



وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

معرفی روش تولید ریشه موین شیرین بیان

در سیستم آبکشت

نگارش:

زهرا شیرازی - عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

عنوان طرح منتج به نشریه	
۲-۰۹-۰۹-۰۰۳-۰۰۰۰۰۹۶	بررسی اثر محرک‌ها در کشت هیدروپونیک گیاهان کامپوزیت شیرین بیان در میزان تولید متابولیت‌های دارویی



عنوان نشریه: معرفی روش تولید ریشه موئین شیرین بیان در سیستم آبکشت

نویسنده:

زهرا شیرازی - استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تهیه شده در: مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور / اداره ترویج و انتقال یافته‌های تحقیقاتی / بخش تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی

مدیر داخلی: فاطمه عباسپور

ویراستار ادبی: اصغر احمدی

نوبت چاپ: اول

شمارگان: الکترونیکی

قیمت: رایگان

نشانی: بزرگراه تهران-کرج، خروجی پیکانشهر، شهرک سرو آزاد، خیابان شهید علی گودرزی، بلوار باغ گیاه‌شناسی ملی ایران، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور.

تلفن: ۵-۴۴۷۸۷۲۸۲-۰۲۱ وب سایت: www.rifr-ac.ir

نوبت و سال انتشار: اول-۱۴۰۱

این نشریه به شماره ۶۴۴۴۸ در تاریخ ۱۴۰۲/۰۸/۲۷ در مرکز اطلاعات و مدارک علمی

کشاورزی به ثبت رسیده است.

ISBN : 978-964-473-527-1



9 789644 735271

مخاطبان نشریه:

کارشناسان، پژوهشگران و اعضای هیئت علمی بخش‌های زیست‌فناوری و گیاهان دارویی مؤسسات تحقیقاتی و دانشگاه‌ها

اهداف آموزشی:

شما خوانندگان گرامی در این نشریه با:

روش تولید ریشه موین در گیاهچه در شرایط *ex vitro*، اثبات ایجاد ریشه موین و ایجاد سیستم آبکشت گیاهان کامپوزیت به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه

آشنا خواهید شد.

فهرست مطالب

چکیده	۵
مقدمه	۵
مراحل انجام کار	۹
تهیه کشت سوسپانسیون آگروباکتریوم ریزوژنز	۱۰
تلقیح گیاهچه‌های شیرین بیان با آگروباکتریوم ریزوژنز	۱۱
انتقال گیاهان کامپوزیت به محیط آبکشت	۱۳
تأیید القاء ریشه‌های موئین	۱۴
بررسی فیتوشیمیایی گیاهان کامپوزیت شیرین بیان	۱۷
معرفی روش کشت گیاهان کامپوزیت در شرایط آبکشت بمنظور تولید متابولیت‌های ثانویه ..	۱۸
منابع مورد استفاده	۲۰

چکیده

شیرین بیان یکی از مهمترین گیاهان دارویی ایران است. استخراج مواد موثره این گیاه منجر به برداشت ریشه‌های عمیق و چندساله از خاک شده که این امر تخریب محیط زیست را بدنبال دارد. از راهکارهای تولید و افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاهان، تلقیح گیاهان با آگروباکتریوم ریزوژنز و تولید ریشه موین است. ریشه‌های موین توان بالایی در تولید انواع متابولیت‌ها داشته و دارای مزایایی مانند سرعت رشد بالا در محیط فاقد هورمون هستند. از محدودیت‌های مهم کشت ریشه موین، تکثیر آنها در مقیاس وسیع است که نیازمند استفاده از بیوراکتورهای استریل و پرهزینه است. با تولید گیاهان کامپوزیت (گیاه تلقیح شده با آگروباکتریوم ریزوژنز دارای ریشه موین و بخش هوایی طبیعی) در شرایط *ex vitro* می‌توان گیاهانی دارای ریشه‌های موین و با صرفه‌جویی در زمان و هزینه تولید کرد و جهت حل مشکل کشت در مقیاس وسیع ریشه‌های موین، از تلفیق آبکشت گیاهان کامپوزیت بهره برد. در این دستورالعمل با نحوه تولید گیاهان کامپوزیت شیرین بیان در شرایط *ex vitro* و کشت آنها در محیط آبکشت برای تولید متابولیت‌های ثانویه آشنا خواهید شد. تلفیق کشت گیاهان کامپوزیت در محیط آبکشت روش نوینی برای تولید متابولیت‌های مورد نظر در شرایط کنترل شده و جلوگیری از برداشت ریشه‌های چند ساله از طبیعت و تخریب منابع است.

کلمات کلیدی: آگروباکتریوم ریزوژنز، شیرین بیان، گلیسیریزین، گیاه کامپوزیت، متابولیت ثانویه

مقدمه

گیاه شیرین بیان با نام علمی *Glycyrrhiza glabra* L. گیاهی چندساله از خانواده بقولات (Fabaceae) و از مهمترین گیاهان دارویی بومی ایران است که به دلیل دارا بودن ترکیبات دارویی و غذایی مهم در ریشه و ریزوم آن در دنیا حائز اهمیت بوده و مورد توجه صنایع دارویی، غذایی، آرایشی و دخانیات قرار گرفته است (زرگری، ۱۳۷۱). ریشه شیرین بیان در اکثر فارماکوپه‌ها به عنوان دارو یاد شده و حدود ۴۰۰۰ سال است که استفاده دارویی دارد و در فارماکوپه کشورهای نظیر آمریکا، چین و سایر

❖ معرفی روش تولید و کشت ریشه مویین شیرین بیان در سیستم آبکشت / ۶

کشورها ثبت شده است (Li et al., 2011). این گیاه دارای ترکیبات متعددی از خانواده‌های تری تری‌ها ساپونین‌ها (۲۰-۴ درصد) مانند گلیسیریزین، بیش از ۳۰۰ نوع فلاونوئید از جمله لیکویریتین، لیکویریتیجین، چالکون‌های ایزولیکویریتیجین، ایزولیکویریتین، ایزوفلاونوئیدها، هیدروکسی کومارین، استرول، رزین‌ها، روغن‌های فرار، ساکارز (۱-۲ درصد)، نشاسته، پلی‌ساکاریدها (۲-۳۰ درصد) و به مقدار جزئی اسانس است (Asl and Hosseinzadeh, 2008). شیرین بیان در طب سنتی آسیا و اروپا برای درمان زخم معده و عفونت‌های تنفسی، در طب سنتی چین در درمان هپاتیت، تومور و بیماری‌های قلبی کاربرد دارد و در طب سنتی ایران نیز در درمان ورم معده و سرفه استفاده شده است (Li et al., 2012). شیرین بیان در درمان گاستریت، عفونت‌های تنفسی و مسکن در التهاب‌های پوستی و همچنین درمان گرفتگی عضلات، تورم و روماتیسم کاربرد دارد. گلیسرزیک اسید موجود در گیاه با توانایی مهار باکتری هلیکوپیلوری در درمان زخم معده، مشکلات مخاطی معده و کاهش اسید معده مؤثر است (Csuk et al., 2010). این گیاه بر سیستم غدد درون‌ریز بدن تأثیرگذار است و مصرف آن ممکن است مقدار تستوسترون خون را کاهش دهد. همچنین اثرات افزایش ترشح سرتونین و پروستاگلندین در معده را داشته و اثرات ضدتورم معده را از این طریق اعمال می‌نماید (Colalto, 2010). استفاده از این گیاه در درمان تورم بخش فوقانی دستگاه تنفس، زخم‌های معده و دوازدهه تأیید شده است (Krausse et al., 2004). عصاره این گیاه مانع همانندسازی ویروس HIV در بیماران مبتلایان به ایدز می‌شود و برخی از ترکیبات این گیاه اثرات ضد سرطانی و برخی اثرات مهار آنزیم‌ها را بر عهده دارند. وجود ترکیبات کاهنده چربی و فلاونوئیدها با فعالیت آنتی‌اکسیدان قوی نیز در این گیاه گزارش شده است. گزارشات متعددی اثرات سمیت سلولی عصاره شیرین بیان را بررسی کرده‌اند و نتایج بیانگر این است که عصاره این گیاه سمیت سلولی بسیار کمتر و اثر مهاری ضعیف‌تری نسبت به داروهای استروئیدی و غیراستروئیدی دارد (Maysoon et al., 2011).

جهت بهره‌برداری از گیاه، ریشه‌های ۲-۳ ساله از خاک خارج شده و پس از خشک‌شدن مورد استفاده صنعتی و سنتی متعدد قرار می‌گیرد. از آنجا که در طبیعت سرعت تولید متابولیت‌های ثانویه

معرفی روش تولید و کشت ریشه موین شیرین بیان در سیستم آبکشت / ۷

کند بوده و مدت زمان طولانی برای تولید لازم است، استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی برای تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه و دارویی ضروری به نظر می‌رسد. بیوتکنولوژی از طریق کشت سلول، بافت و یا اندام گیاهان در شرایط درون‌شیشه (*in vitro*)، این موقعیت را فراهم می‌سازد که تولید متابولیت‌های گیاهی تحت شرایط کنترل‌شده و در مدت زمان کوتاه‌تری انجام گیرد. تولید متابولیت ثانویه در گیاهان نوعی تمایز است و بین تمایز سلولی و تولید متابولیت ثانویه ارتباط وجود دارد. برخی از متابولیت‌ها فقط در مرحله کشت ریشه تولید می‌شوند (اصغری، ۱۳۸۵). گلیسیریزین از مهمترین مواد موثره گیاه شیرین بیان می‌باشد که از ریشه‌های گیاه گزارش شده است (Amani et al., 2005). کشت ریشه را می‌توان به روش تولید ریشه نابجا و ریشه تراریخت ایجاد نمود. از راهکارهای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان، استفاده از یک ناقل طبیعی به نام آگروباکتریوم ریزوژنز و طراحی سیستم کشت ریشه موین می‌باشد (Bourgau et al., 2001). استفاده از کشت ریشه موین به‌عنوان یک سیستم بیولوژیکی مناسب برای تولید متابولیت‌های ثانویه و به ویژه متابولیت‌های موجود در ریشه گیاهان بسیار حائز اهمیت است (Guillon et al., 2006). سرعت رشد بالا، انشعابات فراوان و نگهداری آسان از مزایای این نوع کشت است. ریشه‌های موین دارای پایداری ژنتیکی و بیوسنتزی هستند، به‌علاوه این ریشه‌های تراریخت در مقایسه با ریشه‌های معمول گیاه سطوح بالاتری از متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند. از ریشه‌های موین می‌توان به‌عنوان منبع همیشگی تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده کرد، زیرا این ریشه‌ها قابلیت رشد در بیوراکتورها را دارند و برای تولید نیمه‌صنعتی و صنعتی متابولیت‌های ثانویه استفاده می‌شوند (Hu and Du, 2006). تیون و رزنکوویست (Toivonen and Rosenqvist, 1995)، با استفاده از آگروباکتریوم سویه C58C18 دارای پلاسمید Ri در گونه *G. glabra* ریشه موین تولید نمودند ولی در این تحقیق هیچ مقدار گلیسیریزین قابل اندازه‌گیری مشخص نشد. لی و همکاران (Li et al., 2000)، با ایجاد ریشه‌های موین در شیرین بیان چندین ترکیب فلاونوئیدی را مشاهده کردند. در تحقیقات آسادا و همکاران (Asada et al., 2000)، با استفاده از کشت ریشه‌های موین گونه *G. glabra* بیوسنتز بخش پرنیل ترکیب Glabrol (فلاونوئید) از طریق مسیر غیر موالونیک بررسی شد.

❖ معرفی روش تولید و کشت ریشه مویین شیرین بیان در سیستم آبکشت / ۸

کوالنکو و همکاران (Kovalenko et al., 1989)، پروتوپلاست گونه *G. glabra* را با آگروباکتریوم ریزوژنز تلقیح کردند که پس از القاء ریشه‌های مویین، مقدار ترکیبات فنلی دو برابر بیشتر از سلول‌های غیر تراریخت گزارش شد. شیرازی و همکاران (Shirazi et al., 2012)، تولید گلیسییریزین در ریشه مویین شیرین بیان بومی ایران گونه *G. glabra* را عنوان کردند که اولین گزارش از تولید گلیسییریزین در ریشه مویین این گونه بود. از محدودیت‌های کشت ریشه مویین، نبود بخش‌های هوایی است، رشد بخش‌های هوایی به‌عنوان عامل برای تولید فعال ژن‌های موثر در مسیر گلیسییریزین است (Hayashi et al., 2009; Kirakosyan et al., 2009). در سال‌های اخیر برای مطالعه عملکرد ژن‌ها در ریشه، از روش تولید گیاهان کامپوزیت (composite plant) استفاده می‌شود که روشی موثر و سریع تولید گیاه با اندام هوایی طبیعی و ریشه‌های تلقیح‌شده با آگروباکتریوم ریزوژنز بوده و به روش کشت بافت و در محیط استریل درون‌شیشه قابل انجام است. روش *ex vitro*، روشی جدیدتر، سریع و کم هزینه‌تر است که مرحله کشت بافت در آن حذف گردیده است. گیاهان کامپوزیت پتانسیل زیادی برای بررسی بیان ژن (از جمله بیان موقت ژن) و بررسی فنوتیپ ریشه دارند و از آنها برای مطالعه جذب مواد غذایی، انتقال هورمون و برهمکنش ریشه گیاه با باکتری‌های ایجادکننده گره استفاده می‌شود (Collier et al., 2005). آخرین مرحله توسعه تکنیک‌های تولید متابولیت‌های ثانویه در سیستم‌های آزمایشگاهی استفاده از بیوراکتورها می‌باشد. از محدودیت اصلی به‌کارگیری تجاری ریشه‌های مویین، کشت وسیع آنها در مقیاس صنعتی است زیرا کشت ریشه‌های مویین در مقیاس بزرگ مشکلات منحصر به فردی را به وجود می‌آورند و تکان دادن مکانیکی آنها در بیوراکتورها سبب زخم‌شدن ریشه‌های مویین و تولید کالوس می‌شود که از دیدگاه تولید متابولیت‌های ثانویه نامطلوب می‌باشد و با تولید متابولیت‌های ثانویه همبستگی منفی دارد (Giri and Narasu, 2000). با تلفیق تکنولوژی‌های بر پایه باغبانی (سیستم آبکشت) و بیوتکنولوژی (تراریختی ژنتیکی با آگروباکتریوم ریزوژنز) می‌توان روشی برای تولید و افزایش مولکول‌های طبیعی دارای خواص دارویی و آرایشی ایجاد کرد. تولید گیاه کامپوزیت شیرین‌بیان توسط زبرجدی و همکاران (Zebarjadi et al., 2017) و پیری و همکاران (Piri et al., 2016)، گزارش شد که به توانایی تراریختی

❖ معرفی روش تولید و کشت ریشه موین شیرین بیان در سیستم آبکشت / ۹

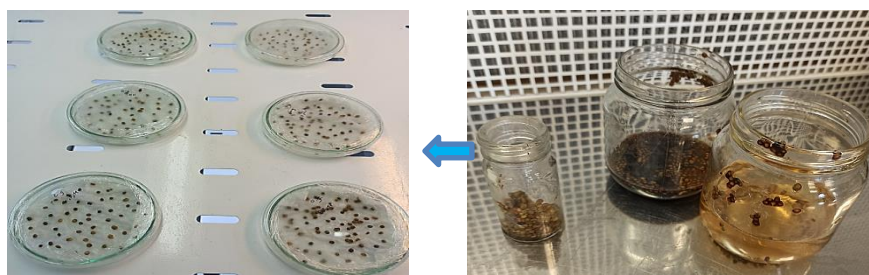
سویه‌های مختلف باکتری در تولید گیاه کامپوزیت پرداختند. شیرازی و همکاران (Shirazi et al., 2018)، انتقال ژن *CYP88D6* در گیاهان کامپوزیت شیرین بیان در محیط کشت بافت و استریل را گزارش کردند.

دستور العمل فنی حاضر، روش تولید گیاه کامپوزیت شیرین بیان در شرایط *ex vitro* و انتقال گیاهچه‌ها به شرایط آبکشت به عنوان بیوراکتوری جهت تولید متابولیت‌های مختلف ارائه خواهد داد که، روش مناسب، کم هزینه و کاربردی برای تولید و افزایش متابولیت‌های گیاه شیرین بیان در شرایط کنترل شده است.

مراحل انجام کار

کشت بذور شیرین بیان

در این دستورالعمل از بذور شیرین بیان تهیه شده از شرکت پاکان بذر استفاده شد. به دلیل پوسته ضخیم بذر و به منظور خراش دهی از اسید سولفوریک غلیظ (۹۸ درصد) به مدت ۲۰ دقیقه استفاده کنید. سپس، اسید را از بذرها به طور کامل با شستشو توسط آب جدا کرده و روی پتری دیش‌های دارای کاغذ مرطوب و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۷-۲۳ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی قرار دهید. بعد از ۲۴ ساعت بذرها را داخل پتری‌های جدید دارای کاغذ صافی و در دمای ۲۷-۲۳ درجه سانتی‌گراد و در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی قرار دهید و به محیط، محلول 1/4 MS بدون ویتامین با $pH=5/8$ (جدول ۱) اضافه کنید (شکل ۱). گیاهچه‌های ۵-۳ روزه جهت تلفیح با باکتری استفاده می‌شوند.



شکل ۱- خراش دهی و کشت بذور شیرین بیان بر روی کاغذ صافی

معرفی روش تولید و کشت ریشه مویین شیرین بیان در سیستم آبکشت / ۱۰

جدول ۱- ترکیبات محلول‌های ذخیره‌ای محیط کشت MS بدون ویتامین

عنصر (گرم بر لیتر)	محلول ذخیره ماکرو 10X
KH_4NO_3	۱۶/۵
KNO_3	۱۹
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	۴/۴
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	۳/۷
KH_2PO_4	۱/۷
عنصر (میلی گرم بر لیتر)	محلول ذخیره میکرو 100X
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	۲۲۳۰
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	۸۶۰
H_3BO_3	۶۲۰
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	۲۵
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	۲/۵
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	۲/۵
KI	۸۳
عنصر (میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر)	محلول ذخیره آهن 100X
$\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	۲۷۸
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	۳۷

تهیه کشت سوسپانسیون آگروباکتریوم ریزوژنز

برای تهیه کشت سوسپانسیونی، یک کلون از باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز سویه ATCC 15834 را روی محیط جامد LB با pH=۷ (جدول ۲) دارای ۵۰ میلی گرم در لیتر ریفامپیسین و ۱۵ گرم بر لیتر آگار بصورت استریل تهیه کرده و در شرایط استریل کشت کنید. یک روز قبل از تلقیح، واکشت‌هایی مایع شامل یک کلون از باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز سویه ATCC 15834 را در فالكون ۵۰ میلی لیتر اتوکلاو شده حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت LB مایع (بدون آگار) و ۵۰ میلی گرم در لیتر ریفامپیسین کشت کنید. سپس کشت مایع باکتری به شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد، با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه و شرایط تاریکی منتقل گردد تا باکتری رشد کرده و فعال شود. بعد از سپری شدن این

❖ معرفی روش تولید و کشت ریشه موین شیرین بیان در سیستم آبکشت / ۱۱

مدت، غلظت سوسپانسیون باکتری را با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در OD_{600} تعیین کنید. غلظت سوسپانسیون $OD_{600} = (0/2-0/4)$ مناسب تلقیح است.

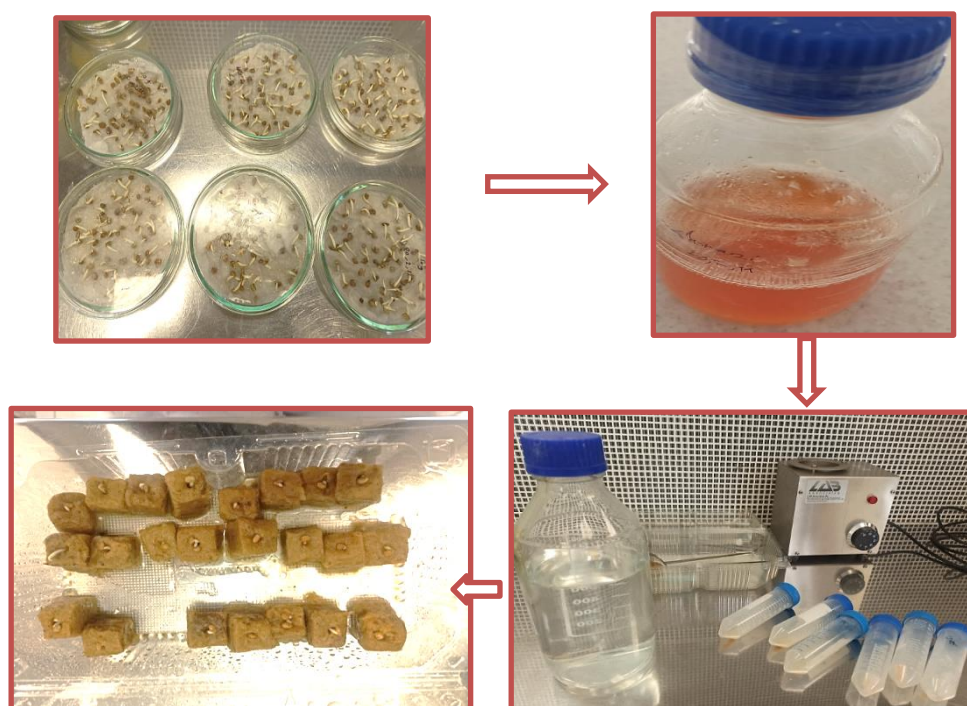
جدول ۲- ترکیبات مورد نیاز تهیه یک لیتر محیط کشت LB	
اجزاء	غلظت (گرم بر لیتر)
عصاره مخمر	۵
تریپتون	۱۰
کلریدسدیم	۱۰

تلقیح گیاهچه‌های شیرین بیان با آگروباکتریوم ریزوژنز

برای تلقیح ابتدا ریشه‌های گیاهچه‌های جوانه‌زده، سالم و یکدست را از محور زیر لپه به صورت اریب با تیغ اسکالپل برش دهید و بمنظور جلوگیری از پژمردگی، نمونه‌ها را درون آب استریل بگذارید. سپس سوسپانسیون باکتری آماده و فعال شده را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط و با قدرت نسبی ۳۳۰۰ (RCF) سانتریفیوژ کنید تا باکتری رسوب کند و باقی محیط کشت را دور بریزید. مکعب‌های پشم‌سنگ استریل‌شده را در ابعاد ۱ سانتیمتر در ۱ سانتیمتر برش‌داده و درون آن‌ها یک حفره ایجاد کنید و سپس پشم‌سنگ‌ها را داخل ظروف یکبار مصرف درب‌دار ضدعفونی‌شده با الکل قرار دهید. باکتری رسوب‌داده درون فالكون را به آهستگی ابتدا با ۱۰ میلی‌لیتر محلول $1/4$ MS اتوکلاو شده و با استفاده از سمپلر حل‌نموده و در نهایت ۲۰ میلی‌لیتر دیگر محلول $1/4$ MS مجدداً اضافه کنید و به آرامی فالكون‌ها را تکان دهید. درون هر سوراخ پشم‌سنگ یک گیاهچه با ریشه قطع‌شده قرار دهید و ۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری $OD_{600} = (0/2-0/4)$ داخل پشم‌سنگ ریخته و در نهایت مقداری آب استریل درون ظروف نگهداری گیاهچه‌ها اسپری کنید تا فضا از رطوبت اشباع شود (شکل ۲). درب ظروف را بسته و در اتاقک رشد با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی قرار دهید. بعد از ۲۴ ساعت، درب ظروف حاوی گیاهچه‌ها را به مدت ۲-۱ ساعت باز بگذارید و سپس به هر پشم‌سنگ ۶ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه کنید و مجدداً درب ظروف را بسته و به اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی

❖ معرفی روش تولید و کشت ریشه مویین شیرین بیان در سیستم آبکشت / ۱۲

گراد با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل کنید. در طول مدت رشد گیاهچه‌ها، ریشه‌ها را با آب مقطر و هر هفته یکبار با محیط 1/4 MS آبیاری کنید. بعد از رشد و ظهور ریشه‌های مویین (شکل ۳)، جهت حذف باکتری اضافی، ریشه‌ها با آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (۵۰۰ میلی گرم در لیتر) شستشو داده شوند.



شکل ۲- تلقیح گیاهچه های شیرین بیان با آگروباکتریوم ریزوژنز



شکل ۳- رشد گیاهان کامپوزیت و ظهور ریشه‌های مویین در آنها

معرفی روش تولید و کشت ریشه موین شیرین بیان در سیستم آبکشت / ۱۳

انتقال گیاهان کامپوزیت به محیط آبکشت

حدود یکماه بعد از رشد گیاهچه‌ها، گیاهان را به محیط آبکشت و با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل کنید. در این مدت هر ۱۰ روز یکبار محیط کشت با محلول ۱/۲ هوگلند (جدول ۳) تعویض شود و جهت هوادهی از پمپ آکواریوم استفاده کنید (شکل ۴). پس از رشد کافی ریشه‌ها، از نوک ریشه‌های گیاه کامپوزیت به‌صورت تصادفی، ریشه انتخاب‌کرده و به‌داخل نیتروژن مایع منتقل کنید و تا زمان استخراج DNA، در فریزر با دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند.

جدول ۳- ترکیبات و مقدارهای مورد استفاده در محیط هوگلند

مقدار (گرم)	ترکیبات	محلول ذخیره
۰/۳۷	KCl	
۰/۱۵۲	H ₃ BO ₃	
۰/۰۳۴	MnSO ₄ .H ₂ O	
۰/۰۵۸	ZnSO ₄ .7H ₂ O	
۰/۰۱۳	CuSO ₄ .5H ₂ O	
۰/۰۰۹۲	H ₂ MoO ₄	
۰/۱۸۶۲	Fe-EDTA	
۹/۴۴۶	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	۲- حل کردن در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر
۶/۰۶۶	KNO ₃	۳- حل کردن در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر
۱/۱۰۵۳	NH ₄ H ₂ PO ₄	
۲/۴۶۴۷	MgSO ₄ .7H ₂ O	۴- حل کردن در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر

معرفی روش تولید و کشت ریشه مویین شیرین بیان در سیستم آبکشت / ۱۴



شکل ۴- انتقال گیاهچه‌های کامپوزیت شیرین بیان به سیستم آبکشت دارای محلول ۱/۲ هوگلند و هوادهی با پمپ آکواریوم

تأیید القاء ریشه‌های مویین

- استخراج DNA با بافر CTAB و به روش (Cai et al., 1997) و مطابق دستورالعمل زیر انجام شود.
۱. مقدار ۰/۲ گرم از ریشه‌ها را با استفاده از نیتروژن مایع پودر کنید. برای هر یک از ریشه‌ها از بوته و هاون جداگانه جهت ساییدن استفاده کنید.
 ۲. بلافاصله ریشه‌های پودر شده را به داخل تیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری حاوی یک میلی‌لیتر بافر استخراج CTAB منتقل و ۱۲ میکرولیتر مرکاپتواتانول به آن‌ها اضافه کنید.
 ۳. پس از مخلوط شدن، تیوپ‌ها را به مدت یک ساعت در حمام آب گرم ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار دهید. در این فاصله تیوپ‌ها را چند بار تکان دهید تا پودر ریشه‌ها در حلال حل شود.
 ۴. به هر نمونه ۶۰۰ میکرولیتر کلروفرم: ایزوآمیل الکل به نسبت ۲۴:۱ (v/v) افزوده و نمونه‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط تکان کنید.
 ۵. تیوپ‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۸۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کنید و بعد از ایجاد سه لایه، لایه رویی را برداشته و به تیوپ جدید منتقل کنید. در صورت شفاف نبودن لایه رویی مراحل ۵ و ۶ را دوباره تکرار کنید.
 ۶. برای رسوب دادن DNA، ۶۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد را به تیوپ‌ها افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ کنید.

❖ معرفی روش تولید و کشت ریشه مویین شیرین بیان در سیستم آبکشت / ۱۵

۷. محلول رویی را به آرامی دور بریزید. رسوب DNA را با محلول شستشوی اول (جدول ۵) و در دمای محیط به مدت ۲۰ دقیقه شستشو دهید و سپس با محلول شستشوی دوم (جدول ۵) نیز به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط شستشو دهید.

جدول ۵- مواد تشکیل دهنده محلول های مورد نیاز استخراج DNA ژنومی					
محلول شستشوی اول		محلول شستشوی دوم		بافر استخراج CTAB	
Ethanol	76%	Ethanol	76%	Tris/HCL (pH=7.5)	20 mM
NaOAc	0.2 M	NH ₄ OAc	0.01M	NaCl	840 mM
				EDTA (pH=8)	12mM
				CTAB	2%

۸. نمونه ها را در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کنید و محلول رویی را بردارید و رسوب DNA را به مدت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه در دمای محیط خشک کنید و در نهایت رسوب DNA را در ۵۰ میکرولیتر از بافر TE حل نمایید و تا زمان استفاده در یخچال ۴ درجه سانتی گراد قرار دهید.

بعد از رویت DNA استخراجی بر روی ژل آگارز یک درصد و با توجه به اینکه ژن *rolB* در ناحیه T-DNA آگروباکتریوم ریزوژنز قرار دارد، برای اثبات انتقال T-DNA باکتری به ژنوم گیاه و تولید ریشه مویین از تکثیر بخشی از این ناحیه ژنی روی DNA استخراجی استفاده کنید. بدین منظور یک جفت آغازگر اختصاصی با توالی مشخص جهت تکثیر ژن *rolB* (جدول ۶) را به شرکت های سنتزکننده آغازگر مانند شرکت سیناژن سفارش دهید. شرایط تکثیر را با دستگاه ترموسایکلر مطابق جدول های ۷ و ۸ تنظیم کنید. تائید مولکولی ریشه های مویین و تمایز آنها از ریشه های نابجای احتمالی با تکثیر اختصاصی ژن *rolB* و رویت باند در ناحیه ۷۸۰ جفت باز انجام می گیرد (شکل ۵).

معرفی روش تولید و کشت ریشه مویین شیرین بیان در سیستم آبکشت / ۱۶

جدول ۶- مشخصات آغازگر *roB*

نام آغازگر	توالی آغازگر
<i>roB</i> Forward	TTAGGCTTCTTTCATTTCGGTTTACTGCAGC
<i>roB</i> Reverse	ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCACGA

جدول ۷- برنامه PCR برای تکثیر *roB*

واکنش	دمای واکنش (سانتی گراد)	زمان واکنش	تعداد سیکل
واسرشته سازی اولیه	۹۵	۱۰ دقیقه	۱
واسرشته سازی	۹۵	۶۰ ثانیه	
اتصال آغازگر	۵۸	۶۰ ثانیه	۳۵
بسط	۷۲	۶۰ ثانیه	
بسط نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

جدول ۸- اجرا مورد نیاز PCR جهت تکثیر ژن *roB*

مقدار (میکرولیتر)	اجزا محلول واکنش
۵	مخلوط واکنش
۰/۵	آغازگر رفت (۱۰ نانوگرم در میکرولیتر)
۰/۵	آغازگر برگشت (۱۰ نانوگرم در میکرولیتر)
۱	DNA
۳	آب دیونیزه

معرفی روش تولید و کشت ریشه مویین شیرین بیان در سیستم آبکشت / ۱۷



شکل ۵- تکثیر و رویت باند ۷۸۰ جفت باز مربوط به ژن *rolB* در ژنوم ریشه گیاهان کامپوزیت.

(A1) کنترل مثبت که تکثیر ژن *rolB* از کلون‌های آگروباکتریوم ریزوژنر

(A2- A5) تکثیر ژن *rolB* از ژنوم ریشه گیاهان کامپوزیت

(A6) عدم تکثیر و رویت ژن *rolB* از ژنوم ریشه گیاهان شاهد (تلقیح نشده)

بررسی فیتوشیمیایی گیاهان کامپوزیت شیرین بیان

برای بررسی مقدار تولید متابولیت‌ها در گیاهان کامپوزیت و شاهد، گیاهچه‌ها را بعد از رشد کافی برداشت کرده و تا زمان عصاره‌گیری در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری کنید. نمونه‌ها را در آون با دمای ۳۰ درجه سانتیگراد خشک کنید. سپس نمونه خشک شده را با هاون پودر کرده و با ۱۵۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد مخلوط کنید و به مدت ۶ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار دهید. عصاره استخراج شده را با کاغذ واتمن شماره ۱ فیلتر کرده و متانول اضافی را با کاهش فشار توسط روتاری با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد حذف کنید. از عصاره آبی حاصل برای ارزیابی مشتقات گلابریدین و گلیسیریزین استفاده کنید. برای تعیین مقادیر متابولیت‌های مورد نظر بعد از تهیه استاندارد، از روش کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC) استفاده کنید. مشخصات دستگاه شامل Unicam-crystal-200 با یک پمپ Jasco PU-2089 مجهز به یک آشکارساز آرایه دیود (Jasco MD-2015 (DAD و در طول موج ۲۵۴ نانومتر انجام شود.

❖ معرفی روش تولید و کشت ریشه مویین شیرین بیان در سیستم آبکشت / ۱۸

جداسازی با ستون (RP-18 column (4.0 × 250 mm internal diameter, 5 μm) انجام شود. فاز متحرک شامل A : 0.05 درصد اسید فرمیک آبی و B : متانول، با سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه در حالت گرادیان (min 30% B, 6 min 70% B, 9 min 100% B, 12 min 100% B, re-equilibration) time 3 min تنظیم شود. در نهایت هر یک از ترکیبها را با مقایسه پیک استانداردهای معتبر خود اندازه گیری کنید. نتایج مقدار متابولیت های گلابرن، گلابریدین، گلیسیریزیک اسید و لیکویریتین در کشت کامپوزیت گیاهان شیرین بیان را در سیستم آبکشت در جدول ۹، مشاهده می کنید که بیشتر متابولیت های تولیدی به صورت معنی دار در گیاهان کامپوزیت بالاتر از گیاهان شاهد است.

جدول ۹- تولید مواد متابولیت های ثانویه در گیاهان کامپوزیت شیرین بیان در سیستم آبکشت نسبت به گیاهان شاهد (تلقیح نشده)

نمونه	گلابرن	گلابریدین	گلیسیریزیک اسید	لیکویریتین
گیاه شاهد	$1/79^b \pm 0/16$	$6/88^b \pm 0/76$	$2/3^a \pm 0/27$	$5/34^b \pm 0/4$
گیاه کامپوزیت	$6/05^a \pm 0/19$	$16/55^a \pm 0/69$	$2/26^a \pm 0/2$	$7/31^a \pm 0/46$

مقادیر برحسب میلی گرم بر گرم وزن خشک می باشد.

معرفی روش ایجاد گیاهان کامپوزیت در شرایط آبکشت بمنظور تولید متابولیت های ثانویه

روش کشت گیاه کامپوزیت در سیستم آبکشت (شکل ۶)، همانگونه که نتایج نشان داد، سیستم کارآمدی برای تولید متابولیت های موجود در ریشه شیرین بیان تحت شرایط کنترل شده است که تمامی مزایای ریشه مویین را داشته و از طرفی زمان و هزینه تولید آن کمتر است و نیاز به بیوراکتورهای اختصاصی کشت ریشه مویین که پرهزینه و قابل اجرا در شرایط کاملاً استریل هستند را برطرف می کند.

معرفی روش تولید و کشت ریشه موین شیرین بیان در سیستم آبکشت / ۱۹



شکل ۶- تولید گیاهان کامپوزیت شیرین بیان در سیستم آبکشت

معرفی روش تولید و کشت ریشه موین شیرین بیان در سیستم آبکشت / ۲۰

منابع مورد استفاده

اصغری، غلامرضا (۱۳۸۵)، بیوتکنولوژی گیاهان دارویی، انتشارات جهاد دانشگاهی اصفهان.

زرگری، علی (۱۳۷۱)، گیاهان دارویی، جلد سوم، انتشارات دانشگاه تهران، ۹۴۲ صفحه

- Amani, M., Hosein, R.S and Kashani, A.M., 2005. Optimal extraction of glycyrrhetic acid from licorice root. Journal of Food technology, 3(4): 576-80.
- Asada, Y., Li, W. and Yoshikawa, T., 2000. Biosynthesis of the dimethylallyl moiety of glabrol in *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures via a non-mevalonate pathway. Phytochemistry, 55(4): 323-326.
- Asl, M.N. and Hosseinzadeh, H., 2008. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 22(6): 709-724.
- Bourgau, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant science, 161(5): 839-851.
- Cai, D. et al., 1997. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. Science, 275(5301): 832-834.
- Colalto, C., 2010. Herbal interactions on absorption of drugs: mechanisms of action and clinical risk assessment. Pharmacological Research, 62(3): 207-227.
- Collier, R., Fuchs, B., Walter, N., Kevin Lutke, W. and Taylor, C.G., 2005. Ex vitro composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology. The Plant Journal, 43(3): 449-457.
- Csuk, R., Schwarz, S., Kluge, R. and Strohl, D., 2010. Synthesis and biological activity of some antitumor active derivatives from glycyrrhetic acid. European journal of medicinal chemistry, 45(12): 5718-5723.
- Giri, A. and Narasu, M.L., 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotechnology advances, 18(1): 1-22.
- Guillon, S., Tremouillaux-Guiller, J., Pati, P.K., Rideau, M. and Gantet, P., 2006. Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. TRENDS in Biotechnology, 24(9): 403-409.
- Hayashi, H., 2009. Molecular biology of secondary metabolism: case study for *Glycyrrhiza* plants, Recent Advances in Plant Biotechnology.
- Hu, Z.B. and Du, M., 2006. Hairy root and its application in plant genetic engineering. Journal of integrative plant biology, 48(2): 1. ۲۷-۲۱
- Kirakosyan, A., Kaufman, P.B. and Hayashi, H., 2009. Molecular biology of secondary metabolism: case study for *Glycyrrhiza* plants. Recent advances in plant biotechnology: 89-103.
- Krausse, R., Bielenberg, J., Blaschek, W. and Ullmann, U., 2004. *In vitro* anti-Helicobacter pylori activity of Extractum liquoritiae, glycyrrhizin and its metabolites. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 54(1): 243-246.
- Li, J., Dai, X., Liu, T. and Zhao, P.X., 2012. LegumeIP: an integrative database for comparative genomics and transcriptomics of model legumes. Nucleic acids research, 40(D1): D1221-D1229.
- Li, W., Asada, Y. and Yoshikawa, T., 2000. Flavonoid constituents from *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. Phytochemistry, 55(5): 447-456.

- Li, Y J. et al., 2011. Screening and characterization of natural antioxidants in four *Glycyrrhiza* species by liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(45): 8181-8191.
- Maysoon, M.N.M.S., Arieg, A.W.M., Jazaer, A.A.T. and Ghassan, M.S., 2011. Biological study of the effect of licorice roots extract on serum lipid profile, liver enzymes and kidney function tests in albino mice. *African Journal of Biotechnology*, 10(59): 12702-12.۷۰۶
- PG, K., Antonjuk, V. and Maliuta, S., 1989. Secondary metabolites production from transformed cells of *Glycyrrhiza glabra* and *Potentilla alba* as a producers of radioprotective compounds. *genetic engineering*: 10.
- Piri, K., Sepahvand, K. and Mirzaie Asl, A., 2016. Generation of composite plants in licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) using *Agrobacterium rhizogenes*.
- Shirazi, Z., Aalami, A., Tohidfar, M. and Sohani, M.M., 2018. Metabolic engineering of glycyrrhizin pathway by over-expression of beta-amyrin 11-oxidase in transgenic roots of *Glycyrrhiza glabra*. *Molecular biotechnology*, 60: 412-419.
- Shirazi, Z., Piri, K., Asl, A.M. and Hasanloo, T., 2012. Glycyrrhizin and isoliquiritigenin production by hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra*. *J. Med. Plants Res*, 31: 4640-4646.
- Toivonen, L. and Rosenqvist, H., 1995. Establishment and growth characteristics of *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. *Plant cell, tissue and organ culture*, 41: 249-258.
- Zebarjadi, A., Safari, M. and Cheghamirza, K., 2017. *Ex vitro* production of transgenic composite plants in *Glycyrrhiza glabra* via *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation as a new method. *Journal of Medicinal Plants*, 16(61): 102-109.