فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال شانزدهم، شماره ۱، زمستان ۱۴۰۲ ص. ۶۴-۵۵

مقاله پژوهشی

بررسی میزان تولید ترکیبات فنلی، فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی در کالوس‌های حاصل از جداکشت‌های متنوع گیاه کاسنی (*Cichorium intybus* L.)

زهرا زارع[۱*]، مهین قائمی[۲]، فریبا عقیلی[۳]

[۱] گروه آموزش زیست شناسی، دانشگاه فرهنگیان.تهران. ایران

[۲] گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان. گرگان. ایران

[۳] گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان. گرگان. ایران.

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): z.zare@cfu.ac.ir

تاریخ دریافت: فزودین ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۲

https://doi.org/10.30495/jdb.2023.1982786.1360

چکیده

ترکیبات طبیعی آنتی‌اکسیدان می‌توانند جایگزین مناسبی در صنایع دارویی باشند. کالوس گیاه کاسنی (*Cichorium intybus* L) منبع خوبی برای تولید آنتی‌اکسیدان است. هدف پژوهش ارزیابی میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه کاسنی در شرایط درشیشه و گیاه طبیعی است. بدین منظور پس از تهیه گیاهچه‌های سالم از بذرهای کاسنی در محیط کشت (1/2MS)، جداکشت‌های ساقه، برگ و ریشه تهیه شد و جهت کالوس‌زایی در محیط‌های کشت MS مایع با تیمارهای هورمونی متفاوت کشت شد. عصاره‌های متانلی از کالوس‌های حاصل تهیه شد. محتوی فنول عصاره‌ها با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو، میزان فلاونوئید با روش رنگ‌سنجی کلریدآلومینیوم و فعالیت آنتی‌اکسیدانی از روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی با دی فنیل پیکریل هیدرازین (DPPH) ارزیابی شد. برای تعیین نوع ترکیبات فنولی موجود در عصاره از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا(HPLC) استفاده شد. نتایج نشان داد بیشترین میزان فنل کل 2.613 mg/g وزن‌تر کالوس مربوط به جداکشت برگ و با تیمار هورمونی کینتین (0.5mg/L) بیشترین میزان فلاونوئید 0.828 mg/g مربوط به جداکشت ساقه با تیمار هورمونی 2,4-D (0.5mg/L) و بیشترین میزان آنتی‌اکسیدان کل 89.35 % مربوط به جداکشت ساقه با تیمار هورمونی BAP (1mg/L) بود. بیشترین میزان اسیدکلروژنیک 0.513 mg/g مربوط به جداکشت برگ با تیمار هورمونی BAP (0.75mg/L) و بیشترین میزان اسیدکافئیک 0.009 mg/g مربوط به جداکشت ساقه با تیمار هورمونی کنیتن (1mg/L) بود. کالوس‌های حاصل از جداکشت ساقه و برگ با دارا بودن سطح مطلوبی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی می‌تواند به عنوان یک منبع آنتی‌اکسیدان طبیعی جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مورد استفاده قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: *Cichorium intybus* L، کالوس، فنل، فلاونوئید، آنتی اکسیدان، جداکشت.

مقدمه

گیاهان دارویی به عنوان یکی از مهم‌ترین منابع تامین دارو برای سلامت انسان از گذشته تاکنون مورد استفاده بوده‌اند [۱]. برخی ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در گیاهان از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به شمار می‌آیند که توان آنتی اکسیدانی بدون اثرات جانبی دارند. ترکیبات آنتی اکسیدان می‌توانند استرس اکسیداتیو در سلول‌ها را کاهش داده و قادر به مهار رادیکالهای آزاد بوده و از اکسیداسیون جلوگیری کنند [۲]. امروزه پژوهش‌های زیادی در زمینه ترکیبات آنتی اکسیدانی طبیعی به دست آمده از منابع گیاهی انجام می‌شود. از رایج ترین آنتی کسیدان های طبیعی می‌توان به فلاونوئیدها، ترکیبات‌فنلی، مشتقات اسید سینامیک، توکوفرول‌ها، اسیدهای آمینه، پپتیدها و اسیدهای آلی چند عاملی اشاره کرد [۳]. گیاه کاسنی با نام علمی *Cichorium intybus L.* متعلق به تیره آفتابگردان(Asteraceae) است. این گیاه از زمان‌های قدیم برای بیماری‌های مختلف استفاده می‌شده است؛ و دارای خواص دارویی مختلفی است [۴]. ترکیبات فیتوشیمیایی گزارش شده از بخش‌های مختلف کاسنی عبارتند از مشتقات اسیدکافئیک، فلاونوئیدها، پلی‌فنول‌ها، کاروتنوئیدها، آنتوسیانین‌ها، تانن‌ها، کومارین‌ها، لاکتون‌های سسکوی ترپن، اسیدهای چرب، پکتین، کولین‌ها، بنزو – ایزوکرومن‌ها، آلکالوئیدها، ویتامین‌ها، آمینوها و مواد معدنی [۶] [۵] [۴].

مطالعاتی توسط پژوهشگران مختلف یر روی گیاه کاسنی به صورت طبیعی و یا در کشت‌های درون شیشه‌ای به ویژه با جداکشت‌های مختلف در القا و بهینه‌سازی کالوس و یا تولید متابولیت های ثانویه انجام گرفته است که به برخی از آنها می‌توان اشاره کرد:

Hadizadeh et al (2016)، کشت بافت گیاه کاسنی را مورد بررسی قرار دادند و استفاده از کشت درون شیشه ای را برای القای ریشه‌های مویین در این گیاه که از قابلیت سنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه برخوردارند، پیشنهاد کردند [۷].

Fathi et al (2019)، بهینه‌سازی میزان تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درشیشه و در محیط کشت MS در گیاه کاسنی را بررسی و نتیجه‌گرفتند که تولید متابولیت‌های ثانویه، به عوامل مختلف و از جمله به سن و نوع ریزنمونه نیز بستگی دارد [۸].

Koohsari et al (2020)، اثر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد و نوع ریزنمونه را بر کالوس‌زایی و میزان تولید فنل و فلاونوئید گیاه کاسنی مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که دمبرگ بهترین ریزنمونه برای تولید کالوس است و بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را داراست [۶].

Fardi (2017)، در پژوهشی فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس گیاه را با استفاده از روشDPPH گزارش نمود و نشان داد که میزان فعالیت آنتی اکسیدانی با افزایش غلظت اسانس افزایش می یابد [۹].

Golshahi & Bahrami Kia (2017)، در پژوهشی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های برگ گیاه کاسنی را مورد بررسی قرار دادند و پتانسیل بالای آنتی‌اکسیدانی برگ‌های گیاه را در شرایط طبیعی نشان دادند [۱۰].

با توجه به مطالب مطرح شده هدف از این پژوهش، ایجاد کالوس از جداکشت‌های مختلف گیاه کاسنی(ریشه، ساقه و برگ) در محیط‌های کشت با مقادیر متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد و سنجش میزان ترکیبات فلاونوئیدی و فنل‌ها و همچنین سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی این کالوس‌هاست. ضرورت انجام پژوهش نیز شناسایی خواص متنوع گیاهان دارویی جهت استفاده بهینه از آن‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه بذر و ضدعفونی

بذور گیاه کاسنی (*Cichorium intubys L*) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. ابتدا جهت ضدعفونی به وسیله مایع ظرفشویی شستشو شدند، بعد از آبکشی به مدت 10 ثانیه در اتانول 70درصد قرار گرفتند و بعد از آبکشی مجدد با آب مقطر استریل، در هیپوکلریت سدیم و آب (1:5) به مدت 20 دقیقه غوطه‌ور شدند و سه مرتبه با آب مقطر استریل در شرایط استریل زیر هود لامینار کاملاً شستشو شدند [۶].

تهیه گیاهچه استریل

بذور به پتری‌دیش‌های حاوی کاغذصافی مرطوب شده زیر هود لامینار در شرایط استریل منتقل گردیدند. پتری‌دیش‌ها با نوار

پارافیلم کاملاً ایزوله شدند و به اتاقک کشت با دمای 2±23° انتقال داده شدند، بذور جوانه زده و عاری از بیماری به‌وسیله پنس و اسکالپل در شرایط استریل و زیر هود لامینار از پوشش خود جدا شدند و در محیط کشت معادل نصف غلظت موراشیگ و اسکوگ (1/2MS) همراه با 8 gr/L آگار، 30 gr/L ساکارز کشت گردیدند. از گیاهچه‌های سالم و با بنیه مناسب به عنوان ماده‌ی اولیه برای تهیه ریزنمونه‌ها استفاده شد [۱۱].

کالوس زایی

پس از بدست آوردن گیاهچه‌های کاسنی، ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه توسط اسکالپل تقریباً در اندازه‌های یکسان ($1.5 \times 1\ cm$) تهیه شدند و در محیط‌های کشت مایع با تیمارهای هورمونی 2,4-D با غلظت‌های (0,0.5,0.75,1 mg/L)، BAP (0,0.5,0.75,1 mg/L) و Kin (0,0.5,0.75,1 mg/L) جهت کالوس‌زایی قرار داده شدند. جهت هوادهی بهتر ریزنمونه های غوطه ور در محیط کشت مایع، ظروف حاوی نمونه ها در دستگاه بهمزن دوار قرار داده شد [۶].

تهیه عصاره کالوس‌ها

به منظور اندازه‌گیری فنل، فلاونوئید و آنتی اکسیدان، میزان 0.5 gr از هر نمونه کالوس تر و نمونه رشد کرده در شرایط طبیعی به همراه 5 ml متانول 80 درصد (نسبت 1 به 10) در یک هاون سرد کوبیده و همگن شدند. مواد همگن شده به لوله‌های آزمایشگاهی محافظ نوری منتقل گردید و به مدت 24 ساعت روی شیکر قرار داده شد، سپس به مدت 5 دقیقه در 3000 rpm سانتریفیوژ شد و از قسمت فوقانی عصاره برای اندازه‌گیری فنل کل، محتوای فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه‌ها استفاده گردید [۱۲].

اندازه گیری مقدار فنول کل

محتوی فنول کل با استفاده از معرف فولین - سیوکالتیو توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-Vis مدل (Unico UV 2100) اندازه گیری شد.

ابتدا $20\ \mu l$ از عصاره برداشته شد و با 1.16 ml آب مقطر و $100\ \mu l$ فولین سیوکالتیو اضافه شد و بعد از یک دقیقه استراحت، $300\ \mu l$ کربنات سدیم یک مولار (10.6 gr در 100 ml آب مقطر) به محلول افزوده شد و به مدت سی دقیقه در حمام بخار $40^{o}C$ در تاریکی قرار گرفت. در شاهد متانول 80 درصد جایگزین عصاره متانولی گردید. سپس در طول موج 760 نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر قرائت گردید[۱۳].

گالیک اسید به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار رفت و میزان فنول کل بر اساس میزان معادل "میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره" گزارش گردید. آزمایشات سه بار تکرار و میانگین آن‌ها گزارش شد.

اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید

از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم برای تعیین مقدار فلاونوئید کل استفاده شد. بدین منظور0.5 ml از عصاره متانولی با1.5 ml متانول، 0.1 ml آلومینیوم کلرید 10درصد در اتانول (10 gr آلومینیوم کلرید در 100 ml اتانول وآب مقطر)، 0.1 ml استات پتاسیم 1مولار (2.41 gr در 10 ml آب مقطر) و 2.8 ml آب مقطر مخلوط شد. برای تهیه شاهد، متانول خالص جایگزین عصاره متانولی گردید. محلول حاصل 30 min در تاریکی قرار داده شد و سپس در طول موج 415 nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. جهت رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف استاندارد کوئرستین استفاده شد از معادله خط بدست آمده برای تعیین غلظت فلاونوئید کل استفاده گردید [۱۳].

اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی به روش (DPPH)

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی به کمک دی فنیل پیکریل هیدرازین (DPPH) مورد ارزیابی قرار گرفت. DPPH ترکیبی است بنفش رنگ که به دلیل حضور گروه‌های فنیل در ساختار آن به راحتی به صورت رادیکال در آمده و در واقع منبع رادیکال آزاد می باشد. توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون توسط ترکیبات و عصاره‌های مختلف در این تست با میزان بی‌رنگ کردن یا کاهش میزان جذب

نوری محلول بنفش (DPPH) در متانول مورد سنجش قرار می‌گیرد.

به این منظور 1 ml از عصاره متانولی با 1 ml ترکیب DPPH با غلظت 0.1 میلی مولار (4 ml رادیکال در 100 ml متانول) مخلوط گردید. برای شاهد، 1 ml متانول خالص به1 ml عصاره متانولی قرار داده شد و برای بلانک از 2 ml متانول خالص استفاده شد. بعد از 30 دقیقه تاریکی، نمونه‌ها در طول موج 517 nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. اعداد به دست آمده از جذب نمونه توسط رابطه زیر به درصد مهار تبدیل شد.

$$\text{درصدمهارراديكال‌هاي‌آزاد (DPPH)} = \frac{(A_C - A_S)}{A_C} \times 100$$

در این رابطه Ac و As به ترتیب برابر با عدد جذب نمونه و کنترل می‌باشد. اعداد به دست آمده برابر با درصد مهار رادیکال‌های آزاد در عصاره متانولی (0.1 ppm) نمونه‌ها می‌باشد. کلیه آزمایشات سه بار تکرارشدند و میانگین آن‌ها گزارش شد [۱۳].

تعیین نوع ترکیبات فنولی (اسید کلروژنیک و اسید کافئیک)

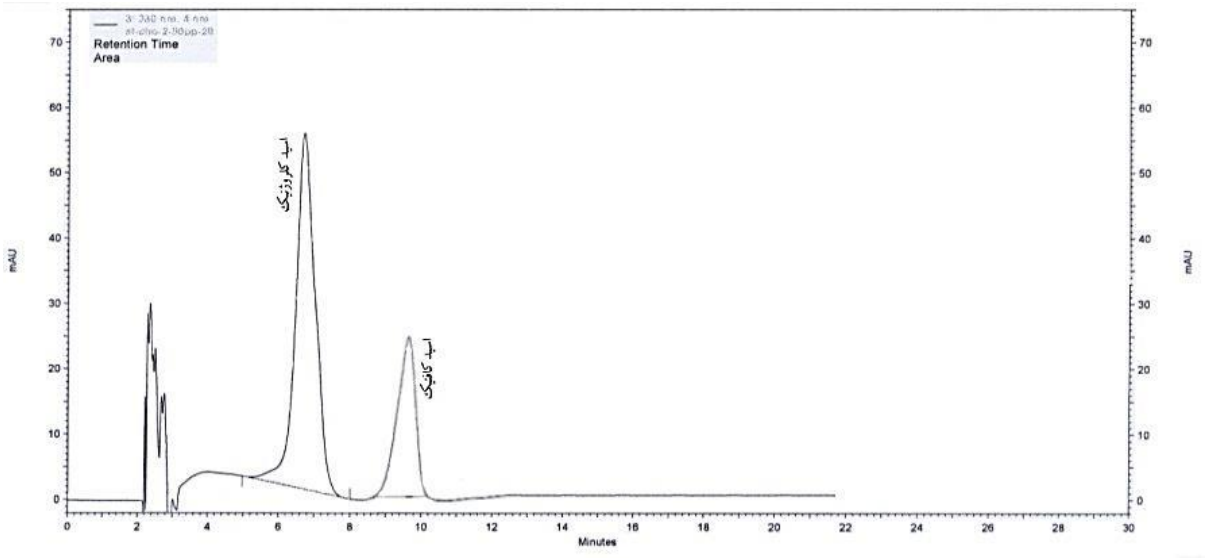
به منظور تعیین نوع ترکیبات فنولی موجود در عصاره از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده شد. برای این منظور جهت آماده‌سازی نمونه، دو گرم کالوس تر و نمونه رشد کرده در شرایط طبیعی با دقت هزارم توزین گردید و در 10 ml متانول خالص (1:5) در هاون سرد همگن شد، و به مدت 10 دقیقه در التراسوند قرار داده شد (لوله محتوی محلول کاملاً به وسیله فویل آلمینیومی در برابر نور محافظت گردید) و به مدت 12 ساعت روی شیکر قرار داده شد، سپس به مدت 10 دقیقه در دور 3500 سانتریفیوژ گردید. بخش فوقانی محلول بعد از گذشتن از فیلتر سرنگی، به ظروف مخصوص HPLC منتقل گردید و آماده تزریق به دستگاه HPLC شد.

فاز متحرک شامل 1 ml لیتراسید استیک، 89 ml آب مقطر و 10 ml استونیتریل با سرعت جریان 1ml/min و دمای $40^{\circ}c$ بود.

با مقایسه زمان تأخیر (مدت زمانی که طول می‌کشد تا ترکیب مورد نظر از ستون خارج شود) و سطح زیر منحنی نمونه با نمونه‌های استاندارد، میزان اسیدکافئیک و اسیدکلروژنیک تعیین و در نهایت بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن تر کالوس نمونه بیان گردید. [۱۵] [۱۴].

تهیه شکل کالیبراسیون برای اسید کلروژنیک و اسید کافئیک

به‌منظور رسم منحنی‌های استاندارد از استانداردهای اسیدکلروژنیک و اسیدکافئیک غلظت‌های 2 تا 100 mg/L تهیه گردید، سپس با تزریق $20\ \mu l$ از هر نمونه سطح زیر نمونه‌ها محاسبه شد (شکل ۱) [۱۶].



شکل۱- کروماتوگرام نمونه استاندارد، اسید کلروژنیک با غلظت 50 mg/L و اسید کافئیک با غلظت 7mg/L

تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمایش به صورت فاکتوریل بین تیمارهای مختلف هورمونی و جداکشت بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار صورت گرفت. مقایسه میانگین با آزمون دانکن در سطح احتمال 5 درصد تعیین شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و رسم نمودارها با استفاده از Excel انجام شد.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین تیمارها و جداکشت های مختلف مورد بررسی اثر معنی‌داری در میزان فنل، فلاونوئید و فعالت آنتی اکسیدانی مشاهده می‌شود و نتایج آماری در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار است (جدول ۱)

میزان فنل و فلاونوئید کل

مقایسه میانگین‌ها نشان داد بیشترین میزان فنل کل 2.613 میلی‌گرم بر گرم وزن تر کالوس مربوط به اثرات متقابل جداکشت برگ با تیمار هورمونی کینتین (0.5mg/L) بود که لحاظ آماری با تیمارهای اثرات متقابل جداکشت ساقه با تیمار هورمونی کینتین (0.5mg/L) و جداکشت‌های ساقه و برگ با تیمار BAP (1mg/L) اختلاف معنی‌داری نداشت. کمترین میزان فنل کل 0.5mg/L کالوس مربوط به گیاه طبیعی بود (شکل ۲).

همچنین مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین میزان فلاونوئید 0.828 میلی گرم بر گرم وزن تر کالوس مربوط به اثرات متقابل جداکشت ساقه با تیمار هورمونی 2,4-D (0.5mg/L) بود. کمترین میزان فلاونوئید 0.121 میلی گرم بر گرم وزن تر کالوس مربوط به اثرات متقابل جدا کشت ریشه با تیمار شاهد بود (شکل ۳).

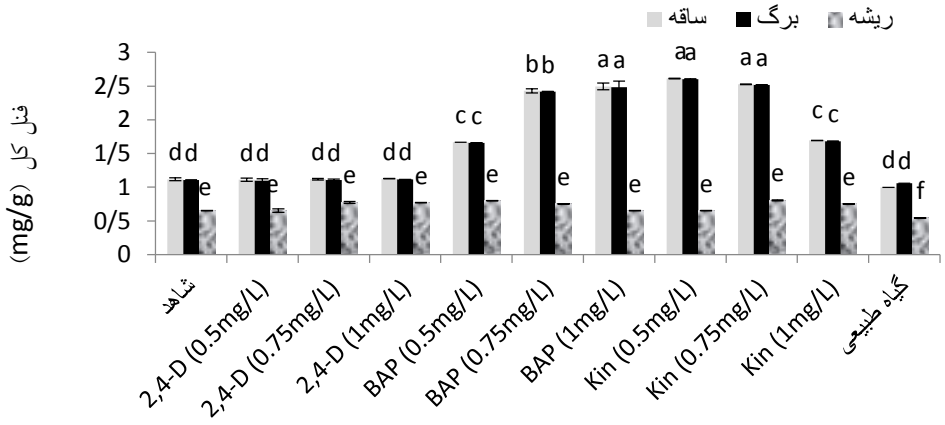
میزان فعالیت آنتی اکسیدانی

مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل هورمون و جداکشت بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد که بیشترین میزان آنتی‌اکسیدان کل (89.35 درصد رادیکال آزاد) مربوط به جداکشت ساقه با تیمار هورمونی BAP (1mg/L) بود و کمترین میزان آنتی‌اکسیدان کل (45.32درصد رادیکال آزاد) مربوط به جدا کشت ریشه با تیمار هورمونی 2,4-D (0/5 mg/L) بود (شکل ۴).

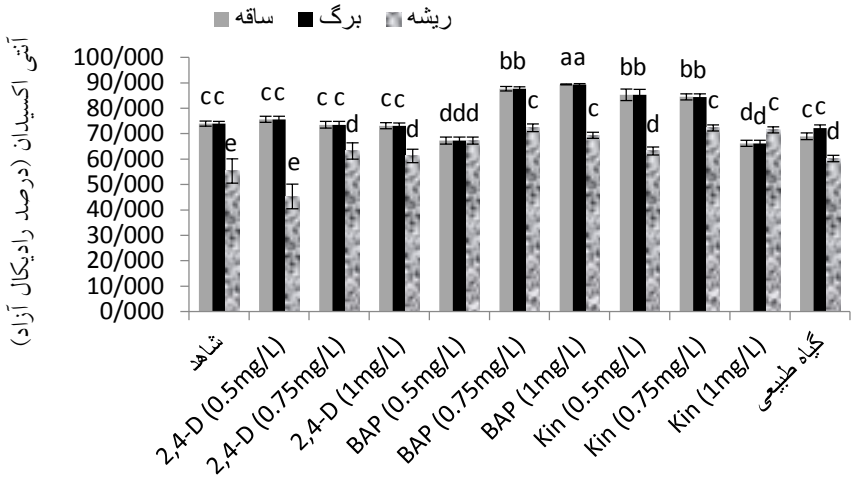
جدول ۱- تجزیه واریانس میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی کالوس‌ها تحت تاثیر تیمارهای مختلف هورمون

منابع تغییرات	درجه آزادی	فنل کل	فلاونوئید کل	آنتی‌اکسیدانت	اسید کلروژنیک	اسید کافئیک
تیمار	10	3.85*	3.08*	89.25*	0.354*	0.004*
اندام	2	2.613*	1.98*	66.14*	0.301*	0.003*
تیمار * اندام	20	1.92*	1.66*	42.36*	0.48*	0.0001*
خطا	33	45.632	22.362	16.85	48.632	16.325
درصد ضریب تغییرات		5.414	6.704	48.36	3.525	6.184

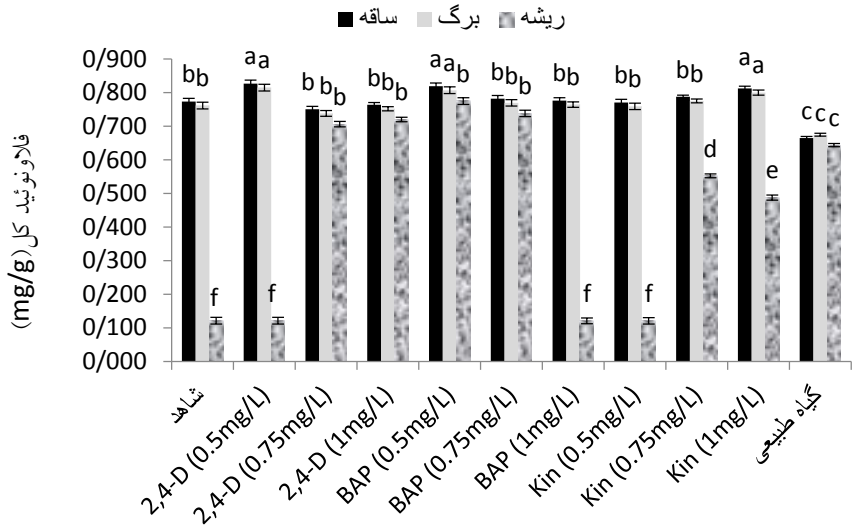
* اختلاف معنی‌دار در سطح ۵%



شکل ۲- مقایسه میانگین های مربوط به اثرات متقابل تیمارهای هورمونی و جداکشت روی میزان فنل کل



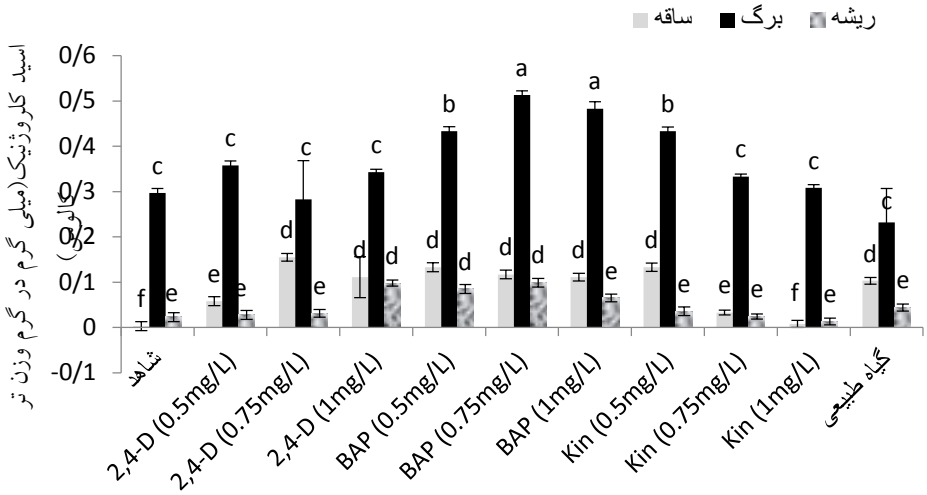
شکل ۳- مقایسه میانگین‌های مربوط به اثرات متقابل تیمارهای هورمونی و جداکشت بر میزان فلاونوئید



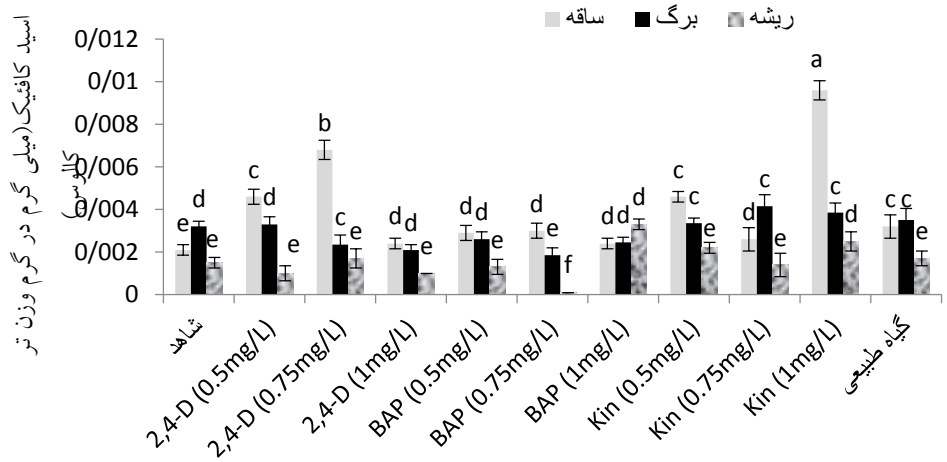
شکل ۴- مقایسه میانگین‌های مربوط به اثرات متقابل تیمارهای هورمونی و جداکشت بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی

در بررسی میزان اسیدکلروژنیک نتایج مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل تیمارهای هورمونی و جداکشت نشان داد، که بیشترین میزان اسید کلروژنیک 0.513 میلی گرم بر گرم وزن تر کالوس مربوط به جداکشت برگ با تیمار هورمونی BAP (0.75mg/L) بود که البته از لحاظ آماری با تیمار اثرات متقابل جداکشت برگ با تیمار هورمونی BAP (1mg/L) اختلاف معنی‌داری نداشت. کمترین میزان اسیدکلروژنیک نیز مقدار 0.003 میلی‌گرم بر گرم وزن تر کالوس مربوط به جدا کشت ساقه با تیمار شاهد بود (شکل ۵).

مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل تیمارهای هورمونی و جداکشت نیز نشان داد، که بیشترین میزان اسیدکافئیک 0.009 میلی‌گرم بر گرم وزن تر کالوس مربوط به اثرات متقابل جداکشت ساقه با تیمار هورمونی کنیتن (1mg/L) و کمترین میزان اسید کافئیک 0.0001 میلی‌گرم بر گرم وزن تر کالوس مربوط به اثرات متقابل جداکشت ریشه با تیمار هورمونی BAP(0/75 mg/L) بود (شکل ۶).



شکل ۵- مقایسه میانگین‌های مربوط به اثرات متقابل تیمارهای هورمونی و جداکشت بر میزان اسیدکلروژنیک



شکل ۶- مقایسه میانگین‌های مربوط به اثرات متقابل تیمارهای هورمونی و جداکشت بر میزان اسیدکافئیک

بحث

ترکیبات فنلی دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بسیارقوی بوده و سبب حذف رادیکال های آزاد و جلوگیری از تجزیه هیدروپروکسیدازها به رادیکال های آزاد می‌شوند [۱۷] و [۱۸]. فلاونوئیدها از مهم‌ترین ترکیبات فنلی موجود در گیاهان هستند که توانایی بالایی در بازدارندگی رادیکال‌های سوپراکسید دارند [۱۹]. مطالعات انجام شده نقش اکوفیزیولوژی این ترکیبات را به عنوان یکی از شاخص‌های حساس به تغییرات محیطی و همچنین، یکی از نشانگرهای بیوشیمیایی دفاعی گیاه در برابر تنش های محیطی نشان می دهد [۱۸].

افزایش عوامل کنترل کننده تنش در برابر عوامل استرس زا که در این پژوهش غلظت هورمون و ترکیبات تشکیل دهنده محیط کشت هستند، از جمله مهمترین دلایل افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه محسوب می‌شوند.

همچنین Bystricka et al (2010) نشان دادند که میزان و نوع ترکیبات فنلی در گیاهان دارویی به گونه، نوع اندام و مرحله رشد گیاه بستگی دارد[۲۰]. تنوع جداکشت‌های مورد استفاده در این پژوهش نیز بدین منظور انتخاب شده است.

نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین میزان فنل کل2/613 میلی‌گرم بر گرم وزن تر کالوس مربوط به اثرات متقابل جداکشت

برگ با تیمار هورمونی کینتین (0.5mg/L) بود. همچنین بیشترین میزان فلاونوئید 0/828 میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر کالوس مربوط به اثرات متقابل جداکشت ساقه با تیمار هورمونی 2,4-D (0.5mg/L) بود. بیشترین میزان آنتی‌اکسیدانت کل (89.35 درصد رادیکال آزاد) مربوط به اثرات متقابل جداکشت ساقه با تیمار هورمونی BAP (1mg/L) بود. بیشترین میزان اسید کلروژنیک 0/513 میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر کالوس مربوط به اثرات متقابل جداکشت برگ با تیمار هورمونی BAP (0.75mg/L) و بیشترین میزان اسید کافئیک 0/009 میلی گرم بر گرم وزن‌تر کالوس مربوط به اثرات متقابل جداکشت ساقه با تیمار هورمونی کینتین (1mg/L) بود.

به نظر می‌رسد که در این محیط افزایش غلظت هورمون به عنوان یک عامل استرس‌زا سبب افزایش واکنش سلول به محیط و در نتیجه تجمع بیشتر عوامل مهار رادیکال‌های آزاد شده است. همچنین جداکشت ساقه و برگ نسبت به جداکشت ریشه پاسخ‌های شدیدتری به افزایش غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد در جهت تولید ترکیبات آنتی اکسیدانی نشان داده‌اند؛ این نتایج با نتایج پژوهش‌های Fazeli Nasab et al (2015)، که نشان دادند عصاره هیدروالکلی برگ های گیاه کنار (*Ziziphus mauritiana* L.) نسبت به سایر اندام‌ها توان آنتی‌اکسیدانی بیشتری دارد، هم سو است [۲۱]. همچنین با پژوهش‌های Rashedi et al (2015)با گزارش بیشتر بودن محتوای فنل و فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی برگ و ساقه گیاه علف مار (Capparis spinosa L) نسبت به سایر اندام‌های رویشی و زایشی هم سو است [۲۲]، همچنان که در پژوهش حاضر نیز کالوس‌های حاصل از جداکشت های برگ و ساقه نسبت به کالوس‌های حاصل از جداکشت ریشه میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و آنتی‌اکسیدانی بیشتری نشان داده‌اند.

نتایج این پژوهش از نظر وجود اسیدکلروژنیک و اسیدکافئیک به عنوان ترکیبات فنولی در عصاره‌های کالوس‌های کاسنی و نقش آن‌ها در ایجاد فعالیت آنتی اکسیدانی با گزارش‌های پژوهش Ky et al (2001) در بین ارقام قهوه هم سو است. آنان دریافتند که بالاتر بودن خواص آنتی اکسیدانی در قهوه روبوستا نسبت به قهوه آرابیکا به دلیل بالاتر بودن دو ترکیب اسیدکلروژنیک و کافئین در رقم روبوستا نسبت به رقم دیگر است [۲۳].

همچنین نتایج پژوهش با پژوهش‌های Allah Dadi & Mosharraf Borojeni (2017)، در ارتباط با وجود اسیدهای کلروژنیک و کافئیک به عنوان دو نمونه از عمده‌ترین اسیدهای فنولیک در گیاه کنگر فرنگی(Cynara scolymus L.) که موثر در جذب رادیکال‌های آزاد سلول‌ها هستند و نقش پاداکسندگی ایفا می‌کنند، هم‌سو است [۲۴]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسیدکلروژنیک توسط Sato et al (2011) نیز گزارش شده است [۲۵]. همچنین Vogt (2010) نیز ترکیبات هیدروفیل از جمله فنول را در عصاره های قطبی، مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی دانسته است [۱۹].

به طور کلی نتایج این پژوهش با نتایج پژوهش‌های Hodaie et al (2017) از نظر میزان کل ترکیبات فنلی، محتوای فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی موجود در چند گونه از گیاهان داوودی که متعلق به تیره کاسنی می‌باشند هم سو است [۲۶]. گونه‌های داوودی هم‌خانواده با گیاه کاسنی بوده و ترکیبات فنلی مشابهی برخودارند. همچنین نتایج این پژوهش با پژوهش دیگری که در ارتباط با گیاه اونوپوردون (Onopordon) از همین خانواده (کاسنی) توسط Valizadeh et al (2013) صورت گرفته است هم‌سو می‌باشد. ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی موجود در عصاره‌ی تام این گیاه نیز سبب فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن شده است [۲۷].

در این مطالعه، ارتباط خوبی بین میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی مشاهده شـد.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین عصاره‌های مختلف کالوس‌ها از نظر مقدار کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی بوده که وجود چنین تنوعی می‌تواند بیانگر نقش برهم‌کنش تنظیم‌کننده‌های رشد و نوع اندام انتخاب شده در تولید این ترکیبات در کشت درشیشه باشد.

بر اساس نتایج این مطالعه کالوس‌های حاصل از جداکشت ساقه و برگ با دارا بودن سطح مطلوبی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی می‌تواند به عنوان یک منبع آنتی اکسیدان طبیعی به

عنوان جایگزین آنتی اکسیدان‌های مصنوعی مورد استفاده قرار گیرد.

Reference

[1] Akçam O.E. Alkaloid Production in Tissue Cultures of *Papaver somniferum* L. cv. Office-95. *Plant Tissue Cult. Biotech*. 2006; 16: 1-4.

[2] Mohajerani M. Antioxidant activity and total phenolic content of *Nerium oleander* L. grown in north of Iran. Iran J Pharm Res, 2012; 11(4):1121-1126.

[3] Azadmard Damirchi S. Edible oils. Amidi. Press. 2010. Tehran.

[4] Singh R., Kaur Chahal K. Cichorium intybus L: A review on phytochemistry and pharmacology. Int. j. chem. Stud, 2018; 6(3): 1272-1280.

[5] Janda K., Gutowska I., Geszke Moritz M., Jakubczyk K. The Common Cichory (Cichorium intybus L.) as a Source of Extracts with Health-Promoting Properties, A Review. *Molecules*, 2021; 26: 1814.

[6] Koohsari A, Chalavi V, Akbarpour V. Effect of explant type and growth regulators on callus formation and chicory secondary metabolites. *JOPPR*, 2020; 27(2): 59-72.

[7] Hadizadeh H, Mohebodini M, Esmaeilpoor B. Effects of auxins on induction and establishment of adventitious and hairy roots culture of the medicinal plant chicory (*Cichorium intybus* L.). *IJMAPR*, 2016; 32(3):397-389.

[8] Fathi R., Mohebodini M., Chamani E. Hairy root induction in chicory for secondary metabolites production. *Genetic Engineering and Biosafety Journal* (*JGEB*).2019; 8(1):63-76.

[9] Fardi F. Determination of chemical compounds and antioxidant properties of chicory plant (Cichorium intybus) from Razavi Khorasan province. *The fourth international conference on applied research in chemical and biological sciences*. 2017.

[10] Golshahi F., Bahrami Kia S. measurement of antioxidant activity and iron chelating activity of whole chicory leaf extract. *The fourth international conference on applied research in chemical and biological sciences*.2017.

[11] Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant, 1962;15(3): 473- 97.

[12] Zohouri A. Tabatabaee Yazdi F. Mortazavi S.A., Shahidi F. Comparision of efficiency and extraction of color and natural compounds from red beet by maceration and ultrasonic extraction methods. *JFST*, 2014; 52(13): 50-56.

[13] Ebrahimzade M.A., Pourmorad F., Hafezi S. Antioxidant Activities of Iranian Corn Silk. Turk. J. Biol, 2008; 32:43-49.

[14] Trajtemberg S. P., Apostolo N.M. Fernandez g. Calluses *of Cunara cardunculus* Var. *cardunculus* cardoon (Asteraceae): Determination of cynarine and cholorogenic acid by auyomated high-performance capillary electrophoresis. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2008; 42:537-537.

[15] Santos-games P. C., Seabra R. M., Andrade P. B., Fernandes-Ferreira M. Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (Salvia officinalis L.). J. Plant Physiol. 2003; 160:1025-1032.

[16] Chen X., Xiao J. RP-HPLC-DAD detrmination of flavonoids: Separation of Quercetin, luteolin and Apigenin in *Marchantia convolute.* Iran J Pharm Res. 2005; 3:175-181.

[17] Zheng W., Wang S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric.Food Chem*. 2001; 49: 5165-5170.

[18] Razali N., Razab R., Junit S.,Abdulaziz A. Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale* L.). *Food Chem*. 2008; 111: 38-44.

[19] Vogt T. Phenyl propanoid biosyntesis. *Mol Plant*, 2010; 3: 2-20.

[20] Bystricka J., Vollmannova A., Margitanova E., Cicova I. Dynamics of polyphenolics formation in different plant parts and different growth phases of selected buckwheat cultivars. *Acta Agric. Slov*. 2010; 95: 225-229.

[21] Fazeli Nasab B., Siros Mehr A., Mirzaei N., Soleimani M. Evaluation and

comparison of phenol content, total flavonoids and antioxidant performance of leaves and fruits in 14 different genotypes of (Ziziphus mauritiana L.) in southern Iran. EJMP, 2015; 4(4): 1-14

[22] Rashedi H., Amiri H., Gharezi A. Assessment of phytochemical and antioxidant properties of the *Capparis spinosa* L. Khuzestan province. *J. Qazvin Univ. Med. Sci. Health Serv*, 2015; 18: 11-17.

[23] Ky C.L., Louarn J., Dussert S., Guyot B., Hamon S., Noirot M. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild Coffea Arabica L. and C. canephora P. accessions. *Food Chem*, 2001; 75: 223-230.

[24] Allah Dadi M., Mosharraf Borojeni L. Investigating the effect of harvesting time on some phytochemical properties of medicinal plant leaves (Cynara scolymus L). EJMP, 2017; 6(4): 40-54.

[25] Sato Y., Itagaki S., Kurokawa T., Ogura J., Kobayashi M., Hirano T., Sugawara M., Iseki K. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int. J. Pharm*, 2011; 403: 136-138.

[26] Hodaie M., Rahim Malek M., Arzani A. Evaluation of some bioactive compounds and antioxidant activity of methanolic leaf extract and the amount of flower essence of different cultivars of chrysanthemum plant. *Plant Prod. Res. J*, 2017; 25(4): 133-143.

[27] Valizadeh A., Ostad Rahimi A., Fathollahi Zenouz N. Investigating the antioxidant potential of the whole plant extract of Onopordon leptolepis L. in in vitro conditions. *Depiction of Health*, 2013; 2(4): 15-9.

Journal of Developmental Biology
Vol. 16, No.1, Winter 2024

Investigating the amounts of phenolic compounds, flavonoids production and antioxidant activity in calluses obtained from different cultivars of chicory (Cichorium intybus L.)

Zare Z. [1]*, Ghaemi M.[2], Aghili F.[3]

[*1] Assistant Professor, Department of Biology Education, Farhangian University. Tehran, Iran.
[2] professor assistant, Department of Biology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran.
[3] MA., Department of Biology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran.

* (Corresponding author): z.zare@cfu.ac.ir

https://doi.org/10.30495/jdb.2023.1982786.1360

Received: March .2023 Accepted: June.2023

Abstract

Natural antioxidant compounds can be a suitable substitute in pharmaceutical industries. Callus of (Cichorium intybus L) is a good source for antioxidant production. The research aim is to evaluate the amounts of phenolic compounds, flavonoid and antioxidant activity of plant in vitro and natural conditions. For this purpose, after preparing healthy seedlings from chicory seeds in (1.2 MS) culture medium, stem, leaf and root explants were prepared and cultured for callus formation in liquid MS with different hormone treatments. Methanolic extracts were prepared from each Callus.The phenolic content and flavonoid were determined by Folin – Ciocalteu and aluminum chloride methods and antioxidant activity by measuring the reduction of radical capacity by DPPH. The HPLC method was used to determine the type of phenolic compounds in the extracts.The results showed the highest amount of total phenol is 2.613 mg/g of the Callus weight related to the leaf explant with Kin (0.5mg/L), the highest amount of flavonoid is 0.828 mg/g related to the stem explant with 2,4-D (0.5mg /L) and the highest amount of total antioxidant was 89.35% related to the stem explant with BAP (1mg/L).The highest amount of chlorogenic acid was 0.513 mg/g related to the leaf explant with BAP (0.75 mg/L) and the highest amount of caffeic acid was 0.009 mg/g related to the stem explant with Kin (1 mg/L).The Callus obtained from stem and leaf explants, having a good level of phenolic and flavonoid compounds, can be used as a source of natural antioxidants instead of synthetic antioxidants.

Keywords: *Cichorium intybus* L, callus, phenol, flavonoid, antioxidant, explant.