

The effect of methyl jasmonate on the production of bioactive compounds in hairy root licorice (*Glycyrrhiza glabra*)

Abstract

Considering the low amount of important bioactive compounds such as glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in licorice and its complex chemical synthesis, using the hairy root and stimulating their production using elicitors is an efficient method for in vitro production. Therefore, in this study, first, using *Agrobacterium rhizogenes*, hairy roots were produced. To remove bacteria after inoculation was used normal cefotaxime and cefotaxime sodium salt, and to increase the production of bioactive compounds, methyl jasmonate elicitor with a concentration of 100 μM was used. The roots were harvested one, two, three and five days after the treatment, and traits such as glycyrrhizin content, glycyrrhetic acid content, total flavonoid content, total phenol content and antioxidant activity were measured in hairy roots. The results showed that the amount of glycyrrhizin, glycyrrhetic acid and total flavonoids decreased in all treatments compared to the control treatment, and the amount of this decrease in the second treatment (without elicitor, removal of bacteria with one inoculation and cefotaxime sodium salt) was the highest (0.959 and 0.925 times for glycyrrhizin and glycyrrhetic acid respectively). The amount of total phenol and antioxidant activity were the highest in the treatment that was under the influence of the elicitor for two days (31.22 GAE/g D.W and 90.85%) and the control treatment, respectively. The lack of effect or the negative effect of methyl jasmonate on the amount of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in this research can be attributed to the effect of the species and ecotype, the number of cultures after inoculation, the type of antibiotic, the concentration of the elicitor and the time period that they have been affected by the elicitor. Considering the large amount of bioactive compounds in this research, compared to other researches, the results can provide a suitable solution for increasing glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in a short time and at a lower cost.

Key words: Methyl Jasmonate, Glycyrrhizin, glycyrrhetic acid, cefotaxime sodium salt

اثر متیل جاسمونات بر میزان تولید ترکیبات زیست فعال در ریشه موئین شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*)

چکیده

با توجه به میزان اندک ترکیبات زیست فعال مهم مانند گلیسیریزین و گلیسریتیک اسید در شیرین بیان و سنتز شیمیایی پیچیده آن، استفاده از ریشه موئین و تحریک تولید آنها با استفاده از الیسیتورها روشی کارآمد برای تولید این ویترو می باشد. لذا در این تحقیق ابتدا با استفاده از آگروباکتریوم رایزوترن اقدام به تولید ریشه موئین شد. جهت حذف باکتری بعد از تلقیح از سفوتاکسیم معمولی و نمک سفوتاکسیم سدیم، و جهت افزایش تولید ترکیبات زیست فعال، از الیسیتور متیل جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکرومولار استفاده شد. برداشت ریشه ها در یک، دو، سه و پنج روز بعد از تیمار انجام و صفاتی مانند: میزان گلیسیریزین، میزان گلیسریتیک اسید، میزان فلاونوئید کل، میزان فنل کل و فعالیت آنتی اکسیدانی در ریشه های موئین اندازه گیری شد. نتایج نشان داد میزان گلیسیریزین، گلیسریتیک اسید و فلاونوئید کل در کلیه تیمارها نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت و میزان این کاهش در تیمار دوم (بدون الیسیتور، حذف باکتری با یک واکشت با نمک سفوتاکسیم سدیم) بیشترین مقدار (۰/۹۵۹ و ۰/۹۲۵ برابر به ترتیب برای گلیسیریزین و گلیسریتیک اسید) بود. میزان فنل کل و فعالیت آنتی اکسیدانی به ترتیب در تیماری که دو روز تحت تاثیر الیسیتور بوده (۳۱/۲۲ گالیک اسید بر گرم وزن خشک و ۹۰/۸۵ درصد) و نیز تیمار شاهد، بیشترین مقدار را دارا بود. عدم تاثیر و یا تاثیر منفی متیل جاسمونات بر روی میزان گلیسیریزین و گلیسریتیک اسید، در این تحقیق را می توان به اثر گونه و اکوتیپ، تعداد واکشت بعد از تلقیح، نوع آنتی بیوتیک، غلظت الیسیتور و مدت زمانی که تحت تاثیر الیسیتور قرار گرفته اند، نسبت داد. با توجه به میزان زیاد ترکیبات زیست فعال در این تحقیق، نسبت به سایر تحقیقات، نتایج

می‌تواند راهکار مناسبی را جهت افزایش گلیسیریزین و گلیسیریتینیک اسید در زمان کوتاه و هزینه کمتر ارائه دهد.

کلمات کلیدی: متیل جاسمونات، گلیسیریزین، گلیسیریتینیک اسید، نمک سفوناکسیم سدیم

مقدمه

شیرین بیان گیاهی چند ساله، با طول تقریبی ۶۰ سانتیمتر بوده و به صورت وحشی در کشورهای آسیای غربی و ویتنام رشد می‌کند (Amagaya et al., 1984). گونه *Glycyrrhiza glabra* در ایران به صورت خودرو و علف هرز در مزارع گندم و نخود در دیم‌زارهای استان های کرمانشاه، ایلام، فارس، اصفهان و اراک پراکنش یافته است (Ghahraman, 1999). ریشه‌ها و استولن‌های گونه‌های شیرین بیان *Glycyrrhiza glabra*، *G. uralensis* و *G. inflata*، یکی از مهمترین داروهای خام در دنیا را تشکیل می‌دهند و محتوی مقادیر زیادی از ماده موثر گلیسیریزین^۱ (۲ تا ۸٪ از ماده خشک) که یک نوع تریترپنوئید ساپونین است، می‌باشند. گلیسیریزین طیف وسیعی از فعالیت‌های دارویی نظیر ضد التهاب، محافظ کبد، زخم معده، ضد حساسیت و ضد ویروس در برابر ویروس‌های مختلف RNA یا DNA دار مانند ویروس نقص ایمنی اکتسابی (HIV) انسان و سندرم حاد تنفسی را شامل شده و در سراسر دنیا به عنوان یک ماده دارویی در دسترس می‌باشد (Seki et al., 2011). گلیسیریتینیک اسید^۲ یکی دیگر از ترکیبات زیست فعال شیرین بیان است که به شکل دو ایزومر Glycyrrhetic acid و α Glycyrrhetic acid وجود دارد (Li et al., 2014). این ترکیب دارای خواص دارویی مانند ضد التهاب (Kowalska Lis, 2019)، ضد تومور (Zhou et al., 2019) و سایر اثرات دارویی (Ding et al., 2020) می‌باشد. این گیاه دارویی در معرض خطر انقراض قرار گرفته است. زیرا استخراج گلیسیریزین از ریشه گیاه سبب نابودی کل گیاه می‌شود (Spollansky et al., 2000).

تمایز سلولی و تشکیل اندام در برخی موارد برای تولید ترکیبات فعال زیستی ضروری است. بر خلاف کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی، ریشه‌ها اندام‌هایی هستند که از نظر ساختاری شبیه گیاه بوده، بنابراین تمایز آن باعث فعال شدن مستقیم متابولیسم ثانویه می‌شود (Alcalde et al., 2022). *Agrobacterium rhizogenes*، یک باکتری خاکزی می‌باشد که القای ریشه موئین را تسهیل می‌کند (Thwe et al., 2016). T-DNA باکتری *Agrobacterium rhizogenes* دارای دو توالی مستقل است که با مرزهای TL (چپ) و TR (راست) مشخص می‌شوند. TL-DNA و TR-DNA به طور کلی به طور مستقل به ژنوم گیاه میزبان منتقل و در آن ادغام می‌شوند، اما تنها TL-DNA برای ایجاد ریشه‌های موئین ضروری و بنابراین کافی است. تجزیه و تحلیل توالی TL-DNA چهار ژن *rol A*، *rol B*، *rol C* و *rol D* را نشان داده که برای القای ریشه‌های موئین ضروری هستند (Yordanova et al., 2017). برای تولید متابولیت‌های تخصصی، ریشه‌های موئین به دلیل ویژگی‌هایی مانند پایداری ژنتیکی، تولید زیست توده بالا و ظرفیت بیوستتزی کارآمد مناسب تر از کشت سلولی یا کالوس هستند. علاوه بر این، ریشه‌های موئین قادر به تولید متابولیت‌های تخصصی برای مدت زمان طولانی هستند (Häkkinen et al., 2016). فرآیند تحریک سازی^۳ باعث ایجاد اختلال بین جاسمونات‌ها و گیرنده‌های آنها در غشای پلاسمایی می‌شود. همچنین باعث ایجاد آبخاری از پاسخ‌های دفاعی در سلول‌ها از جمله تولید گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن (ROS و RNS) و القای آنزیم‌های می‌شود که به عنوان محافظت کننده در برابر تنش اکسیداتیو می‌باشند (Giri & Zaheer, 2016). لذا پاسخ‌های دفاعی در سلول‌ها منجر به سنتز و تجمع مولکول های سیگنالینگ مانند SA، JA، اکسید نیتریک (NO) و اتیلن (ET) و همچنین تنظیم بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوستتز متابولیت ثانویه می‌شود (Baenas et al., 2014).

پیشینه پژوهش

مطالعات زیادی در خصوص القای ریشه موئین در گیاه شیرین بیان صورت گرفته است (Mehrotra et al. 2008; Shirazi et al. 2012;)

¹ Glycyrrhizin

² Glycyrrhetic acid

³ Elicitation

(Tenea et al., 2008). کشت ریشه‌های موئن یک تولید پایداری از گلیسیریزین را فراهم می‌آورد (Tenea et al., 2008). بزرگترین مزیت ریشه موین، ظرفیت بیوسنتز یکسان یا بیشتر برای تولید متابولیت ثانویه، در مقایسه با گیاهان مادر آنهاست (Kim et al., 2002). تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه با استفاده از الیستورها روشی کارآمد برای تولید درون شیشه ای متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. نشان داده شده است که جاسمونات‌ها مولکول‌های کلیدی در فرایند تحریک سازی بوده که با تحریک رونویسی یا ترجمه سبب افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه ای می‌شوند (Gundlach et al., 1992). متیل جاسمونات سبب افزایش تولید سلیمارین در کشت سلولی گیاه خار مریم شده است (Sa'ñchez-Sampedro et al., 2005). متیل جاسمونات در یک تعدادی از مراحل مسیر متابولیکی فلاونوگن‌ها عمل نموده و اثر محرک آن بستگی به سنتز پروتئین دنوو دارد (Sa'ñchez-Sampedro et al., 2005). لذا در این تحقیق ابتدا با استفاده از اگروباکتریوم رایزوزنز سویه A4 اقدام به تولید ریشه موئن از هیپوکوتیل و کوتیلدون گیاه شیرین بیان نموده، سپس اثر متیل جاسمونات به عنوان یک الیستور در تولید ترکیبات زیست فعالی مانند گلیسیریزین و گلیسیریتینیک اسید بررسی شد. همچنین برای اولین بار اثر دو نوع آنتی بیوتیک سفوتاکسیم معمولی و نمک سفوتاکسیم سدیم نیز بر روی میزان ترکیبات زیست فعال این گیاه مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌شناسی پژوهش

مواد گیاهی: بذرهای شیرین بیان گونه glabra از استان اصفهان شهرستان سمیرم جمع آوری گردید.

مواد شیمیایی: کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک خریداری شده و استاندارد گلیسیریزین، گلیسیریتینیک اسید و متیل جاسمونات نیز از شرکت سیگما آلد ریچ تهیه شد. دو نوع آنتی بیوتیک در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت که نمک سفوتاکسیم سدیم (CAS No:64485-93-4) شرکت سیگما آلد ریچ و سفوتاکسیم معمولی تزریقی تهیه شده از داروخانه بود.

القای ریشه موئین

بذور شیرین بیان ابتدا به مدت ۱۵ دقیقه در اسید سولفوریک غلیظ قرار گرفت. بذور به مدت ۲۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد ضد عفونی شده و به مدت یک دقیقه در زیر هود استریل با آب مقطر استریل دو مرتبه شستشو و سپس در محیط یک دوم MS کشت و به منظور تولید گیاهچه استریل در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۲ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شد. از هیپوکوتیل و کوتیلدون گیاهچه‌های ۲۵ روزه به منظور القای ریشه موئن استفاده شد (Srivastava et al., 2019). یک تک کلنی از *Agrobacterium rhizogenes* سویه A4 برداشته و در محیط کشت LB کشت شد. محیط کشت در دمای 28 ± 0.5 درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت داخل انکوباتور شیکردار با دور 200 rpm قرار داده شد. سلول‌های باکتری با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و برداشت شد. به منظور انجام تلقیح، محیط کشت MS مایع به سلول‌ها اضافه و بار دیگر سانتریفیوژ شد. سلول‌ها در محیط کشت MS 1/2 حل و محیط کشت در دمای 28 ± 0.5 درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت بر روی شیکر با دور 150 rpm انکوبه شد. ریز نمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل جدا و بعد از سوراخ کردن با سرسوزن، نمونه‌ها در محلول MS محتوی سلول‌های باکتری به مدت ۲۵ دقیقه بر روی شیکر با دور 80 rpm قرار گرفت. نمونه‌های کنترل نیز در آب مقطر استریل غوطه‌ور شده و بر روی شیکر قرار گرفت. جهت حذف باکتری، نمونه‌ها با آب مقطر محتوی ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر سفوتاکسیم شستشو داده شد. نمونه‌ها بر روی کاغذ صافی خشک شد و سپس در محیط کشت MS 1/2 جامد محتوی ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر سفوتاکسیم قرار گرفت. نمونه‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و تاریکی به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. نمونه‌ها با وجود حضور ریشه موئن، تا حذف کامل باکتری در محیط کشت MS 1/2 جامد محتوی ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر سفوتاکسیم واکشت داده شد. بعد از مشاهده ریشه موئن، نمونه‌ها به مدت سه هفته در محیط کشت MS 1/2 جامد باقی ماندند. مقداری از نمونه‌ها نیز بعد از تلقیح به محیط کشت MS 1/2 جامد محتوی سفوتاکسیم سدیم سالت (5mg/l) انتقال داده شد. این آنتی بیوتیک باعث حذف کامل باکتری از محیط شده

و بعد از حضور ریشه موئین تنها یک واكشت در محیط كشت MS $\frac{1}{2}$ جامد محتوی سفوتاكسیم سدیم سالت (5mg/l) انجام شد. سپس ریشه از ریزنمونه ها به آرامی جدا شده و در محیط كشت MS مایع فاقد هورمون قرار گرفت. ارلن ها به شیکر با دور 150rpm، دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و تاریکی منتقل شد.

تیمار با الیستور

به منظور افزایش غلظت ترکیبات زیست فعال و نیز رشد ریشه، ریزنمونه ها به مدت ۳۵ روز در محیط كشت MS مایع فاقد هورمون قرار گرفتند. استوک متیل جاسمونات با حل شدن در محلول DMSO تهیه و به منظور استریل نمودن، از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. متیل جاسمونات در غلظت ۱۰۰ میکرومولار به ریشه ها اضافه شد. به نمونه های کنترل (ریشه های موئین تحت تیمار سفوتاكسیم معمولی و واكشت متوالی در این آنتی بیوتیک، به عنوان شاهد و ریشه های موئینه که فقط یکبار تحت تیمار سفوتاكسیم سدیم سالت قرار گرفته اند (تیمار دو)، آب مقطر استریل اضافه شد. سپس برداشت در فواصل زمانی یک، دو، سه و پنج روز بعد از تیمار با الیستور انجام شد. ریشه ها برداشت شده و در سایه به مدت ۷۲ ساعت خشک و برای آنالیز مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج DNA و واكش زنجیره ای پلیمرز

به منظور تایید ترانسفورماسیون، ریشه های موئین کنترل (فاقد الیستور) در مجاورت ازت مایع قرار گرفت و به خوبی پودر شد. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. DNA ژنومی با پرایمرهای اختصاصی TL-DNA با توالی 3'-AAG TTG AAT GAG TAT GAC TGCC-5' Forward و 5'-GGA CGA CAT GGC ACT Reverse-3' CTG GGAG-3' تکثیر شد. واكش زنجیره ای پلیمرز با ۹۴ درجه سانتی گراد برای سه دقیقه به دنبال آن ۳۶ سیکل: ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۴۵ ثانیه انجام و سپس یک سیکل نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه انجام شد (Srivastava et al., 2019).

آنالیزهای بیوشیمیایی

نیم گرم ریشه موئین خشک به خوبی پودر شد. ریشه پودر شده با ۱۰ میلی لیتر متانول (۹۸ درصد) به مدت نیم ساعت در درجه حرارت اتاق با دستگاه سوکسله عصاره گیری شد. سپس عصاره با کاغذ صافی صاف، عصاره خشک و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان استفاده نگهداری شد.

محتوای فنل کل (TPC) و فلاونوئید کل (TFC): محتوای فنل کل در نمونه ها با استفاده از روش Folin-Ciocalteu تعیین شد (Wojdyło et al., 2007). محتوای فلاونوئید کل با استفاده از روش رنگ سنجی کلرید آلومنیوم (aluminum chloride colorimetric) تعیین شد (Chang et al. 2002). معادله منحنی استاندارد (y = 0.1427 + 0.0029 x, r² = 0.999) و (y = -0.065 + 0.0088 x, r² = 0.939) برای اندازه گیری TPC و TFC در نمونه ها و داده ها به ترتیب با میلی گرم معادل گالیک اسید (GAE) و کوثرسیتین (QUE) به ازای گرم ماده خشک بیان شد.

اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی (DPPH): ۰/۱ میلی لیتر از عصاره متانولی در غلظت های مختلف تهیه و به نمونه ها ۵ میلی لیتر محلول متانولی DPPH ۰/۱ میلی مولار افزوده گردید. مخلوط به شدت تکان داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق نگهداری شد. سپس جذب نمونه ها در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. متانول ۸۰ درصد به عنوان بلانک استفاده شد. درصد بازدارندگی (inhibition%) نمونه ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{inhibition\%} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

که A_c و A_s به ترتیب عدد جذب مربوط به نمونه‌های گیاهی و نمونه کنترل می‌باشد.

از شاخص IC_{50} برای بررسی فعالیت حذف‌کنندگی رادیکال DPPH استفاده شد. برای بررسی بهتر این فعالیت از آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (Huang et al., 2005).

اندازه‌گیری گلیسیریزین و گلیسیریتینیک اسید: ریشه‌های خشک شده به خوبی پودر و با متانول ۷۰ درصد به مدت ۱۶ الی ۱۸ ساعت در دمای ۴۰ الی ۴۵ درجه سانتی‌گراد عصاره‌گیری شد. آماده‌سازی نمونه‌ها و آنالیز HPLC با استفاده از روش Nasrollahi و همکاران (۲۰۱۴) انجام شد. استاندارد گلیسیریزین و گلیسیریتینیک اسید در غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر آماده شد. آنالیز نمونه‌ها برای بررسی میزان گلیسیریزین و گلیسیریتینیک اسید با استفاده از دستگاه HPLC (Agilent 1260 infinity II HPLC system) با مشخصات: دتکتور VWD UV-VIS با طول موج ۲۵۴ نانومتر، فاز معکوس شامل ستون C18 به طول ۲۵۰×۴.۶ mm با ستون اولیه انتگرال ۵ میکرومتر، فاز متحرک شامل متانول: آب: اسید استیک (۶:۳۴:۶۰) بود. درجه حرارت ستون ۴۰ درجه سانتی‌گراد و شدت جریان حلال در ستون یک میلی‌لیتر بر دقیقه و حجم تزریق نمونه‌ها ۵ میکرولیتر بود.

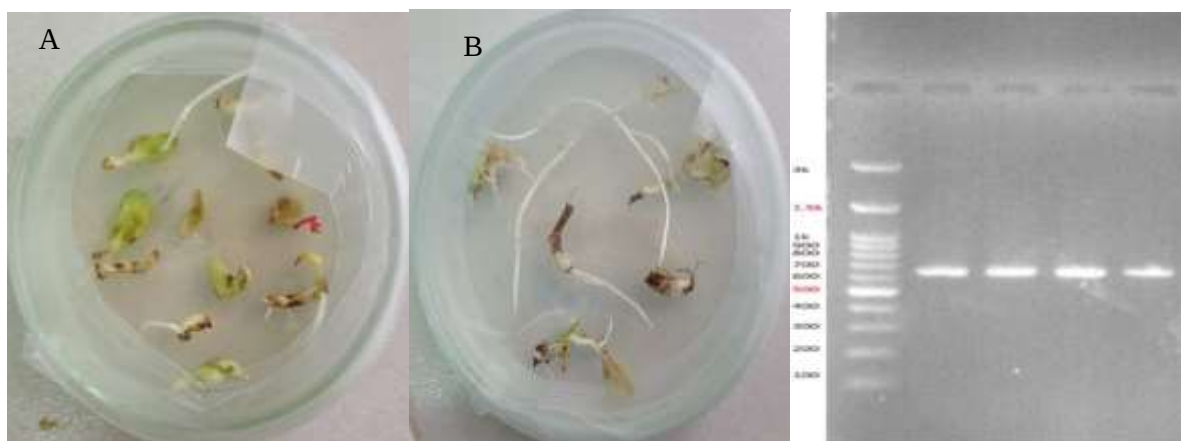
تجزیه و تحلیل داده‌ها

کلیه آزمایشات با سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تیمارهای مورد بررسی عبارتند از: تیمار یک یا تیمار شاهد: بدون الیسیاتور تحت سفوتاکسیم معمولی، تیمار دو: تیمار بدون الیسیاتور تحت سفوتاکسیم سدیم سالت، تیمار سه: تحت تاثیر ۱۰۰ میکرومولار الیسیاتور متیل جاسمونات و برداشت یک روز بعد از تیمار، تیمار چهار: تحت تاثیر ۱۰۰ میکرومولار الیسیاتور متیل جاسمونات و برداشت دو روز بعد از تیمار، تیمار پنج: تحت تاثیر ۱۰۰ میکرومولار الیسیاتور متیل جاسمونات و برداشت سه روز بعد از تیمار، تیمار شش: تحت تاثیر ۱۰۰ میکرومولار الیسیاتور متیل جاسمونات و برداشت پنج روز بعد از تیمار. تجزیه واریانس داده‌ها و آزمون مقایسه میانگین دانکن برای بررسی تفاوت معنی‌دار بین ریشه‌های موئین کنترل و ریشه‌های موئین تیمار شده در سطح ۵ درصد انجام شد. کلیه آنالیزها با نرم افزار SAS نسخه 9.2 انجام و نمودارهای بررسی میزان متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز با نرم افزار Excel نسخه ۲۰۱۶ ترسیم گردید.

یافته‌های پژوهش

تولید ریشه موئین و تایید آن با واکنش زنجیره ای پلیمراز

از ریزنمونه هیپوکوتیل و کوتیلدون برای ترانسفورماسیون استفاده شد. در بین ریزنمونه‌های استفاده شده از نظر تحریک ریشه، اولین نشانه‌های ریشه‌دهی در هیپوکوتیل بعد از دو روز و در کوتیلدون بعد از چهار روز مشاهده گردید. صرفنظر از زمان ریشه‌دهی هر دوی هیپوکوتیل و کوتیلدون بیشترین فراوانی تولید ریشه را داشتند (شکل 1-A,B). ریشه‌های موئین که تقریباً ۵ تا ۷ سانتی متر طول داشتند، انتخاب و به محیط کشت MS مایع منتقل شدند. جهت رشد ریشه و تجمع گلیسیریزین ریشه‌های ۳۵ روزه در محیط مایع قرار گرفتند. ریشه‌هایی که از رشد و خصوصیات مورفولوژی مناسبی برخوردار بودند، برای اثبات ترانسفورماسیون مورد استفاده قرار گرفتند. آنالیز PCR با پرایمرهای منطقه TL (Srivastava et al., 2019) برای اثبات ترانسفورماسیون مورد استفاده قرار گرفت. نتایج PCR تکثیر یک قطعه 650 bp را نشان داده و ترانسفورماسیون را تایید نمود (شکل 1-C).



شکل ۱- A و B: القای ریشه در هیپوکوتیل و کوتیلدون گیاه شیرین بیان با استفاده از *Agrobacterium rhizogenes* سویه A4، C- تکثیر قطعه ۶۵۰ جفت بازی مربوط به پرایمر اختصاصی منطقه TL ... در چهار لاین ترانسژنیک گیاه شیرین بیان

تأثیر الیستور متیل جاسمونات بر روی میزان گلیسیریزین و گلیسیریتینیک اسید

تجزیه واریانس صفات نشان داد بین کلیه تیمارها از نظر تأثیر روی صفات مورد بررسی، در سطح یک درصد اختلاف معنی دار وجود دارد (جدول ۱). در این تحقیق از آگروباکتریوم رایزوزنز سویه A4 برای القای ریشه موئین استفاده شد. مشاهده شد که نوع آنتی بیوتیک سفوتاکسیم معمولی و تعداد واکشت جهت حذف باکتری بعد از القای ریشه موئین تأثیر بسزایی در میزان ترکیبات زیست فعال بخصوص گلیسیریزین و گلیسیریتینیک اسید دارد. در نمونه‌هایی که بعد از تلقیح از نمک سفوتاکسیم سدیم استفاده شد، به دلیل قدرت بالای این آنتی بیوتیک در حذف باکتری، در اولین واکشت باکتری حذف و نیازی به واکشت مجدد نبود. استفاده از سفوتاکسیم معمولی باعث حذف کامل باکتری از محیط نشده و چندین واکشت متوالی حتی بعد از تولید ریشه موئین جهت حذف کامل باکتری انجام گرفت. لذا مدت زمان در معرض قرار گیری ریشه‌ها با باکتری افزایش و این امر منجر به افزایش ترکیبات زیست فعال شد.

میزان گلیسیریزین در کلیه تیمارها نسبت به تیمار شاهد (تیمار ۱ بدون الیستور تحت سفوتاکسیم معمولی) کاهش نشان داده بود. میزان این کاهش در تیمار ۲ (بدون الیستور، حذف باکتری با یک واکشت با نمک سفوتاکسیم سدیم) ۰/۹۵۹ برابر، در یک روز بعد از تیمار ۰/۶۴۴، دو روز بعد از تیمار ۰/۸۷۸، سه روز بعد از تیمار ۰/۸۵۷ و در پنج روز بعد از تیمار با الیستور متیل جاسمونات ۰/۶۸۰ برابر مشاهده شد. میزان کاهش گلیسیریتینیک اسید نیز نسبت به شاهد ۰/۹۲۵ برابر در تیمار ۲، ۰/۷۶۹ برابر در یک روز بعد از تیمار، ۰/۷۷۶ برابر در دو روز بعد از تیمار، ۰/۸۶۵ برابر در سه روز بعد از تیمار و ۰/۸۵۵ برابر در پنج روز بعد از تیمار با الیستور متیل جاسمونات بود. نتایج مقایسه میانگین صفات نیز نشان داد که در هر دوی میزان گلیسیریزین و گلیسیریتینیک اسید، تیمار کنترل بیشترین افزایش را نسبت به سایر تیمارها داشته و در گروه A قرار گرفته و تیمار دو (بدون الیستور، حذف باکتری با یک واکشت با سفوتاکسیم سدیم سالت) کمترین افزایش را نسبت به سایر تیمارها داشته و در گروه F قرار گرفتند. میزان گلیسیریزین و گلیسیریتینیک اسید در حضور متیل جاسمونات نسبت به کنترل کاهش نشان داد (شکل ۲ و شکل ۳-الف).

تأثیر الیستور متیل جاسمونات بر روی میزان فلاونوئید کل، میزان فنل کل و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی

نتایج تجزیه واریانس صفات نشان داد که بین کلیه تیمارها از نظر تأثیر بر روی میزان فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی اختلاف بسیار معنی داری مشاهده گردید (جدول ۱). میزان فلاونوئید کل نیز در کلیه تیمارها نسبت به شاهد کاهش نشان داد ولی میزان این کاهش

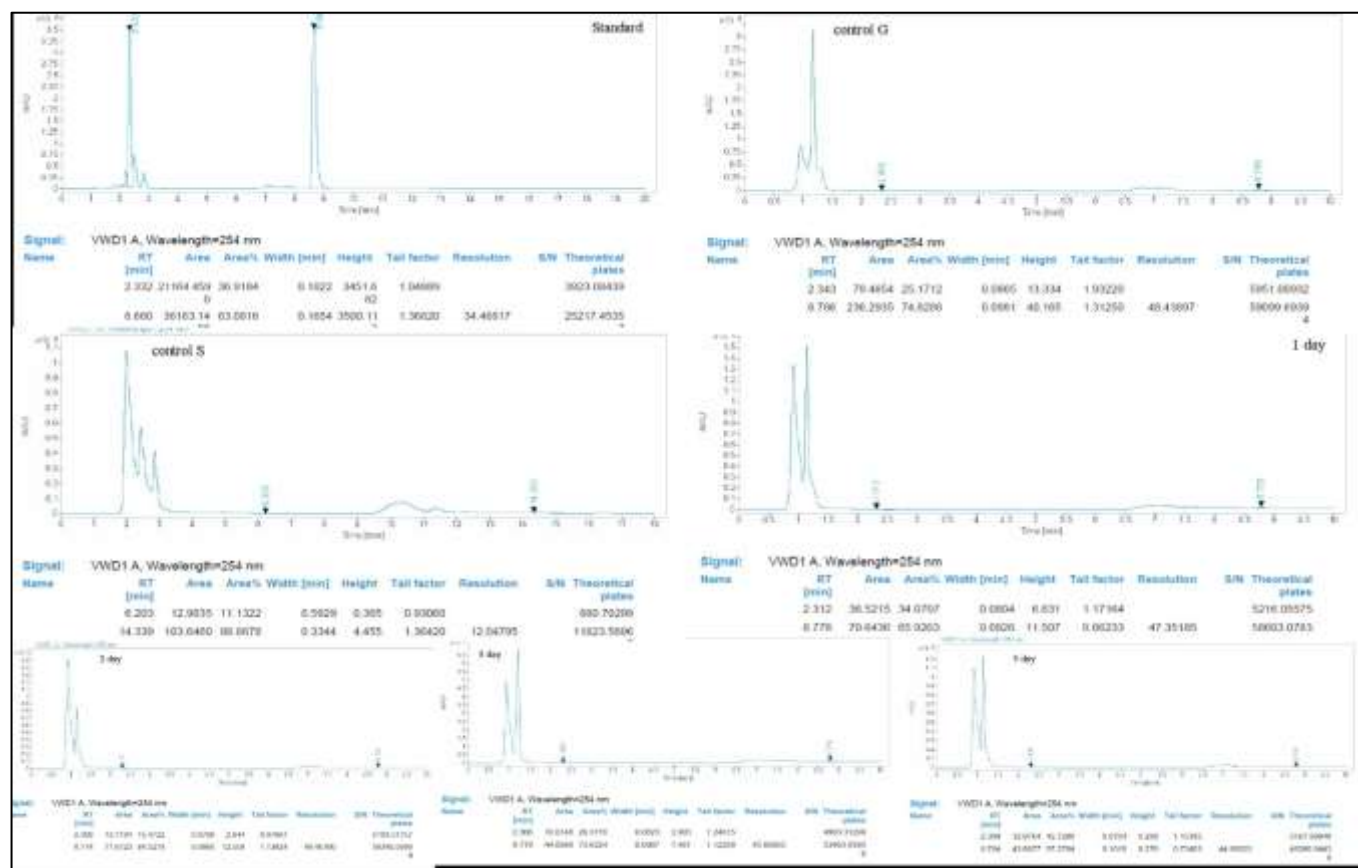
نسبت به کاهش در گلیسیریزین و گلیسیریتینیک اسید کمتر بود. به طوریکه میزان کاهش در تیمار دوم ۰/۲۳۳۷ برابر، در یک روز بعد از تیمار با الیسیستور ۰/۱۶۶ برابر، دو روز بعد از تیمار ۰/۰۳۷ برابر، در سه روز بعد از تیمار ۰/۱۲۱ برابر و در پنج روز بعد از تیمار با الیسیستور متیل جاسمونات ۰/۱۴۶ برابر مشاهده گردید. تیمار شاهد در گروه A، تیمار چهار (دو روز بعد از تیمار با الیسیستور) در گروه B و تیمار دو که دارای کمترین میزان فلاونوئید بود در گروه E قرار گرفت (شکل ۳-ب). میزان فنل کل نیز در کلیه تیمارها به استثنای تیمار چهار (دو روز بعد از تیمار با الیسیستور)، نسبت به تیمار شاهد کاهش نشان داد. میزان این کاهش در تیمار دو ۰/۱۲۶ برابر، در یک روز بعد از تیمار با الیسیستور ۰/۱۵۵ برابر، ۰/۰۷۳ در سه روز بعد از تیمار ۰/۱۴۰ برابر و در پنج روز بعد از تیمار با الیسیستور متیل جاسمونات ۰/۱۴۶ برابر مشاهده گردید. میزان افزایش تیمار چهار (دو روز بعد از تیمار با الیسیستور) ۰/۰۵۱۶ برابر بود. بر اساس نتایج مقایسه میانگین، بر اساس میزان فنل تیمارها به چهار گروه تقسیم شدند که تیمار چهار در گروه A و تیمار یک (شاهد) در گروه B قرار گرفت. تیمارهای دو، سه و شش نیز به دلیل دارا بودن کمترین مقدار فنل در گروه D قرار گرفت (شکل ۳-ج).

میزان فعالیت آنتی اکسیدانی نیز در کلیه تیمارها به استثنای تیمار چهار (دو روز بعد از تیمار با الیسیستور) نسبت به تیمار شاهد روند کاهشی داشت. بیشترین درصد مهار رادیکال آزاد در تیمار چهارم (۹۰/۸۵) و در تیمار شاهد (۸۸/۷۵) مشاهده و کمترین درصد مهار رادیکال آزاد در تیمار شش (پنج روز بعد از تیمار با الیسیستور) و تیمار دو (فاقد الیسیستور تحت تیمار سفوتاکسیم سدیم سالت) به ترتیب ۷۷/۳۴ و ۷۸/۹ مشاهده گردید. تیمارها بر اساس درصد مهار رادیکال آزاد در شش گروه قرار گرفتند که تیمار چهار (دو روز بعد از تیمار با الیسیستور) در گروه A، تیمار شاهد در گروه B و تیمار دوم و ششم به دلیل دارا بودن کمترین مقدار به ترتیب در گروه DE و E قرار گرفتند (شکل ۳-د).

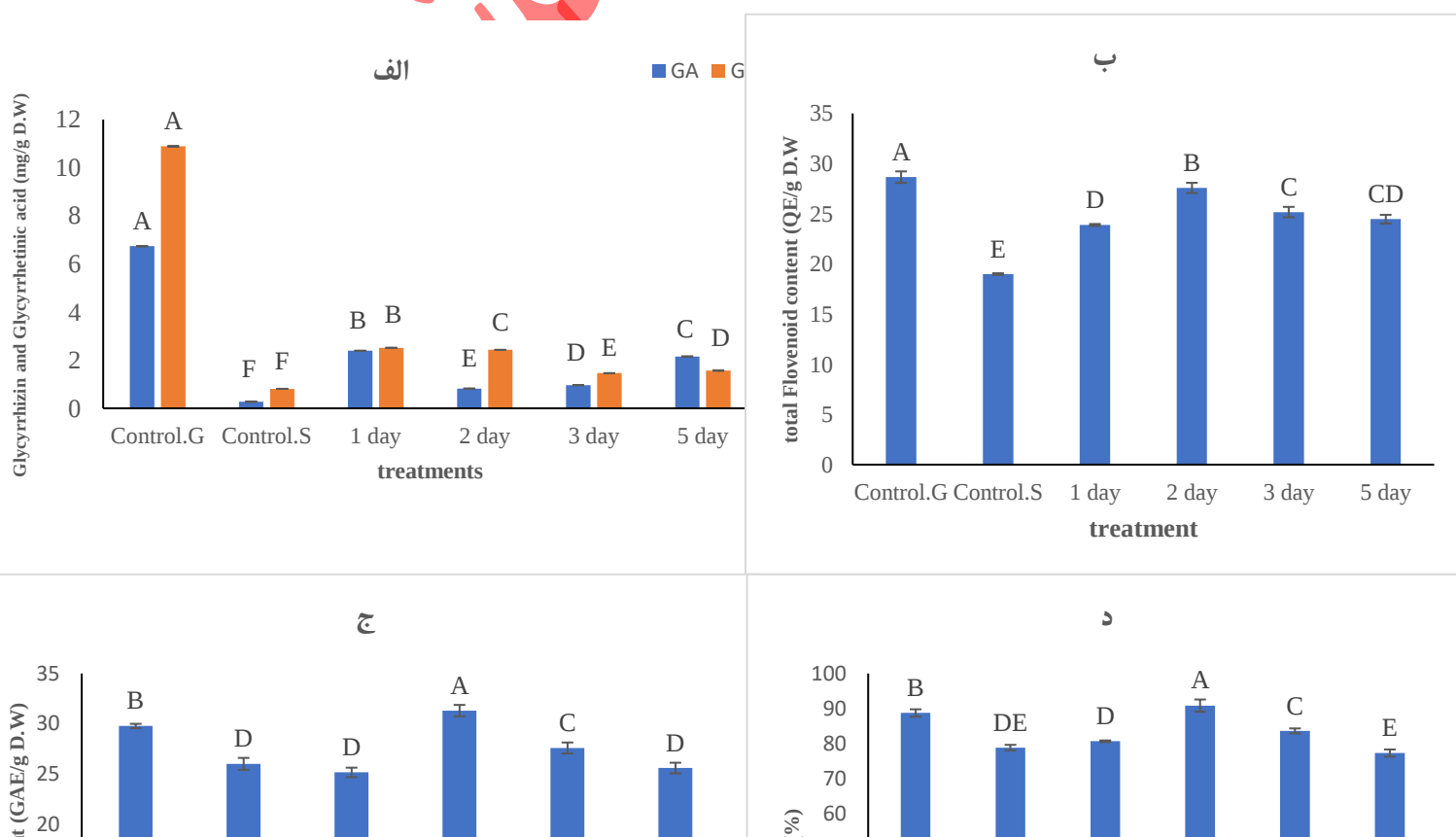
جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در ریشه موئین شیرین بیان تحت تیمار الیسیستور متیل جاسمونات

میانگین مربعات					
منابع	تغییرات /	گلیسیریزین	گلیسیریتینیک اسید	فلاونوئید	فنل
صفات	(mg/g. D.W)	(mg/g. D.W)	(mg/g. D.W)	(QE/g D.W)	(GAE/g D.W)
تیمار	۱۶/۶۶۱**	۴۲/۹۳۲**	۳۴/۴۰۷**	۱۸/۶۱۲**	۸۹/۰۲**
خطا	۰/۰۰۰۰۰۳	۰/۰۰۰۰۰۰۱	۰/۱۷۶	۰/۲۵۵	۱/۰۶۴
ضریب تغییرات (%)	۰/۰۸۹۲	۰/۰۰۰۱	۱/۶۹۴	۱/۸۳۳	۱/۲۳۷

** نتایج در سطح ۱ درصد معنی دار می باشد.



شکل ۲- نمودار HPLC مربوط به آنالیز گلیسیریزین و گلیسریتینیک اسید در ریشه موپین شیرین بیان (نمودار استاندارد، کنترل با سفوتاکسیم معمولی، کنترل با نمک سفوتاکسیم سدیم، یک، دو، سه و پنج روز بعد از تیمار با متیل جاسونات)



شکل ۳- اثر متیل جاسمونات بر روی (الف) میزان گلیسیریزین (GA) و گلیسیریتینیک اسید (GT)، (ب): میزان فلاونوئید کل، (ج): میزان فنل کل، (د): درصد مهار رادیکال های آزاد در ریشه موئین شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*). تیمار Control G: تیمار شاهدی که تحت تاثیر سفوتاکسیم معمولی بوده است، تیمار Control S: تیمار شاهدی که تحت تاثیر نمک سفوتاکسیم سدیم بوده است، 1day، یک روز تحت تیمار متیل جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکرومولار، 2 day: دو روز تحت تیمار متیل جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکرومولار، 3 day: سه روز تحت تیمار متیل جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکرومولار و 5 day: پنج روز تحت تیمار متیل جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکرومولار

بحث

سیستم ترانسفورماسیون ریشه موئین با استفاده از باکتری گرم منفی اگروباکتریوم رایزوژنز بدست می آید، که محققان را قادر به استفاده از این باکتری در گیاهان دو لپه و تعدادی از گیاهان تک لپه ای نموده است (Castellanos-Arévalo *et al.*, 2020). T-DNA در پلاسمید Ri این باکتری که ژنهای دارای لوکوس چندگانه (*rol*) را رمزبایی کرده، و تمایززدایی داخل ریشه را تقویت می کند، در طول آلودگی، وارد ژنوم گیاه شده و با آن ادغام می شود. بنابراین سبب القای ریشه موئین با شاخه های متعدد در محل زخم در گیاه آلوده می شود (Qu and Christ, 2007). در این تحقیق نیز از سویه A4 اگروباکتریوم رایزوژنز برای تلقیح استفاده شد. به نظر می رسد بعد از فرایند تلقیح، حذف یکباره باکتری با آنتی بیوتیک نمک سفوتاکسیم سدیم، سبب القای ریشه موئین در ریزنمونه شده ولی در حالتی که از سفوتاکسیم معمولی استفاده شده است، به دلیل حضور باکتری بعد از القای ریشه موئین در محیط کشت، فرایند تلقیح در ریشه های تراریخت تکرار و به موازات آن ترکیبات زیست فعال نیز در آن افزایش یافته است. فناوری ترانسفورماسیون *A. rhizogenese* به دلیل سرعت رشد سریع، عدم نیاز به مکمل هورمونی اگزوژن، پایداری ژنتیکی بالا و توانایی عالی در سنتز متابولیت های ثانویه، پتانسیل زیادی برای کاربرد در مطالعه عملکرد ژن گیاه و ویژگی های بیولوژیکی دارد (Wang *et al.*, 2023). عملکرد تراریختی اگروباکتریوم رایزوژنز تحت تاثیر سن ریزنمونه، سویه باکتریایی، زمان واکشت، گونه گیاهی، روش آلودگی و ترکیب محیط کشت قرار می گیرد (Sarker *et al.*, 2020). در این تحقیق با در نظر گرفتن یکسان بودن کلیه شرایط، زمان واکشت با توجه به نوع آنتی بیوتیک برای دو تیمار متفاوت بوده و در تیماری که تحت تاثیر سفوتاکسیم معمولی جهت حذف باکتری قرار گرفته است، تعداد واکشت بیشتر و نیز مدت زمان بیشتری حتی بعد از تشکیل ریشه موئین تحت تاثیر باکتری قرار گرفته است، لذا این تفاوت ها باعث افزایش و تجمع متابولیت های ثانویه بخصوص گلیسیریزین و گلیسریتینیک اسید شده است. الیسیستورهای زیستی و غیر زیستی مختلفی جهت افزایش گلیسیریزین در ریشه موئین شیرین بیان گونه

glabra استفاده شده بود. بیشترین میزان گلیسیریزین در الیستور مانان^۴ با غلظت ده میلی گرم بر لیتر و مدت زمان ده روز هم کشتی، ۳/۳۰۸۹ میلی گرم بر گرم ماده خشک (Srivastava et al., 2019)، و کاربرد متیل جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکرومولار در پنج روز هم کشتی در شیرین بیان گونه inflata به میزان ۱۰۸/۹۱ میکروگرم بر گرم وزن خشک، یا ۰/۱۰۸۹۱ میلی گرم بر گرم وزن خشک گزارش شده بود (Wongwicha et al., 2011). در این تحقیق بیشترین میزان گلیسیریزین در تیمار شاهد تحت تاثیر سفوناکسیم معمولی به میزان ۶/۷۴۰ میلی گرم بر گرم وزن خشک و میزان گلیسریتینیک اسید به میزان ۱۰/۸۹۰ میلی گرم بر گرم وزن خشک مشاهده شد که افزایش چشمگیری نسب به سایر تحقیقات داشت. می توان علت این افزایش را به نوع اکوتیپ و مدت زمان هم کشتی نسبت داد. اثر معنی دار اکوتیپ بر روی میزان متابولیت های ثانویه ریشه موئین اکوتیپ های Ajowan ایرانی نیز گزارش شده است (Moradi et al., 2021).

تولید متابولیت های ثانویه در گیاهان بوسیله عوامل مختلفی در طبیعت تحت تاثیر قرار می گیرد. فاکتورهای مختلفی مانند خشکی، درجه حرارت و آلودگی های میکروبی باعث تنوع در میزان تولید متابولیت های ثانویه می شوند (Zhao et al., 2005). اجرای استراتژیک این عوامل تحت موقعیت های کنترل شده می تواند سبب تغییرات زیادی در عملکرد متابولیت های ثانویه شود (Torkamani et al., 2014). تحریک با الیستورهای غیر زیستی و زیستی برای افزایش تولید فلاونول ها و فلاونول ها در ریشه های موئین استفاده شده است. هورمون های گیاهی مانند متیل جاسمونات و تنظیم کننده های رشد گیاهی مانند اتفون^۵ در بعضی از مطالعات به عنوان الیستور غیر زیستی، برای تحریک بیوسنتز ترکیبات زیست فعال مورد استفاده قرار گرفته است (Hussain et al., 2022). افزایش تولید متابولیت های ثانویه در ریشه های موئین تحت تیمار متیل جاسمونات در گیاهان مختلف گزارش شده است. تیمار ریشه موئین با متیل جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکرومولار سبب افزایش تولید گلیسیریزین در شیرین بیان گونه inflata شده است (Wongwicha et al., 2011) ترانسفورماسیون گیاه *S. baicalensis* با باکتری اگروباکتریوم رایزوزنز سویه A4 تولید ریشه های موئین با ۵ درصد فلاونوئید نمود که میزان این فلاونوئیدها، ۷۲ ساعت بعد از تیمار با متیل جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکرومولار به ۱/۸ برابر افزایش یافت (Kuzovkina et al., 2005). افزایش تولید پاکلی تاکسول در ریشه موئین تاکسول تحت تیمار ۱۰۰ میکرومولار فنیل آلانین و ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات (Syklovska-Baranek et al., 2009)، افزایش تولید ریناکانتین^۶ نسبت به تیمار شاهد بعد از تیمار ریشه موئین گیاه *Rhinacanthus nasutus* با ۱۰ میکرومولار متیل جاسمونات (Cheruvathur & Thomas, 2014)، افزایش تولید محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و مهار رادیکال های آزاد در ریشه موئین *Isatis tinctoria* تحت تیمار ۱۷۹ میکرومولار متیل جاسمونات نسبت به تیمار شاهد (Gai et al., 2019)، افزایش تولید تری ترپنوئیدها در ریشه موئین *Centella asiatica* تحت تیمار ۴۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات نسبت به شاهد (Baek et al., 2020) مثال هایی از نقش موثر متیل جاسمونات در افزایش تولید متابولیت های ثانویه در گیاهان می باشد. همانطور که مشاهده می شود کلیه این تحقیقات، با نتایج تحقیق حاضر مبنی بر عدم افزایش ترکیبات زیست فعال در تناقض است. همسو با نتایج این تحقیق، عدم تاثیر متیل جاسمونات بر روی میزان متابولیت های ثانویه گیاهان دارویی مختلفی نیز گزارش شده است: تاثیر متیل جاسمونات بر روی میزان اسانس، ترکیبات اسانس و میزان فنل کل گیاه نعنای در مزرعه و گلخانه بررسی و نتایج نشان داد که در هر دو شرایط میزان اسانس و میزان فنل کل افزایش، میزان منتون^۷ نیز به طور قابل توجهی افزایش ولی پولگون^۸ و متوفوران^۹ کاهش یافته بود. علت این تناقض نیز مراحل فنولوژیکی و نمو گیاه گزارش شده بود (Kandoudi et al., 2023). به نظر می رسد غلظت الیستور و مدت زمان در معرض قرار گیری ریشه موئین فاکتورهای مهمی جهت تاثیر مثبت متیل جاسمونات بر روی میزان متابولیت های ثانویه باشد. در تحقیقی کاربرد ۱۵ میکرومولار متیل جاسمونات به مدت چهار ساعت هم کشتی در ریشه موئین گیاه *Withania somnifera* سبب افزایش مشتقات ویتانولوئید (Sivanandhan et al., 2013)، کاربرد ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات و ۵ روز هم کشتی سبب افزایش ترکیبات فنلی در

⁴ mannan

⁵ ethephon

⁶ rhinacanthin

⁷ Menthone

⁸ pulegone

⁹ menthofuran

ریشه موئن گیاه *Polygonum multiflorum* شد (Ho et al., 2018). لذا در این تحقیق احتمالاً صرفنظر از نوع گونه و اکوتیپ، عدم تأثیر مثبت متیل جاسمونات بر روی میزان گلیسیریزین، گلیسریتینیک اسید و محتوای فلاونوئید کل به دلیل استفاده از غلظت بالای الیسیتور یا مدت زمان زیاد هم کشتی باشد. هر چند در گونه‌های دیگر شیرین بیان (گونه *inflata*) افزایش گلیسیریزین در غلظت ۱۰۰ میکرومولار مشاهده و غلظت ۵۰ میکرومولار تأثیر معنی‌داری بر روی افزایش گلیسیریزین نشان نداده بود (Wongwich et al., 2011). همچنین دلیل دیگر کاهش متابولیت‌های ثانویه نیز احتمالاً "مرگ تدریجی ریشه به دلیل غلظت بالای الیسیتور متیل جاسمونات باشد. چرا که در تحقیق دیگری در ریشه‌های موئن *Catharanthus roseus* تیمار شده با غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بی‌نظمی در کلاهدک ریشه مشاهده و این امر سبب کاهش بیومس شده بود. همچنین غلظت ۱۰۰ میکرومولار، باعث ایجاد اختلال در یکپارچگی غشای میتوکندری و کاهش بیوستتز ATP شد. علاوه بر این، چندین پروتئین که در انرژی و متابولیسم ثانویه دخیل بودند شناسایی و تغییر در تجمع این پروتئین‌ها مشاهده شده بود (Eliel Ruiz-May et al., 2011). میزان فنل کل و فعالیت آنتی اکسیدانی نیز تحت تیمار الیسیتور متیل جاسمونات در دو روز بعد از تیمار مقداری نسبت به شاهد افزایش یافته بود که می‌تواند به دلیل نقش موثر متیل جاسمونات بر سایر ترکیبات فنلی و همبستگی مثبت بین میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی باشد.

نتیجه‌گیری و پیشنهادات

میزان ترکیبات زیست فعال به خصوص میزان گلیسیریزین و گلیسریتینیک اسید در ریشه موئن شاهد که جهت حذف باکتری بعد از تلقیح از آنتی بیوتیک سفوتاکسیم معمولی استفاده شده بود، بیشتر از سایر تیمارها مشاهده شد. الیسیتور متیل جاسمونات در غلظت ۱۰۰ میکرومولار سبب کاهش میزان ترکیبات زیست فعال شد. توصیه می‌شود جهت عملکرد بهتر و تولید بیشتر ترکیبات زیست فعال بخصوص گلیسیریزین و گلیسریتینیک اسید، بعد از تلقیح با اگر باکتریوم رایزوزنز سویه A4، به جای حذف یکباره باکتری از محیط، از سفوتاکسیم معمولی در واکشت‌های متعدد استفاده شده و سپس جهت افزایش بیشتر این متابولیت‌های ثانویه مفید از الیسیتور مناسب (به جز متیل جاسمونات) در اکوتیپ سمیرم اصفهان استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش قسمتی از نتایج طرح پژوهشی به شماره PR-UOZ99-9 می‌باشد. لذا نویسندگان این مقاله از دانشگاه زابل جهت تأمین هزینه‌های این طرح تشکر و قدردانی می‌کنند.

منابع

Alcalde, M.A., Perez-Matas, E., Escrib, A., Cusido, R.M., Palazon, J., & Bonfill, M. (2022). Biotic Elicitors in Adventitious and Hairy Root Cultures: A Review from 2010 to 2022. *Molecules*, 27, 5253. <https://doi.org/10.3390/molecules27165253>.

Amagaya, S., Sugishita, E., Ogihara, Y., Ogawa, S., Okada, K., & Aizawa T. (1984). Comparative studies of the stereoisomers of glycirrhithic acid on anti-inflammatory activities. *Journal Pharmacobio- Dynamics*, 7 (12), 923-928.

Baek, S., Ho, T.-T., Lee, H., Jung, G., Kim, Y. E., Jeong, C.-S., et al. (2020). Enhanced biosynthesis of triterpenoids in *Centella asiatica* hairy root culture by precursor feeding and elicitation. *Plant Biotechnology Reports*. 14, 45–53. <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00573-w>.

Baenas, N., García-Viguera, C., & Moreno, D. A. (2014). Elicitation: a tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules*, 19, 13541-13563. <https://doi.org/10.3390/molecules190913541>.

- Castellanos-Arévalo, A. P., EstradaLuna, A. A., CabreraPonce, J. L., ValenciaLozano, E., de HerreraUbaldo, H., Folter., S., et al. (2020). Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of grain (*Amaranthus hypochondriacus*) and leafy (*A. hybridus*) amaranths. *Plant Cell Reports*, 39 (9), 1143-1160. [https://doi: 10.1007/s00299-020-02553-9](https://doi.org/10.1007/s00299-020-02553-9).
- Chang, CC., Yang, MH., Wen, HM., & Chern, JC. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food Drug Analysis*, 10, 3. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>.
- Cheruvathur, M. K., & Thomas, T. D. (2014). Effect of plant growth regulators and elicitors on rhinacanthin accumulation in hairy root cultures of *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 118, 169-177. <https://doi: 10.1007/s11240-014-0473-9>.
- Ding, H., Deng, W., Ding, L., Ye, X., Yin, S., & Huang, W. (2020). Glycyrrhetic acid and its derivatives as potential alternative medicine to relieve symptoms in nonhospitalized COVID-19 patients. *Journal of Medicinal Virology*. 92, 2200-2204. <https://doi: 10.1002/jmv.26064>.
- Eliel, R-M., Clelia, D- P, Rosa, M. G-Á., Zhentian, L, Bonnie, S., Watson, L. W., Sumner, V M. -Vargas. (2011). Methyl Jasmonate Induces ATP Biosynthesis Deficiency and Accumulation of Proteins Related to Secondary Metabolism in *Catharanthus roseus* (L.) G. Hairy Roots, *Plant and Cell Physiology*, 52 (8), 1401-1421, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr086>.
- Gai, Q-Y., Jiao, J., Wang, X., Zang, Y.-P., Niu, L.-L., and Fu, Y.-J. (2019). Elicitation of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures by salicylic acid and methyl jasmonate for the enhanced production of pharmacologically active alkaloids and flavonoids. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 137, 77–86. <https://doi: 10.1007/s11240-018- 01553-8>.
- Ghahraman, A., (1999), Basic Botany: Anatomy and Morphology, University of Tehran Press, 1, 539-542.
- Giri, C. C., & Zaheer, M. (2016). Chemical elicitors versus secondary metabolite production in vitro using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 126, 1-18. <https://doi: 10.1007/s11240-016-0985-6>.
- Gundlach, H., Muller, M.J., Kutchan, T.M., & Zenk, M.H. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 2389-2393.
- Häkkinen, S. T., Moyano, E., Cusidó, R. M., & Oksman-Caldentey, K.-M. (2016). Exploring the metabolic stability of engineered hairy roots after 16 years maintenance. *Frontier Plant Science*. 7, 1486. <https://doi: 10.3389/fpls.2016.01486>.
- Ho, T.T., Lee, J.D., Ahn, M.S., Kim, S.W., & Park, S.Y. (2018). Enhanced production of phenolic compounds in hairy root cultures of *Polygonum multiflorum* and its metabolite discrimination using HPLC and FT-IR methods. *Applied Microbiology Biotechnology*, 102, 9563-9575. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9359-9>.
- Huang, DJ., Ou, BX., & Prior, RL. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53:1841-1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>.
- Hussain, M.J., Abbas, Y., Nazli, N., Fatima, S., Drouet, S., Hano, C., & Abbasi, B.H. (2022). Root cultures, a boon for the production of valuable compounds: A comparative review. *Plants*, 11 (3), 439. <https://doi: 10.3390/plants11030439>.
- Kandoudi, W., Tavaszi-Sárosi, S., & Németh-Zámoriné, E. (2023). Inducing the Production of Secondary Metabolites by Foliar Application of Methyl Jasmonate in Peppermint. *Plants*, 12, 2339. <https://doi.org/10.3390/plants12122339>.
- Kim YJ, Wyslouzil BE, & Weathers PJ. (2002). Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 38:1-10. <https://doi.org/10.1079/IVP2001243>.

- Kowalska, A., & Kalinowska-Lis, U. (2019). 18beta-Glycyrrhetic acid: its core biological properties and dermatological applications. *International Journal of Cosmetic Scientists*. 41, 325–331. [https://doi: 10.1111/ics.12548](https://doi.org/10.1111/ics.12548).
- Kuzovkina, I.N., Guseva, A.V., Kovács, D., Szöke, É., & Vdovitchenko, M.Y. (2005). Flavones in genetically transformed *Scutellaria baicalensis* roots and induction of their synthesis by elicitation with methyl jasmonate. *Russian Journal of Plant Physiology*, 52, 77-82. <https://doi.org/10.1007/s11183-005-0012-y>.
- Li, J. Y., Cao, H. Y., Liu, P., Cheng, G. H., & Sun, M. Y. (2014). Glycyrrhizic acid in the treatment of liver diseases: literature review. *Biomedical Research International*, 872139. [https://doi: 10.1155/2014/872139](https://doi.org/10.1155/2014/872139).
- Mehrotra, S., Kukreja, A.K., Khanuja, S.P.S., & Mishra, B.N. (2008). Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra* in bioreactor. *Electronical Journal of Biotechnology*. 11:69-75. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-34582008000200009>.
- Moradi, N., Sadat Noori, S.A., Fadavi, A., Mortazavian, S.M.M., & Pakdin Parizi, A. (2021). Analysis efficiency of Iranian Ajowan ecotypes on hairy root production by different agrobacterium rhizogenesis strains. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding*. 10 (1), 117-127. <http://doi:10. IJGPB.2022.17488.1325>.
- Nasrollahi, V., Mirzaie-asl, A., Piri, K., Nazeri, S., & Mehrabi, R. (2014). The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of triterpenoid saponins in liquorice (*Glycyrrhiza glabra*). *Phytochemistry*, 103:32-37. <http://doi: 10.1016/j.phytochem.2014.03.004>.
- Qu, X., & Christ, B. J. (2007). In vitro culture of the obligate parasite *Spongospora subterranea* (cercozoa; plasmodiophorida) associated with root-inducing transferred- DNA transformed potato hairy roots. *Journal of Eukaryot. Microbiology*, 54 (6), 465-467. <http://doi: 10.1111/j.1550- 408.2007.00289.x>.
- Sánchez-Sampedro, M.A., Fernandez-Tarrago, J., Corchete, P., (2005). *Biotechnol. J.*, 119, 60-69.
- Sarkar, J., Misra, A., & Banerjee, N. (2020). Genetic transfection, hairy root induction and solasodine accumulation in elicited hairy root clone of *Solanum erianthum* D. Don. *Journal of Biotechnology*, 323, 238-245. <http://doi: 10.1016/j.jbiotec.2020.09.002>.
- Seki, H., Sawai, S., Ohyama, K., Mizutani, M., & Ohnishi T. (2011). Triterpene Functional Genomics in Licorice for Identification of CYP72A154 Involved in the Biosynthesis of Glycyrrhizin, *The Plant Cell*, 23, 4112-4123. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.082685>.
- Sivanandhan, G., Dev, K.G., Jeyaraj, M., Rajesh, M., Arjunan, A., Muthuselvam, M., Manickavasagam, M., & Ganapathi, A. (2013). Increased production of withanolide A, withanone and withaferin A in hairy root cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal elicited with methyl jasmonate and salicylic acid. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 114, 121-129. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0297-z>.
- Spollansky, T., Pitta-Alvarez, S., & Giulietti, A. (2000). Effect of jasmonic acid and aluminum on production of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 3(1): 72-75.
- Srivastava, M., Singh, G., Sharma, S., Shukla, S., & Misra, P. (2019). Elicitation Enhanced the Yield of Glycyrrhizin and Antioxidant Activities in Hairy Root Cultures of *Glycyrrhiza glabra* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38, 373-384. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9847-2>.
- Syklowska-Baranek, K., Pietrosiuk, A., Kokoszka, A., & Furmanowa, M. (2009). Enhancement of taxane production in hairy root culture of *Taxus x media* var. Hicksii. *Journal of Plant Physiology*, 166, 1950–1954. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.05.001>.
- Tenea, G.N., Calin A., Gavrila, L., & Cucu N. (2008). Manipulation of root biomass and biosynthetic potential of *Glycyrrhiza glabra* L. plants by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. *Roumanian Biotechnological Letter*, 13, 3922-3932.
- Thwe, A., Arasu, M., Li, X., Park, C.H., Kim, S.J., Al-Dhabi, N.A., & Park, S.U. (2016). Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and phenylpropanoid biosynthesis in Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Frontier Microbiology*, 7, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00318>.

- Torkamani, M., Jafari, M., Abbaspour, N., Heidary, R., & Safaie, N. (2014). Enhanced production of valerenic acid in hairy root culture of *Valeriana officinalis* by elicitation. *Open Life Science*, 9:853-863. <https://doi.org/10.2478/s11535-014-0320-3>
- Wang M., Qin, Y-Y., Wei, N-N., Xue, H-Y., & Dai, W-S. (2023). Highly efficient *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root transformation in citrus seeds and its application in gene functional analysis. *Frontier Plant Science*. 14:1293374. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1293374>.
- Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105:940-949. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.038>.
- Wongwicha, W., Tanaka, H., Shoyama, Y., & Putalun, W. (2011). Methyl Jasmonate Elicitation Enhances Glycyrrhizin Production in *Glycyrrhiza inflata* Hairy Roots Cultures. *Journal of Biosciences*. 66 c, 423 - 428. <https://doi.org/10.1515/znc-2011-7-815>.
- Yordanova, Z.P., Georgiev, M.I. (2017). Cell Factories. Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition). Academic Press. 2, 72-76. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00158-1>.
- Zhao, J., Davis, LC., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23:283-333. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.003>.
- Zhou, F., Wu, G., Cai, D., Xu, B., Yan, M., Ma, T., et al. (2019). Synthesis and biological activity of glycyrrhetic acid derivatives as antitumor agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 178, 623-635. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.029>.

The effect of methyl jasmonate on the production of bioactive compounds in hairy root licorice (*Glycyrrhiza glabra*)

Abstract

Introduction: Licorice is a member of the Fabaceae family renowned for its medicinal properties. The most important bioactive compounds of this plant are glycyrrhizin and glycyrrhetic acid, which are predominantly stored in the roots and stolons. Glycyrrhizin has a wide array of pharmacological activities, including anti-inflammatory, liver protective, gastric ulcer, antiallergic and antiviral activities against various RNA or DNA viruses, such as human acquired immunodeficiency virus (HIV) and acute respiratory syndrome. Glycyrrhetic acid has medicinal properties such as anti-inflammatory, antitumour and other medicinal effects. Considering the low amount of these compounds in plants and their complex chemical synthesis, the use of hairy roots and subsequent stimulation of the production of these secondary metabolites via elicitors constitute an efficient method for their in vitro production. **Research background:** Many studies have focused on the induction of hairy roots in licorice. Hairy roots provide stable production of glycyrrhizin. The greatest advantage of hairy roots is that they have the same or greater biosynthetic capacity to produce secondary metabolites than their parent plants do. There have been several reports of increased production of secondary metabolites using methyl jasmonate. Methyl jasmonate acts in a number of steps of the metabolic pathway of flavonoid biosynthesis, and its stimulating effect depends on the synthesis of de novo protein. Therefore, in this study, hairy roots were produced from *Agrobacterium rhizogenes* strain A4, and the effect of methyl jasmonate as an elicitor in the production of bioactive compounds such as glycyrrhizin and glycyrrhetic acid was investigated. **Materials and methods:** Licorice seeds were collected from the semiram region of Isfahan Province. After seedlings from hypocotyls and cotyledons were produced, they were used for induction. The *Agrobacterium rhizogenes* A4 strain was used to induce hairy roots. Two types of antibiotics were used to remove bacteria: general cefotaxime and cefotaxime sodium salt. After hairy roots were produced, 21-day-old roots were placed in liquid ½ MS media for 35 days. For elicitation, methyl jasmonate was used at a concentration of 100 µM. Hairy roots were harvested at one, two, three and five days after elicitation. Traits such as glycyrrhizin content, glycyrrhetic acid content, total phenol content, total flavonoid content and antioxidant activity were measured in control and treated hairy roots. Data analysis was performed via SAS software ver. 9.2, and graphs were drawn with Excel software. **Results:** Compared with those in the other treatments, the amounts of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in the control treatment, which were used to remove bacteria from normal cefotaxime, were greater. Therefore, this treatment was placed in group A, and treatment two (without an elicitor, removing bacteria with one inoculation with cefotaxime sodium salt), which presented the lowest increase compared with the other treatments, was placed in group F. The amount of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid was lower in the presence of methyl jasmonate than in the control. The amount of total flavonoids also decreased in all the treatments compared with the control, but the amount of this decrease was lower than the decreases in glycyrrhizin and glycyrrhetic acid contents. On the basis of the average comparison results, the amount of phenol in the treatments was divided into four groups: treatment four (two days exposed to methyl jasmonate elicitor) was placed in group A, and treatment one (control) was placed in group B. The other treatments were placed in group D because they had the lowest amount of phenol. The amount of antioxidant activity also decreased in all the treatments except for treatment four (two days after treatment with elicitor) compared with the control treatment. The highest percentage of free radical inhibition was observed in the fourth treatment (90.85) and in the control treatment (88.75), and the lowest percentage of free radical inhibition was observed in the sixth treatment (five days after treatment with elicitor), while the percentages in the second treatment (without elicitor under sodium salt) were 77.34 and 78.9, respectively. **Conclusion:** The lack of effect or negative effect of methyl jasmonate on bioactive compounds, especially the amount of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid, in this research can be attributed to the effects of species and ecotype, the number of cultures after inoculation, the type of antibiotic used to remove bacteria, the concentration of elicitor and the duration of time, who have been affected by the elicitor, attributed. Considering that, in most studies, the

amount of secondary metabolites produced using hairy roots under elicitor treatment was less than or at least close to the amount mentioned in this research, the results of this research could be a suitable solution for increasing the amount of bioactive compounds, especially glycyrrhizin. and provide glycerethnic acid in a short time and at a lower cost.

Key words: *Methyl Jasmonate, Glycyrrhizin, glycyrrhetic acid, cefotaxime sodium salt*

پایان کارهای دانشجویی