اثر محرک‌های اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات بر میزان تولید ماده مؤثره گلیسیریزین و ایزولیکویریتیجنین در ریشه‌های مویین شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.)

زهرا شیرازی[۱]، خسرو پیری[۱*]، اصغر میرزایی اصل[۱]، طاهره حسنلو[۲] و طیبه قیاسوند[۳]

[۱] همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

[۲] کرج، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، گروه فیزیولوژی مولکولی

[۳] همدان، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۱۱

چکیده

در این پژوهش اثر محرک‌های اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات روی سرعت رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های مویین شیرین‌بیان مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اهمیت متابولیت‌های ثانویه گلیسیریزین و ایزولیکویریتیجنین موجود در ریشه‌های این گیاه، از روش القاء ریشه‌های مویین تراریخت استفاده شد. کشت ریشه‌های مویین با تلقیح ریزنمونه‌های برگ و ساقه از گیاهچه‌های سه هفته‌ای با آگروباکتریوم ریزوژنز ایجاد شد. حضور T-DNA در لاین‌های ریشه مویین توسط PCR تأیید گردید. اثر محرک اسید سالیسیلیک سبب افزایش تولید گلیسیریزین شد. نتایج آزمون همبستگی، رابطه معکوسی بین وزن خشک و مقدار گلیسیریزین را در نتیجه تیمار با اسید سالیسیلیک نشان داد. بیشترین مقدار گلیسیریزین و کمترین مقدار وزن خشک در غلظت ۵۰۰ میکرومولار حاصل شد. تیمار ریشه‌های مویین با اسید سالیسیلیک باعث کاهش معنی‌دار ایزولیکویریتیجنین شد. همچنین نتایج نشان داد، استفاده از متیل جاسمونات باعث کاهش تولید گلیسیریزین و ایزولیکویریتیجنین می‌شود.

واژه‌های کلیدی: شیرین‌بیان، ریشه‌های مویین، گلیسیریزین، ایزولیکویریتیجنین، محرک‌ها

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۸۱۳۰۷۸۳، پست الکترونیکی khpiri@gmail.com

مقدمه

شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) از گیاهان دارویی تیره نخودیان (*Fabaceae*) می‌باشد. اندام مورد مصرف آن ریشه و استولون است که دارای ترکیباتی مانند تری‌ترپن-ساپونین‌ها، چالکون‌ها و ۳۰۰ نوع فلاونوئید می‌باشد (۲، ۳ و۱۱). بسیاری از اثرات درمانی ریشه شیرین‌بیان بعلت دو گروه از ترکیبات ساپونینی و فلاونوئیدی است (۲۸). استفاده از شیرین‌بیان در اختلالات کبدی حاد، هپاتیت B و C مزمن، هموفیلی و اختلالات سیستم ایمنی مؤثر می‌باشد. ترکیب گلیسیریزین در صنایع غذایی و همچنین در درمان اختلالات ریوی، گوارشی، کبدی، صفراوی و زخم‌های معده استفاده می‌شود (۱۳ و ۴۵). از عصاره آن داروهایی مانند (Aspalon)^{R} و (Glycyron)^{R} تولید می‌شود (۹، ۱۹ و ۲۸). ایزولیکویریتیجنین چالکونی ساده و پیش ماده تولید ترکیبات فلاونوئیدی است و دارای اثرات استروژنی، آنتی‌اکسیدان، ضد حساسیت و ضد التهاب بوده و به‌عنوان داروی ضد سرطان و مؤثر در درمان آریتمی می‌باشد (۱۸). با توجه به اینکه در طبیعت سرعت تولید متابولیت‌های ثانویه کند می‌باشد، استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی در شرایط این ویترو(*in vitro*) این موقعیت را فراهم می‌سازد که تولید در شرایط کنترل شده و در زمان کوتاه‌تری انجام گیرد (۳۶ و ۴۴). در برخی از روش‌های بیوتکنولوژی مانند کشت سلول و سوسپانسیون سلولی نیز مقدار تولید

متابولیت‌های ثانویه بدلیل عدم تمایز بافت کم است و برخی از متابولیت‌ها فقط در بافت‌هایی که تمایز مورفولوژیکی نشان می‌دهند، تجمع می‌یابند. ازجمله روش‌های کشت تمایز یافته، کشت ریشه می‌باشد (۱ و ۸). کشت ریشه بصورت ریشه‌های نابجا و ریشه‌های تراریخت انجام می‌شود (۱۵). سیستم کشت ریشه در گیاهان معمولا سرعت رشد کمتری نشان داده و نیاز به فیتوهورمونی خارجی دارد (۴). روش جایگزین برای تولید مواد دارویی با منشأ ریشه، تراریختی گیاهان با استفاده از آگروباکتریوم ریزوژنز و ایجاد سیستم کشت ریشه مویین می‌باشد (۱۷ و ۴۴). این باکتری از محل زخم وارد گیاه شده و با انتقال قطعه T-DNA پلاسمید Ri به درون ژنوم سلول گیاهی، ریشه‌های نئوپلاستیک را در گیاه ایجاد می‌کند (۱۴، ۱۶، ۴۰، ۴۳ و ۴۹). سرعت رشد بالا، انشعابات فراوان، نگهداری آسان در محیط عاری از هورمون‌های گیاهی، پایداری ژنتیکی و بیوسنتزی از مزایای کشت ریشه‌های مویین می‌باشد (۱، ۱۶، ۲۳، ۲۷ و ۴۰). بدلیل مقدار پایین تولید متابولیت با استفاده از تکنولوژی کشت بافت، از روش‌های متعددی برای جبران آن استفاده می‌گردد (۲۳). یکی از روش‌ها استفاده از محرک‌ها (Elicitors) می‌باشد که معمولا باعث تسریع در تشکیل متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (۳۵). مکانیسم‌های دفاعی گیاه با شناسایی این سیگنال‌ها (محرک) بوسیله گیرنده‌های موجود در غشای پلاسمایی و تولید ترکیبات اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک اندوژن فعال می‌شود. فعال شدن پاسخ دفاعی سبب سنتز پروتئین‌های مرتبط با مکانیسم‌های دفاع سلولی و القاء تولید متابولیت‌های ثانویه با ایجاد یکسری تغییرات سلولی می‌گردد (۴۲). در بیشتر موارد اضافه‌کردن محرک‌ها در غلظت‌های کم به سیستم‌های سلولی، بیوسنتز ترکیبات خاصی را تحریک و یا بهبود می‌بخشد (۳۲ و ۳۴). با توجه به نوع گیاه و نوع متابولیت مورد نظر، می‌توان از عصاره-های استخراج شده از ارگانسیم‌ها و یا از برخی مواد شیمیایی به‌عنوان محرک استفاده نمود (۱۲). در این تحقیق از دو محرک متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک به‌منظور بررسی تولید گلیسیریزین، ایزولیکویریتیجنین و سرعت رشد ریشه‌های مویین شیرین بیان استفاده شد که این دو محرک در القاء و سنتز متابولیت‌های ثانویه ریشه‌های تراریخت بسیاری از گونه‌های گیاهی مؤثر می‌باشند.

مواد و روشها

القاء ریشه‌های مویین: بذرهای گیاه شیرین‌بیان از شرکت پاکان بذر اصفهان (منطقه ورزنه اصفهان) تهیه گردید و بذرها به مدت ۴۰ دقیقه در اسید سولفوریک غلیظ (۹۸ در صد) قرار گرفتند، سپس چندین بار با آب مقطر استریل آبکشی شده و پس از آن روی محیط MS (۳۱) نیمه جامد کشت شدند. برای تهیه کشت سوسپانسیون باکتری، از آگروباکتریوم ریزوژنز سویه AR15834 که از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج تهیه گردید، استفاده شد. برای تلقیح ریزنمونه‌های بدست آمده از گیاهچه‌های یک کلونی از باکتری کشت شده در محیط کشت جامد LB در شرایط استریل برداشته شد (۳۷) و در محیط کشت مایع LB دارای آنتی‌بیوتیک ریفامپسین کشت گردید. در مرحله بعد محیط LB مایع آلوده شده به باکتری به اتاق رشد با دمای ۲۸ °C منتقل شد و روی شیکر با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت در شرایط تاریکی قرار گرفت تا باکتری رشد کرده و فعال شود. برای تراریختی، جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر حدود ۰/۶ تنظیم گردید. ریزنمونه‌های برگ و ساقه از گیاهچه‌های سه هفته‌ای به مدت ۲۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری قرار گرفتند، سپس به محیط کشت MS نیمه جامد منتقل شدند و در اتاق رشد در دمای ۲۵±۲ °C و و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. ۴۸ ساعت بعد از هم‌کشتی برای حذف باکتری، ریزنمونه‌ها به محیط نیمه جامد MS دارای ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم منتقل گردیدند. برای حذف کامل باکتری در واکشت‌های بعدی از غلظت‌های پائین‌تر سفوتاکسیم استفاده گردید. تراریختی

ریشه‌های مویین را می‌توان با ردیابی ژن‌های موجود روی T-DNAاین باکتری که مهمترین آنها ژن‌های *rol*A، *rol*B و *rol*C می‌باشند، تأیید نمود. تأیید تراریختی ریشه‌های مویین شیرین‌بیان از طریق تکنیک PCR و پس از اطمینان از حذف باکتری در ریشه‌ها انجام شد. بدین منظور ابتدا استخراج DNA از ریشه‌های مویین و طبیعی گیاه با استفاده از بافر استخراج CTAB انجام شد. تکثیر ژن *rol*B با آغازگرهای اختصاصی

Forward primer 5'-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCACGA -3'

Reverse primer 5'- TTAGGCTTC TTTCATTCGGTTTACTGCAGC -3'

و برای ۳۷ چرخه شامل واسرشت در دمای ۹۴ °C به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۸°C به مدت ۱ دقیقه و گسترش در دمای ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه انجام شد. در نهایت بعد از تأیید مولکولی ریشه‌های مویین یک لاین برای بررسی اثر محرک‌ها انتخاب شد.

اثر محرک‌ها بر سرعت رشد و محتوای تولید متابولیت-های ثانویه: بعد از تهیه محیط کشت MS مایع، در ارلن-های ۲۵۰ میلی لیتری به مقدار ۵۰ میلی لیتر از محیط توزیع شد و عمل استقرار ریشه‌های (۳-۲) سانتی‌متری دارای انشعاب (با وزن خشک حدود ۵-۴ میلی‌گرم) در محیط مایع انجام گردید. همه نمونه‌ها برای ادامه رشد روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. بعد از پایان دوره ۵۵ روزه، به‌منظور بررسی تأثیر محرک‌ها در رشد ریشه‌ها و تولید ماده مؤثره گلیسیریزین و ایزولیکویریتیجنین، محرک‌های متیل جاسمونات در ۴ غلظت (۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۰ میکرو مولار) و اسید سالیسیلیک در ۴ غلظت (۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۰ میکرو مولار) به محیط کشت اضافه گردید و ریشه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در محیط حاوی محرک‌ها قرار گرفتند. برای تعیین سرعت رشد ریشه‌ها بر اساس وزن خشک تولید شده، ریشه‌ها برداشته شده و پس از خشک شدن کامل اندازه‌گیری شدند. برای اندازه‌گیری گلیسیریزین و ایزولیکویریتیجنین ابتدا ریشه‌ها به روش هایاشی و همکاران (۲۱) عصاره-گیری شدند و بررسی کمی به وسیله دستگاه HPLC انجام شد. کلیه نتایج در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار و توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ آنالیز شد. استاندارد گلیسیریزین از شرکت فلوکا و ایزولیکویریتیجنین از شرکت ایندو فاین تهیه گردید. نمونه‌ها برای اندازه‌گیری گلیسیریزین به روش هارست و همکاران (۲۴) بعد از حل شدن در آب مقطر به دستگاه HPLC با مشخصات ستون (RPC18 (۱۵۰×۳/۹mm، اندازه منافذ ۵ میکرومتر و فاز متحرک شامل اسید استیک، آب و متانول به‌ترتیب به نسبت ۶: ۳۴ :۶۰ انجام شد. برای ایزولیکویریتیجنین به روش لیو و همکاران (۲۹) بعد از حل شدن در متانول ۱۰۰ درصد به دستگاه با مشخصات ستون RPC18 (۲۵۰×۴/۶ mm)، اندازه منافذ ۵ میکرومتر و فاز متحرک شامل اسید استیک (یک درصد) و استونیتریل به نسبت ۵۵ : ۴۵ تزریق شد.

شکل۱- کشت ریشه‌های مویین شیرین بیان در محیط مایع

نتایج

القاء ریشه‌های مویین: گیاه شیرین‌بیان با تلقیح به سویهAR15834 باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز پاسخ مثبت نشان داد و استفاده از این سویه باعث تولید ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌ها شد. ریشه‌های مویین تولید شده از نظر مورفولوژی خصوصیاتی از قبیل رشد سریع، انشعابات فرعی زیاد در محیط فاقد هورمون را از خود بروز دادند و به‌راحتی از ریشه‌های معمولی قابل تشخیص بودند. ریشه-

های مویین پس از انتقال به محیط MS مایع سریع‌تر از نمونه‌های کشت شده روی محیط نیمه جامد مشابه رشد کردند (شکل ۱).

تأیید تراریختی ریشه‌های مویین: الکتروفورز ژل آگارز محصولات PCR در دستگاه ژل داکیومنت مشاهده شد. برای هر یک از نمونه‌های ریشه مویین و پلاسمید باکتری (شاهد مثبت) تک باند مشاهده گردید (شکل ۲).

بررسی اثر اسید سالیسیلیک بر تولید متابولیت‌های ثانویه و وزن خشک ریشه‌های مویین: تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک بر تولید گلیسیریزین و ایزولیکویریتیجنین در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌داری داشت. مقایسه میانگین وزن خشک ریشه‌های مویین تیمار شده با اسید سالیسیلیک تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال یک درصد نشان نداد ولی در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۱).

اسید سالیسیلیک باعث افزایش معنی‌دار در تولید گلیسیریزین شد و بیشترین مقدار گلیسیریزین بر اثر تیمار با ۵۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک بدست آمد. در غلظت‌های پایین‌تر اسید سالیسیلیک میزان تولید گلیسیریزین تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت. تیمار ریشه‌های مویین با اسید سالیسیلیک باعث کاهش معنی‌دار ایزولیکویریتیجنین شد. البته کمترین مقدار این ماده در ۵۰۰ میکرومولار بدست آمد.

جدول۱- مقایسه میانگین میزان تولید گلیسیریزین و ایزولیکویریتیجنین به روش Duncan در غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک در سطح احتمال ۱ درصد و وزن خشک در سطح احتمال ۵ درصد

اسید سالیسیلیک (µM)	وزن خشک(mg)	گلیسیریزین(µg/g)	ایزولیکویریتیجنین(µg/g)
۰	۲۸۰/۶ ab	۲۷/۸۳ b	۹۰/۳۶ a
۱۲۵	۳۳۷ a	۱۰/۵۲ b	۲۳/۷۳ b
۲۵۰	۳۲۱/۵۵ a	۱۷/۹۵ b	۲۵/۴۲ b
۵۰۰	۱۵۴/۵۵ b	۹۷/۲a	۱۷/۷۲ b

آزمون وزن خشک در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار نشد

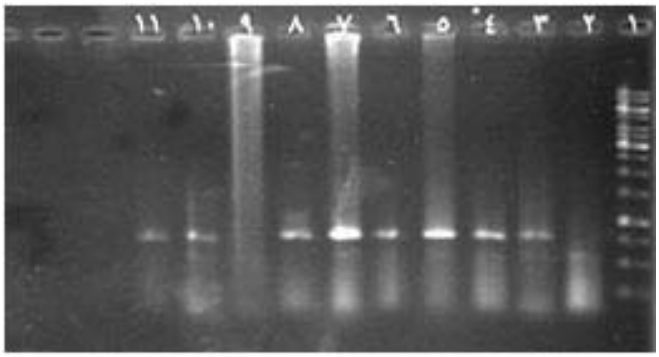
جدول۲- آزمون همبستگی بین وزن خشک، مقدار گلیسیریزین و ایزولیکویریتیجنین بر اثر تیمار با اسید سالیسیلیک

	گلیسیریزین	ایزولیکویریتیجنین	وزن خشک
گلیسیریزین	۱		
ایزولیکویریتیجنین	-۰/۲۶۷	۱	
وزن خشک	- ۰/۹۹۳**	۰/۱۵۰	۱

جدول۳- مقایسه میانگین وزن خشک، میزان تولید گلیسیریزین و ایزولیکویریتیجنین به روش Duncan در غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات در سطح احتمال ۱ درصد

متیل جاسمونات(µM)	وزن خشک(mg)	گلیسیریزین(µg/g)	ایزولیکویریتیجنین(µg/g)
۰	۲۸۰/۶a	۲۷/۸۳ a	۹۰/۳۶ a
۵۰	۲۳۴/۶ a	۱۶/۷۷ ab	۱۴/۱۶ b
۱۰۰	۴۳۱/۸ a	۲۰/۰۵ a	۸/۷۳ b
۲۰۰	۳۲۳/۳ a	۲/۷۳ b	۱۰/۲۲ b

اگرچه کمترین مقدار ایزولیکوپریتیجنین در غلظت ۵۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک حاصل شد ولی در این غلظت رنگ محیط بر خلاف تیمار با سایر غلظت‌ها تغییر نمود و بافت ریشه، قهوه‌ای و نرم شد که ممکن است در این غلظت فلاونوئیدها از جمله ایزولیکوپریتیجنین وارد محیط کشت شده‌باشند (شکل۳). برای پاسخ دقیق‌تر نیاز به بررسی مولکولی همزمان ژن‌های مسیر تولید ایزولیکوپریتیجنین در این غلظت می‌باشد.



شکل۲- نتایج ژل محصولات PCR ریشه‌های مویین شیرین بیان. چاهک شماره۱: مارکر مولکولی (1Kb)، چاهک شماره :۷ پلاسمید باکتری، چاهک شماره ۹: ریشه طبیعی، چاهک شماره ۲: آب مقطر و بقیه چاهک‌ها: ریشه های مویین

کمترین میزان وزن خشک (۱۵۴ میلی‌گرم) ریشه‌ها در تیمار۵۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک مشاهده شد. نتایج آزمون همبستگی (جدول ۲) نیز رابطه معکوس بین وزن خشک و مقدار گلیسیریزین را در نتیجه تیمار با اسید سالیسیلیک نشان داد. در بررسی آزمون همبستگی بین ایزولیکوپریتیجنین و گلیسیریزین رابطه معنی‌داری بر اثر تیمار با اسید سالیسیلیک مشاهده نشد که می‌تواند نشان دهنده تنظیم متفاوت این ترکیبات در گیاه باشد.

شکل۳- تغییر رنگ محیط در غلظت ۵۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک (سمت چپ)

بررسی اثر متیل جاسمونات بر تولید متابولیت‌های ثانویه و وزن خشک ریشه‌های مویین: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها در غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات و سطح احتمال یک درصد بر تولید گلیسیریزین و ایزولیکوپریتیجنین تأثیر معنی‌داری داشتند. میانگین وزن خشک ریشه‌ها در غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های شاهد نشان نداد، ولی افزایش وزن در غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار مشاهده شد (جدول ۳). بیشترین تأثیر برای افزایش وزن خشک با غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات بدست آمد، هرچند این اختلاف معنی‌دار نبود. اما نتایج کاهش تولید مواد مؤثره گلیسیریزین و ایزولیکوپریتیجنین را با استفاده از متیل جاسمونات نشان داد. در بررسی آزمون همبستگی وزن خشک، تولید گلیسیریزین و ایزولیکوپریتیجنین بر اثر تیمار با متیل جاسمونات رابطه معنی‌داری مشاهده نشد.

بحث

نتایج وا و همکاران (۴۶) روی ریشه¬های مویین گیاه *Evcommia ulmodes* نشان داد که غلظت¬های بالای سالیسیلیک باعث تغییر رنگ و مورفولوژی ریشه¬ها و

ترشح ترکیبات به محیط می¬شود، که دلیل آن را جلوگیری از اثرات سمی سالیسیلیک بیان کردند. خلیلی و همکاران (۲۶) با به¬کار بردن محرک اسید سالیسیلیک روی ریشه¬های مویین *Silybum marianum*، کاهش وزن ریشه¬ها و در مقابل افزایش ماده مؤثر سیلیمارین و فلاونولیگنان¬های تاکسیفلینوسیلیبین و کاهش ایزوسیلیبین را گزارش نمودند، که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. همچنین در مطالعات اثر اسید سالیسیلیک روی ریشه¬های مویین *Azadira chtaindica*، افزایش تولید ترکیبات مؤثره در این ریشه¬ها مشاهده¬گردید (۳۳). در مطالعات مانث و همکاران (۳۰) روی ریشه¬های *Vicia faba* کاهش قابل توجه رشد ریشه و ایجاد سمیت بر اثر تیمار با غلظت¬های بالای ۳/۵ میلی¬مولار اسید سالیسیلیک مشخص گردید.

در بیشتر گزارش‌ها تیمار با متیل جاسمونات باعث القاء و افزایش بیوسنتز ترکیبات ثانویه شده است و در گزارش‌های معدودی نیز کاهش تولید متابولیت¬ها را سبب می¬شود. شبانی و همکاران (۷) با بکار بردن متیل جاسمونات روی گیاهچه¬های شیرین¬بیان، افزایش ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدی کل در ریشه¬های این گیاه را گزارش کردند. همچنین شبانی و همکاران (۳۸) کاهش وزن خشک ریشه و افزایش تولید گلیسیریزین را در نتیجه تیمار گیاهچههای شیرین بیان با متیل جاسمونات گزارش کردند. در تحقیقات تاگوچی و همکاران (۴۱) استفاده از اسید جاسمونیک در غلظت های ۱۰۰ – ۰ میکرو¬مولار، مقدار متابولیت¬های تروپان آلکالوئیدی را کاهش داد. در گزارش‌های سلیمانی و همکاران (۶) ماده مؤثره آرتمیزینین با بکار بردن محرک اسید جاسمونیک روی ریشه¬های مویین *Artemisia annua* کاهش یافت.

گیاه شیرین‌بیان ترکیبات ثانویه مختلفی را تولید می‌کند و گلیسیریزین و ایزولیکویریتیجنین تنها دو گروه از این ترکیبات می‌باشند و در مسیر تولید تریترپنوئید ساپونین گلیسیریزین در این گیاه، ترکیبات ثانویه دیگری مانند انواع استرول‌ها و تری‌ترپنوئیدها تولید می‌شوند. در تحقیقات هایاشی و همکاران (۲۲) بکار بردن محرک متیل جاسمونات در کشت سلولی شیرین‌بیان، میزان سویا ساپونین را افزایش داد، در صورتی‌که حتی با محرک نیز گلسیریزین تولید نشد. افزایش تولید گلیسیریزین در شیرین‌بیان معمولا با کاهش تولید سایر تریترپنوئید ساپونین‌ها (سویا ساپونین یک و دو) و بعکس همراه می-باشد (۲۲). در مورد مسیر فلاونوئیدی شیرین‌بیان، چالکون‌های مختلفی تولید می‌شوند و ایزولیکویریتیجنین یکی از آن‌ها و ایزومر ساختمانی ترکیب لیکویریتیجنین است و این دو ترکیب قابل تبدیل به یکدیگر می‌باشند (۲۵، ۳۹، و ۴۷). افزایش گلیسیریزین در مقابل کاهش ایزولیکویریتیجنین با بکار بردن اسید سالسیلیک، کاهش ایزولیکویریتیجنین با هر دو محرک، کاهش هر دو متابولیت با متیل جاسمونات و حتی اثرات متفاوت یک محرک در غلظت‌های مختلف روی یک ماده مؤثره را می‌توان به تفاوت مسیر بیوسنتزی گلیسیریزین و ایزولیکویریتیجنین و مسیر سیگنالی متفاوتی که دو محرک در غلظت‌های مختلف منجر به فعال شدن آن‌ها می‌گردند، نسبت داد. با شناخت کامل ژن‌های مسیر بیوسنتزی گلیسیریزین و ایزولیکویریتیجنین که موضوع تحقیقات مولکولی مختلف است و مطالعه اثر محرک‌های اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات می‌توان پاسخ دقیقی به چگونگی عمل این محرک‌ها داد. همچنین اثر متنوع محرک‌ها به عوامل مختلفی مانند غلظت محرک، مدت زمان هم‌کشتی سلول با آن‌ها، نوع کشت (کشت سوسپانسیونی، شاخساره یا ریشه)، مرحله رشد سلول و ژنوتیپ گیاه بستگی دارد (۴۸). مرادی و همکاران (۱۰) با بکار بردن اسید سالیسیلیک در کشت گیاهچه و ریشه مویین شابیزک، دلیل تغییرات بیان دو ژن *PMT* و *H6H* در مسیر تولید آتروپین و اسکوپولامین را به اثرات متفاوت غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک در بیان ژنهای مذکور در اندام‌های مختلف

گزارش کردند. در این تحقیق از ریشه‌های مویین ۵۵ روزه به منظور بررسی اثر دو محرک و مدت زمان هم‌کشتی ۷۲ ساعت با محرک‌ها استفاده شد و تنها ژنوتیپ در دسترس و قابل استفاده از منطقه ورزنه اصفهان بود. در صورتی‌که با تغییر هر یک از این شرایط، ممکن است نتایج متفاوتی بدست آید.

در غلظت ۵۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک کاهش رشد و افزایش گلیسیریزین و تغییر مورفولوژیکی ریشه‌ها (قهوه‌ای و نرم شدن بافت ریشه) مشاهده شد. با توجه به اینکه در مطالعات هایاشی و همکاران (۲۰) مقدار گلیسیریزین اندازه‌گیری شده در ریشه‌های گیاهچه-های دو هفته‌ای شیرین‌بیان کم بود ولی با افزایش سن گیاه افزایش یافت. در بررسی‌های داورپناه و همکاران (۵) ریشه‌های مسن شیرین‌بیان دارای بیشترین مقدار گلیسیریزین بودند و زمان مطلوب برداشت ریشه‌ها در پایان فصل پاییز (پایان فصل رشد) گزارش شد. می‌توان نتیجه گرفت احتمالا تولید گلیسیریزین در مراحل پایانی رشد ریشه، زمانیکه سلول-های ریشه به‌سمت پیری می‌روند، افزایش می‌یابد و استفاده از عواملی که منجر به پیری سلول‌ها می‌شوند برای افزایش تولید گلیسیریزین می‌تواند مفید باشد.

سپاسگزاری

از گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا و و کلیه کسانی که به‌نحوی در انجام این تحقیق همکاری نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی به عمل می آید.

منابع

۱- اصغری، غ (۱۳۸۵). بیوتکنولوژی گیاهان دارویی و تولید داروهای گیاهی، انتشارات جهاد دانشگاهی اصفهان. ۲۸۷ صفحه

۲- جایمند، ک و رضایی، م (۱۳۸۱). اندازه‌گیری گلیسیریزین در ریشه گیاه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) توسط دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC). فصلنامه گیاهان دارویی، شماره ۱۴. صفحه ۱۳-۱

۳- حاجی مهدی پور، ه، امن زاده، ی، حسنلو، ط، شکرچی، م، عابدی، ز و پیر علی همدانی، م (۱۳۸۷) . بررسی کیفیت ریشه های شیرین بیان جمع آوری شده از رویشگاه‌های مختلف ایران. فصلنامه گیاهان دارویی، سال هفتم . دوره سوم.صفحه ۱۱۴-۱۰۶

۴- حسنلو، ط، رضازاده، ش و رهنما، ح (۱۳۸۷). ریشه‌های مویین منبعی برای تولید ترکیبات با ارزش دارویی. فصلنامه گیاهان دارویی، شماره ۲۹. صفحه ۱-۱۷

۵- داورپناه، ز، شیخ زین الدین، م، دخانی، ش و سعیدی، ق (۱۳۸۸). بررسی اثر فصل و منطقه برداشت بر میزان اسید گلیسیریزیک، املاح معدنی و قند موجود در ریشه شیرین بیان. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، شماره ۴۷. صفحه ۴۴-۲۷

۶- سلیمانی، ط،کیهانفر، م، پیری، خ، حسنلو، ط و گودرزی، م (۱۳۸۹). ایجاد ریشه‌های مویین در سه گیاه دارویی بومی ایران و مطالعه اثر محرک‌های مناسب بر تولید متابولیت‌های ثانویه در این ریشه‌ها. پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا

۷- شبانی، ل و احسان پور، ع، ا (۱۳۸۸). القاء آنزیم‌های آنتی اکسیدان، ترکیبات فنولیک و فلاونوئید در کشت در شیشه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) با استفاده از متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۲. شماره ۴. صفحه۷۰۳-۶۹۱

۸- فارسی، و، ذوالعلی، ج (۱۳۸۲). اصول بیوتکنولوژی گیاهی. انتشارات دانشگاه مشهد.ترجمه. ۴۹۵ صفحه

۹- قاسمی، ع (۱۳۸۸). گیاهان دارویی و معطر:شناخت و بررسی اثرات آن‌ها. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحدشهرکرد. ۵۴۱ صفحه

۱۰-مرادی، ا، شریفی، م و موسوی، الف (۱۳۹۰). بررسی بیان ژن *H6H* و ایزوفرم‌های *PMT* تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک در ریشه مویی و اندام‌های مختلف شابیزک(*Atropa balladonna* L.). مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۴. شماره ۳. صفحه ۳۷۲-۳۶۶

۱۱-نصیری اصل، م و حسین زاده، ح (۱۳۸۵). مروری بر اثرات ضد ویروسی شیرین بیان(*Glycyrrhiza glabra* L.) و ترکیب موثره آن گلیسیریزین. فصلنامه گیاهان دارویی. سال ششم. دوره بیست و دوم.۱۲ -۱

۱۲-یاری خسرو شاهی، ا (۱۳۸۳). بررسی پاسخ به کشت بافت در سرخدار و میزان تاکسول تولیدی در شرایط In vitro. پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

13- Cinatl, J., Morgenstern, B., Bauer, G., Chandra, P., Rabenau, H. and Doerr, H. W. (2003).Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus Lancet, 361: 2045-2046

14- Citovsky,V., Kozlivsky. S. V., Lacroix, B., Zaitsman, A., Dafiny Yelin, M., Vyas, S., Tovkach, A. and Tzfira, T. (2007). Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. Cellular Microbiology, 9(1): 9-20

15- Dixon, R. A and Gonzales, R. A. (1995). Plant cell culture. A parctical approach .Second edition.Oxfordord university press.

16- Giri, A. and Narasu, L. M. (2000). Transgenic hairy roots: Recent trends and applications. Biotechnology Advances, 18(1): 1-22

17- Guillen, S,. Tremouillaux-Guillen, J., Pati, P K., Rideau, M., and Gantet, P. (2006). Harnessing the potential of hairy roots. Trends in Biotechnology, 24: 403-409

18- Han, B. , Zheng, Q., Wang, J. ,Chen, W., Tang, H., Wang, Q., Wang, X and Li, J. (2010). Isoliquiritinenin extractied from licorice *Glycyrrhiza uralensis* roots by A facile conversion technique.Chemistry of Natural Compounds, 46 pp

19- Hayashi, H. and Sudo, H. (2009). Economic importance of licorice. Plant Biotechnology, 26: 101–104.

20- Hayashi, H., Fukui, H. and Tabata, M. (1993). Distribution pattern of saponins in different organs of *Glycyrrhiza glabra*. Planta Medica, 59: 351-353

21- Hayashi, H., Hiraoka, N., Ikeshiro, Y., Yamamoto, H. and Yoshikawa, T. (1998). Seasonal variation of glycyrrhizin and isoliquiritigenin in the root of *Glycyrrhiza glabra*. Biological and Pharmacetical. Bulletin, 21(9): 987-989

22- Hayashi, H., Huang, P., Kenichiro, I. (2003). Up regulation of soyasaponin biosynthesis in cultured cells of *Glycyrrhiza glabra*. Plant Cell Physiology, 44(4): 404-411

23- Hu, Z. B and Du, M. (2006). Hairy root and its application in plant genetic engineeering. Journal of Integrative Plant Biology, 48(2): 121-127

24- Hurst, W. J., Mckim, J. M. and Martin. R. A. (1983). High-performance liquid chromatographic determination of glycrrhizin in licorice products. Journal of Agriculture. Food Chemistery, 31: 387-389

25- Joung, J., kasthuri, G. M., Park, J., Kang, W., Kim, H., Yoon, B., Joung, H. and Jeon, J. (2003). An overexpression of chalcone reductase of *Pueraria Montana* var.*lobata* alters biosynthesis of anthocyanin and 5'-deoxyflavonoids in transgenic tobacco. Biochemical and Biophysical Rezsearch Communicationa, 303: 326-331

26- Khalili, M., Hasanloo, T., Kazemi Tabar, S. K. and Rahnama, H. (2009). Influence of exogenous salicylic acid on flavonolignans and lipoxygenase activity in the hairy root cultures of *Silybum marianum*. Cell Biology International, 33: 988-994

27- Kokate, C. K. (2006). Medicinal plant biotechnology.CBS publisher and distributors 506 pp

28- Li, W., Asad, Y. and Yoshikawa, T. (2000). Flavonoid constituents from *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. Phytochemistry, 55: 447- 456

29- Liu, X. R., Li, L., Wang, Q., Wang, W., Bi, S. K. and Guo, D. A. (2005).Simultaneous determination of nine flavonoids in dalbergia odorifera by LC. Chromatographia, 61: 409–413

30- Manthe, B., Schulz, M. and Schnabl, H. (1992). Effects of salicylic acid on growth and stomatal movements of *Vicia faba* L.: evidence for salicylic acid metabolization Journal of Chemistry Ecology, 18: 1525-1539

31- Murashige, T. and Skoog, F. (1962).A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physioligy of Plant, 15: 473-497

32- Namdeo, A. G. (2007). Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites. Pharmacognosy Reviews, 1: 69-79.

33- Prakash, G., Ashok, K., Srivastava, M. (2008). Statistical elicitor optimization studies for the enhancement of azadirachtin production in bioreactor *Azadirachta indica* cell cultivation. Biochemistery Engineering Journal, 40: 218-226

34- Radman, R., Saez, T., Bucke, C. and Keshavarz, T. (2003). Elicitation of plant and microbial systems. Biotechnology and Applied Biochemistry, 37: 91-102

35- Ramachandra, S. R.and Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advanced, 20: 1001-153

36- Ravishankar, G. A. and Ramachandra, R. S. (2000). Biotechnological production of phyto-pharmaceuticals. Journal of Biochmistry Molecular Biology and Biophysics, 4: 73-102

37- Sambrook, J., Fritrsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory

Manual. Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring, Harbor, NY

38- Shabani, L., Ehsanpour, A. A., Asgari, G. and Emami, J. (2009). Glycyrrhizin production by in vitro cultured *Glycyrrhiza glabra* elicited by methyl Jasmonate and salicylic acid. Russian Journal of Plant Physiology, 56(5): 621–626

39- Shimada, N., Nakatsuka, T., Nishihara, M., Yamamura, S. A. and Aoki, T. (2006). .Isolation and characterization of a cDNA encoding polyketide reductase in *Lotus japonicus*. Plant Biotechnology, 23: 509-513

40- Stephanie, G., Jocelyne, T. G., Pratap, K. P. Marc, R. and Pascal. G. (2006). Hairy root research:recent scenario and prospects. Current Opinion in Plant Biology, 9: 341-346

41- Taguchi, G., Sharan, M., Gonda, K., Yanagisawa, K., Shimosaka, M., Hayashida, N. and Okazaki, M. (1998). Effect of methyl jasmonate and elicitor on *PAL* expression in tobacco cultured cells. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 7: 79-84

42- Talarczyk, A. and Hennig, J. (2001). Early defence responses in plants infected with pathogenic organisms. Cell and. Molecular. Biology. Letters, 6: 955–970

43- Tzfira, T. and Citovsky, V. (2006). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plant biology and biotechnology. Current Opinion in Biotechnology, 17: 147-154

44- Valko, M., Izakovic. M., Mazur, M., Rhodes, C. J. and Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Molecular Cell Biochemistry, (1-2): 37-56

45- Wang, Z. H., Nishioka, M., Kurosaki, y., Nakayama, T. and Kimura, T. (1995). Gastrointestinal absorption characteristics of glycyrrhizin from *Glycyrrhiza* extract. Biological and Pharmacetical. Bulletin, 18(9): 41-1238

46- Wu, X. (2007). Establishment and chemical analysis of haity root of *Eucommia ulmodies*.The Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in the School of Renewabe Natural Resources

47- Zhang, H. C., Liu, J. M., .Lu, H. Y. and Gao, S. L. (2009). Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the over- expression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatmen. Plant Cell Reports 28: 1205-1213

48- Zhao, J., Hu, Q., Gu,Y. Q. and Zhu, W. H. (2001). Elicitor-induced indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cell cultures is related to $Ca2^{+}$-influx and the oxidative burst. Plant Science, 161: 423

49- Ziemienowicz. A. (2001). Odysseyof Agrobacterium T-DNA. Acta Biochemica Polonica, 48(3): 623-6350

The effect of methyl jasmonate and salicylic acid elicitors on production amount of Glycyrrhizin and Isoliquiritigenin in hairy roots of Licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.)

Shirazi Z.[1]. Piri Kh.[1], Mirzaie Asl A.[1], Hasanloo T.[2] and Ghiasvand T.[3]

[1] **Biotechnology Dept., Bu Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran**

[2] **Molecular Physiology Dept., Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, I.R. of Iran**

[3] **Research Center for Molecular Medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, I.R. of Iran**

Abstract

The effect of salicylic acid and methyl jasmonate elicitors on the growth speed and the secondary metabolites production was investigated in *G.glab*ra hairy roots. Considering the importance of the Glycyrrhizin and Isoliquiritigenin secondary metabolites in the roots of this plant, a method of the induction of transformed hairy roots was used in this study. Hairy roots culture was established by Inoculated leaf and stem explants with *Agrobacterium rhizogenes* of the three-week old seedlings. The presence of T-DNA in the hairy root lines was performed by PCR. The effect of Salicylic acid was caused an increase in the production of Glycyrrhizin. Correlation of test results showed an inverse relationship between dry weight and amount of Glycyrrhizin in the treatment with salicylic acid. The highest amount of Glycyrrhizin and the lowest dry weight was obtained in 500 micro-molar concentration. Treatment of the hairy roots with salicylic acid was caused a significant decrease in Isoliquiritigenin. Also results showed, methyl jasmonate reduces the production of Glycyrrhizin and Isoliquiritigenin.

Key words: Licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.), Hairy roots, Glycyrrhizin, Isoliquiritigenin, Elicitors