



Effect of Methyl Jasmonate on the Production of Bioactive Compounds in Hairy Root Licorice (*Glycyrrhiza glabra*)

Maryam Allahdou^{✉1}, Leila Mehravaran², Hamideh Khajeh³

1. Corresponding Author, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran. E-mail: Maryam.allahdou@uoz.ac.ir
2. Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran. E-mail: leila.mehravaran@uoz.ac.ir
3. Institute of Plant Biotechnology, University of Zabol, Zabol, Iran. E-mail: hmdekhaej@yahoo.com

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Article	Considering the low amount of important bioactive compounds such as glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in licorice and their complex biosynthesis, in vitro production of hairy roots is an efficient method for licorice secondary metabolites production. Therefore, this experiment aimed to investigate the efficiency of licorice hairy roots in the presence of <i>Agrobacterium rhizogenes</i> and the effect of methyl jasmonate (MeJA) at 100 μ m, as an elicitor, on inducing glycyrrhizin and glycyrrhetic acid production.. After inoculation, two kinds of the cefotaxime were used to eliminate the bacterium. The hairy roots were then harvested after one, two, three, and five days of elicitation. Overall, The results showed that the amount of glycyrrhizin, glycyrrhetic acid and total flavonoids decreased in all treatments compared to the control, and the magnitude of this reduction in hairy roots treated with one inoculation of cefotaxime sodium salt and no MeJA was the highest in terms of glycyrrhizin (0.959 times) and glycyrrhetic acid (0.925 times) production. In addition, the amount of total phenol (31.22 GAE/g D.W) and antioxidant activity (90.85%) was highest in in the hairy roots subjected to MeJA for two days and the control. MeJA had negative or no effect on production of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid, which can be related to type of species, ecotype, and antibiotics as well as the number of subcultures after inoculation, the concentration of the elicitor, and a period of time at which hairy roots exposed to a given elicitor. Based on our findings, cefotaxime is recommended to omit the bacteria from culture media. Overall, our findings could be used as an economically method to increase bioactive compounds, especially glycyrrhizin and glycerethnic acid, at a short time and low cost.
Article history: Received: 18 Augustu 2024 Received in revised form: 27 October 2024 Accepted: 30 October 2024 Published online: Spring 2025	
Keywords: <i>Cefotaxime sodium salt,</i> <i>Glycyrrhetic acid,</i> <i>Glycyrrhizin,</i> <i>Methyl Jasmonate.</i>	

Cite this article: Allahdou, M., Mehravaran, L. & Khajeh, H. (2025). Effect of Methyl Jasmonate on the Production of Bioactive Compounds in Hairy Root Licorice (*Glycyrrhiza glabra*). *Iranian Journal of Horticultural Science*, 56 (1), 1-17. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.380834.2200>



© The Author(s).

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.380834.2200>

Publisher: The University of Tehran Press.

Extended Abstract

Introduction

Licorice, belonging to Fabaceae, is well known for its medicinal properties. Glycyrrhizin and glycyrrhetic acid are of the most important bioactive compounds mainly accumulated in Licorice roots and stolons. Glycyrrhizin possesses 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. Likewise, glycerhethnic acid has numerous medicinal properties, such as anti-inflammatory, antitumor, and so on. Plants generally contain low amount of above-mentioned compounds; therefore, using hairy roots and eliciting them by an appropriate substance has

attracted the attentions in order to produce such compounds (as secondary metabolites) at *in vitro* condition. Many studies have concentrated on inducing hairy roots production in licorice. Hairy roots generally are able to produce glycyrrhizin. The greatest advantage of hairy roots, as compared to other parts of a plant, is contributed to their biosynthetic capacity for producing secondary metabolites. Recently, the beneficiary effects of methyl jasmonate (MeJA) on inducing secondary metabolites have been documented in different reports, because of its role in the biosynthesis of flavonolignans. This study aimed to investigate the effect of MeJA, as an elicitor, on *in vitro* production of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in hairy roots of licorice.

Materials and Methods

Licorice seeds were initially collected from the Semiram region of Isfahan Province and soaked in MS media for germination. Hypocotyls and cotyledons were used as explants for producing bioactive compounds. In this context, *Agrobacterium rhizogenes* A4 strain was used to induce hairy roots. The two types of antibiotics were also employed to remove bacteria including cefotaxime and cefotaxime sodium salt. After emerging, the 21-day-old roots were immersed in a liquid ½ MS medium for 35 days. In our research, MeJA (100 µM) was used as an elicitor. Hair roots were harvested at one, two, three, and five days after elicitation. In this experiment, numerous traits were measured including glycyrrhizin, glycyrrhetic acid, total phenol, total flavonoid, and antioxidant activity. In order to analyze the data and draw graphs, SAS (ver. 9.2) and Excel softwares were used, respectively.

Results

The results of this research showed that the content of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid was higher in the control (bacteria eliminated using general cefotaxime and no MeJA). The lower amount of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid was produced using MeJA. The total flavonoid content was lower in all treatments than in the control, but the extent of this decrease was less than the decrease in glycyrrhizin and glycyrrhetic acid. The roots that were exposed to MeJA for two days contained the highest amount of total phenol, followed by the roots of the control group, as indicated by the results of the mean comparisons. Hairy root in other treatments had the lowest amount of phenolic compounds. Furthermore, the activity of antioxidants declined in all the treatments, except for hairy roots exposed to MeJA for two days as well as control. These roots showed the highest percentage of free radical inhibition as 90.85 and 88.75, respectively, whereas the lowest was recorded in hairy roots treated with MeJA for five days. The percentage of free radical inhibition in hairy roots were derived in media containing sodium salt cefotaxime for bacteria elimination, and without elicitation, as well as those were subjected to Me JA for five day showed 78.9 and 77.34, respectively.

Conclusion

The results of this research showed that the lack or negative effects of MeJA on bioactive compounds, especially glycyrrhizin and glycyrrhetic acid, are different based on type of species, ecotype, and antibiotic used to remove bacteria as well as the number of sub culture after inoculation, the concentration of given elicitor, and the duration of time subjecting to the elicitor(s). In a vast majority of previous studies, the rate of secondary metabolites produced by elicited hairy roots was lower or approximately close to the amount recorded in our work. Overall, our findings could be used as an economically method to increase bioactive compounds, especially glycyrrhizin and glycerethnic acid, at a short time and low cost.

Author Contributions

Maryam Allahdou contributed to the conception of the study, doing laboratory work, data collection and analysis, interpretation of data, and drafting the manuscript. Leila Mehravaran assisted in the analysis and interpretation of results, and Hamideh Khajeh did laboratory work, data collection, and analysis.

Data Availability Statement

All data supporting the findings of this study are available within the paper and the datasets during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgements

This article is taken from research project number PR-UOZ99-9. The authors of the article thank University of Zabol for the financial support of this research.

Ethical considerations

This article does not contain any studies involving human and animal subjects.

Conflict of interest

On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.



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

مریم اله دو^۱ | لیلا مهرآوران^۲ | حمیده خواجه^۳

۱. نویسنده مسئول، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران. رایانامه: Maryam.allahdou@uoz.ac.ir
۲. گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران. رایانامه: leila.mehravarann@uoz.ac.ir
۳. پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران. رایانامه: hmdekhaie@yahoo.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۲۸ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۸/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۰۹ تاریخ انتشار: بهار ۱۴۰۴ کلیدواژه‌ها: گلیریزین، گلیریتینیک اسید، نمک سفوتاکسیم سدیم.	با توجه به میزان اندک ترکیبات زیست فعال مهم، مانند گلیریزین و گلیریتینیک اسید در شیرین بیان و پیچیدگی سنتز شیمیایی آنها، تولید درون شیشه ای ریشه موئین و تحریک تولید آنها با استفاده از الیستورها روشی کارآمد برای تولید در شرایط درون شیشه ای می باشد. لذا در این پژوهش، با استفاده از آگروباکتریوم رایزوژنز اقدام به تولید ریشه موئین شد. جهت حذف باکتری، بعد از تلقیح از دو نوع آنتی بیوتیک سفوتاکسیم معمولی و نمک سفوتاکسیم سدیم، و برای افزایش تولید ترکیبات زیست فعال از الیستور متیل جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکرومولار استفاده شد. برداشت ریشه ها در یک، دو، سه و پنج روز بعد از تیمار انجام شد. نتایج نشان داد که محتوای گلیریزین، گلیریتینیک اسید و فلاونوئید کل در تمام تیمارها نسبت به تیمار شاهد کاهش داشت. میزان این کاهش در تیمار بدون الیستور، حذف باکتری با یک واکشت با نمک سفوتاکسیم سدیم بیشترین (۰/۹۵۹ و ۰/۹۲۵ برابر به ترتیب برای گلیریزین و گلیریتینیک اسید) بود. میزان فنل کل (۳۱/۲۲) گالیک اسید بر گرم وزن خشک) و فعالیت آنتی اکسیدانی (۹۰/۸۵ درصد)، در ریشه هایی که دو روز تحت تاثیر الیستور بودند و ریشه های شاهد بیشترین مقدار بود. در این تحقیق، میزان گلیریزین و گلیریتینیک اسید تحت تاثیر الیستور متیل جاسمونات قرار نگرفت و یا کاهش یافت که می تواند به اثر گونه و اکوتیپ، تعداد واکشت بعد از تلقیح، نوع آنتی بیوتیک، غلظت الیستور و مدت زمانی که ریشه های موئین تحت تاثیر الیستور قرار گرفته اند نسبت داده شود. بر اساس نتایج، استفاده از سفوتاکسیم برای حذف باکتری از محیط کشت توصیه می شود.

استناد: اله دو، مریم؛ مهرآوران، لیلا و خواجه، حمیده (۱۴۰۴). اثر متیل جاسمونات بر میزان تولید ترکیبات زیست فعال در ریشه موئین شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*)

نشریه علوم باغبانی ایران، ۵۶ (۱)، ۱-۱۷. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.380834.2200>



© نویسندگان.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.380834.2200>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

مقدمه

شیرین بیان گیاهی چند ساله، با طول تقریبی ۶۰ سانتی متر است که به صورت خودرو در کشورهای آسیای غربی و ویتنام رشد می کند (Amagaya et al., 1984). گونه *Glycyrrhiza glabra* در ایران نیز به صورت خودرو و علف هرز در مزارع گندم و نخود در دیمزارهای استان های کرمانشاه، ایلام، فارس، اصفهان و اراک پراکنش دارد (Ghahraman, 1999). ریشه ها و استولن های *G. glabra*، *G. uralensis* و *G. inflata* از مهمترین داروهای خام در دنیا به شمار می روند. این گونه ها حاوی مقادیر زیادی از ماده موثره گلیسیریزین (دو تا هشت درصد از ماده خشک)، که یک نوع تریتروپنئید ساپونین است، می باشند. گلیسیریزین طیف وسیعی از کاربردهای دارویی، نظیر خاصیت ضد التهابی، محافظت از کبد، درمان زخم معده، ضد حساسیت و ضد ویروس در برابر ویروس های 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 می باشد (Seki et al., 2011). گلیسیریتینیک اسید یکی دیگر از ترکیبات زیست فعال شیرین بیان است که به شکل دو ایزومر 18α-Glycyrrhethinic acid و 18β-acid وجود دارد (Li et al., 2014). این ترکیب دارای خواص دارویی، مانند ضد التهاب (Kowalska 2019)، ضد تومور (Zhou et al., 2019) و اثرات دارویی دیگر (Ding et al., 2020) می باشد. با توجه به این که استخراج گلیسیریزین از ریشه گیاه سبب نابودی گیاه می شود، این گیاه دارویی در بسیاری مناطق در معرض خطر انقراض قرار گرفته است (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، ریشه های موئین از نظر تولید ترکیبات زیست فعال شبیه به گیاه می باشند، بنابراین تمایز آنها باعث فعال شدن مستقیم متابولیسم ثانویه می شود (Alcalde et al., 2022). باکتری *Agrobacterium rhizogenes* یک باکتری خاکزی است که القای ریشه موئین را تسهیل می کند (Thwe et al. 2016). T-DNA این باکتری دارای دو توالی مستقل است که با مرزهای TL (چپ) و TR (راست) مشخص شده و به طور مستقل به ژنوم گیاه میزبان منتقل و در آن ادغام می شوند، اما تنها TL-DNA برای ایجاد ریشه های موئین ضروری و کافی است. تجزیه و تحلیل توالی TL-DNA نشان داده است که چهار ژن *rol A*، *rol B*، *rol C* و *rol D* برای القای ریشه های موئین ضروری هستند (Yordanova et al., 2017). برای تولید متابولیت های خاص، ریشه های موئین به دلیل ویژگی هایی مانند پایداری ژنتیکی، تولید زیست توده بالا و ظرفیت بیوستتزی کارآمد مناسب تر از کشت سلولی یا کالوس می باشند. علاوه بر این، ریشه های موئین قادر به تولید متابولیت های خاص برای مدت زمان طولانی هستند (Häkkinen et al., 2016). فرآیند تحریک سازی باعث ایجاد اختلال بین جاسمونات ها و گیرنده های آنها در غشای پلاسمایی می شود. تحریک سازی، همچنین باعث ایجاد آبخاری از پاسخ های دفاعی در سلول ها، از جمله تولید گونه های فعال اکسیژن و نیتروژن (ROS و RNS) و القای آنزیم هایی شده که به عنوان محافظت کننده در برابر تنش اکسیداتیو عمل می نمایند (Giri & Zaheer, 2016). بدین جهت، پاسخ های دفاعی در سلول ها منجر به سنتز و تجمع مولکول های سیگنالی، مانند جاسمونیک اسید، سالیسیلیک اسید، اکسید نیتریک و اتیلن و نیز تنظیم بیان ژن های درگیر در مسیر بیوستتزی متابولیت ثانویه می شود (Baenas et al., 2014).

پیشینه پژوهشی

امکان القای ریشه موئین در گیاه شیرین بیان توسط محققین مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (Mehrotra et al. 2012; Tenea et al., 2008; Shirazi et al. 2008). کشت ریشه های موئین تولید پایدار گلیسیریزین را فراهم می آورد (Tenea et al., 2008). بزرگترین مزیت ریشه موئین، ظرفیت بیوستتزی یکسان یا بیشتر برای تولید متابولیت ثانویه، در مقایسه

با گیاهان مادر آنها می‌باشد (Kim et al., 2002). علاوه بر این، تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه با استفاده از الیستورها روشی کارآمد برای تولید درون شیشه‌ای متابولیت‌های ثانویه است. جاسمونات‌ها مولکول‌های کلیدی در فرایند تحریک سازی بوده و با تحریک رونویسی یا ترجمه سبب افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای می‌شوند (Gundlach et al., 1992)، چنانچه متیل جاسمونات سبب افزایش تولید سلیمارین در کشت سلولی گیاه خار مریم شده است (Sañchez-Sampedro et al., 2005). متیل جاسمونات در برخی از مراحل مسیر متابولیکی فلاونوگن‌ها عمل نموده و اثر محرک آن بستگی به سنتز پروتئین دنوو دارد (Sañchez-Sampedro et al., 2005).

در این پژوهش ابتدا ریشه‌های موئین از هیپوکوتیل و کوتیلدون گیاه شیرین بیان، با استفاده از آگروباکتریوم رایزوترن سویه A4، تولید شد، سپس اثر متیل جاسمونات به‌عنوان یک الیستور در تولید ترکیبات زیست فعال گلیسیریزین و گلیسیریتینیک اسید ارزیابی شد. همچنین، برای اولین بار اثر دو نوع آنتی بیوتیک سفوتاکسیم و نمک سفوتاکسیم سدیم روی میزان ترکیبات زیست فعال این گیاه مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌شناسی پژوهش

بذرهای شیرین بیان گونه *Glycyrrhiza glabra* از استان اصفهان، شهرستان سمیرم جمع‌آوری گردید. استانداردهای گلیسیریزین و گلیسیریتینیک اسید، متیل جاسمونات و آنتی بیوتیک سفوتاکسیم سدیم (CAS No: 64485-93-4) از شرکت سیگما آلدیج و سایر مواد شیمیایی از شرکت مرک خریداری شدند. سفوتاکسیم تزریقی نیز از داروخانه تهیه گردید.

القای ریشه موئین

در ابتدا خواب بذرهای با قرار گرفتن به مدت ۱۵ دقیقه در اسید سولفوریک غلیظ، شکسته شد. سپس، بذرهای با هیپوکلیت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضد عفونی شدند و به‌دنبال آن دوبار با آب مقطر استریل هر بار به مدت یک دقیقه شستشو شدند. تولید گیاهچه‌های استریل با کشت بذرهای در محیط 1/2 MS و نگهداری در شرایط دمایی ۲۵ درجه سلسیوس، و فتوپرود ۱۲ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انجام شد. از هیپوکوتیل و کوتیلدون گیاهچه‌های ۲۵ روزه به‌عنوان ریز نمونه جهت القای ریشه موئین استفاده شد (Srivastava et al., 2019). برای آماده‌سازی باکتری جهت تلقیح به ریزنمونه‌ها، ابتدا یک تک‌کلی از باکتری *Agrobacterium rhizogenes* سویه A4 در محیط کشت LB کشت شد و در داخل انکوباتور شیکر با دمای ۲۸±۰/۵ درجه سلسیوس و ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد سپس با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و سلول‌های باکتری جدا شد. بعد از اضافه نمودن محیط کشت MS مایع به سلول‌ها بار دیگر سانتریفیوژ انجام شد. در مرحله بعد سلول‌های حاصل به محیط کشت 1/2 MS منتقل، و به مدت یک ساعت در دمای ۲۸±۰/۵ درجه سلسیوس روی شیکر با دور 150 دور در دقیقه انکوبه شدند. ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون با استفاده از سوزن زخم شدند و در محلول MS محتوی سلول‌های باکتری به مدت ۲۵ دقیقه، با سرعت ۸۰ دور در دقیقه، روی شیکر قرار گرفتند. ریزنمونه‌های شاهد نیز در آب مقطر استریل غوطه‌ور شده و روی شیکر قرار گرفتند. جهت حذف باکتری، نمونه‌ها با آب مقطر حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم شستشو داده شدند. نمونه‌ها روی کاغذ صافی خشک شدند و به محیط کشت 1/2 MS جامد محتوی ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم منتقل و به مدت ۴۸ ساعت در محیط تاریک با دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. نمونه‌ها، با وجود ظهور ریشه موئین، تا حذف کامل باکتری به مدت ۳ هفته در محیط کشت 1/2 MS جامد محتوی ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم واکشت شدند. تعدادی از نمونه‌ها نیز، بعد از تلقیح به محیط کشت 1/2 MS جامد محتوی نمک سفوتاکسیم سدیم (۵ میلی‌گرم در لیتر) انتقال داده شدند. این آنتی بیوتیک باعث حذف کامل باکتری از محیط می‌شود. بعد از ظهور ریشه موئین، تنها یک واکشت در این محیط کشت انجام شد. سپس، ریشه از ریزنمونه‌ها به آرامی جدا و با انتقال به محیط کشت MS مایع و فاقد هورمون روی شیکر با دور ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سلسیوس در محیط تاریک قرار گرفت.

تیمار با الیستور

به منظور افزایش غلظت ترکیبات زیست فعال و رشد ریشه، ریزنمونه‌ها به مدت ۳۵ روز در محیط کشت MS مایع فاقد هورمون قرار گرفتند. استوک متیل جاسمونات با حل شدن در محلول DMSO تهیه و با فیلتر ۰/۴۵ میکرون استریل شد. متیل جاسمونات در غلظت ۱۰۰ میکرومولار به محیط کشت ریشه‌ها اضافه شد. به نمونه‌های شاهد (ریشه‌های موئین تحت تیمار سفوتاکسیم معمولی و واکنش متوالی در این آنتی بیوتیک)، و ریشه‌های موئینی که فقط یکبار تحت تیمار نمک سفوتاکسیم سدیم قرار گرفته بودند، آب مقطر استریل اضافه شد. سپس، ریشه‌ها در فواصل زمانی یک، دو، سه و پنج روز، بعد از تیمار با الیستور برداشت شدند و در سایه به مدت ۷۲ ساعت خشک شدند. در این بررسی اثر الیستور (متیل جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکرومولار) و آنتی بیوتیک (سفوتاکسیم معمولی و سفوتاکسیم سدیم سالت) در محیط کشت روی رشد ریشه‌های موئین و ترکیبات زیست فعال مورد بررسی قرار گرفت. تیمارها عبارت بودند از: محیط کشت بدون الیستور و دارای سفوتاکسیم معمولی (تیمار یک، شاهد)، بدون الیستور تحت سفوتاکسیم سدیم سالت (تیمار ۲)، حاوی الیستور و برداشت ریشه‌ها یک روز بعد از تیمار (تیمار سه)، حاوی الیستور و برداشت ریشه‌ها دو روز بعد از تیمار (تیمار چهار)، حاوی الیستور و برداشت ریشه‌ها سه روز بعد از تیمار (تیمار پنج)، حاوی الیستور و برداشت ریشه‌ها پنج روز بعد از تیمار.

استخراج DNA و واکنش زنجیره ای پلیمرز

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 گلیسریریزین، ریشه‌های ۳۵ روزه در محیط مایع قرار گرفتند. ریشه‌هایی که از رشد و خصوصیات مورفولوژیک مناسبی برخوردار بودند جهت اثبات ترانسفورماسیون مورد استفاده قرار گرفتند. آنالیز PCR با پرایمرهای منطقه TL (Srivastava et al., 2019) به منظور اثبات ترانسفورماسیون مورد استفاده قرار گرفت.

در ابتدا ریشه‌های موئین شاهد (فاقد الیستور) در مجاورت ازت مایع قرار گرفته و به خوبی پودر شدند. 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 5'-AAG TTG AAT GAG TAT GAC TGCC-3' Forward و 5'-GGA CGA Reverse-3' CAT GGC ACT CTG GGAG-3' تکثیر شد. چرخه دمایی واکنش زنجیره ای پلیمرز به صورت زیر انجام شد: ۹۴ درجه سلسیوس به مدت سه دقیقه و به دنبال آن ۳۶ چرخه با دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و یک چرخه نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه (Srivastava et al., 2019).

آنالیزهای بیوشیمیایی

ابتدا نیم گرم ریشه موئین خشک و 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 صاف، خشک و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان استفاده نگهداری شد.

محتوای فنل کل و فلاونوئید کل

محتوای فنل کل در نمونه‌ها با استفاده از روش فولین-سیوکالتیو (Wojdyło et al., 2007) و محتوای فلاونوئید کل با روش رنگ سنجی کلرید آلومنیوم تعیین شد (Chang et al., 2002). معادله منحنی استاندارد $y = 0.1427 + 0.0029x$ و $(x, r^2 = 0.999)$ و $(y = -0.065 + 0.0088x, r^2 = 0.939)$ به ترتیب برای اندازه گیری محتوای فنل کل و فلاونوئید کل به دست آمد و داده ها به ترتیب با واحدهای میلی گرم معادل گالیک اسید و کوئرستین، به ازای گرم ماده خشک بیان شد.

$$y = 0.1427 + 0.0029x \quad (r^2 = 0.999)$$

(رابطه ۱)

$$y = -0.065 + 0.0088x \quad (r^2 = 0.939)$$

رابطه ۲)

میزان فعالیت آنتی اکسیدانی (DPPH)

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنتی اکسیدانی (DPPH) مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره متانولی نمونه‌ها در غلظت‌های مختلف تهیه و به آنها ۵ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار افزوده گردید. مخلوط به‌شدت تکان داده شد، و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق نگهداری شد. سپس، جذب نمونه‌ها در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. متانول ۸۰ درصد به‌عنوان بلانک استفاده شد. درصد بازدارندگی نمونه‌ها با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد.

$$\text{درصد بازدارندگی} = \frac{Ac-As}{Ac} \times 100 \quad \text{رابطه ۳)}$$

در این رابطه As و Ac به‌ترتیب عدد جذب مربوط به نمونه‌های گیاهی و نمونه کنترل می‌باشند. از شاخص IC50 برای بررسی فعالیت حذف‌کنندگی رادیکال DPPH استفاده شد. به‌منظور بررسی بهتر این فعالیت، از آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (Huang et al., 2005).

اندازه‌گیری گلیسرین و گلیسرینیک اسید

ریشه‌های خشک و پودر شده، با متانول ۷۰ درصد به مدت ۱۶ الی ۱۸ ساعت در دمای ۴۰ الی ۴۵ درجه سلسیوس عصاره‌گیری شدند. آماده‌سازی نمونه‌ها و آنالیز HPLC با استفاده از روش Nasrollahi et al. (2014) انجام شد. محلول‌های استاندارد گلیسرین و گلیسرینیک اسید در غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر آماده شد. آنالیز نمونه‌ها برای بررسی میزان گلیسرین و گلیسرینیک اسید با استفاده از دستگاه HPLC (Agilent 1260 infinity II HPLC system) انجام شد. مشخصات دستگاه HPLC شامل دیتکتور VWD UV-VIS با طول موج ۲۵۴ نانومتر، فاز معکوس شامل ستون C18 به طول ۲۵۰×۴/۶ میلی‌متر با ستون اولیه انتگرال ۵ میکرومتر، و فاز متحرک شامل متانول: آب: اسید استیک (۶:۳۴:۶۰) بود. درجه حرارت ستون ۴۰ درجه سلسیوس و شدت جریان حلال در ستون یک میلی‌لیتر بر دقیقه و حجم تزریق نمونه‌ها ۵ میکرولیتر بود.

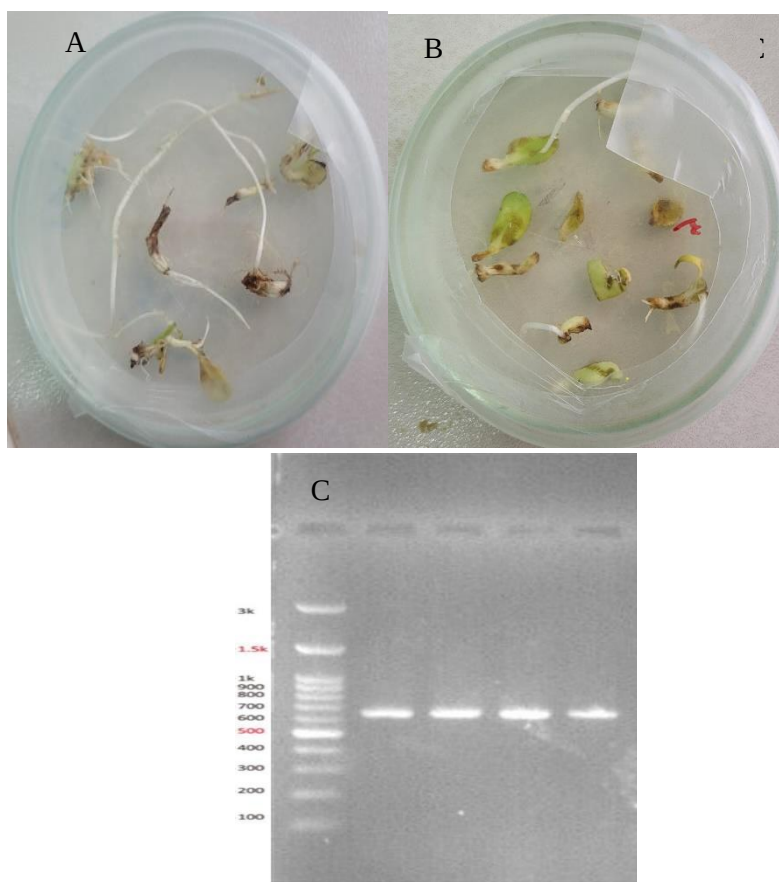
تجزیه و تحلیل داده‌ها

کلیه آزمایشات با سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تجزیه واریانس داده‌ها و آزمون مقایسه میانگین دانکن برای بررسی تفاوت معنی‌دار بین ریشه‌های موبین شاهد و ریشه‌های مؤین تیمار شده در سطح پنج درصد انجام شد. کلیه آنالیزها با نرم افزار SAS، نسخه 9.2 انجام و نمودارهای بررسی میزان متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنتی اکسیدانی نیز به کمک نرم افزار Excel، نسخه 2016 ترسیم گردیدند.

یافته‌های پژوهش

تولید ریشه مؤین و تایید آن با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

براساس نتایج این بررسی اولین نشانه‌های ظهور ریشه‌ها در ریزنمونه هیپوکوتیل و بعد از دو روز مشاهده شد، درحالی‌که در ریزنمونه کوتیلدون بعد از چهار روز مشاهده گردید. صرف‌نظر از زمان ریشه‌دهی، هردو ریزنمونه هیپوکوتیل و کوتیلدون ریشه‌های فراوانی تولید کردند بیشترین فراوانی تولید ریشه را داشتند (شکل 1-A, B). نتایج PCR تکثیر یک قطعه 650 bp را نشان داد و ترانسفورماسیون را تایید نمود (شکل 1-C).



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

تأثیر الیسیتور متیل جاسمونات بر میزان گلیسیریزین و گلیسیریتنیک اسید

تجزیه واریانس صفات نشان داد که بین تمام تیمارهای مورد بررسی از نظر تولید گلیسیریزین و گلیسیریتنیک اسید در سطح یک درصد اختلاف معنی دار وجود دارد (جدول ۱). مشاهده شد که نوع آنتی بیوتیک و تعداد واکشت، جهت حذف باکتری آگروباکتریوم رایزوترنز سویه A4، بعد از القای ریشه موئین تأثیر بسزایی در میزان ترکیبات زیست فعال، به خصوص گلیسیریزین و گلیسیریتنیک 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 باعث حذف کامل باکتری از محیط نشد، لذا چندین واکشت متوالی، حتی بعد از تولید ریشه موئین، جهت حذف کامل باکتری انجام گرفت. در طی این مراحل، مدت زمان قرار گیری ریشه‌ها در مجاورت باکتری افزایش یافت که منجر به افزایش ترکیبات زیست فعال شد.

میزان گلیسیریزین در تمام تیمارها نسبت به تیمار شاهد (محیط بدون الیسیتور، تحت سفوتاکسیم) کاهش یافت. میزان این کاهش در تیمار بدون الیسیتور و حذف باکتری با یک واکشت با نمک سفوتاکسیم سدیم به میزان ۰/۹۵۹ برابر و در تیمارهای حاوی الیسیتور در روزهای یک، دو، سه و پنج روز بعد از تیمار به ترتیب ۰/۶۴۴، ۰/۸۷۸، ۰/۸۵۷ و ۰/۶۸۰ برابر تیمار شاهد مشاهده شد. همچنین، میزان کاهش گلیسیریتنیک اسید نسبت به شاهد در تیمار بدون الیسیتور و حذف باکتری با یک واکشت با نمک سفوتاکسیم سدیم ۰/۹۲۵ برابر، و در تیمارهای حاوی الیسیتور در روزهای یک، دو، سه و پنج روز بعد از تیمار به ترتیب ۰/۷۶۹، ۰/۷۷۶، ۰/۸۶۵ و ۰/۸۵۵ برابر بود. نتایج مقایسه میانگین صفات نیز نشان داد که تیمار شاهد حاوی سفوتاکسیم

بیشترین مقادیر گلیسیریزین و گلیسیریتینیک اسید را دارا بود، در حالی که تیمار بدون الیسیطور و حذف باکتری با یک واکشت با سفوتاکسیم سدیم سالت کمترین میزان این ترکیبات را به خود اختصاص داد. استفاده از متیل جاسمونات میزان گلیسیریزین و گلیسیریتینیک اسید را نسبت به شاهد حاوی سفوتاکسیم معمولی کاهش داد (شکل ۲ و شکل ۳-الف).

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

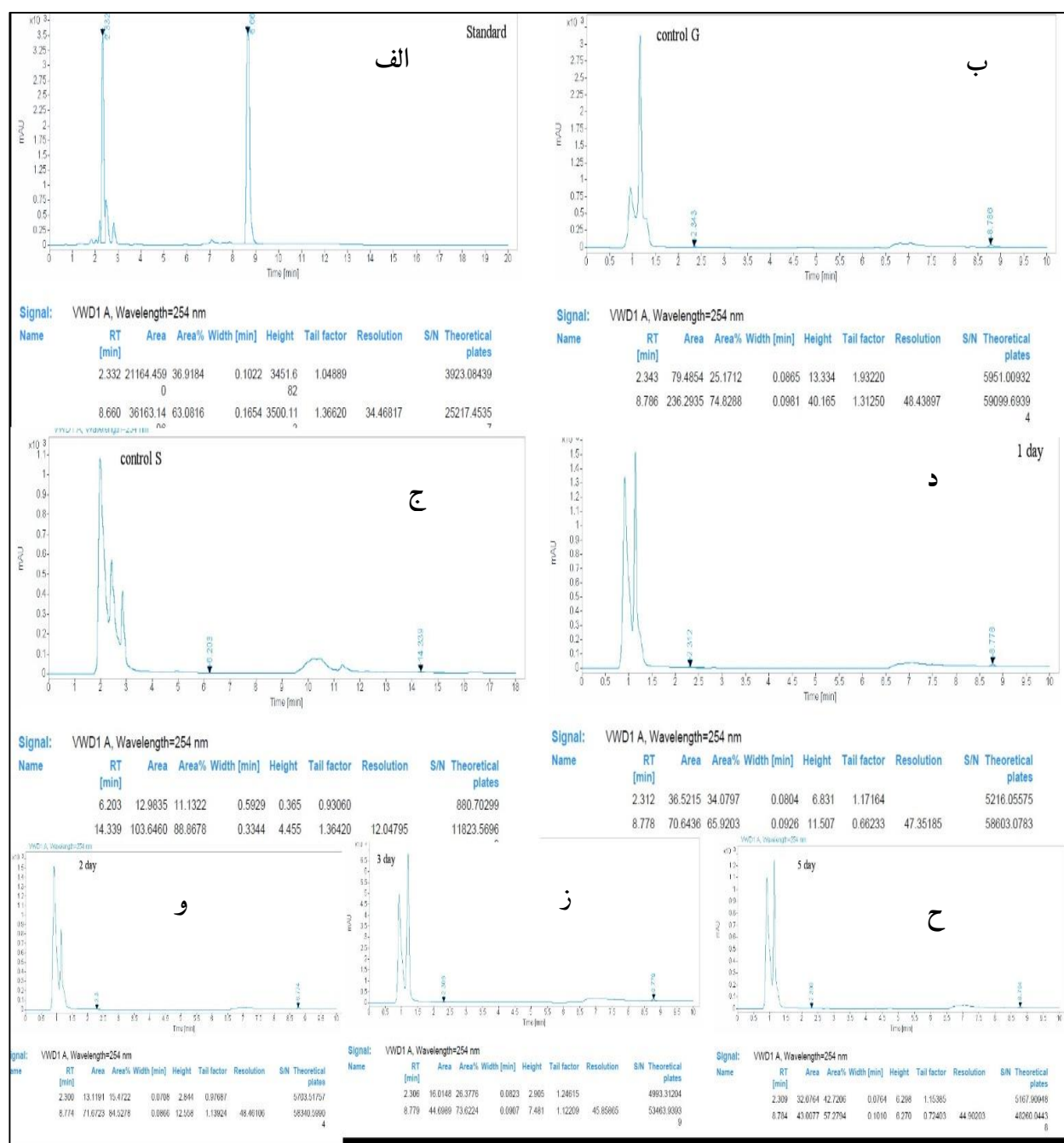
نتایج تجزیه واریانس صفات نشان داد که بین تمام تیمارهای مورد بررسی از نظر تأثیر روی میزان فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی اختلاف معنی دار وجود دارد (جدول ۱). میزان فلاونوئید کل در تمام تیمارها نسبت به شاهد کمتر بود، اما میزان این کاهش نسبت به کاهش در گلیسیریزین و گلیسیریتینیک اسید کمتر بود. میزان کاهش فلاونوئید کل در تیمار بدون الیسیطور و حذف باکتری با یک واکشت با نمک سفوتاکسیم سدیم $0/2337$ برابر، و در تیمارهای حاوی الیسیطور در روزهای یک، دو، سه و پنج روز بعد از تیمار به ترتیب $0/166$ ، $0/037$ ، $0/121$ و $0/146$ برابر ثبت شد. بیشترین میزان فلاونوئید کل به ترتیب در تیمار شاهد و پس از آن تیمار برداشت دو روز بعد از اعمال الیسیطور به دست آمد، کمترین میزان فلاونوئید نیز در تیمار بدون الیسیطور و حاوی نمک سفوتاکسیم سدیم مشاهده شد (شکل ۳-ب). میزان فنل کل نیز در تمام تیمارها، بجز تیمار برداشت دو روز بعد از تیمار با الیسیطور، نسبت به تیمار شاهد کاهش نشان داد. میزان این کاهش در تیمار بدون الیسیطور و حذف باکتری با یک واکشت با نمک سفوتاکسیم سدیم $0/126$ برابر، و در تیمارهای حاوی الیسیطور در روزهای یک، دو، سه و پنج روز بعد از تیمار به ترتیب $0/155$ ، $0/073$ ، $0/140$ و $0/146$ برابر بود. میزان فنل کل در ریشه‌هایی که دو روز بعد از تیمار با الیسیطور برداشت شدند به میزان $0/0516$ برابر نسبت به شاهد افزایش داشت. بر اساس نتایج، بیشترین میزان فنل کل از ریشه‌هایی که دو روز بعد از تیمار با الیسیطور برداشت شدند و پس از آن در تیمار شاهد بدون الیسیطور و حاوی سفوتاکسیم به دست آمد، درحالی که در بین سایر تیمارها تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

میزان فعالیت آنتی اکسیدانی نیز در تمام تیمارها، بجز ریشه‌های برداشت شده در روز دوم بعد از تیمار با الیسیطور، نسبت به تیمار شاهد کاهش داشت. بیشترین درصد مهار رادیکال آزاد در تیمار برداشت دو روز بعد از تیمار با الیسیطور ($90/85$) و پس از آن تیمار شاهد ($88/75$) مشاهده شد و کمترین درصد مهار رادیکال آزاد متعلق به تیمارهای ۶ (پنج روز بعد از تیمار با الیسیطور) و تیمار ۲ (فاقد الیسیطور تحت تیمار نمک سفوتاکسیم سدیم) به ترتیب $77/34$ و $78/9$ بود.

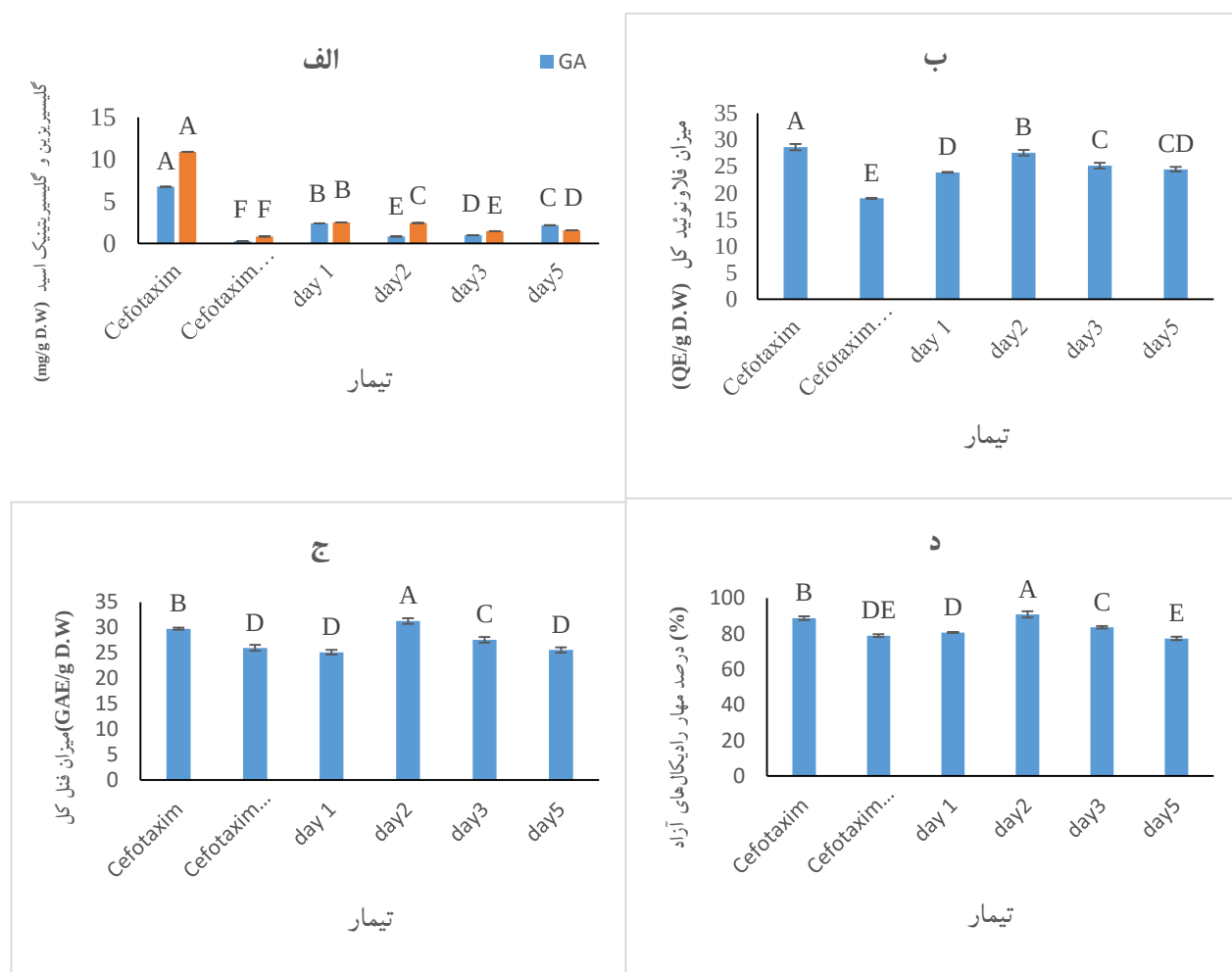
جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در ریشه موئن شیرین بیان تحت تیمار الیسیطور متیل جاسمونات.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		گلیسیریزین	گلیسیریتینیک اسید	فلاونوئید	فنل DPPH
تیمار	۵	$16/661^{**}$	$42/933^{**}$	$34/407^{**}$	$18/612^{**}$
خطا	۱۲	$0/00003$	$0/000001$	$0/176$	$0/255$
ضریب تغییرات %		$0/0892$	$0/0001$	$1/694$	$1/833$

** نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح یک درصد.



شکل ۲. کروماتوگرام جداسازی گلیسریریزین و گلیسریتینیک اسید از عصاره ریشه موئین شیرین بیان با استفاده از HPLC (الف: نمودار استاندارد، ب: کنترل با سفوتاکسیم، ج: کنترل با نمک سفوتاکسیم سدیم، د: یک روز بعد از تیمار، و: دو روز بعد از تیمار، ز: سه روز بعد از تیمار، ح: پنج روز بعد از تیمار با متیل جاسمونات).



شکل ۳. اثر متیل جاسمونات (۱۰۰ میکرومولار) بر میزان گلیسیریزین (GA) و گلیسیریتینیک اسید (GT) (الف)، میزان فلاونوئید کل (ب)، میزان فنل کل (ج)، درصد مهار رادیکال‌های آزاد (د) در ریشه موئین شیرین بیان.

Cefotaxim: شاهد تحت تاثیر سفوتاکسیم، Cefotaxim Sodium Salt: شاهد تحت تاثیر نمک سفوتاکسیم سدیم، day 1: یک روز تحت تیمار متیل

جاسمونات، day 2: دو روز تحت تیمار متیل جاسمونات، day 3: سه روز تحت تیمار متیل جاسمونات و day 5: پنج روز تحت تیمار متیل جاسمونات.

بحث

سیستم ترانسفورماسیون ریشه موئین با استفاده از باکتری گرم منفی اگروباکتریوم رایزوزنز بدست می‌آید. این روش، محققان را قادر به استفاده از این باکتری در گیاهان دولپه و تعدادی از گیاهان تک‌لپه‌ای می‌نماید (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 می‌کند، بر اثر آلودگی وارد ژنوم گیاه شده، و پس از ادغام با آن باعث القای ریشه موئین با شاخه‌های متعدد در محل زخم در گیاه آلوده می‌شود (Qu and Christ, 2007). در این تحقیق نیز از سویه A4 اگروباکتریوم رایزوزنز جهت تلقیح استفاده شد. به نظر می‌رسد بعد از فرایند تلقیح، حذف یکباره باکتری با آنتی بیوتیک نمک سفوتاکسیم سدیم سبب القای ریشه موئین در ریزنمونه گردید. در حالتی که از سفوتاکسیم معمولی استفاده شد، 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 یافت. فناوری ترانسفورماسیون اگروباکتریوم رایزوزنز به دلیل سرعت رشد سریع، عدم نیاز به مکمل هورمونی اگزوزن، پایداری ژنتیکی بالا و توانایی عالی در سنتز متابولیت های ثانویه، پتانسیل زیادی برای کاربرد در مطالعه عملکرد ژن گیاه و ویژگی های زیست شناختی دارد (Wang et al., 2023). عملکرد تراریختی اگروباکتریوم رایزوزنز تحت تأثیر سن ریزنمونه، سوبه 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 تمامی شرایط، زمان واکشت با توجه به نوع آنتی بیوتیک برای دو تیمار متفاوت بود. در تیماری که تحت تأثیر سفوتاکسیم جهت حذف باکتری قرار گرفته بود، به دلیل وجود آلودگی باکتریایی، تعداد واکشت بیشتر بوده، بطوریکه حتی بعد از تشکیل ریشه موئین نیز برای حذف باکتری واکشت های متعددی انجام گرفت. این تفاوت ها باعث افزایش و تجمع متابولیت های ثانویه، به خصوص گلیسیریزین و گلیسیریتیک اسید شده است. الیسیستورهای زیستی و غیر زیستی مختلفی جهت افزایش گلیسیریزین در ریشه موئین *G. glabra* استفاده شده است. بیشترین میزان گلیسیریزین با استفاده از الیسیستور مانان 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 گونه *G. inflata* به میزان ۱۰۸/۹۱ میکروگرم بر گرم وزن خشک، گزارش شده است (Wongwicha et al., 2011). در این تحقیق، بیشترین میزان گلیسیریزین در تیمار شاهد تحت تأثیر سفوتاکسیم معمولی به میزان ۶/۷۴۰ میلی گرم بر گرم وزن خشک و میزان گلیسیریتیک اسید به میزان ۱۰/۸۹۰ میلی گرم بر گرم وزن خشک ثبت شد، که افزایش چشمگیری را نسبت به سایر تحقیقات نشان داد. علت این افزایش می تواند مربوط به نوع اکوتیپ، و مدت زمان هم کشتی باشد. اثر معنی دار اکوتیپ بر میزان متابولیت های ثانویه ریشه موئین در اکوتیپ زنیان رومی نیز گزارش شده است (Moradi et al., 2021).

تولید متابولیت های ثانویه در گیاهان به وسیله عوامل مختلفی در طبیعت تحت تأثیر قرار می گیرد. عوامل مختلفی مانند خشکی، درجه حرارت و آلودگی های میکروبی باعث تنوع در میزان تولید متابولیت های ثانویه می شوند (Zhao et al., 2005). اعمال هدفمند این عوامل تحت موقعیت های کنترل شده می تواند سبب تغییرات زیادی در عملکرد متابولیت های ثانویه گردد (Torkamani et al., 2014). افزایش تولید فلاونول ها و فلاوانول ها در ریشه های موئین با استفاده از الیسیستورهای غیر زیستی و زیستی گزارش شده است. هورمون های گیاهی، مانند متیل جاسمونات و تنظیم کننده های رشد گیاهی مانند اتفون در برخی از مطالعات به عنوان الیسیستور غیر زیستی برای تحریک بیوسنتز ترکیبات زیست فعال مورد استفاده قرار گرفته اند (Hussain et al., 2022). تیمار ریشه موئین با متیل جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکرومولار سبب افزایش تولید گلیسیریزین در *G. inflata* شده است (Wongwicha et al., 2011). در یک تحقیق (Kuzovkina et al., 2005)، ترانسفورماسیون گیاه *Scutellaria baicalensis* با باکتری اگروباکتریوم رایزوزنز سوبه A4 تولید ریشه های موئین با پنج درصد فلاونوئید نمود، علاوه بر این کاربرد متیل جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکرومولار میزان این ترکیبات را ۷۲ ساعت بعد به ۱/۸ برابر افزایش داد. تحقیقات متعددی نقش موثر متیل جاسمونات در افزایش تولید متابولیت های ثانویه در گیاهان را به اثبات رسانده اند. افزایش تولید پاکلی تاکسول در ریشه موئین تاکسول تحت تیمار ۱۰۰ میکرومولار فنیل آلانین و ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات (Sykowska-Baranek et al., 2009)، افزایش تولید ریناکانتین 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) گزارش شده است. در تحقیق حاضر، استفاده از متیل جاسمونات سبب افزایش ترکیبات زیست فعال نشد. عدم تاثیر متیل جاسمونات بر میزان متابولیت‌های ثانویه در برخی گیاهان دارویی نشان داده شده است. در بررسی تاثیر متیل جاسمونات بر میزان و نوع ترکیبات موثره نعنای در مزرعه و گلخانه، میزان اسانس و میزان فنل کل در هر دو محیط افزایش یافت. علاوه بر این، متون نیز به‌طور قابل توجهی افزایش، اما پولگون و منتوفوران کاهش یافتند. علت این تناقض نیز در رابطه با مراحل فنولوژیکی و نمو گیاه گزارش گردید (Kandoudi et al., 2023). به‌نظر می‌رسد غلظت الیسیاتور و مدت زمان در معرض قرار گیری ریشه موئین، عوامل مهمی جهت تاثیر مثبت متیل جاسمونات بر میزان متابولیت‌های ثانویه باشد. در تحقیقی، کاربرد ۱۵ میکرومولار متیل جاسمونات به مدت چهار ساعت هم‌کشتی در ریشه موئین گیاه پنبه‌باد سبب افزایش مشتقات ویتانولوئید شد (Sivanandhan et al., 2013). همچنین، کاربرد ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات و ۵ روز هم‌کشتی سبب افزایش ترکیبات فنلی در ریشه موئین گیاه *Polygonum multiflorum* گردید (Ho et al., 2018). به‌نظر می‌رسد که در تحقیق حاضر صرف‌نظر از نوع گونه و اکوتیپ، عدم تاثیر مثبت متیل جاسمونات بر میزان گلیسیریزین، گلیسریتینیک اسید و محتوای فلاونوئید کل به دلیل غلظت بالای الیسیاتور یا مدت زمان زیاد هم‌کشتی باشد. از سوی دیگر، در گونه‌های دیگر شیرین بیان (*Glycyrrhiza inflata*) افزایش گلیسیریزین در غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات گزارش شده است، اما غلظت ۵۰ میکرومولار آن تاثیر معنی‌داری بر افزایش گلیسیریزین نداشته است (Wongwich et al., 2011). همچنین، علت دیگر کاهش متابولیت‌های ثانویه ممکن است مرگ تدریجی ریشه به دلیل غلظت بالای الیسیاتور متیل جاسمونات باشد. بی‌نظمی در کلاهدک ریشه و کاهش بیومس، ایجاد اختلال در یکپارچگی غشای میتوکندری و کاهش بیوستنز ATP در ریشه‌های موئین *Catharanthus roseus* به غلظت بالای متیل جاسمونات (۱۰۰ میکرومولار) نسبت داده شده است. علاوه بر این، تغییر در تجمع پروتئین‌های دخیل در تولید انرژی و متابولیسم ثانویه مشاهده شده است (Ruiz-May et al., 2011). میزان فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز تحت تیمار الیسیاتور متیل جاسمونات دو روز بعد از تیمار نسبت به شاهد افزایش یافت که نشان دهنده نقش موثر متیل جاسمونات بر سایر ترکیبات فنلی و همبستگی مثبت بین میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی است.

نتیجه‌گیری و پیشنهادات

براساس نتایج این پژوهش، استفاده از آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم معمولی برای حذف باکتری منجر به تولید بیشترین میزان گلیسیریزین و گلیسریتینیک اسید، گردید، اما کاربرد متیل جاسمونات در غلظت ۱۰۰ میکرومولار سبب کاهش میزان ترکیبات زیست‌فعال از جمله گلیسیریزین و گلیسریتینیک شد. توصیه می‌شود جهت عملکرد بهتر و تولید بیشتر این ترکیبات، بعد از تلقیح آگروباکتریوم رایزوژنز سویه A4 به‌جای حذف یکباره باکتری از محیط، از سفوتاکسیم در واکشت‌های متعدد استفاده شود. علاوه بر این استفاده از سایر الیسیاتورها برای افزایش بیشتر متابولیت‌های ثانویه در اکوتیپ سمیرم شیرین بیان مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق، بخشی از نتایج طرح پژوهشی به شماره PR-UOZ99-9 می‌باشد. نویسندگان این مقاله از دانشگاه زابل جهت تامین هزینه‌های این طرح تشکر و قدردانی می‌نمایند.

1. Menthone
2. pulegone
3. menthofuran
4. *Withania somnifera*

REFERENCES

- Alcalde, M. A., Perez-Matas, E., Escrich, 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. & Young Park, S. (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., Estrada-Luna, A. A., Cabrera-Ponce, J. L., Valencia-Lozano, E., Herrera-Ubaldo, H., de Folter., S. ... & Délano-Frier, J. P. (2020). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of grain (*Amaranthus hypochondriacus*) and leafy (*A. hybridus*) amaranths. *Plant Cell Reports*, 39(9), 1143-1160. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02553-9>.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M. & Chern, J. C. (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 and Organ Culture*, 118, 169-177. <https://doi.org/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 (10), 2200-2204. <https://doi.org/10.1002/jmv.26064>.
- Gai, Q.-Y., Jiao, J., Wang, X., Zang, Y.-P., Niu, L.-L. & 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 and Organ Culture*, 137, 77-86. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-01553-8>.
- Ghahraman, A. (1999). *Basic botany: anatomy and morphology*, University of Tehran Press, pp. 539.
- 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 and Organ Culture*, 126, 1-18. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-0985-6>.
- Gundlach, H., Muller, M. J., Kutchan, T. M., & Zenk, M. H. (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, 89(6), 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. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1486. <https://doi.org/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 and Biotechnology*, 102, 9563-9575. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9359-9>.
- Huang, D., Ou, B. & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 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.org/10.3390/plants11030439>.
- Kandoudi, W., Tavaszi-Sárosi, S. & Németh-Zámboriné, 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 Y., Wyslouzil B. E. & Weathers P. J. (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). 18 β -Glycyrrhetic acid: its core biological properties and dermatological applications. *International Journal of Cosmetic Science*, 41(4), 325-331. <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.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. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(2), 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.org/10.1155/2021.17488.1325>.
- 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.org/10.1016/j.phytochem.2014.03.004>.
- Qu, X. & Christ, B.J. (2007). In vitro culture of the obligate parasite *Spongospora subterranea* (Cercospora; plasmodiophorida) associated with root-inducing transferred- DNA transformed potato hairy roots. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 54(6), 465-467. <http://doi.org/10.1111/j.1550-408.2007.00289.x>.
- Ruiz-May, E., De-la- Peña, C., Galaz- Ávalos, M., Lei, Z., Watson, B. S., Sumner, L. W., Loyola-Vargas, V. M., (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>.
- Sa´nchez-Sampedro, M. A., Fernandez-Tarrago, J., Corchete, P., (2005). Yeast extract and methyl jasmonate induced silymarin production in cell culture of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Journal of Biotechnology*, 119(1), 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.org/10.1016/j.jbiotec.2020.09.002>.
- Seki, H., Sawai, S., Ohyama, K., Mizutani, M. & Muranaka 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 and 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: 10.1007/s00344-018-9847-2](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(17), 1950–1954. [https:// doi: 10.1016/j.jplph.2009.05.001](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.05.001).
- Tenea, G.N, Calin A., Gavrilă, L. & Cucu N. (2008). Manipulation of root biomass and biosynthetic potential of *Glycyrrhiza glabra* L. plants by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. *Roumanian Biotechnological Letters*, 13, 3922-3932.
- Thwe, A., Arasu, M., Li, X., Park, CH., Kim, S.J., Al-Dhabi, NA. & Park, S.U. (2016). Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and phenylpropanoid biosynthesis in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn). *Frontiers in 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. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1293374. <http://dx.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. foodc hem. 2007. 04. 038](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. *Zeitschrift für Naturforschung*, 66c, 423 - 428. [https://doi: 10.1515/znc-2011-7-815](https://doi.org/10.1515/znc-2011-7-815).
- Yordanova, Z. P., Georgiev, M. I. (2017). Cell factories. In T. Brian, B.G. Murray & D.J. Murphy (Eds.), *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, (pp. 72–76), vol II, Second edition. Academic Press. <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(4), 283-333. [https:// doi: 10.1016/j.biotechadv.2005.01.003](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.003).
- Zhou, F., Wu, G., Cai, D., Xu, B., Yan, M. ...& Lei, H.M. (2019). Synthesis and biological activity of glycyrrhetic acid derivatives as antitumor agents. *European Journal of Medicine Chemistry*, 178, 623-635. [https://doi: 10.1016/j.ejmech.2019.06.029](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.029).