی بسیاری از کشورها استفاده می‌شود. ریشه خرفه حاوی ترکیبات ثانویه مفید و به مقدار بسیار کم هستند. هدف تحقیق حاضر بررسی کاربرد یکی از روش‌های زیست فناوری، به منظور افزایش تولید ترکیبات موثر دارویی با تولید ریشه‌های موین می‌باشد.

مواد و روش‌ها: دانه‌های خرفه ضدعفونی شده کشت شدند، محور زیر لپه دانه رست‌ها با آگروباکتریوم ریزوژن (جدایه‌های A15 و A4) تلقیح شدند. آزمایش‌های PCR (Polymerase Chain Reaction) برای تایید انتقال ژن انجام شدند. محور زیر لپه گیاهان تلقیح شده و شاهد (تلقیح نشده با باکتری) بر روی محیط کشت MS (Murashig & Skoog, 1962) جامد کشت داده شدند. وجود کافیک اسید حاصل از گیاهان تراریخته و کنترل با آنالیزهای HPLC (High Performance Liquid Chromatography) و فعالیت آنتی اکسیدانی با آزمون DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: آزمایش‌های PCR حضور ژن *rolB* از جدایه‌های A15 و A4 را در خرفه تراریخته نسبت به کنترل (فاقد ژن *rol*) نشان دادند. پس از تشکیل کالوس، ریشه‌های موین القاء شدند. وجود ریشه‌های موین خرفه تراریخته در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بودند. آنالیز HPLC بر وجود مقدار بیشتر کافیک اسید در خرفه تراریخته را نسبت به شاهد تایید دارد، که ۳۴ درصد بالاتر بودند. فعالیت آنتی اکسیدانی خرفه تراریخته با جدایه A4 ۸۶/۷۳۷ بودند که درصد بازدارندگی در غلظت پایین انجام شده است.

نتیجه‌گیری: ریشه‌های موین خرفه تراریخته می‌توانند برای افزایش بازده تولید آلکالوئیدهای کافیک اسید در صنایع داروسازی قابل استفاده باشند.

کلیدواژه‌ها: انتقال ژن، خرفه، ریشه موین، آنتی اکسیدان.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۶ ؛ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۱/۲۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۳۱ ؛ تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۴/۰۲
استاد به این مقاله: فراهانی، فرح؛ انصاری بیدار، معصومه؛ زرگر، محسن (۱۴۰۳). آنالیز بیوشیمیایی و آنتی اکسیدانی کافیک اسید ریشه‌های موین گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.) تراریخته با آگروباکتریوم ریزوژن. *بیولوژی کاربردی*، ۱۴(۲)، ص ۸۴-۸۶.



۱. مقدمه

گیاهان حاوی ترکیبات شیمیایی موثر، به عنوان گیاهان دارویی شناخته می‌شوند. ترکیبات طبیعی گیاهان از بخش‌های مختلف شاخه، برگ‌ها، گل‌ها، ریشه‌ها، میوه‌ها و دانه‌ها حاصل می‌شوند. همچنین آنها از زمان‌های بسیار قدیم توسط انسان‌ها به عنوان دارو مورد استفاده قرار می‌گرفتند (۱). تاثیر مفید دارویی ترکیبات طبیعی گیاهان عموماً بدلیل تولید ترکیبات ثانویه موجود در گیاهان است. کشت در شیشه^۱ سلول‌ها و بافت‌های گیاهی، به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه مختلف، معمولاً بدلیل مقدار بازده کم و ناپایداری‌های ژنتیکی، با موفقیت پایین همراه است. در سال‌های اخیر، محققان بسیاری به فرآیند تلقیح باکتری گرم منفی خاک آگروباکتریوم ریزوژنز برای تولید ریشه‌های مویین توجه کرده‌اند. آگروباکتریوم به عنوان یک ناقل طبیعی برای انتقال ژن عمل می‌کند که موجب تولید ریشه‌های مویین در گیاهان تراریخته می‌شود (۲). ریشه‌های مویین حاصل از انتقال ژن بواسطه آگروباکتریوم ریزوژنز بدلیل رشد سریع، ترکیبات بیوشیمیایی پایدار و تولید متابولیت‌های ثانویه نسبتاً زیاد، به طور گسترده برای تولید ترکیبات مفید گیاهی استفاده می‌شوند (۳، ۴، ۵).

خرفه^۲ در فهرست گیاهان دارویی سازمان بهداشت جهانی^۳ به عنوان یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی بوده و به نام اکسیر جهانی شناخته شده است (۶). خرفه با پراکندگی و فراوانی بسیار فراوان، در طب سنتی بسیاری از کشورها کاربرد دارد. اخیراً بسیاری از مطالعات فارماکولوژیکی نشان دادند، که گیاه دارویی خرفه کاهنده دردهای معده و کبد، ادرارآور بوده و عصاره برگ آن در درمان درد کلیه مفید است (۷). همچنین عامل ضد درد و ضد سرفه بوده و نیز در کنترل قند خون بیماران دیابتی کاربرد دارد (۸). در بسیاری از نواحی دنیا شامل کشورهای شرق آسیا نیز به عنوان سبزی خوراکی استفاده می‌شود (۹). خواص زیستی دیگر از جمله ضد التهاب بودن، انبساط ماهیچه و کنترل تب (۱۰)، ممانعت از حمله‌های قلبی و بهبود سیستم ایمنی انسان را نیز به عهده دارد. خرفه غنی از اسیدهای چرب امگا-۳ است (۱۱). علاوه بر این، از مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی گیاه خرفه اسیدهای فنولیک و گلیکوزیدهای فلاون، مانند هسپیریدین (HP) و کافنیک اسید (CA) (۱۲)، فرولیک اسید و کوماریک اسید (p-CA) (۱۳) گزارش شده است. از ترکیبات فعال زیستی مفید در سلامت با تاثیر آنتی اکسیدانی، فرولیک اسید و کافنیک اسید (۱۴)، فعالیت ضدسرطانی، هسپیریدین (۱۵) و p-کوماریک اسید با بازدارندگی رشد باکتری‌ها هستند (۱۶). بنابراین، اجزاء متشکله فعال زیستی به

1. In vitro

2. *Portulaca oleracea*

3. WHO

عنوان مواد ترکیبات شیمیایی مارکر (معرف) در تشخیص عصاره خرفه می‌توانند قابل استفاده باشند. اخیراً، تحقیقات *In vivo* بر فرماکوکینتیک هسپیریدین (۱۷)، فرولیک اسید (۱۸) و کوماریک اسید (۱۹) به ترتیب با آنالیزهای HPLC، LC/MS/MS و LC/MS متمرکز شده است.

پژوهشی در نیجریه بر روی عصاره آبی اندام‌های هوایی خرفه، وجود استروئیدها، پروتئین و آلکالوئیدها را گزارش نمودند (۲۰). پژوهش دیگری در اتیوپی، خواص آنتی اکسیدانی عصاره خرفه را در موش‌های نر بررسی کردند (۲۱). ترکیبات آنتی اکسیدانی، اکسیداسیون چربی‌ها را مهار یا به تأخیر می‌اندازند و یا در سایر مولکول‌ها از تشکیل و ازدیاد واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون ممانعت می‌کنند (۲۲). از طرفی، کاربرد آنتی اکسیدان‌های سنتتیک هیدروکسی تولوئن بوتیل^۱ و هیدروکسی آنوسیل بوتیل^۲ در مواد غذایی بدلیل اثرات سمیت آنها در برخی گونه‌ها و پتانسیل سرطان‌زایی احتمالی ممنوع شده است. در سال‌های اخیر تحقیقات بر روی آنتی اکسیدان‌های طبیعی و امن با منشاء گیاهی به شدت افزایش یافته است (۲۳). گیاهان معطر و دارویی به دلیل متابولیت‌های ثانویه اصلی، خود منبع آنتی اکسیدان‌های طبیعی هستند. آنها می‌توانند با اهدای هیدروژن به رادیکال‌های بسیار واکنش‌پذیر، به عنوان آنتی اکسیدان عمل کنند و در نتیجه از تشکیل بیشتر رادیکال‌ها جلوگیری نمایند. پتانسیل آنتی اکسیدانی آنها به تعداد و آرایش گروه‌های هیدروکسیل و میزان ترکیب ساختار بستگی دارد (۲۴). گیاه خرفه دارای ترکیبات طبیعی با خواص آنتی اکسیدانی است، مقدار ترکیبات زیستی فعال در ریشه‌های آن بسیار کم و قابل استحصال نمی‌باشد. امروزه تلاش بسیاری برای کاربرد روش‌های زیست فناوری به منظور دستیابی به ترکیبات طبیعی آنتی اکسیدان وجود دارد. از این‌رو تحقیق حاضر یکی از روش‌های زیست فناوری برای افزایش مقدار متابولیت‌های ثانویه با خواص آنتی اکسیدانی گیاه خرفه را مورد بررسی قرار داده است.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. مواد گیاهی

بذرهای گیاه خرفه^۳ از شهرستان محلات تهیه شدند. بذرها به مدت ۳۰ ثانیه در ظروف حاوی اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند. اتانول درون ظرف‌ها تخلیه شده و سپس بذرها به ظرف حاوی محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد تحت شرایط استریل منتقل و به آرامی به مدت ۲۰ دقیقه به هم زده

1. BHT (Butylated Hydroxy Toluene)

2. BHA (Butylated Hydroxyl Anisole)

3. Portulaca oleracea L.

شدند. در نهایت سه بار با آب مقطر ضدعفونی، شستشو داده شدند. دانه‌های ضدعفونی شده به محیط کشت جامد (۲۵)^۱ منتقل گردیدند (۲۶).

۲-۲. کشت جدایه‌های باکتری

جدایه‌های A15 و A4، باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز از کلکسیون کشت باکتری‌ها،^۲ گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران^۳ در کرج تهیه شدند. باکتری‌ها روی محیط کشت (LB)^۴ حاوی عصاره مخمر (۵ گرم بر لیتر)، تریپتوفان (۱۰ گرم بر لیتر)، کلرید سدیم (۱۰ گرم بر لیتر) و آگار (۱۵ گرم بر لیتر) کشت شدند و pH محیط کشت روی عدد ۷ تنظیم گردید. کلنی‌های دو جدایه مورد نظر باکتری در ۱۰ میلی لیتر محیط LB مکمل با ریفامپیسین (۵۰ میلی گرم، در ۱۰ میلی لیتر) اضافه شدند و ظروف کشت بر روی شیکر (۱۱۰ دور در دقیقه) در دمای ۲۶ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند، تا میزان تراکم آنها در طول موج نوری ۶۰۰ نانومتر (۰/۶) باشد (۲۷).

۲-۳. تولید و بقاء ریشه‌های موبین خرفه

ده روز پس از استقرار گیاهچه‌های گیاه پرپوش در محیط کشت جامد MS^۵ (۲۵)، دانه رست‌های در شیشه رشد کردند. بخش محور زیرلپه آنها جدا شده و به قطعات ۱۰ میلی متری بریده شدند. قطعات حاصل به عنوان ریزنمونه بر روی محیط کشت جامد MS فاقد هورمون، به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند (شکل ۱ الف، ب). ریزنمونه‌ها (سالم و یا زخمی شده) با فروبردن در محلول سوسپانسیون جدایه‌های A4 و A15 باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز، به مدت ۳۰ دقیقه آلوده شدند. پس از ۲ روز هم‌کشتی ریزنمونه‌ها و جدایه‌های باکتری در دمای ۲۴ درجه سانتیگراد، آنها به محیط کشت MS جامد حاوی آنتی بیوتیک سفوتاکسیم (۳۰۰ میلی گرم بر لیتر، ضدعفونی شده با فیلتر) به منظور حذف جدایه‌های باکتری از ریزنمونه‌ها منتقل گردیدند. نمونه‌های شاهد دارای ریزنمونه‌های مشابه با نمونه‌های تیمار، اما فقدان هم‌کشتی با سویه‌های A4 و A15 باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز را داشتند. ریزنمونه‌های تیمار شده بر روی محیط کشت MS جامد حاوی

1. MS (Murashige and Skoog 1962)

2. PTCC

3. IROST

4. Luria-Bertani

5. Murashige and Skoog 1962

سفوتاکسیم در اتاق رشد (شرایط بهینه دمای ۲۴ درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی/ ۸ ساعت تاریکی) به منظور تولید ریشه‌های موین نگهداری شدند.

پس از ۷ روز هم‌کشتی ریزنمونه‌ها با جدایه‌های باکتری، ابتدا کالوس (توده‌های سلولی) تشکیل شدند. کالوس‌ها بر روی محیط کشت MS جامد با شرایط بهینه کشت شدند و ریشه‌های موین به طول ۵-۴ سانتیمتر پس از ۲۰ روز قابل مشاهده بودند. پس از ۶ بار واکشت (به مدت ۳ ماه)، ریشه‌های موین طویل شده قطع گردیدند و به محیط کشت MS جامد (فاقد هورمون) و بدون سفوتاکسیم منتقل شدند. این روش ۳-۴ بار تکرار شد، تا زمانی که جدایه‌های باکتری در اطراف ریزنمونه‌ها مشاهده نشدند (۲۶).

۲-۴. آنالیز^۱ ریشه‌های موین

ریشه‌های موین برای حضور ژن *rolB* مورد آزمایش قرار گرفتند. در آنالیز PCR از DNA ژنومی و پرایمر RoIB780 (پرایمر فوروارد 5'- GTTCTCGCGAGAAGATGCA-3' و پرایمر معکوس 5'-CAGTTTCGCATCTTGACAG-3') استفاده گردید، که قطعه ۷۸۰bp از ژن *rol* تکثیر شدند (پرایمرها از شرکت پیشگام و مارکر لدر از شرکت فرمنتاس تهیه شدند). شرایط آزمایش‌های PCR با مقدار ۲ نانوگرم DNA گیاهی (با حجم ۲ میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر بافر Taq، ۰/۴ میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر DNA پلیمراز (۵ واحد/ میکرولیتر Taq)، ۲ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۱ میلی مولار)، ۱۱/۱ میکرولیتر آب استریل دیونیزه و کل محلول مذکور ۲ میکرولیتر بهینه شده است. برنامه انجام آزمایش‌های PCR با دستگاه ترموسایکلر (۳۵ سیکل)، برنامه دمای هر سیکل شامل ۹۵ درجه سانتیگراد (۱ دقیقه)، ۵۸ درجه سانتیگراد (۱ دقیقه) و ۷۲ درجه سانتیگراد (۱ دقیقه) انجام شده است (۲۸، ۲۹). DNA پلاسمید جدایه‌های A4 و A15 باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز با روش تجزیه آلکالینی (قلیایی) استخراج شد. این نمونه DNA پلاسمید به عنوان شاهد مثبت و DNA ریشه‌های خرفه غیرتراریخته به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شدند (۳۰).

۲-۵. ژل الکتروفورز DNA تکثیرشده

محصول تکثیرشده بوسیله الکتروفورز ژل آگاروز ۲ درصد در بافر تریس استیک برومیک اسید (1X) جدا شده بودند و با رنگ‌آمیزی برموفنل بلو و گزین سیانول اتیدیوم بروماید تشخیص داده

1. PCR (Poly Chain Reaction)

شدند و با استفاده از لامپ‌های نور ماوراء بنفش قابل رویت بودند (۳۱).

۲-۶. استخراج کافئیک اسید و آنالیز HPLC

ریشه‌های خرفه تراریخته و ریشه‌های موین حاصل از خرفه تراریخته با جدایه‌های A4 و A15 باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز در دمای اتاق (۲۴ درجه سانتیگراد) خشک و با آسیاب پودر شدند. ۱۰۰ میلی گرم پودر حاصل با ۵ میلی لیتر محلول اسید کلریدریک (۰/۱ مولار) به مدت ۹۰ دقیقه مخلوط شد. عصاره حاصل با فیلتر کاغذی (قطر منافذ ۰/۴۵ میکرومتر) صاف شد و برای آنالیز HPLC آماده گردید (۳۲). آنالیز HPLC با دستگاه Knauer (ساخت برلین، آلمان) مجهز به ستون C18 (۲۵ سانتیمتر × ۴/۶ سانتیمتر) و شناساگر اشعه ماوراء بنفش انجام شد. فاز متحرک ستون محلول فسفات دی هیدروژن پتاسیم ۰/۰۲ مولار (۹۵ درصد)، استونیتریل (۵ درصد) و شرایط pH ۳ و طول موج شناسایی ۲۸۰ نانومتر بودند و حجم تزریق هر بار ۲۰ میکرولیتر بود.

۲-۷. تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی

میزان فعالیت آنتی اکسیدانی کافئیک اسید با روش کوکیک انجام شده است (۳۳). ۴ میلی لیتر محلول عصاره ریشه‌های موین خرفه تراریخته در غلظت‌های مختلف (۱۰۰ تا ۶۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) با ۱ میلی لیتر محلول متانولی DPPH (۵۰۰ میکرو مولار) (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) مخلوط شد. مخلوط حاصل کاملاً هم‌زده شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق ثابت گذاشته شد. با دستگاه طیف‌سنجی^۱ میزان جذب نوری محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شده و از متانول به عنوان محلول بلانک استفاده گردید. جذب نوری پایین‌تر محلول نشان‌دهنده سرعت حذف بالاتر رادیکال‌های آزاد است. فعالیت آنتی اکسیدانی (برحسب درصد) طبق فرمول زیر محاسبه می‌شود:

ظرفیت حذف DPPH (%) = $100 \times (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}$ (جذب نوری محلول بلانک - جذب نوری نمونه / جذب نوری محلول بلانک)

$$\text{DPPH scavenging capacity (\%)} = 100 \times (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}})$$

محلول بلانک: متانول، نمونه: عصاره ریشه موین خرفه تراریخته.

همه آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند.

آنالیز آماری داده‌های حاصل از نتایج آزمایش‌ها برای تعیین میانگین و انحراف معیار و آزمون

دانکن با نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۱) انجام شد.

۳. نتایج

۳-۱. القاء ریشه‌های مویین

ریشه‌های مویین از ریزنمونه محور زیرلپه خرفه (*P. oleracea*) تلقیح شده با جدایه‌های A4 و A15 باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز تقریباً پس از ۱۰-۶ روز قابل مشاهده بودند (شکل ۱). یافته‌های تحقیق حاضر نشان دادند، بالاترین میزان تراریخته در نمونه محور زیرلپه خرفه ۹۳٪ مشاهده شد که با جدایه A15 باکتری تلقیح شده که از نظر آماری در سطح احتمال ۰/۰۵ معنادار بودند. میزان نمونه خرفه تراریخته با جدایه A4 باکتری تلقیح شده ۶۷٪ مشاهده شد. آنالیز PCR حضور ژن را در ژنوم گیاه خرفه تراریخته تایید می‌کند (شکل ۲). قطعه ۷۰۰ bp ژن مورد نظر بر روی ژل الکتروفورز نمونه گیاه خرفه تراریخته مشابه نمونه شاهد مثبت (پلاسمید باکتری) مشاهده شد، به طوری که این قطعه در خرفه غیرتراریخته (نمونه شاهد منفی) رویت نشد.

۳-۲. ارزیابی کافئیک اسید تولید شده

یکی از مهم‌ترین کاربردهای ریشه مویین، تولید یا ارتقاء تولید متابولیت‌های ثانویه نسبت به ریشه‌های معمولی است. ریشه‌های مویین کشت شده در محیط کشت MS فاقد هورمون جمع‌آوری گردید و برای تعیین مقدار کافئیک اسید با دستگاه HPLC مورد استفاده قرار گرفتند. همانطور که در شکل (۳) آمده است، قله منحنی مربوط به متابولیت ثانویه کافئیک اسید در دقیقه ۳/۷۳۳ نسبت به استاندارد رویت گردید (جدول ۱). نتایج مقدار کافئیک اسید گیاهان خرفه تراریخته با جدایه‌های A4 و A15 نسبت به گیاه شاهد (غیرتراریخته) تفاوت معنادار در سطح احتمال ۰/۰۵ را نشان دادند (شکل‌های ۳-۵). قله‌های زمان بازداری گیاهان خرفه غیرتراریخته و تراریخته تلقیح شده با جدایه‌های A4 و A15 بین ۳ تا ۴ دقیقه و به ترتیب ۳/۸۱۷ دقیقه، ۳/۸ دقیقه و ۳/۸۷۳ دقیقه بودند (شکل ۳).

مقدار کافئیک اسید ریشه خرفه غیرتراریخته ۶۴/۰۲۳ درصد بود. همانطور که در جدول (۱) آمده است، مقدار کافئیک اسید تولید شده در ریشه‌های مویین خرفه تراریخته با جدایه‌های A4 و A15 تفاوت معناداری نسبت به گیاه شاهد داشتند و مقدار آنها به ترتیب ۹۱/۱۲۳ درصد و ۹۲/۷۱۶ درصد بودند که تقریباً ۳۴ درصد بیشتر از گیاه شاهد است (شکل ۴). بنابراین، با تکنیک تولید ریشه‌های مویین، مقدار کافئیک اسید در خرفه تراریخته نسبت به شاهد، به طور قابل توجهی افزایش یافته است. مقادیر میانگین در آنالیزهای آماری آزمون دانکن با سطح احتمال ۰/۰۵ تایید شد. عموماً سطح آکالوئیدها در ریشه‌های مویین تراریخته به طور معنی‌داری افزوده شده که در صنایع دارویی،

شیمیایی و تجاری کاربرد دارد.

۳-۳. فعالیت حذف رادیکال ها با واکنش DPPH

ترکیب DPPH یک ماده آلی بسیار پایدار با رنگ بنفش تیره است که دامنه طول موج‌های ۵۱۵-۵۲۸ را جذب می‌کند. یک پروتون از هر مولکول دهنده، عمدتاً ترکیبات فنلی را دریافت می‌کند و رنگ آن کمرنگ‌تر و تقریباً زرد می‌شود (۳۴). به طوری که غلظت متابولیت‌های ثانویه یا درجه هیدروکسیلاسیون ترکیبات آلکالوئیدی افزایش یافته است. همچنین فعالیت حذف رادیکال‌ها توسط ترکیب DPPH بیشتر شده و می‌تواند به عنوان فعالیت آنتی اکسیدانی شناخته شود (۳۵). فعالیت حذف رادیکال‌ها توسط کافئیک اسید در نمونه‌های شاهد و تیمارها (عصاره ریشه غیرتراریخته و ریشه‌های موئین تراریخته با جدایه‌های A4 و A5) با تغییر رنگ نشان داده شده است (شکل ۵). همانطور که مقدار کافئیک اسید افزایش یافته، یک ارتقاء منظم در فعالیت حذف رادیکال توسط آن مشاهده شده است. ویژگی آنتی اکسیدانی کافئیک اسید با فعالیت حذف رادیکال آزاد با تعیین DPPH ارزیابی شد و نتایج به صورت درصد بازدارندگی نشان داده شده است (جدول ۱). در همه نمونه‌ها دامنه درصد بازدارندگی از ۴۸/۹۲ درصد تا ۸۶/۷۳ درصد بدست آمد. بیشینه فعالیت آنتی اکسیدانی (درصد بازدارندگی، ۸۶/۷۳۷ درصد) در ریشه موئین خرفه تراریخته با جدایه A4 باکتری مشاهده گردید (جدول ۲). طبق گروه‌بندی دانکن، نمونه‌های شاهد و تیمارها در یک گروه قرار دارند و در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نبودند.

مقادیر درصد بازدارندگی ریشه غیرتراریخته و ریشه‌های موئین تراریخته با تلقیح جدایه‌های A4 و A15 به ترتیب ۴۸/۹۲۷ درصد، ۷۵/۴۳ درصد و ۸۶/۷۳۷ درصد بودند. نتایج نشان دادند فعالیت آنتی اکسیدانی در ریشه موئین تراریخته با تلقیح جدایه A4 باکتری در مقایسه با سایر ریشه‌ها، مقادیر خیلی کم داشت. ارزیابی DPPH مندرج در جدول (۲) نشان داد، گیاه خرفه می‌تواند به عنوان یک حذف‌کننده رادیکال‌های آزاد تا حد معینی عمل کند. از طرفی، هرگونه کارایی حذف‌کنندگی رادیکال آزاد برحسب نوع حلال مورد استفاده و گیاهان مورد مطالعه، متفاوت بود. بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی در عصاره متانولی ریشه موئین خرفه تراریخته تلقیح با سویه A4 مشاهده گردید. این مسئله باید بدلیل حضور آنتی اکسیدان‌های با قطبیت بیشتر و توانایی استخراج آنها با حلال‌های قطبی بیشتر در ریشه موئین خرفه تراریخته تلقیح با سویه A4 باشند. همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی ریشه‌های موئین تراریخته تلقیح شده با دو سویه، تقریباً با نتایج برخی تحقیقات در گیاه خرفه، نسبتاً نزدیک هستند (۳۶).

۴. بحث

نتایج تحقیق حاضر وجود بیش از ۶۰ درصد انتقال ژن و تولید خرفه تراریخته را از ریزنمونه محور زیرلپه نشان دادند. لیور^۱ و همکاران (۲۰۰۵) بیشترین درصد تراریخته را از ریزنمونه محور زیرلپه گیاه *Ruta graveolens* گزارش کردند (۳۷). شاکرن^۲ و همکاران (۲۰۱۴) میزان ریزنمونه‌های گیاه تراریخته *Datura metel* تلقیح شده با جدایه A4 باکتری را ۵۵٪ گزارش کردند (۳۸). انواع جدایه‌های باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز در میزان توانایی آلودگی ریزنمونه‌ها تفاوت‌های بارزی را نشان می‌دهند (۳۹). جدایه‌های باکتری، نوع ریزنمونه و مولکول‌های پیام‌رسان می‌توانند در میزان تولید ریشه‌های موین گیاه تراریخته موثر باشند (۴۰). ریشه‌های موین در گیاهان بویژه تراریخته با آگروباکتریوم ریزوژنز، تولید انشعابات فرعی می‌کنند که فاکتور اساسی در افزایش کارایی بیوماس آنها است (۴۱). لیور و همکاران (۲۰۰۵) وجود این قطعه را بر روی ژل الکتروفورز ژنوم گیاه *Ruta graveolens* نشان دادند (۳۷، ۲۸).

انتقال ژن‌های متنوع با جدایه‌های مختلف آگروباکتریوم ریزوژنز القاء شده، با ناقل پلاسمید این باکتری‌ها انجام شده است (۴۲). بنابراین، بیان متنوع ژن‌های T-DNA در ریشه‌های موین، ادغام ژن‌های T-DNA در جایگاه متفاوت DNA ژنومی ریزنمونه‌ها و تعداد کپی‌های متعدد ادغام شده T-DNA ژنوم‌ها دلیلی بر تنوع اختصاصی در تشکیل ریشه‌های موین هستند (۴۳). مقدار کافنیک اسید در نمونه‌های تراریخته تحقیق حاضر بیش از ۹۰ درصد گزارش شدند. چنگ^۳ و همکاران (۲۰۱۱) میانگین مقدار کافنیک اسید در گیاه خرفه را با دستگاه HPLC، 91.5 ± 0.69 گزارش کردند که به نتایج تحقیق حاضر نزدیک است (۴۴). تفاوت مقدار تولید متابولیت‌های ثانویه در سویه‌های مختلف باکتری، بدلیل تفاوت در تعداد کپی‌های گذاشته شده در ژنوم گیاه و الگوهای بیان ژن T-DNA متفاوت در ریشه‌های موین تراریخته با جدایه‌های باکتری گزارش شده است (۴۵). احتمالاً تفاوت دیگر به نوع روش تزریق T-DNA به درون ژنوم گیاه مربوط مربوط است (۴۶). افزایش بیوماس ریشه‌های موین می‌تواند بدلیل تاثیر ژن بر تقسیم سلولی و در نتیجه افزایش پتانسیل بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه باشد (۴۶). نتایج درصد بازدارندگی و حذف رادیکال‌های آزاد نمونه‌های خرفه تراریخته در محدوده ۴۰ تا ۸۰ درصد بودند که مطالعات گذشته پیش‌بینی کردند عمدتاً حلال

1. Lievre

2. Shakeran

3. Cheng

قطبی برای استخراج آنتی اکسیدان‌ها استفاده شده است. به طوری که عموماً می‌توان فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتر را در گیاهانی که با متانول استخراج شده، مشاهده کرد (۴۷). بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی در واریته PG2 خرفه گزارش شده است. به طوری که، تنوع فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان متفاوت خرفه و سیستم‌های حلال مختلف بر روی نوع و ساختار ترکیبات کافئیک اسید تاثیر داشت (۳۶). گزارشات متعددی وجود دارد که فعالیت آنتی اکسیدانی از تعداد و آرایش گروه هیدروکسیل، همچنین گلیکوزیلاسیون تاثیر می‌پذیرد (۴۸، ۴۹، ۵۰).

۵. نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر ریشه‌های موئین خرفه تراریخته با بهترین جدایه‌های A4 و A15 باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز القاء شده و با بالاترین سرعت رشد، پایداری ژنتیکی و انشعابات جانبی خوب مشخص گردیدند. ریشه‌های موئین خرفه می‌توانند برای افزایش بازده تولید آلكالوئیدهای کافئیک اسید در صنایع داروسازی قابل استفاده باشند. عصاره خرفه فعالیت آنتی اکسیدانی قوی داشت. بنابراین، از این عصاره می‌توان به عنوان یک آنتی اکسیدان طبیعی با قابلیت دسترسی راحت استفاده کرد.

۶. قدردانی

از دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم برای حمایت از این پروژه تشکر می‌نماییم. همچنین از دکتر حمیده افقی (گروه بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، IROST) برای در اختیار گذاشتن سویه‌های باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز قدردانی می‌گردد.

References

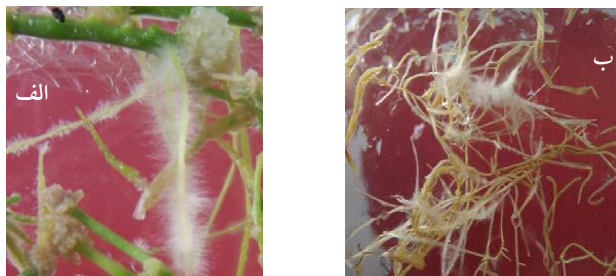
1. Gordon MC & David JN. Natural product drug discovery in the next millennium. *Pharmaceutical Biology*. 2001; 39: 8–17.
2. Binns AN. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens*: 25 years and counting. *Trends in Plant Science*. 2002; 7: 231-233.
3. Shanks JV & Morgan J. Plant Hairy Root Culture. *Current Opinion Biotechnology*. 1999; 10: 151-155.
4. Zolala J, Farsi M, Gordan HR & Mahmoodnia M. Producing a High Scopolamine Hairy Root Clone in *Hyoscyamus muticus* through Transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal Agriculture Science Technology*. 2007; 9: 327-339.
5. Shirazi Z, Piri KH, Mirzaie Asl A & Hasanloo T. Glycyrrhizin and Isoliquiritigenin Production by Hairy Root Culture of *Glycyrrhiza glabra*. *Journal Medicine Plants Research*. 2012; 31: 4640-4646. [in persian]
6. Demirhan E & Ozbek B. Drying Kinetics and Effective Moisture Diffusivity of Purslane Undergoing Microwave Heat Treatment. *Korean Journal Chemical Engineering*. 2010; 27: 1377-1383.
7. Sharifi-Mood B, Shafaghat M, Metanat M, Saeidi S & Rad NS. The Inhibitory Effect of Ajowan Essential Oil on Bacterial Growth. *International Journal Infection*. 2014; 1(2): 21-30. [in persian]
8. Shin JK, Kim GN & Jang HD. Antioxidant and pro-oxidant effects of green tea extracts in oxygen radical absorbance capacity assay. *Journal Medicine Food*. 2007; 10(1): 32-40.
9. Londonkar R & Nayaka HB. Phytochemical and Antimicrobial Activities of *Portulaca Oleracea* L. *Journal Pharmacy Research*. 2011; 4(10): 15-23.
10. Shirmohammadi E, Saeidi S, Mohasseli T & Boogar AR. Antibacterial Effects of Silver Nanoparticles Produced by *Satureja hortensis* Extract on Isolated *Bacillus cereus* from Soil of Sistan Plain. *International Journal Infection*. 2014; 1(3): 25-32. [in persian]
11. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids and antioxidants in edible wild plants. *Biology Research*. 2004; 37(2): 263–77.
12. Yang Z, Xu Y, Jie G, He P & Tu Y. Study on the antioxidant activity of tea flowers (*Camellia sinensis*). *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 2007; 16: 148-152.
13. Xiang L, Xing D, Wang W, Wang R, Ding Y & Du L. Alkaloids from *Portulaca oleracea* L. *Phytochemistry*. 2005; 66(21): 2595-2601.
14. Maurya DK & Devasagayam TP. Antioxidant and prooxidant nature of hydroxyl cinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. *Food Chemical Toxicology*. 2010; 48: 3369-3373.
15. Lee CJ, Wilson L, Jordan MA, Nguyen V, Tang J & Smiyun G. Hesperidin suppressed proliferations of both human breast cancer and androgen-dependent prostate cancer cells. *Phototherapy Research*. 2010; 24(1): 15-19.
16. Aziz N, Farag S, Mousa L & Abo-Zaid M. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios*. 1998; 93(374): 43-54.
17. Jin MJ, Kim U, Kim IS, Kim Y, Kim DH, Han SB, Kwon OS & Yoo HH. Effects of gut

- microflora on pharmacokinetics of hesperidin: a study on non-antibiotic and pseudo-germ-free rats. *Journal Toxicology Environmental Health A*. 2010; 73(21-22): 1441-1450.
18. Zhang T, Yang X, Zhang P, Zhu M, He Z & Bi K. Determination of ferulic acid in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method: application to a pharmacokinetic study. *Analytical Letter*. 2009; 42(14): 2157-2169.
 19. Uang YS & Hsu KYA. Dose dependent pharmacokinetic study on caffeic acid in rabbits after intravenous administration. *Biopharmaceutics. Drug Disposition*. 1997; 18(8): 727- 736.
 20. Okafor A, Ezejindu N. Phytochemical Studies on *Portulaca oleracea* L. *Plant*. 2014; 3(1): 132-136.
 21. Dkhil MA, Abdel Moniem AE, Al-Quraishy S & Saleh RA. Antioxidant effect of purslane (*Portulaca oleracea*) and its mechanism of action. *Journal Medicine Plant Research*. 2011; 5: 1589-63.
 22. Inan O, Ozcan MM & Juhaimi FYA. Antioxidant Effect of Mint, Laurel and Myrtle Leaves Essential Oils on Pomegranate Kernel, Poppy, Grape and Linseed Oils. *Journal Clean Product*. 2012; 27: 151-154.
 23. Spigno G & Faveri DMD. Antioxidants from Grape Stalks and Marc: Influence of Extraction Procedure on Yield, Purity and Antioxidant Power of the Extracts. *Journal Food Engineering*. 2007; 78: 793-801.
 24. Wannes WA, Mhamdi B, Sriti J, Jemia MB, Ouchikh O, Hamdaoui G, Kchouk ME & Marzouk B. Antioxidant Activities of the Essential Oils and Methanol Extracts from Myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) Leaf, Stem and Flower. *Food Chemical Toxicology*. 2010; 48: 1362-1370.
 25. Murashige T & Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*. 1962; 15: 473-497.
 26. Zargar M, Farahani F & Nabavi T. Hairy roots production of transgenic *Catharanthus roseus* L. plants with *Agrobacterium rhizogenes* under in vitro conditions. *Biotechnology Journal*. 2010; 4(21): 2199-2203.
 27. Habibi S, Niknam V, Ebrahimzadeh H & Mirmasoumi M. Comparison of hairy root induction by various strains of *Agrobacterium rhizogenes* in *Astragalus compactus*. *Journal of Plant Researches (Iranian Journal of Biology)*. 2014; 27(5): 804-810. [in persian]
 28. Rahnema H, Hasanloo T, Shams MR & Sepehrifar R. Silymarin production by hairy root culture of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Iran Journal Biotechnology*. 2008; 6: 113-118. [in persian]
 29. Eskandari-Samet A, Piri K, Kayhanfar M & Hasanloo T. Enhancement of tropane alkaloid production among several clones and explants types of hairy root of *Atropa belladonna* L. *Journal Medicine Plant Production*. 2012; 1: 35-42. [in persian]
 30. Pirian K, Piri KH & Ghiyasvand T. Hairy roots induction from *Portulaca oleracea* using *Agrobacterium rhizogenes* to Noradrenaline's production. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*. 2012; 3(3): 642-649. [in persian]
 31. Ahmadi Moghadam Y, Piri Kh, Bahramnejad B & Ghiasvand T. Dopamine Production in Hairy Root Cultures of *Portulaca oleracea* (Purslane) Using *Agrobacterium rhizogenes*.

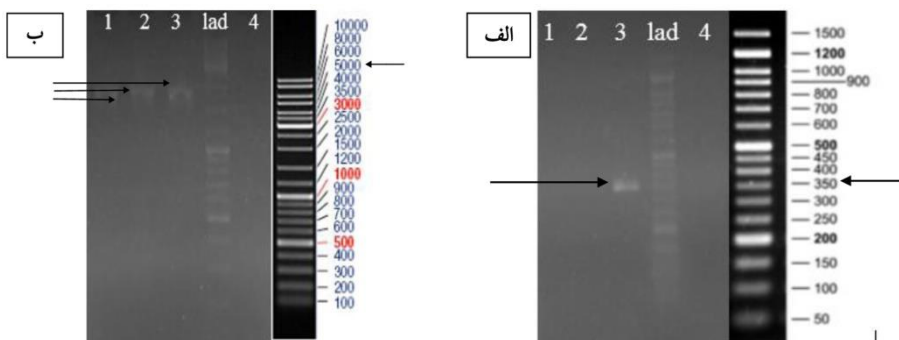
- Journal Agriculture Science Technology*. 2014; 16: 409-420. [in persian]
32. Chen J, Shi YP & Liu JY. Determination of Noradrenalin and Dopamine in Chinese Herbal Extracts from *Portulaca oleracea* L. by High-performance Liquid Chromatography. *Journal Chromatogram Analytic*. 2003; 1003(1-2): 127-132.
 33. Kukic J, Popovic V, Petrovic S, Muneagi P, Ciric A, Stojkovic D, Sokovic M. Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Cynera cardunculus* Extracts. *Food Chemical*. 2008; 107: 867-868.
 34. Sultana A & Rahman K. *Portulaca oleracea* Linn: A Global panacea with ethnomedicinal and pharmacological potential. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013; 5(2): 33-39.
 35. Mohdaly A, Smetanska I, Ramadana M, Sarhan M & Mahmoud A. Antioxidant Potential of Sesame (*Sesamum indicum*) Cake Extract in Stabilization of Sunflower and Soybean Oils. *Industrial Crops Production*. 2011; 34: 952-959.
 36. Lim YY & Quah EPL. Antioxidant properties of different cultivars of *Portulaca oleracea*. *Food Chemical*. 2007; 103: 734-740.
 37. Lievrea K, Hehna A, LeMinh Trana T, Gravota A, Thomassetb B, Bourgauda F & Gontiera E. Genetic transformation of the medicinal plant *Ruta graveolens* L. by an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method. *Plant Science*. 2005; 168: 883-888.
 38. Shakeran Z, Keyhanfar M & Asghari GR. Hairy Roots Formation in Four Solanaceae Species by Different Strains of *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Medicinal Plants and By-products*. 2014; 2: 155-160.
 39. Królicka A, Staniszevska I, Bielawski K, Maliński E, Szafranek J & Łojkowska E. Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*. *Plant Science*. 2001; 160: 259-264.
 40. Tao J & Li L. Genetic transformation of *Torenia fournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. *South Africa Journal Botany*. 2006; 72: 211-216.
 41. Chaudhuri KN, Ghosh B, Tepfer D & Jha S. Genetic transformation of *Tylophora indica* with *Agrobacterium rhizogenes* A4: growth and tylophorine productivity in different transformed root clones. *Plant cell Report*. 2005; 24: 25-35.
 42. Nguyen C, Bourgaud F, Forlot P & Guckert A. Establishment of hairy root cultures of *Psoralea* species. *Plant Cell Report*. 1992; 11: 424-427.
 43. Akramian M, Tabatabaei SMF & Mirmasoumi M. Virulence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on genetic transformation of four *Hyoscyamus* species. *Amer-Euras Journal Agriculture Environ Science*. 2008; 3: 759-763.
 44. Cheng L, Cheng Z, Liu H, Zhang H, Zhang W, Du Y, Wang Y, Li H, Ying X & Kang T. Liquid chromatographic (LC) determination of four bioactive compounds in the *Portulaca oleracea* L. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011; 5(31): 6876-6880.
 45. Giri A & Narasu ML. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advanced*. 2000; 18: 1-22.
 46. Bandyopadhyay M, Jha S & Tepfer D. Changes in morphological phenotypes and withanolide composition of Ri-transformed roots of *Withania somnifera*. *Plant Cell Report*. 2007; 26: 599-609.

47. Valko M, Rhodes CJ, Moncola J, Izakovic M & Mazura M. Mini-review: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemi-Bio Interact.* 2006; 160: 1-40.
48. Cai YZ, Luo Q, Sun M & Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Science.* 2007; 74: 2157-2184.
49. Zin ZM, Hamid AA, Osman A & Saari N. Antioxidative activities of chromatographic fractions obtained from root, fruit and leaf of Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *Food Chemical.* 2006; 94: 169-178.
50. Qing CM, Fan L, Lei Y, Bouchez D, Tourneur C, Yan L & Robaglia C. Transformation of Pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) by *Agrobacterium* infiltration. *Molecular Breeding.* 2000; 6: 67-72.

پیوست



شکل ۱- ریشه‌های موین القاء شده از ریزنمونه محور زیرپیه خرفه^۱
 الف) تلقیح با جدایه A4، باکتری، ب) تلقیح با جدایه A15 باکتری



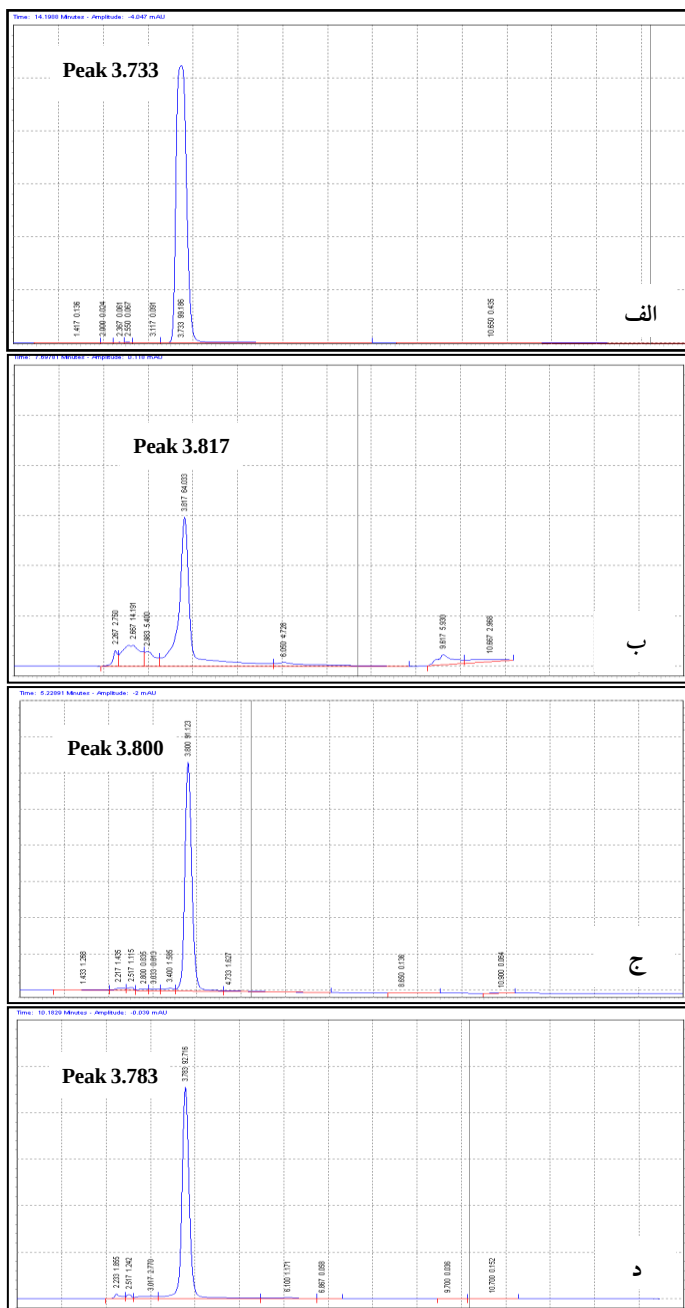
شکل ۲- تکثیر قطعه ۷۰۰ bp، ژن *rol* با واکنش PCR در ریشه‌های موین،

پرایمر B VirD338 (A) پرایمر RoIB780

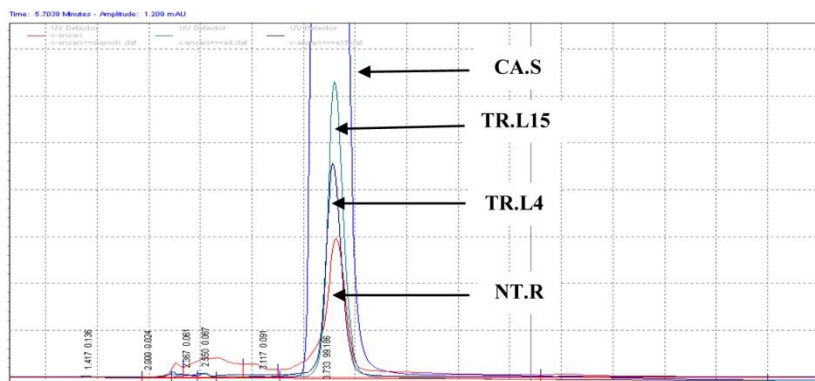
Lad: وزن مولکولی مارکر (لدر ۵۰ bp)، Lane1: DNA ریشه موین تراریخته با جدایه A4،

Lane2: DNA ریشه موین تراریخته با جدایه A15، Lane3: DNA باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز (شاهد مثبت)،

Lane4: DNA ریشه غیر تراریخته (شاهد منفی)



شکل ۳- گروماتوگرام با دستگاه HPLC، طول موج ۲۸۰ نانومتر برای تشخیص کافئیک اسید. الف) کافئیک اسید استاندارد، ب) کافئیک اسید موجود در ریشه غیر تراریخته، ج) کافئیک اسید موجود در ریشه موپین تراریخته با جدایه A4، د) کافئیک اسید موجود در ریشه موپین تراریخته با جدایه A15



شکل ۴- کروماتوگرام مقایسه‌ای با دستگاه HPLC، طول موج ۲۸۰ نانومتر برای تشخیص کافئیک اسید مورد مطالعه. کافئیک اسید استاندارد (CA.S)، کافئیک اسید موجود در ریشه غیر تراریخته (NT.R)، کافئیک اسید موجود در ریشه موپین تراریخته با جدایه A15 (NT.R15) و کافئیک اسید موجود در ریشه موپین تراریخته با جدایه A4 (NT.R4).



TR.L4 TR.L15 NT.R Control

شکل ۵- مقایسه تغییرات رنگ‌پذیری ترکیبات متابولیت‌ها براساس فعالیت آنتی اکسیدانی در خرفه، محلول DPPH (شاهد)، عصاره ریشه غیر تراریخته (NT.R)، عصاره ریشه موپین تراریخته با جدایه A15 با کتری (TR.L15)، عصاره ریشه موپین تراریخته با جدایه A4 (TR.L4).

جدول ۱- دامنه زمان بازداری (برحسب دقیقه) و دامنه سطح زیر منحنی کافئیک اسید خرفه با دستگاه HPLC، نمونه‌های استاندارد، ریشه‌های غیر تراریخته خرفه، ریشه‌های موپین تراریخته خرفه با جدایه‌های A4 و A15

نمونه	دامنه زمان بازداری (دقیقه)	قله زمان بازداری (دقیقه)	دامنه سطح زیر منحنی (%)	قله سطح زیر منحنی (%)
کافئیک اسید استاندارد	۱/۴۱۷-۱۰/۶۵	۳/۷۳۳	۰/۱۳۶-۰/۴۳۵	۹۹/۱۸۶
کافئیک اسید در ریشه غیر تراریخته	۲/۲۶۷-۱۰/۶۶۷	۳/۸۱۷	۲/۷۵-۲/۹۶۸	۶۴/۰۳۳
کافئیک اسید در ریشه موپین تراریخته با جدایه A15	۲/۲۳۳-۱۰/۷	۳/۷۸۳	۱/۸۵۵-۰/۱۵۲	۹۲/۷۱۶
کافئیک اسید در ریشه موپین تراریخته با جدایه A4	۱/۴۳۳-۱۰/۹	۳/۸۰	۰/۱۲۸-۰/۰۶۴	۹۱/۱۲۳

جدول ۲- میانگین درصد بازدارندگی (فعالیت آنتی اکسیدانی) ریشه غیر تراریخته، ریشه موین تراریخته با جدایه A15 باکتری و ریشه موین تراریخته با جدایه A4 باکتری در گیاه خرفه^۱

نمونه	میانگین درصد بازدارندگی $\pm$ انحراف معیار
ریشه غیر تراریخته	$48/927 \pm 0/0312$ a
ریشه موین تراریخته با جدایه A15	$75/43 \pm 0/0707$ a
ریشه موین تراریخته با جدایه A4	$86/737 \pm 0/2183$ a