
LEK. SIROV.	God. XXXIV	Broj 34	Str. 55 – 67	Beograd 2014.
LEK. SIROV.	Vol. XXXIV	No. 34	Pp. 55 – 67	Belgrade 2014.

Originalni naučni rad – Original scientific paper

Rukopis primljen: 9.10.2014.

UDC: 635.54:543

Prihvaćen za publikovanje: 4.11.2014.

PRODUKCIJA HLOROGENE KISELINE U KULTURI TRANSFORMISANIH BILJAKA *CICHORIUM INTYBUS* L.

**Milica Bogdanović¹, Milan Dragičević¹, Angelina Subotić¹,
Ana Simonović¹, Slađana Todorović¹**

¹Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu, Bulevar despota Stefana 142, 11060 Beograd, Srbija

IZVOD

U ovom radu je, nakon transformacije cikoriije pomoću *Agrobacterium rhizogenes* i dobijanja kulture transformisanih korenova i transformisanih regeneranata, analiziran sadržaj hlorogene kiseline (HK) u datim kulturama. Od tri ispitivana klona transformisanih korenova cikoriije, klon 13 se odlikovao izuzetno visokom produkcijom biomase, pa je i količina HK u datoj kulturi bila najviša, tj. 400 puta veća od količine u kulturi netransformisanih korenova. Zahvaljujući spontanoj regeneraciji dati sistem je unapređen, što je omogućilo praćenje promene u nivou HK ne samo između klonova, već i između određenih stadijuma razvića klonova (rozete i biljke u cvetu) i njihovih delova (koren i list). Pokazano je da produkcija HK zavisi kako od klona, tako i od fenofaze u kojoj se dati klon nalazi. U fazi rozete klonova 13 i 36 najveća količina HK detektovana je u korenovima, dok je u fazi cvetanja ovih klonova izmeren znatno niži nivo. Klon 35 je u fazi rozete produkovao najmanju količinu HK, dok je u fazi cvetanja u korenovima datog klona izmeren najviši sadržaj HK. Među regenerantima klon 13 je najbrže rastao a samim tim i najviše produkovao HK.

U ovom radu po prvi put je analiziran sadržaj HK u transformisanim regenerantima cikoriije, a dobijeni rezultati ukazuju da je kultura transformisanih biljaka cikoriije podjednako dobar izvor HK kao i tečna kultura transformisanih korenova.

Ključne reči: cikoriija, *in vitro*, *Agrobacterium rhizogenes*, spontanaregeneracija, hlorogena kiselina.

UVOD

Cichorium intybus L., u narodu poznata još i kao cikorija, vodopija, cigura i ženetrga, je višegodišnja biljka rozetaste forme, vretenastog korena i plavih cvetova koji se obrazuju na goloj stabljici. Ova vrsta široko je rasprostranjena u Evropi, Aziji i severnoj Africi, a introdukovana je i u severnu, tropsku i u južnu Ameriku, južnu Afriku, Australiju i na Novi Zeland. U Srbiji raste pored puteva, po zidinama, na oranicama, livadama, kao i na pustim neobrađenim mestima. Prve podatke o cikoriji kao korisnoj i lekovitoj biljci nalazimo još u staroegipatskim papirusima. U starom Rimu cikorija je konzumirana kao salata i kao lek za želudačne bolesti. Danas se ova vrsta koristi u tradicionalnoj medicini za poboljšanje apetita i varenja, u lečenju malarije, kamena u žuči i posekotina [1]. *C. intybus* ima antimikrobno, antiinflamatorno, hepatoprotektivno, antimalarijsko, vermucidno i antikancerogeno dejstvo [1]. Visoku biološku i nutritivnu vrednost cikorija poseduje zahvaljujući brojnim metabolitima. Do sada je iz ekstrakata *C. intybus* izolovano i identifikovano preko 100 različitih jedinjenja [1]. Koren cikorije sadrži i do 40% inulina, polimera fruktoze, koji se koristi kao zaslađivač i prebiotik [2]. U znatno manjoj količini detektovani su eskulin, flavonoidi i vitamini [3], kao i seskviterpensi laktoni (gvajanolidi, eudeznanolidi i germakranolidi), veoma važna grupa fiziološki aktivnih jedinjenja [4, 5]. Od fenolnih jedinjenja u ekstraktima cikorije najzastupljenija je cihorinska kiselina [6]. Osim ove hidrosicimetne kiseline, *C. intybus* proizvodi i hlorogenu, kafeoiltartaričnu i kafeinsku kiselinu [1, 6]. Hlorogena kiselina široko je rasprostranjena u biljnom svetu i poseduje značajnu biološku aktivnost koja je često povezana sa visokom antioksidativnom aktivnošću [7, 8]. Ova hidrosicimetna kiselina ima antimikrobno [9], antikarcinogeno [8], antiinflamatorno [10], antiviralno [9], hipoglikemijsko [11] i radioprotektivno dejstvo [12].

Poslednjih godina konvencionalne metode gajenja lekovitih biljaka u prirodi primat ustupaju *in vitro* tehnologiji gajenja i produkciji biološki aktivnih sekundarnih metabolita u kontrolisanim uslovima [13]. Posebno mesto zauzima kultura transgenih korenova koja zahvaljujući visokoj produkciji biomase, omogućava kontinuiranu proizvodnju datih jedinjenja u većoj količini nego gajenjem biljaka u prirodi, što je veoma važno u slučaju retkih i spororastućih biljnih vrsta [13]. Zahvaljujući genetičkoj stabilnosti biljnog materijala gajenog u kontrolisanim uslovima, produkcija ciljnih metabolita je tokom vremena stabilna i konstantna [14]. Ranija istraživanja su ukazala da kulture transformisanih korenova cikorije poseduju ogroman potencijal u proizvodnji farmaceutski važnih metabolita. Kulture transformisanih korenova *C. intybus* sintetišu eskulin i eskuletin [15], biološki aktivne seskviterpenske laktone [5, 16], kao i hidrosicimetne kiseline [16] i neka isparljiva jedinjenja [17]. Međutim, o sadržaju sekundarnih metabolita u transformisanim regenerantima cikorije ali i drugih vrsta, generalno jako se malo zna. Mi smo u ranijim eksperimentima pratili sadržaj

gvajanolida u transformisanim regenerantima cikoriije i utvrdili zavisnost količine posmatrane grupe seskviterpenskikh laktona od fenofaze u kojoj se biljka nalazi [5]. Prema našem saznanju to je i jedino istraživanje produkcije sekundarnih metabolita u transformisanim regenerantima *C. intybus*.

U ovom radu smo ranije uspostavljeni sistem transformisanih korenova i regeneranata iskoristili za proučavanje produkcije HK, kao predstavnika druge važne grupe sekundarnih metabolita, fenolnih jedinjenja. Pored toga cilj nam je bio i selekcija klonova sa najvećom produkcijom HK i utvrđivanje zavisnosti produkcije HK od fenofaze u kojoj se nalaze transformisani regeneranti.

MATERIJAL I METODE

1. Kultura transformisanih korenova i spontana regeneracija

Uspostavljanje kulture klijanaca, uslovi *in vitro* gajenja biljaka, transformaciju pomoću *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS, kao i regeneraciju biljaka u kulturi transformisanih korenova smo opisali u prethodnom radu [5]. Transformisani korenovi, kao i kontrolni netransformisani korenovi rasli su na MS medijum bez hormona u prisustvu 6 g l⁻¹ agara i 30 g l⁻¹ saharoze.

2. UPLC-MS kvantifikacija hlorogene kiseline

Biljni materijal sprasjen u tečnom azotu (po 100 mg korenova i 400 mg listova) ekstrahovan je u metanolu sa dodatkom 0,133% mravlje kiseline. Uzorci su sonifikovani 10 min a zatim centrifugirani na sobnoj temperaturi 5 min na 21000 g. Ekstrakcija je ponovljena dva puta, supernatanti su spojeni, razblaženi dejonizovanom vodom u odnosu 1:1 i profiltrirani kroz filtere Minisart® RC15 (#17761R, Sartorius, Goettingen, Nemačka). Sadržaj hlorogene kiseline je analiziran ranije opisanom UPLC-MS/MS metodom [5]. Analize su urađene na Waters Xevo tandem masenom spektrometru (Waters, Milford, Massachusetts, SAD), opremljenim elektrosprej jonizacionim izvorom, i vezanim za Acquity UPLC (Waters) tečni hromatograf. Korišćena je Acquity BEH C18 kolona za razdvajanje (dimenzije kolone 100, 2,1 mm, 1,7 µm; Waters). Mobilna faza se sastojala od vode sa 0,1% mravlje kiseline (A) i acetonitrila (B). Korišćena je elucija sa linearnim gradijentom: 0 min, 5% B; 1,25 min 5% B, 3,55 min, 50% B; 7,1 min, 90% B; 7,85 min 90% B; 8 min, 5% B i 9,85 min, 5% B. Brzina protoka iznosila je 0,5 ml min⁻¹, a injektirana je zapremina od 10 µl. Maseni spektrometar je radio u pozitivnom modu uz kapilarnu voltažu od 3,0 kV. Protok gasa u konusu je iznosio 50 l h⁻¹ a tokom desolvacije 100 l h⁻¹. Temperatura izvora je podešena na

150 °C, dok je desolvaciona temperatura iznosila 650 °C. MRM prelazi su optimizovani korišćenjem Waters Intellistart konzole.

3. Statistička analiza podataka

Statistička analiza podataka urađena je korišćenjem softvera OriginPro 8 (OriginLab Corporation) i Statistica 8 (StatSoft, Inc). Određivanje statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti realizovano je upotrebom analize varijanse (ANOVA) i Fisher LSD *posthoc* testa sa nivoom značajnosti od $P < 0,05$. Različita slova koja prate numeričke vrednosti ukazuju na statistički značajne razlike. Tokom analize sadržaja HK u tečnoj kulturi transformisanih korenova, kada su poređena dva skupa podataka, za kontrolu i tretman, značajnost razlika je utvrđena Studentovim t-testom sa nivoom značajnosti $P \leq 0.05$. Svi eksperimenti su ponovljeni 3 puta. Tačke na graficima predstavljaju srednje vrednosti \pm SE.

REZULTATI I DISKUSIJA

1. Regeneracija transgenih biljaka u kulturi transformisanih korenova

Za eksperimente koji su prikazani u ovom radu korišćene su kulture tri klona transformisanih korenova *C. intybus* (klon 13, 35 i 36) čija je transgena priroda ranije potvrđena [5]. Apikalni eksplantati transformisanih i netransformisanih korenova uspešno su rasli na MS podlozi i već nakon 4 nedelje na njima su se spontano obrazovali prvi pupoljci (Slika 1).

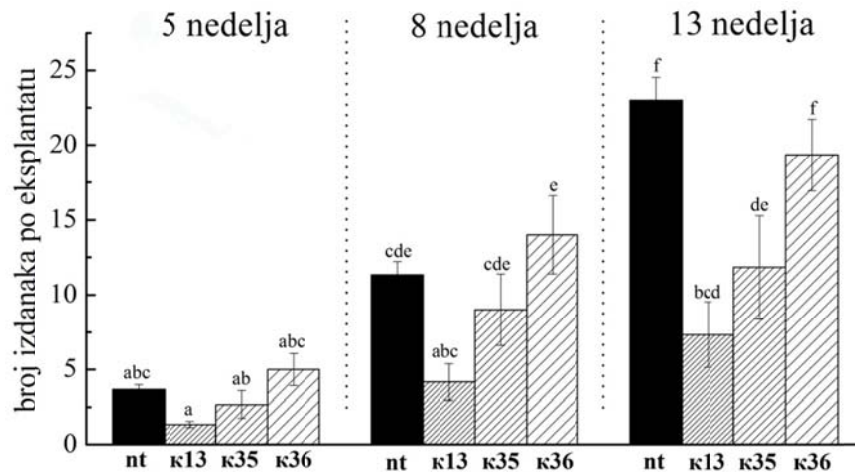
Slika 1. Spontana regeneracija u kulturi transformisanih korenova cikoriје.

Picture 1. Spontaneous regeneration in the Cichory hairy root culture.



Grafikon 1. Spontana regeneracija u kulturi netransformisanih i transformisanih korenova cikorije.

Figure 1. Spontaneous regeneration in transformed and nontransformed Chicory root cultures.



Nt – kultura netransformisanih korenova; k13, k35 i k36 – klonovi transformisanih korenova. Rezultati na grafiku predstavljaju srednje vrednosti tri nezavisna eksperimenta \pm SE ($n = 30$). Vrednosti označene različitim slovima pokazuju statistički značajnu razliku ($P \leq 0,05$).

Nt – nontransformed roots; k13, k35 i k36 – hairy root clones. The values are means of 3 independent experiments \pm SE ($n = 30$). Different letters denote significant differences ($P \leq 0.05$).

Tokom eksperimenta broj obrazovanih pupoljaka se povećavao, da bi nakon 3 meseca iznosio u proseku preko 20 pupoljaka po eksplantatu netransformisanih korenova (Grafikon 1). Slični potencijal regeneracije posedovao je i klon 36, dok su druga dva klona 13 i 35, obrazovali statistički značajno manji broj pupoljaka. Spontana regeneracija u kulturi korenova cikorije bila je očekivana imajući u vidu raniji rad [18] u kome je pokazano da se pupoljci spontano obrazuju na transformisanim korenovima. I kod drugih biljnih vrsta zabeležena je spontana regeneracija i rast pupoljaka u kulturi transformisanih korenova [19, 20]. Međutim, poznati su i slučajevi kada regeneracija izostaje ili je veoma otežana čak i nakon njihovog gajenja na hranljivim podlogama sa biljnim regulatorima rastenja [21]. Još uvek se ne zna tačan uzrok odsustva regeneracije u kulturi transformisanih korenova nekih vrsta [22]. Pojava regeneracije kod *G. punctata* nakon dugogodišnje subkultivacije transformisanih korenova sa eksprimiranim *rolA*, *B* i *C* genima povezana je sa delecijom datih gena u regenerantima [22]. Poznati su i drugi

slučajevi odsustva *rol* gena u regenerantima obrazovanim na transformisanim korenovima [23, 24]. U ranijem radu smo pratili ekspresiju *rol* gena u regenerantima [5] i moguće je da ekspresija ovih gena dovodi do poremećaja homeostaze endogenih hormona koji uzrokuje smanjenje regenerativnog potencijala. Novoobrazovani regeneranti cikorijske su dalje korišćeni za ispitivanje produkcije hlorogene kiseline u *in vitro* uslovima.

2. Produkcija hlorogene kiseline u kulturi transformisanih korenova i transgenih biljaka cikorijske

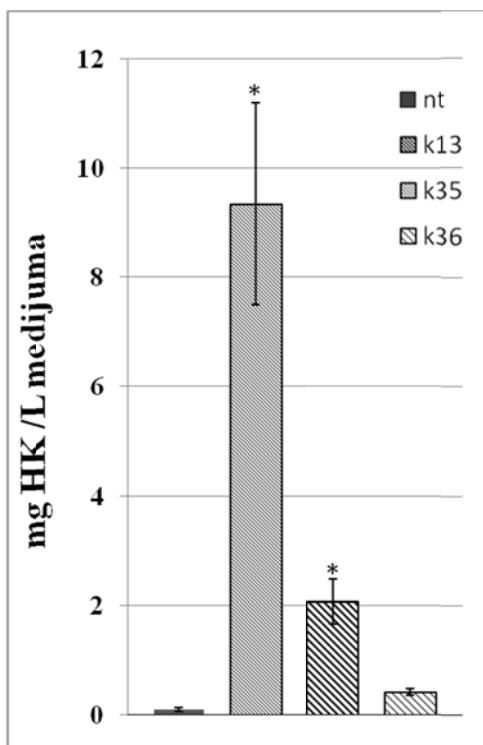
Sadržaj HK ispitivan je kako u tečnoj kulturi transformisanih korenova, tako i u korenovima i listovima transformisanih regeneranata u vegetativnoj fazi i u fazi cvetanja. Netransformisani korenovi u tečnoj kulturi sintetišu ovu hidroksicimetnu kiselinu. Kao što se može videti na Grafikonu 2, produkcija HK u svim ispitivanim tečnim kulturama transformisanih korenova bila je višestruko veća u odnosu na kontrolnu. S' obzirom da se klon 13 odlikovao izuzetno visokom produkcijom biomase i količina HK u datoj kulturi je bila najviša, tj. 400 puta veća od izmerene količine u kontrolnoj kulturi korenova. Povećana produkcija HK potvrđena je i u tečnim kulturama transformisanih korenova *Lactuca virosa* [25]. Produkcija fenolnih jedinjenja do sada je najviše ispitivana u ćelijskim kulturama različitih biljnih vrsta. Tako je HK detektovana u kulturi ćelija nekih vrsta iz familija *Lamiaceae*, *Solanaceae*, *Apiaceae* i *Asteraceae* [26, 27, 28, 29]. Međutim, kako ćelijske kulture odlikuje niska produkcija biomase i genetička nestabilnost, sve više se ispituju i alternativni načini produkcije sekundarnih metabolita u kulturi transformisanih korenova. Prikazani rezultati u ovom radu potvrđuju prethodna istraživanja koja su nagovestila da kulture transformisanih korenova cikorijske mogu da predstavljaju alternativni izvor fenolnih jedinjenja [16].

U prethodnom istraživanju smo pokazali da produkcija gvajanolida zavisi od fenofaze u kojoj se biljke cikorijske nalaze i da je nivo laktucina i dihidrolaktucina najviši u transformisanim korenovima procvetalih biljaka [5]. Tranzicija cikorijske iz vegetativne u generativnu fazu, kao i povećana produkcija gvajanolida u korelaciji su sa ekspresijom *RoIC* gena [5]. U ovom radu korišćeni su isti klonovi cikorijske u cilju provere da li i produkcija HK zavisi od istih faktora. Na osnovu rezultata, prikazanih na Grafikonu 3, može se zaključiti da produkcija HK zavisi kako od genotipa, tako i od fenofaze u kojoj se dati klon nalazi. Klon 35 je u vegetativnoj fazi produkovao najmanju količinu HK, statistički značajno nižu i od netransformisane kontrole. U ovoj fazi razvicia najveća količina HK detektovana je u korenovima klonova 13 i 36. U fazi cvetanja izmereni nivo HK bio je znatno niži u klonovima 13 i 36, dok je u klonu 35 sadržaj ove hidroksicimetne kiseline bioviši od onog koji je izmeren kod biljaka u vegetativnoj fazi iste starosti. Kod biljaka u vegetativnoj fazi razvicia HK je bila prisutna u većoj količini u korenovima, dok je

u biljkama u cvetu njen sadržaj bio ravnomernije raspoređen između listova i korena. U literaturi nema puno podataka o produkciji sekundarnih metabolita u transformisanim regenerantima [5, 30, 31] i većina radova se odnosi na sadržaj alkaloida [30, 31], a samo nekoliko na sadržaj hlorogene kiseline i drugih fenola [32, 33].

Grafikon 2. Sadržaj hlorogene kiseline u tečnoj kulturi netransformisanih i transformisanih korenova cikoriје.

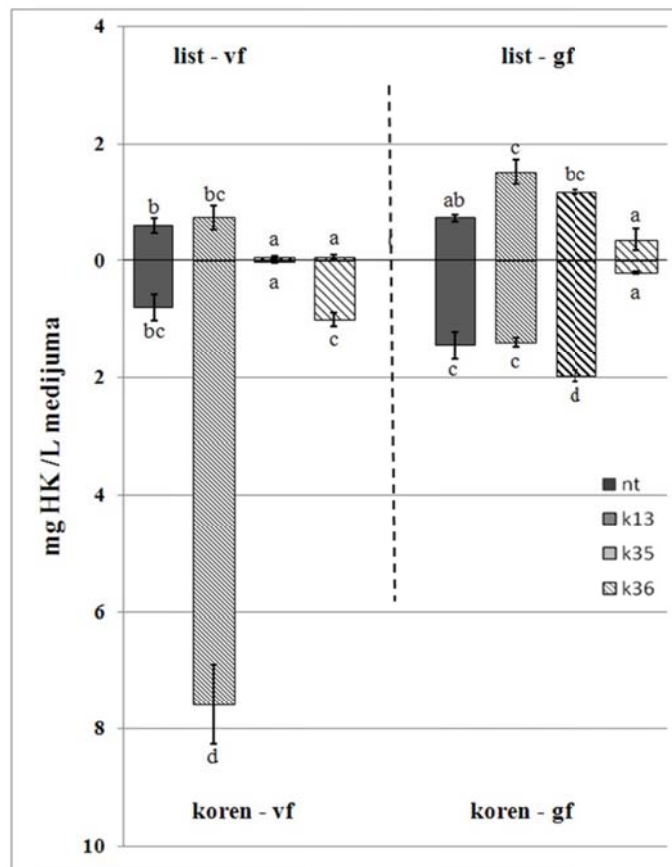
Figure 2. Chlorogenic acid content in liquid Chicory root culture.



Nt – kultura netransformisanih korenova; k13, k35 i k36 – klonovi transformisanih korenova. Rezultati na grafiku predstavljaju srednje vrednosti tri nezavisna eksperimenta \pm SE ($n = 9$). Zvezdicama su obeležene statistički značajno različite vrednosti u odnosu na kulturu netransformisanih korenova ($P \leq 0,05$).

Nt – nontransformed roots; k13, k35 i k36 – hairy root clones. The values are means of 3 independent experiments \pm SE ($n = 9$). Asterisks denote values significantly different in the comparison to the non transformed roots ($P \leq 0.05$).

Grafikon 3.Sadržaj hlorogene kiseline u listovima i korenovima *in vitro* biljaka cikorije u različitim fenofazama (vf – vegetativna faza i gf – generativna faza)
Figure 3.Chlorogenic acid content in leaves and roots of chicory plants growing *in vitro* in different phenophases (vf – vegetative phase, gf – generative phase)



Rezultati na grafiku predstavljaju srednje vrednosti tri nezavisna eksperimenta \pm SE ($n=3$). Statistički značajne razlike između izmerenih srednjih vrednosti utvrdene su odvojeno za rozete i procvetale biljke sa nivoom značajnosti od $P \leq 0,05$. Različita slova koja prate numeričke vrednosti ukazuju na statistički značajne razlike.

The results present mean values of three independent experiments \pm SE ($n=3$). Statistical differences at the significance level of $P \leq 0,05$ are designated by different letters above the bars, as calculated by least significant difference test for rosettes and flowering plants independently.

Produkcija sekundarnih metabolita u korenovima transformisanim sa *A. rhizogenes* često je povećana usled aktivacije odbrambenih gena uzrokovane aktivnošću introdukovanih *rol* gena [34]. Međutim, prisustvo *rol* gena u transformisanim regenerantima ne dovodi uvek do povećanja sadržaja sekundarnih metabolita. Osim što produkcija posmatranih biološki aktivnih jedinjenja varira među različitim klonovima [5, 31, 32, 33], transformisani regeneranti često sadrže i znatno manju količinu sekundarnih metabolita u odnosu na netransformisane biljke [30, 33]. Tačan uzrok ove varijabilnosti je još uvek nepoznat, ali genetički rearanzirani koji nastaju u procesu regeneracije [30], kao i promene u ekspresiji *rol* gena tokom prelaska iz vegetativne u reproduktivnu fazu [5] mogu da uslove promene u sadržaju posmatranih sekundarnih metabolita kod transformisanih regeneranata. Detektovana varijabilnost u nivou hlorogene kiseline između različitih klonova, kao i između različitih fenofaza transformisanih regeneranata (Grafikon 3) i njihovih vegetativnih organa (koren i list) potvrđuje činjenicu da je za postizanje maksimalne produkcije veoma važna selekcija odgovarajućeg klona, odabir metode gajenja, kao i faze razvića.

ZAKLJUČAK

Veća produkcija hlorogene kiseline u kulturi transformisanih korenova, kao i mogućnost njene izolacije iz različitih vegetativnih organa transformisane cikorije ukazuje na ogromni potencijal tehnike *in vitro* gajenja transformisanih biljaka *C. intybus* u cilju dobijanja hlorogene kiseline u količini koja je neophodna za farmaceutske potrebe. Osim toga, kulture transformisanih korenova kao i transformisanih biljaka cikorije mogu da predstavljaju dobar model sistem u daljim ispitivanjima regulatornih mehanizama biosinteze i akumulacije hlorogene kiseline, a i drugih fenolnih jedinjenja.

ZAHVALNICA

Rad predstavlja deo rezultata istraživanja u okviru Projekta OI 173024, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

1. R. A. Street, J. Sidana, G. Prinsloo (2013): *Cichorium intybus*: Traditional Uses, Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, 1- 13.

2. J. R. A. Baert, E. J. Van Bockstaele (1992): Cultivation and breeding of root chicory for inulin production, *Industrial Crops and Products*, vol. 1 (2-4): 229-234.
3. S. Nandagopal, B. R. Kumari (2007): Phytochemical and antibacterial studies of Chicory (*Cichorium intybus* L.)-A multipurpose medicinal plant, *Advances in Biological Research*, vol. 1 (1-2): 17-21.
4. W. Kisiel, K. Zielińska (2001): Guaianolides from *Cichorium intybus* and structure revision of *Cichorium* sesquiterpene lactones, *Phytochemistry*, vol. 57 (4): 523-527.
5. M. D. Bogdanović, S. I. Todorović, T. Banjanac, M. B. Dragičević, F. W. A. Verstappen, H. J. Bouwmeester, A. D. Simonović (2014): Production of guaianolides in *Agrobacterium rhizogenes* - transformed chicory regenerants flowering *in vitro*, *Industrial Crops and Products*, vol. 60, 52-59.
6. D. Heimler, L. Isolani, P. Vignolini, A. Romani (2009): Polyphenol content and antiradical activity of *Cichorium intybus* L. from biodynamic and conventional farming, *Food Chemistry*, vol. 114(3): 765-770.
7. J. H. Chen, C.-T. Ho (1997): Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 45(7): 2374-2378.
8. R. Feng, Y. L. L. Lu, Y. Bowman, V. Qian, M. Castranova, M. Ding (2005): Inhibition of Activator Protein-1, NF- κ B, and MAPKs and Induction of Phase 2 Detoxifying Enzyme Activity by Chlorogenic Acid, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280(30): 27888-27895.
9. B. Özçelik, M. Kartal, I. Orhan (2011): Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids, *Pharmaceutical biology*, Vol. 49, No. 4, 396-402.
10. V. Francisco, G. Costa, A. Figueirinha, C. Marques, P. Pereira, B. Miguel Neves, M. Celeste Lopes, C. García-Rodríguez, M. Teresa Cruz, M. Teresa Batista (2013): Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor- κ B pathway inhibition: Contribution of chlorogenic acid, *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 148(1): 126-134.
11. S. Meng, J. Cao, Q. Feng, J. Peng, Y. Hu (2013): Roles of Chlorogenic Acid on Regulating Glucose and Lipids Metabolism: A Review, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, 1-11.
12. N. Cinkilic, S. K. Cetintas, T. Zorlu, O. Vatan, D. Yilmaz, T. Cavas, S. Tunc, L. Ozkan, R. Bilaloglu (2013): Radioprotection by two phenolic compounds: Chlorogenic and quinic acid, on X-ray induced DNA damage in human blood lymphocytes *in vitro*, *Food and Chemical Toxicology*, vol. 53: 359-363.

13. S. Ramachandra Rao, G. A. Ravishankar (2002): Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites, *Biotechnology Advances*, vol. 20(2): 101-153.
14. F. Bourgaud, A. Gravot, S. Milesi, E. Gontier (2001): Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, *Plant Science*, vol. 161(5): 839-851.
15. H. P. Bais, G. Sudha, G. A. Ravishankar (1999): Putrescine Influences Growth and Production of Coumarins in Hairy Root Cultures of Witloof Chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Lucknow Local), *Journal of Plant Growth Regulation*, vol. 18(4): 159-165.
16. J. Malarz, A. Stojakowska, W. Kisiel (2013): Long-Term Cultured Hairy Roots of Chicory – A Rich Source of Hydroxycinnamates and 8-Deoxylactucin Glucoside, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-13.
17. H. P. Bais, B. Dattatreya, G. Ravishankar (2003): Production of volatile compounds by hairy root cultures of *Cichorium intybus* L under the influence of fungal elicitors and their analysis using solid-phase micro extraction gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 83(8): 769-774.
18. L.-Y. Sun, G. Touraud, C. Charbonnier, D. Tepfer (1991): Modification of phenotype in Belgian endive (*Cichorium intybus*) through genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes*: conversion from biennial to annual flowering, *Transgenic Research*, vol. 1(1): 14-22.
19. A. Subotić, S. Budimir, D. Grubišić, I. Momčilović (2003): Direct Regeneration of Shoots from Hairy Root Cultures of *Centaurium erythraea* Inoculated with *Agrobacterium rhizogenes*, *Biologia Plantarum*, vol. 47(4): 617-619.
20. B. Vinterhalter, S. Ninković, A. Cingel, D. Vinterhalter (2006): Shoot and root culture of *Hypericum perforatum* L. transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS, *Biologia Plantarum*, vol. 50(4): 767-770.
21. S. Dmitrović, N. Mitić, S. Zdravković-Korać, B. Vinterhalter, S. Ninković, L. J. Čulafić (2010): Hairy roots formation in recalcitrant-to-transform plant *Chenopodium rubrum*, *Biologia Plantarum*, vol. 54(3): 566-570.
22. B. Vinterhalter, S. Zdravković-Korać, S. Ninković, N. Mitić, T. Janković, J. Miljuš-Djukić, D. Vinterhalter (2011): Variability in shoot cultures regenerated from hairy roots of *Gentiana punctata*, *Biologia Plantarum*, vol. 55(3): 414-422.
23. J. Batra, A. Dutta, D. Singh, S. Kumar, J. Sen (2004): Growth and terpenoid indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy root clones in relation to left- and right-termini-linked Ri T-DNA gene integration, *Plant Cell Reports*, vol. 23(3): 148-154.

24. R. Piispanen, T. Aronen, X. Chen, P. Saranpää, H. Häggman (2003): Silver birch (*Betula pendula*) plants with aux and rol genes show consistent changes in morphology, xylem structure and chemistry, *Tree Physiology*, vol. 23(11): 721-733.
25. A. Stojakowska, J. Malarz, A. Szewczyk, W. Kisiel (2012): Caffeic acid derivatives from a hairy root culture of *Lactuca virosa*, *Acta Physiologiae Plantarum*, vol. 34(1): 291-298.
26. A. S. Döring, M. Petersen (2014): Production of caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids in plants and suspension cultures of *Glechoma hederacea*, *Phytochemistry Letters*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2014.05.012>
27. F. Gillet, F. Mesnard, O. Fliniaux, J.-P. Monti, M.-A. Fliniaux (1999): Chlorogenic acid in a *Nicotiana plumbaginifolia* cell suspension, *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 37(11): 869-874.
28. M. Kikowska, J. Budzianowski, A. Krawczyk, B. Thiem (2012): Accumulation of rosmarinic, chlorogenic and caffeic acids in *in vitro* cultures of *Eryngium planum* L., *Acta Physiologiae Plantarum*, vol. 34(6): 2425-2433.
29. C.-H. Wu, H. N. Murthy, E.-J. Hahn, K.-Y. Paek (2007): Enhanced production of caftaric acid, chlorogenic acid and cichoric acid in suspension cultures of *Echinacea purpurea* by the manipulation of incubation temperature and photoperiod, *Biochemical Engineering Journal*, vol. 36(3): 301-303.
30. K.-M. Oksman-Caldentey, R. Hiltunen (1996): Transgenic crops for improved pharmaceutical products, *Field Crops Research*, vol. 45(1-3): 57-69.
31. K. Chaudhuri, B. Ghosh, D. Tepfer, S. Jha (2006): Spontaneous plant regeneration in transformed roots and calli from *Tylophora indica*: changes in morphological phenotype and tylophorine accumulation associated with transformation by *Agrobacterium rhizogenes*, *Plant Cell Reports*, vol. 25(10): 1059-1066.
32. A. Bertoli, A. Giovannini, B. Ruffoni, A. D. Guardo, G. Spinelli, M. Mazzetti, L. Pistelli (2008): Bioactive Constituent Production in St. John's Wort *in vitro* Hairy Roots. Regenerated Plant Lines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56(13): 5078-5082.
33. J. Koperdánková, H. Komarovská, J. Košuth, A. Giovannini, E. Čellárová (2009): Characterization of hairy root-phenotype in transgenic *Hypericum perforatum* L. clones, *Acta Physiologiae Plantarum*, vol. 31(2): 351-358.
34. V. P. Bulgakov (2008): Functions of rol genes in plant secondary metabolism, *Biotechnology Advances*, vol. 26(4): 318-324.

IN VITRO PRODUCTION OF CHLOROGENIC ACID IN CULTURE OF TRANSFORMED *CICHORIUM INTYBUS* L. PLANTS

**Milica Bogdanović¹, Milan Dragičević¹, Angelina Subotić¹,
Ana Simonović¹, Slađana Todorović¹**

¹Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, University of Belgrade, Bulevar despota Stefana 142, 11060 Belgrade, Serbia

SUMMARY

Chicory (*Cichorium intybus* L.) is traditionally recognized for its anti-inflammatory, antimicrobial, anticancer and nutritive properties. Among active secondary metabolites detected in chicory, the most important are sesquiterpene lactones and phenolics, including chlorogenic acid (CA). Hereby we have analyzed the content of CA in previously obtained *Agrobacterium rhizogenes* – transformed chicory hairy root cultures and transformed regenerants. Among three analyzed hairy root clones, clone 13 had exceptionally high biomass production, so the amount of CA in this culture was the highest, e.g. 400 times higher in comparison to the untransformed root culture. Since the roots spontaneously regenerated, the system was upgraded to allow the comparison of CA content not only among the clones, but also between different developmental phases of the regenerants (vegetative vs. flowering plants) and their organs (roots vs. leaves). It was shown that the CA production varies from clone to clone, and also depends on the phenophase of the clone. In the rosette stage of clones 13 and 36, the highest amount of CA was detected in roots, while the same clones in the flowering stage had significantly lower CA content. The clone 35 in the vegetative phase produced the lowest amounts of CA. However, in the flowering stage the roots of clone 35 produced the highest CA amount. Among the regenerants, the clone 13 had the fastest growth, and hence the best CA production.

The current paper presents for the first time the CA content in transformed chicory regenerants. The obtained results suggest that the culture of transformed chicory plants can be equally good source of CA as liquid hairy root culture.

Key words: chicory, *in vitro*, *Agrobacterium rhizogenes*, spontaneous regeneration, chlorogenic acid