

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
مَوْلَانَا مُحَمَّدٌ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ



دانشکده مهندسی کشاورزی

رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

بهینه‌سازی تولید اسید گلیسیریزیک در کشت درون شیشه‌ای گیاه شیرین بیان (*Glycyrrhiza*)

(glabra L.

نگارنده:

علی اکبر علیزاده ایوری

اساتید راهنما

سرکار خانم دکتر مهدیه پارسائیان

اساتید مشاور

سرکار خانم دکتر زیبا قسیم‌ی حق

مهندس احسان قدوسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

بهمن ۱۳۹۸

تقدیم به

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگان
به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدنش وجودشان که در این سردترین روزگار ان بهترین پشتیبان است
به پاس قلب های بزرگشان که فریادرس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید
و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند
این مجموعه را به پدر و مادر و همسر عزیزم تقدیم می کنم

با سپاس از سه وجود مقدس:

آنان که ناتوان شدند تا ما به توانایی برسیم....

مویشان سپید شد تا ما رو سفید شویم.....

و عاشقانه سوختند تا گرما بخش وجود ما و روشنگر راهمان باشند..

پدرانمان

مادرانمان

استادانمان

تعهد نامه

اینجانب **علی اکبر علیزاده ایوری** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه **بهینه‌سازی تولید اسید گلیسیریزیک در کشت درون شیشه‌ای گیاه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra L.*)** تحت راهنمایی دکتر مهدیه پارسائیان متعهد می‌شوم.

تحقیقات این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.

در استفاده از نتایج محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.

مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است. کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد و مقالات مستخرج با نام «دانشگاه صنعتی شاهرود» و یا «Shahrood University of Technology» به چاپ خواهد رسید.

حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می‌گردد.

در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت‌های آن‌ها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.

در کلیه مراحل انجام این پایان نامه در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاقی انسانی رعایت شده است.

امضای دانشجو

تاریخ

کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود. استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

چکیده :

شیرین بیان با دارا بودن متابولیت ثانویه اسید گلیسیریزیک جزء گیاهان دارویی مهم محسوب می‌گردد. در این پژوهش، جوانه‌زنی سه اکوتیپ عراقی، کاشمر و جغتای شیرین بیان نشان داد که کاربرد اسید سولفوریک ۹۸ درصد سبب بیشترین جوانه‌زنی (۸۰ درصد) در اکوتیپ عراقی شد. سنجش رشد درون شیشه‌ای گیاهچه‌ها در محیط جامد، مایع و هیدروژل به همراه مصرف و عدم مصرف زغال فعال نشان داد که اغلب صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی ارزیابی شده در محیط کشت مایع حاوی زغال فعال (۲ گرم در لیتر) بهبود یافتند. بررسی اثرات اکسین‌های IAA و NAA بر ریشه‌زایی اکوتیپ‌ها و تغییرات محتوای متابولیت ثانویه نشان داد که اکوتیپ‌های جغتای و کاشمر به ترتیب تحت تیمارهای ۱/۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA از وزن‌ترین و قطورترین ریشه‌ها برخوردار بودند. بیشترین میزان اسید گلیسیریزیک (۱/۳۳ میلی‌گرم برگرم در وزن خشک) در اکوتیپ جغتای تیمار شده با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA تولید گردید. کاربرد سطوح مختلف نانولوله کربنی MWCNTs (۰، ۱۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم) و مونوفسفات پتاسیم KH_2PO_4 (۰، ۲/۲ و ۳ گرم) در گیاهچه‌های درون شیشه‌ای منجر به بهبود، صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی تعداد برگ، طول ساقه و ریشه، وزن تر و خشک ریشه و مقدار اسید گلیسیریزیک را در هر سه اکوتیپ گردید. ارزیابی تولید ریشه‌های تراریخت با استفاده از آگروباکتريوم رایزوتنز سویه AR15834 نشان دهنده برتری ریز نمونه‌های برگ سه هفته‌ای در اکوتیپ کاشمر تیمار شده با ۲۰۰ میکرومولار استوسرینگون بود. همچنین گیاهچه‌های ۷ روزه‌ی اکوتیپ کاشمر زخمی شده از ناحیه هیپوکوتیل، در حضور استوسرینگون حداکثر فراوانی (۶۰ درصد) تولید ریشه‌های تراریخت را نشان دادند. در این مرحله PCR ژن roIB نیز تراریختگی ریشه‌ها را تأیید کرد. براساس یافته‌های مرحله قبل، گیاهچه‌های واجد ریشه‌های تراریخت متصل به هیپوکوتیل جدا شدند و به محیط نیمه جامد MS حاوی سطوح مختلف نانولوله کربنی MWCNTs (۰، ۱۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم) و فسفر KH_2PO_4 (۰، ۲/۲ و ۳ گرم) منتقل شدند. سنجش میزان اسید گلیسیریزیک با HPLC در گیاهچه‌های ۱۴ روزه نشان داد که اکوتیپ کاشمر تیمار شده با ۴۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانوکربن MWCNTs بیشترین میزان این ماده موثره را با میانگین ۱۶/۹۵ میلی‌گرم برگرم در وزن خشک تولید کرد.

کلید واژه:

شیرین بیان، اسید گلیسیریزیک، صفات مورفولوژیکی، ریشه تراریخت، نانوکربن MWCNT

فسفر KH_2PO_4

لیست مقالات مستخرج از پایان نامه

بررسی جوانه زنی و خصوصیات مرتبط با رشد گیاهچه در اکوتیپ های مختلف شیرین بیان، دومین

کنفرانس بین المللی گیاهان دارویی، کشاورزی ارگانیک، مواد طبیعی و دارویی، مشهد، انجمن علمی گیاهان

دارویی ایران، اسفند ۱۳۹۷.

فهرست

فصل اول	۱
مقدمه و کلیات	۱
۱-۱- مقدمه	۲
۲-۱- گیاهشناسی شیرین بیان	۳
۳-۱- رویشگاه و مناطق رشد شیرین بیان	۴
۴-۱- اهمیت دارویی شیرین بیان	۴
۵-۱- عوارض جانبی	۶
۶-۱- داروهای تولید شده از گیاه شیرین بیان در بازار ایران	۶
۷-۱- آماده سازی و کاربردهای تجاری	۷
۸-۱- دلایل تکثیر و باززایی این گیاه در شرایط آزمایشگاهی	۸
۹-۱- طبقه بندی متابولیت های ثانویه	۸
۱-۹-۱- ترپنوئیدها	۸
۲-۹-۱- بیوسنتز تری ترین ساپونین ها	۹
۳-۹-۱- ساپونین های تری ترپنوئید	۹
۴-۹-۱- بیوسنتز اسید گلیسیریزیک	۱۰
۱۰-۱- ترکیبات فنولی	۱۲
۱۱-۱- فلاونوئیدها	۱۳
۱۲-۱- کشت بافت	۱۴
۱۳-۱- اهمیت و کاربرد کشت بافت	۱۵
۱۴-۱- اهمیت و کاربرد کشت بافت در گیاهان دارویی	۱۵
۱۵-۱- کاربرد بیوتکنولوژی در گیاهان دارویی	۱۶
۱۶-۱- استفاده از روش های مختلف بیوتکنولوژی در گیاهان دارویی	۱۷
۱۷-۱- کاربرد کشت سلول و اندام در تولید متابولیت های ثانویه	۱۸
۱۸-۱- سیستم کشت ریشه های موین	۱۹

- ۱۹-۱- تراپختی سلول گیاهی به وسیله آگروباکتریوم ۲۰
- ۲۰-۱- معرفی آگروباکتریوم ۲۰
- ۲۰-۲- مکانیسم انتقال T-DNA به سلول گیاهی ۲۱
- ۲۰-۳- ادغام مولکول T-DNA به داخل ژنوم گیاه ۲۳
- ۲۱-۱- عوامل موثر در ایجاد ریشه‌های مویین ۲۳
- ۲۱-۱-۱- بیماریزایی نژاد آگروباکتریوم ریزوژنز ۲۳
- ۲۱-۲- نوع محیط کشت ۲۳
- ۲۱-۳- سن و نوع ریزنمونه ۲۴
- ۲۲-۱- تایید تراپختی در ریشه‌های مویین ۲۴
- ۲۲-۱-۱- استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیکی ۲۴
- ۲۲-۲- استفاده از نشانگرهای بیوشیمیایی ۲۴
- ۲۲-۳- استفاده از نشانگرهای ژنتیکی ۲۴
- ۲۳-۱- روش‌های افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت ریشه‌های مویین ۲۵
- ۲۳-۱-۱- بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت و شرایط نگهداری ۲۵
- ۲۳-۲- انتخاب لاین و سویه برتر ۲۶
- ۲۳-۳- مهندسی متابولیک ۲۶
- ۲۳-۴- استفاده از بیوراکتورها در مقیاس وسیع ۲۷
- ۲۳-۵- الیسیتورها ۲۷
- ۲۳-۶- بهینه‌سازی عناصر غذایی و تنظیم کننده‌های رشد محیط کشت ۲۹
- ۲۳-۶-۱- قند ۲۹
- ۲۳-۶-۲- نیتروژن ۲۹
- ۲۳-۶-۳- فسفات ۳۰
- ۲۴-۱- نانوکربن ۳۰
- ۲۵-۱- هیدروژل ۳۲
- ۲۵-۱- نقش هیدروژل در کشاورزی ۳۲

۳۳ HPLC -۲۶-۱
۳۳ ۲۷-۱-اهداف اصلی این تحقیق
۳۵ فصل دوم
۳۵ پیشینه تحقیق
۳۶ ۱-۲- متابولیت‌های ثانویه
۳۷ ۲-۲- مروری بر تحقیقات گذشته
۴۱ ۳-۲- استفاده از نانوکربن‌ها در کشت بافت
۴۳ ۴-۲- القای ریشه‌های تراریخت در شیرین بیان
۴۷ فصل سوم
۴۷ مواد و روش‌ها
۴۸ ۱-۳- محل و زمان اجرای پژوهش
۴۸ ۲-۳- مواد مورد استفاده
۴۸ ۱-۲-۳- مواد گیاهی
۴۹ ۲-۲-۳- باکتری
۴۹ ۳-۳- تهیه محیط کشت‌های گیاهی و باکتریایی مورد استفاده
۴۹ ۱-۳-۳- تهیه محیط کشت گیاهی
۵۳ ۴-۳- تهیه سوسپانسیون باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز
۵۳ ۵-۳- تهیه محلول ذخیره آنتی بیوتیک و دیگر ترکیبات مورد نیاز جهت تراریختی
۵۴ ۱-۵-۳- محلول استوک آنتی بیوتیک سفوتاکسیم
۵۴ ۲-۵-۳- محلول استوک استوسرینگون
۵۴ ۶-۳- تهیه محلول ذخیره نانوکربن
۵۴ ۷-۳- زغال فعال
۵۵ ۸-۳- سترون کردن وسایل و محیط کشت
۵۵ ۹-۳- ضدعفونی بذور
۵۵ ۱۰-۳- بررسی اثر تیمارهای شیمیایی بر جوانه زنی بذور اکوتیپ‌های شیرین بیان

- ۱۱-۳- بررسی اثر جوانه‌زنی در محیط‌های مختلف ۵۶
- ۱-۱۱-۳- کشت بذر روی کاغذ صافی ۵۶
- ۲-۱۱-۳- کشت بذر روی محیط جامد MS ۵۶
- ۳-۱۱-۳- صفات اندازه‌گیری شده در این آزمایش ۵۶
- ۱۲-۳- کشت بذور شیرین‌بیان در محیط‌های کشت متفاوت MS ۵۷
- ۱-۱۲-۳- کشت بذر در محیط جامد ۵۷
- ۲-۱۲-۳- کشت مایع ۵۷
- ۳-۱۲-۳- کشت درون هیدروژل ۵۷
- ۴-۱۲-۳- اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیک و مورفولوژیک ۵۷
- ۱۳-۳- شرایط اتاق رشد ۶۰
- ۱۴-۳- بهینه‌سازی رشد ریشه تحت تیمارهای هورمونی NAA و IAA اکوتیپ‌های مختلف گیاه شیرین بیان ۶۱
- ۱۵-۳- بررسی اثر فسفر و نانوکربن بر صفات فیزیولوژیک و مورفولوژیک اکوتیپ‌های مختلف گیاه شیرین بیان ۶۱
- ۱۶-۳- القای ریشه‌های تراریخت در ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه اکوتیپ‌های شیرین‌بیان در شرایط مصرف و عدم مصرف استوسرینگون ۶۲
- ۱۷-۳- القای ریشه‌های موین تراریخت در از گیاهچه‌های چند روزه اکوتیپ‌های شیرین‌بیان در شرایط مصرف و عدم مصرف استوسرینگون ۶۲
- ۱۸-۳- انتقال ریزنمونه‌های گیاه شیرین بیان به محیط کشت دارای آنتی بیوتیک ۶۳
- ۱۹-۳- مشاهده ماکروسکوپی ظهور ریشه‌های تراریخت ۶۳
- ۲۰-۳- بررسی مورفولوژیکی فراوانی تولید ریشه‌های تراریخت ۶۳
- ۲۱-۳- نحوه اطمینان از حذف کامل باکتری ۶۴
- ۲۲-۳- تأیید تراریختی ریشه‌های تراریخت شیرین‌بیان از طریق PCR ۶۴
- ۲۳-۳- تعیین غلظت DNA ژنومی ریشه‌ها با نانودراپ ۶۵
- ۲۴-۳- الکتروفورز DNA ژنومی استخراج شده از ریشه‌ها ۶۵

۶۶TAE(IX) بافر تهیه ۱-۲۴-۳
۶۶ PCR محصولات ۲۵-۳ تهیه ژل آگارز برای الکتروفورز محصولات
۶۷ استخراج پلاسمید از باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز ۲۶-۳
۶۹ PCR برای تأیید تراریختی ریشه‌های شیرین بیان ۲۷-۳
۶۹ PCR واکنش ۱-۲۷-۳
۷۰ ۲۸-۳ سنجش اسید گلیسیریزیک تولید شده در ریشه‌های تراریخت
۷۰ HPLC مراحل سنجش اسید گلیسیریزیک در ریشه‌های تراریخت با دستگاه
۷۰ ۱-۲۹-۳ عصاره گیری از ریشه ها
۷۱ ۲-۲۹-۳ روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)
۷۳ فصل چهارم
۷۳ نتایج و بحث
۷۴ ۱-۴ آزمایش اول: بررسی اثرپیش تیمار و نوع محیط کشت بر جوانه‌زنی بذور مختلف اکوتیپ‌های شیرین بیان
۷۷ ۲-۴ آزمایش دوم: بررسی کاربرد و عدم کاربرد زغال فعال و انواع محیط کشت بر صفات فیزیولوژیک و مورفولوژیک اکوتیپ‌های مختلف گیاه شیرین بیان
۷۷ ۱-۲-۴ تعداد برگ
۷۸ ۲-۲-۴ طول ساقه
۷۹ ۳-۲-۴ طول ریشه اصلی
۸۰ ۴-۲-۴ قطر ساقه
۸۲ ۵-۲-۴ قطر ریشه
۸۳ ۶-۲-۴ تعداد ریشه فرعی
۸۳ ۷-۲-۴ وزن تر گیاهچه
۸۵ ۸-۲-۴ وزن خشک گیاهچه
۸۷ ۹-۲-۴ فنول کل
۸۹ ۱۰-۲-۴ میزان فلاونوئید کل ریشه

- ۸۹-۲-۴-۱۱- میزان قند احیای کل.....
- ۹۰-۲-۴-۱۲- اسید گلیسیریزیک.....
- ۹۲-۳-۴-۳- آزمایش سوم: بهینه سازی رشد ریشه تحت تیمارهای هورمونی IAA و NAA در اکوتیپ‌های مختلف گیاه شیرین بیان.....
- ۹۲-۳-۴-۱- تعداد ریشه فرعی.....
- ۹۳-۳-۴-۲- طول ریشه.....
- ۹۴-۳-۴-۳- قطر ریشه.....
- ۹۵-۳-۴-۴- وزن تر ریشه.....
- ۹۶-۳-۴-۵- وزن خشک ریشه.....
- ۹۷-۳-۴-۶- محتوای اسید گلیسیریزیک.....
- ۹۸-۴-۴-۳- آزمایش چهارم: بررسی اثر فسفر و نانوکربن بر صفات فیزیولوژیک و مورفولوژیک اکوتیپ‌های مختلف گیاه شیرین بیان.....
- ۹۸-۴-۴-۱- تعداد برگ.....
- ۹۹-۴-۴-۲- طول ساقه.....
- ۱۰۰-۴-۴-۳- طول ریشه.....
- ۱۰۱-۴-۴-۴- قطر ریشه.....
- ۱۰۲-۴-۴-۵- تعداد ریشه فرعی.....
- ۱۰۳-۴-۴-۶- وزن تر ریشه.....
- ۱۰۴-۴-۴-۷- وزن خشک ریشه.....
- ۱۰۵-۴-۴-۸- محتوای اسید گلیسیریزیک ریشه.....
- ۱۰۷-۴-۵- آزمایش پنجم: القای ریشه‌های تراریخت در ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان در شرایط کاربرد و عدم کاربرد استوسرینگون.....
- ۱۱۵-۴-۶- آزمایش ششم: القای ریشه‌های تراریخت از ناحیه هیپوکوتیل در گیاهچه‌های چند روزه در اکوتیپ‌های شیرین بیان تحت تیمار و عدم با استوسرینگون و فاقد آن.....
- ۱۱۹-۴-۷- بررسی حذف باکتری آگروباکتریوم رایزوتنز از ریشه‌های موین گیاهان دارویی شیرین بیان.....

۱۱۹.....	۸-۴- تایید تراریختی ریشه‌های شیرین بیان با انجام واکنش PCR
۱۱۹.....	۴-۸-۱- کیفیت DNA استخراج شده از ریشه‌های تراریخت و ریشه‌های طبیعی شیرین بیان
۱۲۰.....	۴-۸-۲- بررسی وجود ژن rolB توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای DNA ژنومی استخراج شده شیرین بیان
۱۲۲.....	۴-۹-۱- ارزیابی میزان اسید گلیسیریزیک تولید شده در ریشه‌های تراریخت گیاهچه‌های هفت روزه در اکوتیپ‌های مختلف شیرین‌بیان
۱۲۲.....	۴-۹-۱- وزن تر ریشه‌های تراریخت
۱۲۳.....	۴-۱۰-۲- وزن خشک ریشه‌های تراریخت
۱۲۴.....	۴-۱۰-۳- میزان اسید گلیسیریزیک
۱۲۷.....	۴-۱۱- نتیجه گیری کلی
۱۲۹.....	۴-۱۲- پیشنهادات
۱۳۰.....	پیوستها
۱۳۳.....	فصل پنجم
۱۳۳.....	منابع

فهرست اشکال

- شکل ۱-۲- ساختار آگلیکون های تری ترپن‌ها..... ۱۰
- شکل ۱-۳- ساختار شیمیایی ترکیب گلیسیریزین..... ۱۰
- شکل ۱-۴- مسیر بیوسنتز ساپونین تری ترپن گلیسیریزین در گیاه شیرین بیان (اقتباس از مارینالینی و همکاران، ۲۰۱۸)..... ۱۱
- شکل ۱-۵- تولید فنیل پروپان از اسید آمینه فنیل آلانین..... ۱۳
- شکل ۱-۶- ساختار اولیه ترکیبات فلاونوئیدی..... ۱۳
- شکل ۱-۷- ساختار پلاسمید آگروباکتریوم ریزوژنز (ونا وتیلر، ۲۰۰۷)..... ۲۳
- شکل ۱-۸- مکانیسم انتقال T-DNA به ژنوم گیاهی (سیتووسکی و همکاران، ۲۰۰۷)..... ۲۴
- شکل ۱-۹- اهداف استفاده از الیستورها در مطالعات مربوط به زیست فناوری متابولیت‌های گیاهی (پاتل و همکاران ۲۰۱۳)..... ۳۰
- شکل ۱-۱۰- ساختارهای مختلف نانومواد مبتنی بر کربن..... ۳۳
- شکل ۳-۱: محل جمع آوری نمونه بذر گیاه شیرین بیان الف: عراق ب: جغتای ج: کاشمر..... ۴۸
- شکل ۴-۱. مقایسه میانگین حداکثر جوانه‌زنی بذور شیرین بیان اکوتیپ‌های مختلف..... ۷۵
- شکل ۴-۲. مقایسه میانگین حداکثر جوانه‌زنی بذور شیرین بیان تحت تیمارهای شیمیایی مختلف..... ۷۵
- شکل ۴-۳. اثر متقابل اکوتیپ‌های مورد نظر تحت تیمارهای شیمیایی..... ۷۶
- شکل ۴-۴. مقایسه میانگین تعداد برگ تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان رشد یافته ۳ محیط کشت MS متفاوت در حضور و عدم حضور زغال فعال..... ۷۸
- شکل ۴-۵. مقایسه میانگین طول ساقه تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان رشد یافته ۳ محیط کشت MS متفاوت در حضور و عدم حضور زغال فعال..... ۷۹
- شکل ۴-۶. مقایسه میانگین طول ریشه‌های اصلی تولید شده در محیط‌های MS مختلف در شرایط کاربرد و عدم کاربرد زغال فعال..... ۸۰
- شکل ۴-۷. مقایسه میانگین قطر ساقه تولید شده در محیط‌های MS مختلف در شرایط کاربرد و عدم کاربرد زغال فعال..... ۸۱

شکل ۴-۸ مقایسه میانگین قطر ساقه تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف گیاه شیرین بیان..... ۸۱

شکل ۴-۹ مقایسه میانگین قطر ریشه تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان رشد یافته ۳ محیط کشت MS متفاوت در حضور و عدم حضور زغال فعال..... ۸۲

شکل ۴-۱۰ مقایسه میانگین تعداد ریشه‌های فرعی تولید شده توسط اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان در سه محیط کشت MS مختلف..... ۸۳

شکل ۴-۱۱ مقایسه میانگین وزن تر گیاهچه‌ی اکوتیپ‌های مختلف گیاه شیرین بیان در شرایط مصرف و عدم مصرف زغال فعال..... ۸۴

شکل ۴-۱۲ مقایسه میانگین وزن تر گیاهچه‌های تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف گیاه شیرین بیان رشد یافته در محیط‌های کشت MS متفاوت..... ۸۴

شکل ۴-۱۳ مقایسه میانگین وزن خشک گیاهچه‌های تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف گیاه شیرین بیان رشد یافته در محیط‌های کشت MS متفاوت..... ۸۵

شکل ۴-۱۴ رشد گیاهان درون بسترهای متفاوت محیط کشت MS پس از ۱۴ روز..... ۸۶

شکل ۴-۱۵ مقایسه میانگین فنول کل تولید شده در محیط‌های MS مختلف در شرایط کاربرد و عدم کاربرد زغال فعال..... ۸۸

شکل ۴-۱۶ مقایسه میانگین فنول کل تولید شده در ریشه اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان در شرایط کاربرد و عدم کاربرد زغال فعال..... ۸۸

شکل ۴-۱۷ مقایسه میانگین میزان کل فلاونوئید کل تولید شده در ریشه اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان کشت شده در محیط‌های MS مختلف..... ۸۹

شکل ۴-۱۸ مقایسه میانگین میزان قند احیا کل تولید شده در ریشه اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان کشت شده در محیط‌های MS مختلف..... ۹۰

شکل ۴-۱۹ مقایسه میانگین میزان گلیسیریزیک کل تولید شده در ریشه اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان کشت شده در محیط‌های MS مختلف..... ۹۱

شکل ۴-۲۰ مقایسه میانگین تعداد ریشه‌های تولید شده در محیط کشت MS غنی شده با سطوح متفاوت هورمون اکسین IAA و NAA در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان..... ۹۳

شکل ۴-۲۱ مقایسه میانگین طول ریشه‌های تولید شده در محیط کشت MS غنی شده با سطوح متفاوت هورمون اکسین IAA و NAA در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان..... ۹۴

شکل ۴-۲۲ مقایسه میانگین قطر ریشه‌های تولید شده در محیط کشت MS غنی شده با سطوح متفاوت هورمون اکسین IAA و NAA در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان ۹۵

شکل ۴-۲۳ مقایسه میانگین وزن تر ریشه‌های تولید شده در محیط کشت MS غنی شده با سطوح متفاوت هورمون اکسین IAA و NAA در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان ۹۵

شکل ۴-۲۴ مقایسه میانگین وزن خشک ریشه‌های تولید شده در محیط کشت MS غنی شده با سطوح متفاوت هورمون اکسین IAA و NAA در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان ۹۶

شکل ۴-۲۵ مقایسه میانگین میزان گلیسیریزین تولید شده در محیط کشت MS غنی شده با سطوح متفاوت هورمون اکسین IAA و NAA در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان ۹۸

شکل ۴-۲۶ مقایسه میانگین تعداد برگ تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان رشد یافته در محیط‌های MS غنی شده با سطوح مختلف فسفر (۰، ۲/۲ و ۳ گرم) و نانوکربن (۰، ۱۰۰ و ۴۵۰ میلی گرم)..... ۹۹

شکل ۴-۲۷ مقایسه میانگین طول ساقه تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان رشد یافته در محیط‌های MS غنی شده با سطوح مختلف فسفر (۰، ۲/۲ و ۳ گرم) و نانوکربن (۰، ۱۰۰ و ۴۵۰ میلی گرم)..... ۱۰۰

شکل ۴-۲۸ مقایسه میانگین طول ریشه تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان رشد یافته در محیط‌های MS غنی شده با سطوح مختلف فسفر (۰، ۲/۲ و ۳ گرم) و نانوکربن (۰، ۱۰۰ و ۴۵۰ میلی گرم)..... ۱۰۱

شکل ۴-۲۹ مقایسه میانگین قطر ریشه تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان رشد یافته در محیط‌های MS غنی شده با سطوح مختلف فسفر (۰، ۲/۲ و ۳ گرم) و نانوکربن (۰، ۱۰۰ و ۴۵۰ میلی گرم)..... ۱۰۲

شکل ۴-۳۰ مقایسه میانگین تعداد ریشه جانبی تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان رشد یافته در محیط‌های MS غنی شده با سطوح مختلف فسفر (۰، ۲/۲ و ۳ گرم) و نانوکربن (۰، ۱۰۰ و ۴۵۰ میلی گرم)..... ۱۰۳

شکل ۴-۳۱ مقایسه میانگین وزن تر ریشه تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان رشد یافته در محیط‌های MS غنی شده با سطوح مختلف فسفر (۰، ۲/۲ و ۳ گرم) و نانوکربن (۰، ۱۰۰ و ۴۵۰ میلی گرم)..... ۱۰۴

شکل ۴-۳۲ مقایسه میانگین وزن خشک ریشه تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان رشد یافته در محیط‌های MS غنی شده با سطوح مختلف فسفر (۰، ۲/۲ و ۳ گرم) و نانوکربن (۰، ۱۰۰ و ۴۵۰ میلی گرم)..... ۱۰۵

شکل ۴-۳۳ مقایسه میانگین محتوای اسید گلیسیریزیک ریشه تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان رشد یافته در محیط‌ها MS غنی شده با سطوح مختلف فسفر (۰، ۲/۲ و ۳ گرم) و نانوکربن (۰، ۱۰۰ و ۴۵۰ میلی گرم)..... ۱۰۶

شکل ۴-۳۴ مقایسه میانگین درصد تولید ریشه‌های تراریخت اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان..... ۱۰۸

شکل ۴-۳۵ مقایسه میانگین درصد تولید ریشه‌های تراریخت در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان در شرایط مصرف و عدم مصرف استوسرینگون..... ۱۱۰

شکل ۴-۳۶ مقایسه میانگین درصد تولید ریشه‌های تراریخت در سنین مختلف گیاهچه‌ای در اکوتیپ‌های مورد بررسی شیرین بیان در شرایط حضور و عدم حضور استوسرینگون ۱۱۰

- شکل ۴-۳۷ مقایسه میانگین درصد تولید ریشه‌های تراریخت از ریزنمونه‌های مختلف گیاه شیرین بیان در شرایط حضور و عدم حضور استوسرینگون ۱۱۱
- شکل ۴-۳۸ مقایسه میانگین درصد تولید ریشه‌های تراریخت حاصل از ریزنمونه‌های مختلف در سنین متفاوت گیاهچه‌ای در گیاه شیرین بیان ۱۱۳
- شکل ۴-۳۹ مقایسه میانگین درصد تولید ریشه‌های تراریخت حاصل از ریزنمونه‌های مختلف در سنین متفاوت گیاهچه‌ای در گیاه شیرین بیان در شرایط مصرف و عدم استوسرینگون ۱۱۴
- شکل ۴-۴۰ مقایسه میانگین درصد ریشه‌های تراریخت تولید شده از گیاهچه‌هایی با سنین مختلف در اکوتیپ-های کاشمر، جغتای و عراق ۱۱۶
- شکل ۴-۴۱ مقایسه میانگین درصد میانگین ریشه‌های تراریخت تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان در حضور و عدم حضور استوسرینگون ۱۱۶
- شکل ۴-۴۲ مقایسه میانگین درصد ریشه‌های تراریخت تولید شده از گیاهچه‌هایی با سنین مختلف در شرایط حضور و عدم حضور استوسرینگون در گیاه شیرین بیان ۱۱۷
- شکل ۴-۴۳ مقایسه میانگین درصد ریشه‌های تراریخت تولید شده از گیاهچه‌هایی با سنین مختلف در شرایط حضور و عدم حضور استوسرینگون در اکوتیپ‌های مختلف گیاه شیرین بیان ۱۱۸
- شکل ۴-۴۴ نرخ تولید ریشه از گیاهچه هفت روزه اکوتیپ جغتای تلقیح شده با سویه AR15834 باکتری آگروباکتریوم در مقایسه با نمونه تلقیح نشده ۱۱۸
- شکل ۴-۴۵ کشت نوک ریشه های موپین در محیط LB، نمونه بدون باکتری (سمت راست) و نمونه آلوده (سمت چپ) ۱۱۹
- شکل ۴-۴۶ الکتروفورز ژل یک درصد آگارز DNA ژنومی استخراج شده از ریشه‌های تراریخت شیرین بیان. چاهک ۱ نشانگر یک کیلو باز. چاهک ۲ و ۳ ریشه‌های طبیعی و ۴ تا ۶ به ترتیب ریشه‌های تراریخت کاشمر، جغتای و عراق ۱۲۰
- شکل ۴-۴۷ نتایج ژل محصولات PCR ریشه های موپین شیرین بیان. چاهک ladder مارکر مولکولی (۱Kb)، شماره ۱ آب مقطر (کنترل منفی)، شماره ۲ تا ۴ به ترتیب ریشه‌های تراریخت گیاهچه‌های ۲۱ روزه کاشمر، جغتای و عراق، چاهک شماره ۵ پلاسمید باکتری (کنترل مثبت) ۱۲۱
- شکل ۴-۴۸ مقایسه میانگین وزن تر ریشه تراریخت اکوتیپ‌های مختلف گیاه شیرین بیان ۱۲۳
- شکل ۴-۴۹ مقایسه میانگین وزن خشک ریشه‌های تراریخت تولید شده از اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان تحت تیمار با سطوح مختلف فسفر ۱۲۴
- شکل ۴-۵۰ مقایسه میانگین میزان اسید گلیسیریزیک ریشه تراریخت اکوتیپ‌های مختلف گیاه شیرین بیان ۱۲۵

شکل ۴-۵۱ مقایسه میزان اسید گلیسیریزیک ریشه‌های تراریخت تحت غلظت‌های مختلف نانوکربن MWCNT در گیاه شیرین بیان ۱۲۶

شکل ۴-۵۲ مقایسه میزان اسید گلیسیریزیک ریشه تراریخت تحت غلظت‌های مختلف فسفر در گیاه شیرین بیان ۱۲۶

شکل ۴-۵۳ مقایسه اثر متقابل میزان اسید گلیسیریزیک ریشه تراریخت تحت غلظت‌های مختلف نانوکربن در اکوتیپ‌های مختلف گیاه شیرین بیان ۱۲۷

فهرست جداول

- جدول ۱-۱: فراورده های دارویی گیاه شیرین بیان (خان احمدی و همکاران، ۱۳۹۱)..... ۷
- جدول ۳-۱: غلظت نمک های پر مصرف محیط کشت پایه MS (mg/l)..... ۵۰
- جدول ۳-۲: غلظت نمک های کم مصرف محیط کشت پایه MS (mg/l)..... ۵۰
- جدول ۳-۳: غلظت آهن محیط کشت پایه MS (mg/l)..... ۵۱
- جدول ۳-۴: غلظت ویتامین های محیط کشت پایه MS (mg/l)..... ۵۱
- جدول ۳-۵: ترکیبات مورد نیاز، برای تهیه یک لیتر محیط کشت LB..... ۵۳
- جدول ۳-۶: توالی آغازگرهای اختصاصی ژن roIB..... ۶۹
- جدول ۴-۱: نتایج تجزیه واریانس حداکثر جوانه زنی بذور اکوتیپ های مختلف شیرین بیان تحت سطوح مختلف پیش تیمار و نوع محیط کشت..... ۷۴
- جدول ۴-۲: نتایج تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک اکوتیپ های شیرین بیان تحت اثر تیمارهای زغال و محیط..... ۷۷
- جدول ۴-۳: نتایج تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیک ریشه ی اکوتیپ های مختلف شیرین بیان رشد یافته تحت تیمارهای زغال و انواع محیط کشت..... ۸۷
- جدول ۴-۴: نتایج تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک ریشه اکوتیپ های مختلف شیرین بیان رشد یافته در محیط کشت MS نیمه جامد حاوی تیمارهای هورمونی NAA و IAA..... ۹۲
- جدول ۴-۵: نتایج تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک اکوتیپ های مختلف شیرین بیان رشد یافته تحت در محیط کشت MS حاوی تیمارهای فسفر و نانوکربن..... ۹۸
- جدول ۴-۶: نتایج تجزیه واریانس درصد تولید ریشه های تراریخت از ریز نمونه های برگ، ساقه و ریشه ی اکوتیپ- های مختلف شیرین بیان با سنین مختلف شرایط کاربرد و عدم کاربرد استوسرینگون..... ۱۰۷
- جدول ۴-۷: نتایج تجزیه واریانس تلقیح ناحیه هیپوکوتیل گیاهچه های با سنین مختلف از اکوتیپ های کاشمر، جغتای و عراقی شیرین بیان تحت شرایط مصرف و عدم مصرف استوسرینگون..... ۱۱۵
- جدول ۴-۸: نتایج تجزیه واریانس وزن تر و خشک و میزان اسید گلیسیریزیک تولید شده در ریشه های تراریخت اکوتیپ های مختلف شیرین بیان تحت تیمارهای فسفر و نانوکربن ریشه های تراریخت

۱۲۲.....

فصل اول

مقدمه و کلیات

گیاهان دارویی دارای اهمیت جهانی و فراگیری هستند و در شمار میراث‌های بومی کشورها محسوب می‌گردند. این گیاهان در طول تاریخ منابع اصلی پزشکی و داروسازی در اکثر نقاط جهان مانند ایران، چین، یونان باستان، هندوستان و مصر بوده‌اند (قاسمی، ۱۳۸۸). امروزه تاکید زیادی بر استفاده از داروهایی با منشأ طبیعی در درمان و حفظ سلامتی شده است، تقریباً یک چهارم داروهای تولید شده حاوی عصاره‌های گیاهی یا ترکیباتی هستند، که از مواد گیاهی استخراج می‌گردند و یا اینکه بر اساس ترکیبات گیاهی مدل سازی شده‌اند (تریپاتی و تریپاتی؛ ۲۰۰۳). با توجه به اینکه در طبیعت سرعت تولید متابولیت‌های ثانویه کند بوده است و مدت زمان طولانی برای تولید آن‌ها لازم است، استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی برای تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی ضروری به نظر می‌رسد (اصغری، ۱۳۸۵). بیوتکنولوژی از طریق کشت سلول، بافت و یا اندام گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای، این موقعیت را فراهم می‌سازد که تولید این متابولیت‌های گیاهی تحت شرایط کنترل شده و در مدت زمان کوتاه‌تری انجام شود (راویشانکار و رامچاندرا، ۲۰۰۰؛ والکو و همکاران، ۲۰۰۵). به دلیل عدم تمایز بافت‌های کشت شده در اغلب کشت‌های سوسپانسیون سلولی، مقدار تولید متابولیت‌های ثانویه کم است و برخی متابولیت‌ها نیز، فقط در بافت‌های خاص دارای تمایز مورفولوژیکی، تجمع می‌یابند (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۲؛ اصغری، ۱۳۸۵).

برخی از متابولیت‌ها فقط در مرحله کشت ریشه تولید می‌شوند. کشت ریشه را می‌توان به صورت ریشه نابجا و ریشه تراریخت اعمال کرد، در کشت ریشه نابجا در گیاهان عالی معمولاً سرعت رشد کمتری داشته و به منبع فیتوهورمونی خارجی نیاز دارد که این امر منجر به سنتز مقادیر بسیار اندک از متابولیت‌های ثانویه می‌گردد (حسنلو و همکاران، ۱۳۸۷). به همین دلیل روش‌های جایگزینی برای تولید مواد دارویی با منشأ ریشه مورد نیاز است. یکی از راهکارهای جدید برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه، تراریختی گیاهان با استفاده از یک ناقل طبیعی به نام آگروباکتریوم رایزوزنز و طراحی سیستم کشت ریشه تراریخت می‌باشد (گایلن و همکاران، ۲۰۰۶). سیستم کشت ریشه تراریخت با داشتن ویژگی‌هایی از جمله رشد سریع، پایداری ژنتیکی، نگهداری

آسان در محیط بدون هورمون و توان تولید متابولیت‌های ثانویه، کاربرد فراوانی دارد. با این وجود، گاهی کارایی تولید متابولیت‌ها در این ریشه‌ها پایین می‌باشد. برای افزایش تولید متابولیت‌ها از روش‌های مختلفی مانند انتخاب لاین برتر تولید کننده متابولیت‌های مورد نظر و نیز تیمار ریشه‌ها با محرک استفاده می‌شود (والکو و همکاران ۲۰۰۶). گیاه مورد استفاده در این تحقیق، شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*) می‌باشد که از گیاهان دارویی با ارزش و بومی ایران به شمار می‌رود. قسمت مورد استفاده گیاه ریشه آن می‌باشد. ریشه شیرین بیان دارای ترکیبات ثانویه مختلفی است که مهمترین آن‌ها ساپونین تری ترپن اسید گلیسیریزیک و چالکون ایزولیکویریتیجینین می‌باشند. شیرین بیان در اختلالات حاد کبدی، هپاتیت B و C مزمن، هپاتیت عفونی، عفونت HIV و اختلالات سیستم ایمنی موثر است. همچنین اثرات استروژنی، ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی این گیاه نیز اثبات شده است (حاجی مهدی پور و همکاران، ۱۳۸۷).

۱-۲- گیاه‌شناسی شیرین بیان

یکی از مهم ترین گیاهان دارویی جهان با بیش از دو هزار سال کاربرد، شیرین بیان است که یک بوته علفی پایا بومی آسیا و منطقه مدیترانه است و متعلق به خانواده Leguminosae است (هیاشی و سودو ۲۰۰۹). نام آن *Glycyrrhiza* از واژه‌های یونانی باستان گلیکوز (شیرین) و ریزا (ریشه) مشتق شده است که بعدها به واژه لاتین لارجیکا (شیرین بیان) ترجمه شد (ایسبروکر و بروداک ۲۰۰۶). شیرین بیان گیاهی چندساله است که ارتفاع آن به حدود ۱/۵ متر نیز می‌رسد، ساقه چروک و رنگ آن قهوه‌ای و درون آن زردرنگ است. برگ‌ها به صورت نامتناسب به چهارتا هفت جفت نابرابر تقسیم می‌شوند و گل‌ها دارای رنگ آبی، بنفش، زرد و یا شیری هستند (هیاشی و سودو ۲۰۰۹).

۱-۳- رویشگاه و مناطق رشد شیرین بیان

این گیاه سابقه‌ای طولانی به عنوان طعم‌دهنده مواد غذایی دارد و یکی از قدیمی‌ترین و محبوب‌ترین داروهای گیاهی در جهان است که از زمان تمدن‌های بین‌النهرین و پیش از بابل و مصری در هر دو فرهنگ شرقی و غربی شناخته شده بود (روسو و همکاران ۲۰۱۴). حدود ۳۰ گونه شناخته‌شده شیرین‌بیان وجود دارد که بومی کشورهای گرمسیر هستند. در میان بسیاری از مطالعات، گونه‌های *Glycyrrhiza uralensis*، *Glycyrrhiza inflata* و *G. glabra* بیشترین استفاده را در صنایع غذایی دارند (ایسبروکر و بروداک ۲۰۰۶). گونه‌های *Glycyrrhiza uralensis* و *G. inflata* در آسیا رشد می‌کنند و *G. glabra* پرکاربردترین گونه است که در اروپای جنوبی و مرکزی واریته *typical* و *echinata*، جنوب و مرکز روسیه واریته (*glandulifera*) و در ایران و عراق واریته (*violacea*) آن پراکنش بیشتری دارد. (ایسبروکر و بروداک ۲۰۰۶، جیانگ و همکاران ۲۰۱۳). در ایران نیز تقریباً این گیاه در تمام شمال، شرق، غرب و مرکز کشور به وفور یافت می‌شود (میرحیدر و همکاران ۲۰۰۲). اگرچه در بسیاری از کشورها به عنوان یک گیاه دارویی کشت و کار می‌شود ولی در دیم زارهای استان کرمانشاه، ایلام، فارس و بعضی از مزارع و مناطق مرکزی ایران مانند اصفهان و اراک به عنوان یک علف هرز در مزارع نخود و گندم محسوب می‌شود (قهرمان و همکاران ۱۹۹۹ و آئوس و همکاران ۲۰۰۲). در کشور ما علاوه بر گونه آن گلبرها دو گونه *G. asperimal* و *G. echinata* نیز از گونه‌های مصرف شیرین بیان محسوب می‌شوند (کریمی و همکاران ۲۰۰۳).

۱-۴- اهمیت دارویی شیرین بیان

ریشه‌ها و ریزوم‌های شیرین‌بیان به مقدار زیاد در صنعت داروسازی استفاده شوند. با این حال این گیاه با توجه به مشکلات جوانه زنی بذور، رشد آهسته و برداشت بی رویه آن، در خطر انقراض قرار دارد. ریشه‌ی شیرین‌بیان حاوی فلاونوئیدهای است که به عنوان عامل ضد تومور شناخته شده است (زیتونگ و همکاران ۲۰۱۷). از جمله مهم‌ترین موادی که از ریشه این گیاه استخراج می‌شود اسید گلیسرزیک است که ۵۰ برابر

شیرین تر از شکر معمولی است. این ماده علاوه بر اینکه به عنوان یک طعم دهنده در داروها و شکلات مورد استفاده قرار می‌گیرد، به عنوان یک ماده شیرین کننده نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (وانگ و همکاران ۲۰۰۰). اسید گلیسیریزیک مهم ترین ماده موجود در ریشه‌ی گیاه شیرین بیان است (زیتونگ و همکاران ۲۰۱۷) که علاوه بر خاصیت‌های ضد سرطانی، خواص التهابی و ملینی نیز آن توجه محققین را به خود جلب کرده است (وانگ و همکاران ۲۰۰۰). با توجه به افزایش تقاضا برای اسید گلیسیریزیک به نظر می‌رسد بهره‌گیری از روش‌های بیوتکنولوژی راهکار مناسبی جهت حصول مقادیر فراوان این ماده در سلول‌های شیرین بیان باشد. اسید گلیسیریزیک و محصولات هیدرولیزی آن کاربردهای دارویی زیادی نظیر خواص ضدآماس، ضدسرطانی، آنتی باکتریالی و ضدحساسیتی دارند. مشتقات اسید گلیسیریزیک می‌توانند در درمان هپاتیت C نیز مورد استفاده واقع شوند. اسید گلیسیریزیک تولید شده از قسمت ریشه این گیاه به عنوان یک داروی تزریقی در درمان بیماری‌های کبدی و بیماری‌های آلرژیک قابل استفاده است (هایاشی و همکاران ۲۰۰۹). از شیرین بیان در طب سنتی آسیا و اروپا برای درمان گاستریت، عفونت‌های تنفسی و زخم‌های پپتیک استفاده می‌شود (لینهیدیت و همکاران ۱۹۹۷). در طب سنتی چین نیز در درمان هپاتیت، پیشگیری از رشد تومور و بیماری‌های قلبی مورد استفاده قرار گرفته است (بلومینتال و همکاران ۲۰۰۰). در طب سنتی ایران نیز گیاه شیرین بیان در درمان ورم معده و ضد سرفه استفاده تجویز می‌شد (لیاج شن و همکاران ۲۰۱۱). گلیسیریزیک اسید با توانایی مهار باکتری هلیکوپیلوری در درمان زخم معده، مشکلات مخاطی معده و کاهش اسید معده مؤثر است (سسوک و همکاران ۲۰۱۰). شیرین بیان بر سیستم غده، درون ریز بدن نیز تأثیرگذار است و مصرف آن ممکن است مقدار تستوسترون خون را کاهش دهد. همچنین اثبات شده است که لیکوریک یا ریشه خشک شیرین بیان آثار ضد تورم معده را از طریق افزایش ترشح سرتونین و پروستاگلندین اعمال می‌نماید (کولالتو و همکاران ۲۰۱۰). کمیسیون (The Complete German Commission E Monographs) آثار استفاده از این گیاه را در درمان احتقان بخش فوقانی دستگاه تنفس و زخم‌های معده و دوازدهه تأیید کرده است (بلومینتال و همکاران ۲۰۰۰). امروزه نیز عصاره شیرین بیان یکی از اجزای ترکیبی شربت سرفه به شمار می‌رود (کروسوس و همکاران ۲۰۰۴) و همچنین به عنوان داروی مسکن در التهاب‌های پوستی و برای درمان اسپاسم، تورم و روماتیسم کاربرد دارد. علاوه بر موارد

یاد شده، خواص ضدسرطانی نیز برای این گیاه گزارش شده است (کوبایا و همکاران ۲۰۰۲). عصاره این گیاه همچنین مانع همانندسازی ویروس HIV در بیماران مبتلا به ایدز می‌شود (آرمانینی و همکاران ۱۹۹۹). وجود ترکیبات کاهش دهنده چربی‌ها و نیز فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی قوی در این گیاه نیز گزارش شده است (سلیم و همکاران ۲۰۱۱). آثار مثبت عصاره این گیاه در جلوگیری از پیشرفت بیماری آترواسکلروز در خرگوش اثبات شده است با این حال تایید چنین اثری در انسان در مرحله تحقیقات است (فیوری و همکاران ۲۰۰۸).

۱-۵- عوارض جانبی

مصرف بی‌رویه شیرین‌بیان یا سایر فرآورده‌های آن به سبب تحریک غدد فوق‌کلیوی و ترشح بیش از اندازه هورمون آلدسترون، ممنوع اعلام شده است. این حالت سبب عوارضی چون اختلال در فعالیت‌های متابولیسمی و بالا رفتن فشار خون می‌شود. در صورت مصرف بیش از ۲۰ گرم در روز، بروز عوارض نامطلوب بعید نیست. استفاده زیاد از شیرین‌بیان برای طحال نیز مضر است. مصرف بسیار بالای شیرین‌بیان ممکن است به بروز فشارخون بالا و حتی سکته قلبی منجر شود. برخی از افراد با مصرف زیاد شیرین‌بیان دچار درد عضله و عده‌ای دیگر با کرخت شدن دست و پا مواجه می‌شوند. مصرف زیاد این ماده سبب افزایش وزن نیز می‌شود. در صورت بالا بودن فشار خون یا ناراحتی کلیه، قلب یا کبد باید از مصرف شیرین‌بیان پرهیز کرد. مصرف این گیاه و فرآورده‌های آن در دوران بارداری یا شیردهی، منع شده است. البته با رعایت میزان معقول مصرف شیرین‌بیان می‌توان از بروز این مشکلات جلوگیری کرده و از خواص بسیار مفید آن بهره‌برد محققین توصیه کرده‌اند که در صورت لزوم مصرف طولانی مدت شیرین‌بیان، بهتر است آن را با کتیرا ترکیب کرد (مها و همکاران ۲۰۱۲).

۱-۶- داروهای تولید شده از گیاه شیرین‌بیان در بازار ایران

در ایران، چندین فرآورده دارویی از گیاه شیرین‌بیان وجود دارد که به اختصار در جدول (۱-۱) بیان شده

است.

جدول ۱- ۱: فراورده های دارویی گیاه شیرین بیان (خان احمدی و همکاران، ۱۳۹۲)

ردیف	دارو	شکل دارویی	شکل دارویی	نام شرکت سازنده
۱	رگلیس	قرص	درمان نفخ معده اثنی عشر، ترشح زیاد اسید و نفخ معده	ایران داروک
۲	د-رگلیس	قرص	پیشگیری از ایجاد زخم پپتیک در مصرف همزمان با داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی	ایران داروک
۳	لیکوفار	قرص	ضد التهاب گلو، خلط آور و ضد سرفه	گل دارو
۴	گاسترین	قرص	ضد التهاب و مسکن درد معده، تسریع در التیام ورم و زخم های معده و اثنی عشر	گل دارو
۵	متازین	قرص	بهبود دردهای گوارشی، درمان زخم معده و ضد نفخ و ملین	ابن ماسویه
۶	آلتادین	قرص	درمان التهاب و تحریک مخاط گلو، خلط آور در سرفه های تحریکی	دینه
۷	شیربنوش	شربت	درمان زخم معده، اثنی عشر، گاستریت و گاسترالوزی	گل دارو
۸	رگلیسیدین	قرص	درمان نفخ معده، اثنی عشر، گاستریت و گاسترالوزی	دینه

۷-۱- آماده سازی و کاربردهای تجاری

ریشه گیاه شیرین بیان به صورت پودر، عصاره خشک و مایع در تجارت جایگاه ویژه ای دارد. عصاره ریشه شیرین بیان دارای مقادیری گلوکز، ساکارز، آسپاراژین، مواد آلبومیدی، رزین و اسانس است. مواد مؤثره این گیاه در صنایع داروسازی، نوشابه سازی، شیرینی سازی و دخانیات مصارف متعددی دارد، عصاره شیرین بیان در هر اونس (۳۵/۲۸ گرم) تقریباً دارای انرژی ای به میزان ۱۰۰ کالری است. با جوشاندن ریشه گیاه و تبخیر بخش عمده آب آن، ماده ای سیاه رنگ مایل به قهوه ای به دست می آید. این ماده به دو صورت جامد و شیر عارضه می شود. لیکوریک، ریشه خشک شده گیاه شیرین بیان است. مهم ترین شاخص در تعیین کیفیت ریشه شیرین بیان درصد اسید گلیسیریزیک و میزان عصاره محلول در آب آن درصد اسید است. به طوری که بر طبق فارماکوپه USP^۱ درصد گلیسیریزیک باید حداقل ۲/۵ درصد و طبق فارماکوپه BP^۲ باید حداقل ۴ درصد در ریشه خشک شده گیاه باشد. میزان عصاره محلول در آب نیز باید حداقل ۲۰ درصد در ریشه های خشک شده پوست نکنده گیاه باشد (بلومینتال و همکاران ۲۰۰۰).

^۱ united States Pharmacopeial

^۲ British pharmacopoeia

۸-۱- دلایل تکثیر و باززایی این گیاه در شرایط آزمایشگاهی

شیرین بیان گیاهی چند ساله است که به طور طبیعی رشد آن محدود به نواحی خاصی است. بیشترین میزان متابولیت‌های ثانویه و ماده موثره‌ی اسیدگلیسیریزیک در ریشه‌های این گیاه تولید می‌گردد. افزایش تقاضا برای ماده موثره اسید گلیسیریزیک، برداشت بی‌رویه این گیاه دارویی در کشور و مشکلات تکثیر کلاسیک آن لزوم توجه به کشت درون شیشه‌ای این گیاه را مورد تاکید قرار می‌دهد. به طوری که بیشترین میزان تولید ریشه در شرایط آزمایشگاهی در کمترین زمان ممکن صورت گیرد.

۹-۱- طبقه‌بندی متابولیت‌های ثانویه

بر اساس ویژگی‌های بیوسنتزی، متابولیت‌های ثانویه به سه گروه ترپن‌ها، ترکیبات ازت‌دار و ترکیبات فنولی تقسیم می‌شوند.

۹-۱-۱ ترپنوئیدها

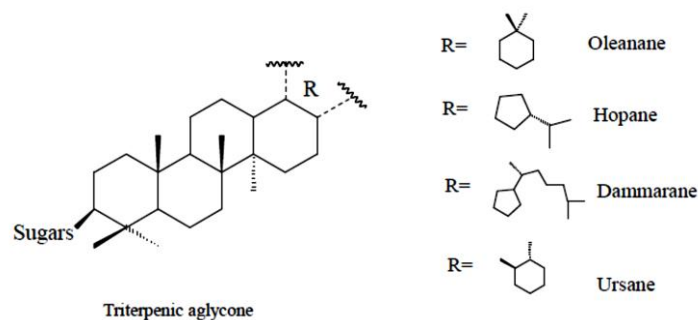
تاکنون بیش از ۴۰۰۰۰ هزار ترپنوئید با ساختارهای مختلف از گونه‌های گیاهان، حیوانات و میکروب‌ها کشف شده است (رابرتس و همکاران ۲۰۰۷). ترپنوئیدها از لحاظ ساختار و تعداد بسیار متنوع هستند ولی همگی از تعداد معینی واحدهای پنج کربنه به نام ایزوپرن (۲-متیل بوت-۱ و ۳-دین) تشکیل می‌شوند (تئو و همکاران ۲۰۰۶). ترپنوئیدها را بر اساس تعداد واحدهای ایزوپرن تشکیل دهنده به همی‌ترپن‌ها (C5)، منوترپن‌ها (C10)، سزکوئی‌ترپن‌ها (C15)، دی‌ترپن‌ها (C20)، سستر ترپن‌ها (C25)، تری‌ترپن‌ها (C30)، تترا ترپن‌ها (C40) و پلی‌ترپن‌ها دسته‌بندی می‌کنند (کیسر و کوکس ۲۰۰۷).

۱-۹-۲- بیوسنتز تری ترپن ساپونین‌ها

ساپونین‌ها دارای دو خاصیت عمومی بسیار مهم هستند؛ اول اینکه در اثر تکان دادن با آب ایجاد کف با دوام می‌نمایند. ثانیاً باعث همولیز شدن گلبول‌های قرمز می‌شوند. در نقاط مختلف دنیا بیش از ۴۰ خانواده و ۴۰۰ گونه گیاه محتوی ساپونین وجود دارد. مهمترین گیاهان حاوی این ماده عبارتند از: شیرین بیان، چوبک و جین سینگ. از نظر ساختمان شیمیایی قسمت غیر قندی ساپونین گلیکوزیدها، دو نوع آگلیکون را شامل می‌شود (چایب، ۲۰۱۰). در گیاهان عالی ۳،۲-اکسیدواسکوالن پیش ماده سنتز ترکیبات استروئیدی و تری ترپنی است. حلقه‌ای شدن ۳،۲-اکسیدواسکوالن توسط آنزیم‌های اکسیدو اسکوالن سیکلاز صورت می‌گیرد که به انواع به انواع اسکلت تری ترپنی که شامل آلفا آمیرین، بتا آمیرین و لوپئول تبدیل می‌شود (جنر و همکاران، ۲۰۰۵). ساپونین‌ها، گلیکوزیدهای استروئیدی و یا تری ترپن هستند که به دلیل خاصیت صابونی به این نام خوانده می‌شوند و همزمان قابل حل در چربی (آگلیکون) و قابل حل در آب (قندها) هستند (کافی و همکاران، ۱۳۷۹).

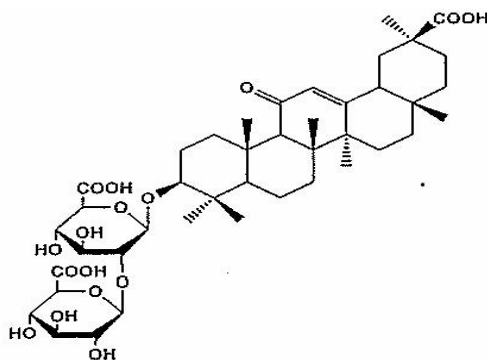
۱-۹-۳- ساپونین‌های تری ترپنوئید

بیشتر در گیاهان دولپه یافت می‌شوند و از مهمترین آن‌ها می‌توان به اسید گلیسیریزیک ریشه شیرین بیان اشاره کرد. قسمت‌های غیر قندی آن‌ها معمولاً به کربن شماره ۳ زنجیره قندی متصل می‌گردد. آگلیکون تریترپن‌ها از حلقه‌ای شدن ۳-۲-اپوکسی، ۳،۲-دی هیدرو اسکوالن ایجاد می‌شوند. حلقه‌ای شدن ۲-۳-اپوکسی و ۳،۲-دی هیدرو اسکوالن ترکیبات پنج حلقه‌ای، دامارانن، اولثانان، اورسانن و هپانن (شکل ۱-۱) را تولید می‌کند (چایب، ۲۰۱۰).



شکل ۱-۱- ساختار آگلیکون‌های تری ترپن‌ها

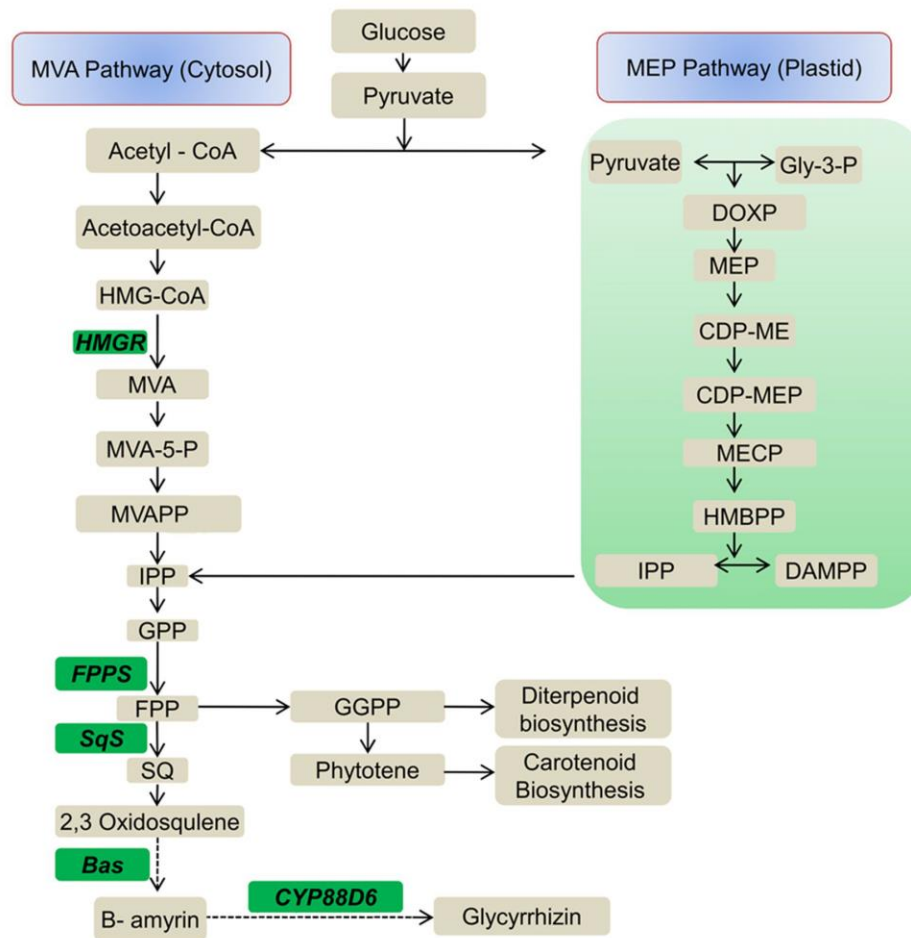
تری ترپنوئید ساپونین‌ها را در سه گروه تقسیم بندی می‌کنند که شامل، آلفاآمیرین، بتاآمیرین و لوپئول است. اسید گلیسیریزیک (شکل ۱-۲) نوعی ساپونین تری ترپن نوع اولئانان است.



شکل ۱-۲- ساختار شیمیایی ترکیب اسید گلیسیریزیک

۱-۹-۴- بیوسنتز اسید گلیسیریزیک

اسید گلیسیریزیک از دو مولکول قند گلوکورونیک اسید و آگلیکون گلیسیرهتینیک اسید که یک نوع اولئان تری ترپنوئید است، تشکیل می‌شود. از آنجایی که *G.glabra* انواع ترپنوئید و ساپونین تری ترپنوئیدی را تولید می‌کند، بنابراین یک مدل گیاهی عالی برای مطالعه بیوسنتز ترپنوئیدها محسوب می‌شود (شکل ۱-۳).



شکل ۱-۳- مسیر بیوسنتز اسید گلیسیریزیک در گیاه شیرین بیان (اقتباس از مارینالینی و همکاران، ۲۰۱۸).

بیوسنتز ترپنوئیدها در شیرین بیان با تبدیل دو مولکول فارنسیل دی فسفات (FPP) به وسیله آنزیم اسکوالن سینتاز (SQS) به اسکوالن شروع می‌شود. در *G. glabra* دو آنزیم (SQS₁ و SQS₂) دارای فعالیت اسکوالن سینتاز، جدا سازی شده است. اسکوالن پیش ماده اصلی تولید استرول‌ها و تری ترپنوئیدها است. در مرحله بعدی آنزیم‌های اکسیدواسکوالن سیکلاز، تشکیل ۲ و ۳ دی اکسیدواسکوالن که ترکیب واسطه استرول‌ها و تری ترپنوئیدها است را کatalیز می‌کند. برای مطالعه مسیر بیوسنتز تری ترپنوئید در شیرین بیان، سه cDNA سه آنزیم اکسیدواسکوالن سیکلاز، بتامیرین سینتاز (BAS)، لوپئول سینتاز (LUS) و سیکلوارتنل سینتاز (CAS) کلونینگ و شناسایی شدند. این سه آنزیم مسئول انشعایی شدن مسیر سنتز ساپونین تری ترپن‌های اولئانان (اسید گلیسیریزیک و سویاساپونین)، تری ترپن لوپان (بتولینیک اسید) و فیتواسترول‌ها هستند. برخلاف

اکسیدو اسکوالن‌های چند فعالیتی، این سه آنزیم جز آنزیم‌های تک فعالیتی محسوب می‌شوند و هر یک تری‌ترین‌های منفردی را ایجاد می‌کنند (هایاشی و همکاران، ۲۰۰۹). در اثر فعالیت بتا‌آمیرین سینتاز، بتا‌آمیرین تولید می‌گردد که ترکیب واسطه بیوسنتز ساپونین تری‌ترپنوئیدهای گلیسیرهتینیک اسید و سویاساپوجنل B می‌باشد. اکسیداسیون بتا‌آمیرین در موقعیت‌های کربن ۱۱ و ۳۰ منجر به تولید گلیسیرهتینیک اسید می‌گردد و اکسیداسیون کربن‌های ۲۲ و ۲۴ به تولید سویاساپوجنل می‌شود (هایاشی و همکاران، ۱۹۹۰). گلیسیرهتینیک اسید و سویاساپوجنل B به ترتیب آگلیکون‌های اسید گلیسیریزیک و سویاساپونین‌های ۱ و ۲ هستند. هیدروکسیلاسیون گروه متیل کربن شماره ۲۴ گلیسیرهتینیک اسید با فعالیت آنزیم ۲۴-هیدروکسیلاز منجر به تولید ۲۴-هیدروکسی گلیسیرهتینیک اسید می‌گردد. در مرحله آخر، اضافه شدن قند به سویاساپوجنل B و ۲۴-هیدروکسی گلیسیرهتینیک اسید به ترتیب سویاساپونین‌های یک و دو و اسید گلیسیریزیک را تولید می‌نماید (هایاشی، ۱۹۹۳ و ۲۰۰۹).

۱-۱۰-۱- ترکیبات فنولی

این ترکیبات دارای یک گروه فنولی (حلقه آروماتیک با یک گروه هیدروکسیل) هستند و به روش‌های مختلفی ساخته می‌شوند و به همین دلیل از نظر متابولیکی گروه نا همگونی را تشکیل می‌دهند. مسیر اصلی ساخت آن‌ها، مسیر اسیدشیکمیک و مسیر اسید موالونیک است. مسیر اسید شیکمیک از کربوهیدرات‌های ساده (آلفا-اریتروز-۴-فسفات و فسفوانول پیروئیک اسید) شروع می‌شود و به سمت تولید اسید آمینه‌های آروماتیک (فنیل آلانین و تریوزین) ادامه می‌یابد. بیشتر ترکیبات فنولی در گیاهان از فنیل آلانین و تریوزین مشتق شده‌اند. در گونه‌های گیاهی مرحله کلیدی ساخت این مواد، تبدیل فنیل آلانین به اسید سینامیک به وسیله آنزیم فنیل آلانین-آمونیااز (PAL) است. فعالیت PAL در گیاهان تحت کنترل عوامل داخلی و خارجی از جمله هورمون‌ها، مقدار مواد غذایی، نور، آلودگی‌های قارچی و زخم‌ها است. محصول آنزیم PAL اسید ترانس سینامیک است که این اسید یک ترکیب فنولی ۹ کربنه ساده است که به عنوان فنیل پروپان شناخته شده است. این

ترکیب شامل یک حلقه بنزنی و یک زنجیره جانبی سه کربنه است. فنیل پروپان جزء مهم ساختمانی ترکیبات فنولی پیچیده است (کافی و همکاران ۱۳۷۹).

۱-۱۱- فلاونوئیدها

فلاونوئیدها دارای پانزده کربن، به همراه دو حلقه آروماتیک (توسط یک پل سه کربنی به یکدیگر متصل می‌شوند) هستند، که گروه بزرگی از ترکیبات فنولی را تشکیل می‌دهند. ساختمان فلاونوئیدها از دو مسیر بیوسنتزی جداگانه ایجاد می‌شود. پل و یک حلقه آروماتیک (حلقه B)، از طریق فنیل آلانین و از مسیر اسید شیکمیک، به وجود می‌آید و یک واحد فنیل پروپان می‌باشد. شش کربن حلقه آروماتیک دیگر (حلقه A) از سه واحد استات و از طریق مسیر اسید مالونیک تشکیل می‌گردد (کافی و همکاران ۱۳۷۹). فلاونوئیدها به عنوان بزرگترین گروه ترکیبات حلقوی اکسیژن دار، شناخته شده‌اند و باعث ایجاد انواع اعمال فیزیولوژیکی و اکولوژیکی مختلف در گیاهان می‌شوند (کافی و همکاران، ۱۳۷۹، کوباسک و همکاران، ۱۹۹۹). بر اساس درجه اکسیداسیون پل سه کربنی و برخی تغییرات دیگر فلاونوئیدها به گروه‌های مختلفی تقسیم می‌شوند که از جمله آن‌ها آنتوسیانین‌ها (قرمز تا آبی رنگ)، کاتشین‌ها، فلاوانول‌ها، فلاوانول، لوکوانتوسیانیدین‌ها، چاکون‌ها (نارنجی و قرمز رنگ)، دی هیدروچالکون، اورونها، فلاوانون‌ها، ایزو فلاون‌ها (زرد رنگ) و فلاون‌ها (زرد رنگ) هستند (صمصام شریعت، ۲۰۰۴)، در گیاهان عالی به ویژه نهان‌دانگان، بیش از ۴۰۰۰ نوع فلاونوئید وجود دارد و بیشتر آن‌ها به شکل گلیکوزیدی (ترکیب با قند) در گیاهان یافت می‌شوند (امیدبیگی، ۱۳۸۴). گروه‌های هیدروکسیل و قند موجود در ساختار فلاونوئیدها، حلالیت آن‌ها را در آب افزایش می‌دهد. در صورتیکه ترکیبات دیگر مانند اترهای متیله یا واحدهای ایزوپنتیل تغییر یافته سبب چربی دوست شدن فلاونوئیدها می‌گردند (کافی و همکاران، ۱۳۷۹).

۱-۱۲- کشت بافت

کشت بافت^۱ اصطلاحی است که برای نشان دادن کشت درون شیشه‌ای بخش‌های مختلف گیاهی در شرایط ضدعفونی شده به کار می‌رود. این تکنیک در ازدیاد نباتات و اصلاح گیاه، تولید زیست توده، تولید فرآورده‌های بیوشیمیایی، بیماری‌شناسی گیاهی، نگهداری و انبار کردن بافت‌های گیاهی، پژوهش‌های علمی و غیره کاربرد دارد. اصطلاح بیوتکنولوژی در برگیرنده همه این فعالیت‌ها می‌شود. اصطلاح ریزازدیادی^۲ به طور اختصاصی به کاربرد تکنیک کشت بافت برای تکثیر گیاه با استفاده از بخش‌های کوچکی از گیاه که در شرایط ضدعفونی شده در لوله آزمایشگاه یا ظرف‌های دیگر پرورش می‌یابند، مربوط می‌شود. در عمل، بسیاری از تولیدکنندگان گیاهی اصطلاح "ریزازدیادی" و "کشت بافت" را مترادف هم به کار می‌برند تا هر شیوه ازدیاد گیاه در شرایط ضدعفونی شده را، توصیف کنند. واژه مترادف دیگر، "کشت درون شیشه ای"^۳ می‌باشد (خوشخوی، ۱۳۸۲). کشت بافت امکان تکثیر سریع تعداد زیادی از گیاهان یکنواخت در حالی که ژنوتیپ خودشان را حفظ کرده اند، فراهم می‌کند (آریکات و همکاران ۲۰۰۴). کشت بافت گیاهی بر پایه سه قابلیت گیاهی استوار است؛ اول، توانمندی^۴، که توان یا ظرفیت توارثی یک سلول گیاهی برای نمو به یک گیاه کامل با القای تحریک مناسب است. توانمندی بر این مطلب دلالت می‌کند که هر سلول واجد تمام اطلاعات لازم برای رشد و تکثیر می‌باشد. گرچه از لحاظ نظری همه سلول‌های گیاهی توانمند هستند، با این حال سلول‌های مریستمی بیشترین توان بیان این ویژگی را دارند. دوم، تمایز زدایی^۵ که توان سلول‌های بالغ برای بازگشت به شرایط مریستمی است و بعد از آن سلول‌ها، بازتمایزی^۶، اندام‌های جدیدی را سازماندهی می‌کنند. سوم

^۱ - Tissue culture

^۲ - Micropropagation

^۳ - In vitro culture

^۴-Totipotency

^۵-Dedifferentiation

^۶ - Redifferentiation

سازگاری^۱، که توانایی ذاتی یک سلول یا بافت گیاهی را برای نمو در یک مسیر مشخص بیان می‌کند (عادلی مسبب، ۱۳۷۸).

۱-۱۳- اهمیت و کاربرد کشت بافت

- ۱) تولید گیاهان عاری از ویروس و بیماری.
- ۲) تکثیر و ریزازدیادی گیاهان.
- ۳) تولید گیاهان هاپلوئید و سپس دیپلوئید کاملاً هموزیگوس از طریق کشت میکروسپور یا بساک.
- ۴) دست‌ورزی ژنتیکی و دورگ‌گیری سوماتیکی با استفاده از الحاق پروتوپلاسمی و همچنین ایجاد تلاقی بین گونه‌ای در شرایط درون‌شیشه‌ای.
- ۵) کشت سوسپانسیون سلولی و تولید متابولیت‌های اولیه مثل قند و کربن و نیز متابولیت‌های ثانویه.
- ۶) ایجاد گیاهان با خصوصیات جدید با استفاده از تنوع سوماکلونال.
- ۷) نجات جنین با استفاده از کشت جنین‌های نارس در تلاقی بین گونه‌ای.
- ۸) نگهداری ژرم پلاسما گیاهان در شرایط درون‌شیشه‌ای.
- ۹) استفاده از کشت بافت در انتقال ژن به گیاهان.
- ۱۰) استفاده در مطالعات بافت‌شناسی، سلول‌شناسی و فیزیولوژی گیاهی (اثنی عشری، ۱۳۸۸).

۱-۱۴- اهمیت و کاربرد کشت بافت در گیاهان دارویی

در حال حاضر بیش از پنجاه هزار گونه گیاهی در گیاه درمانی و به عنوان دارو استفاده می‌شود. تقریباً دو سوم آن‌ها از طبیعت برداشت می‌شوند که منجر به انقراض محلی گونه‌های زیادی از گیاهان یا کاهش محل سکونت آن‌ها شده‌است. روش‌های بیوتکنولوژی نه تنها امکان تولید سریعتر و محافظت از ژنوتیپ‌های گیاهی را

^۱ - Competent

ارائه می‌کند، بلکه برای تغییر و تبدیل اطلاعات ژنی آن‌ها، تنظیم و بیان ژن برای تولید مواد گیاهی با ارزش در مقادیر زیاد و یا با خواص بهتر، راهکارهایی را پیشنهاد می‌دهد (تاشیوا و کوستاکوا ۲۰۱۱).

کشت گیاهان دارویی به منظور استخراج ترکیبات فعال ممکن است با محدودیت‌های خاصی مانند آب و هوا، فصل، آب در دسترس، بیماری‌ها، آفات و کمبود گیاهانی که به طور طبیعی رشد یافته‌اند، مواجه شود. چنین محدودیت‌هایی به استفاده از تکنیک‌های کشت بافت برای تولید ترکیبات فعال منجر شده است (آریکات و همکاران ۲۰۰۴). ریز ازدیادی درون شیشه‌ای، یک روش مؤثر برای تکثیر گونه‌هایی است که نیاز به یکنواختی زیاد در نتاج دارند، بنابراین علاقه به استفاده از این تکنیک‌ها برای تکثیر سریع گیاهان دارویی و معطر در مقیاس بزرگ به طور قابل توجهی افزایش یافته است (ساهو و همکاران ۱۹۹۷). فواید استفاده از کشت بافت به منظور استخراج متابولیت‌های ثانویه عبارتند از: عدم استفاده یا استفاده کمتر از گونه‌های وحشی در معرض خطر انقراض، تولید متابولیت‌های ثانویه خارج از فصل و شرایط آب و هوایی مناسب و تولید سریع متابولیت‌های ثانویه به علت رشد سریع در شرایط درون شیشه‌ای (پایرایک و همکاران ۱۹۸۷). از طرف دیگر بهبود باززایی گیاهان دارویی از طریق اندام زایی مستقیم با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف، می‌تواند کشت و زراعت گیاهان دارویی را ترفیع دهد و نیز از نظر حفاظت درون شیشه‌ای، ناتوانی ذخیره بذر در بانک ژن به دلیل کاهش جوانه‌زنی بذر را جبران کند. همچنین چرخه اصلاحی گیاهانی را که رشد کند دارند، تسریع کرده و تولید ژرم پلاسماهای عاری از پاتوژن را افزایش داده است (زنگ و همکاران ۲۰۱۱).

۱-۱۵- کاربرد بیوتکنولوژی در گیاهان دارویی

گیاهان دارویی منابع با اهمیتی برای تولید دارو هستند. امروزه بیوتکنولوژی گیاهان دارویی بیشتر روی تولید محصولات طبیعی و شناخت مسیرهای بیوسنتزی متمرکز گردیده است (کیسر و کواکس، ۲۰۰۷). با توجه به اینکه در طبیعت سرعت تولید متابولیت‌های ثانویه کند بوده و مدت زمان طولانی برای تولید لازم است، استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی برای تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی ضروری به نظر می‌رسد (اصغری، ۱۳۸۵).

پیشرفت در تحقیقات بیولوژی مولکولی مسیر جدیدی را در کشت‌های این ویترو ایجاد کرده است به طوری که با تولید گیاهان مهندسی شده میزان تولید متابولیت‌های ثانویه در آن‌ها بطور چشمگیری افزایش می‌یابد. علاوه بر این موارد، محدودیت منابع آب و عرصه‌های زراعی برای تولید از یکسو و نیاز روز افزون جامعه جهانی به گیاهان دارویی و داروهایی با منشأ طبیعی و فاقد آثار جانبی از سوی دیگر، مزایای استفاده از روش‌های نوین بیوتکنولوژی در جهت افزایش کمی و کیفی متابولیت‌های دارویی در گیاهان را بیشتر می‌سازد (راویشانکر و راماجاندر، ۲۰۰۰).

۱-۱۶- استفاده از روش‌های مختلف بیوتکنولوژی در گیاهان دارویی

علاوه بر تکنیک‌های کشت بافت و ریز ازدیادی برای تکثیر و تولید انبوه گیاهان دارویی برای انواع گونه‌های تحت حفاظت، روش‌های دیگری اعم از مهندسی متابولیک و کشاورزی مولکولی نیز در این رابطه مطرح شده است. بیوتکنولوژی از طریق کشت سلول، بافت و یا اندام گیاهان در شرایط این ویترو این موقعیت را فراهم می‌سازد که تولید این متابولیت‌های گیاهی تحت شرایط کنترل شده و در مدت زمان کوتاه‌تری انجام گیرد (راویشانکار و راماجاندر، ۲۰۰۰؛ والکو وهمکاران، ۲۰۰۴).

ریزازدیادی، با کشت یک بخش سازماندهی شده گیاهی (اغلب یک جوانه) شروع می‌شود و آن را به سمت تکثیر و باززایی یک گیاه کامل و جدید، در شرایط این ویترو هدایت می‌کند (معینی و کهریزی، ۱۳۸۲). ازدیاد در شرایط این ویترو دارای پتانسیل عظیمی برای تولید گیاهان دارویی با کیفیت بالا می‌باشد که این ویژگی با استفاده از روش‌های مختلف ریزازدیادی بدست می‌آید. ریزازدیادی در گونه‌های گیاهی متنوعی گزارش شده است (کیسر و کواکس، ۲۰۰۷). ازدیاد گیاهان از طریق مریستم‌های انتهایی گیاه و مریستم‌های جانبی در گیاهان دارویی از جمله، *Catharanthus roseus*، *Glutinosa rehmannia*، *Rauwolfia serpentine*، *Isoplexis* و *Datura melet canariensis*، *Bacopa monnieri* و *Digitalis spp* نتایج مطلوبی را نشان داده است (تریپاتی و تریپاتی، ۲۰۰۳؛ کیسر و کواکس، ۲۰۰۷). توسعه کاربرد روش‌های کشت سلول و بافت‌های گیاهی توسط بیولوژیست‌های سلولی محقق گردیده و در نهایت با طراحی بیوراکتورهای صنعتی برای کشت و رشد سلول‌ها،

متابولیت‌های دارویی این گیاهان به مقدار انبوه و اقتصادی تولید می‌گردد (راویشانکر و رامچاندرا، ۲۰۰۰)، همچنین تغییر ژنتیکی به خصوص القاء ریشه‌های مویین، به عنوان روشی موثر برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه مطرح شده است (تریپاتی و تریپاتی، ۲۰۰۳).

۱-۱۷- کاربرد کشت سلول و اندام در تولید متابولیت‌های ثانویه

روش‌های مختلفی از قبیل کشت سلولی، کشت اندام (جوانه، جنین، ریشه و کشت ریشه‌های مویین) به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار گرفته است که در ذیل به آن‌ها اشاره می‌شود (اصغری، ۱۳۸۵؛ دیکسون و گنزالس، ۲۰۰۵). آزمایشات نشان داده است که ژن‌های مسئول مراحل مختلف مسیرهای بیوسنتزی در کشت سوسپانسیون بعضی از گونه‌های گیاهی دست نخورده باقی مانده‌اند و فقط در زمان تمایز و سازمان یافتگی سلول‌ها فعال می‌شوند. این تمایز برای تولید متابولیت، می‌تواند در حد ساختمان سلول و یا اندام‌های داخل سلولی و حتی در مواردی تمایز بیوشیمیایی باشد. این نتایج استفاده از روش‌های کشت اندام و بافت (ریشه، جوانه و جنین) را افزایش داده است (اصغری، ۱۳۸۵؛ دیکسون و گنزالس، ۲۰۰۵). کشت اندام‌های جدا شده از گیاهان به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار می‌گیرد و به انواع مختلفی مانند کشت جنین، کشت شاخساره، کشت ریشه و کشت ریشه‌های مویین تقسیم می‌شوند (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۲). برای مثال در برخی از گیاهان دارویی مانند *Nicotina tabacum* تولید متابولیت هدف، زمانی افزایش می‌یابد که تمایز به سمت جوانه ایجاد شود. کشت جوانه به دو صورت جوانه نابجا و یا به صورت جوانه تراریخت در گیاهان متعددی انجام شده است. برخی از متابولیت‌ها نیز فقط در کشت ریشه تولید می‌شوند. کشت ریشه به صورت ریشه‌های نابجا و ریشه‌های تراریخت ایجاد می‌گردد. کشت ریشه‌های نابجا برای تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان متعددی استفاده شده است. در گونه‌های گیاه *Senecio* کشت ریشه به منظور تولید آلکالوئید پریولیزیدین انجام شده است و تعدادی از پریولیزیدین آلکالوئیدها در این کشت تولید شدند (دیکسون و گنزالس، ۲۰۰۵). در گیاهان *Dubosia myoparoides* *Atropa belladonna* و *Scopolia parviflora* تبدیل فنیل آلانین به اسید تروپیک به القاء ریشه بستگی دارد، همچنین برای تولید بعضی ترکیبات چون دی سولفیدها

در کالوس پیاز *Allium cepa* القاء ریشه ضروری است. اخیراً استفاده از آگروباکتریوم ریزوژنز برای ایجاد تمایز، توجه محققین تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت ریشه‌های تراریخت گیاهان را به خود جلب نموده است. این ریشه‌های مویین (ریشه تراریخت) را می‌توان در محیط‌های عاری از هورمون‌های گیاهی رشد داد و مشاهده کرد که در مقایسه با سلول‌های اولیه میزان تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه در آن‌ها افزایش می‌یابد (اصغری، ۱۳۸۵).

۱۸-۱- سیستم کشت ریشه‌های مویین

سیستم کشت ریشه در گیاهان عالی معمولاً از سرعت رشد کمتری برخوردار است و نیاز به هورمون گیاهی خارجی دارد، که این امر منجر به سنتز بسیار اندک متابولیت‌های ثانویه می‌گردد (حسنلو و همکاران، ۱۳۸۷). در نتیجه روش‌های جایگزین برای تولید مواد دارویی با منشاء ریشه مورد نیاز است. یکی از روش‌ها برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه، تراریختی گیاهان، با استفاده ناقل طبیعی به نام آگروباکتریوم مولد ریشه (آگروباکتریوم ریزوژنز) و ایجاد سیستم کشت ریشه مویین است. سیستم کشت ریشه مویین برای دامنه گسترده‌ای از تحقیقات مرتبط با تولید مواد ثانویه دارویی در کشت‌های این ویتر و از جمله بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه، باززایی و تولید گیاهان تراریخت، مهندسی ژنتیک و تولید پروتئین‌های نو ترکیب، مدل سازی برای مطالعه ریزوسفر، مطالعه روابط هورمونی و آنزیمی در فرآیند‌های بیولوژی سلولی مورد توجه قرار گرفته است. تولید ریشه‌های مویین تراریخت به عنوان یک سیستم کارآمد برای تولید متابولیت‌های ثانویه معرفی شده است (والکو و همکاران، ۲۰۰۵؛ گایلن و همکاران، ۲۰۰۶). باکتری مورد استفاده برای تولید ریشه‌های تراریخت در گیاهان از نوع باکتری‌های خاکزی و گرم منفی هستند و 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 (گیری و همکاران، ۲۰۰۰؛ زیونومیز، ۲۰۰۱؛ سیتوسکی و همکاران، ۲۰۰۶؛ استفانی و همکاران، ۲۰۰۶؛ تزفیرا و سیتوسکی، ۲۰۰۶). ریشه‌های مویین القاء شده به وسیله آگروباکتریوم ریزوژنز اولین بار در سال ۱۹۸۲ از کشت بافت هویج بدست آمد. بعد از پایه‌ریزی تکنیک‌های تراریختی با آگروباکتریوم، تعداد قابل ملاحظه‌ای از کشت ریشه‌های تراریخت

گزارش گردید. در سال ۲۰۰۴ تعداد کشت‌های ریشه مویین به ۱۸۵ گونه ۴۱ خانواده گیاهی افزایش یافت. خانواده سیب زمینی با بیش از ۴۰ گونه و سپس نخودیان با ۲۶ گونه، بیشترین تعداد تراریختی و القاء ریشه مویین را نشان دادند. بیماری‌زایی سویه باکتری و مقاومت گیاه به تلقیح به وسیله باکتری نیز نقش مهمی در تراریختی دارد (کازوکینا و اشنایدر، ۲۰۰۶).

۱-۱۹- تراریختی سلول گیاهی به وسیله آگروباکتریوم

با شناخت خصوصیات پلاسمیدهایی که توسط دو باکتری بیماری‌زای گیاهی یعنی *A.tumefaciens* و *A.rhizogenes* حمل می‌شوند، غلبه بر موانع دست ورزی ژن‌های گیاهی محقق گردیده است (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۲؛ تزفیرا و سیتووسکی، ۲۰۰۸).

۱-۲۰- معرفی آگروباکتریوم

آگروباکتریوم ریزوژنز از گروه باکتری‌های میله‌ای، گرم منفی و متعلق به خانواده ریزوبیاسه است.

جدیدترین نامگذاری آگروباکتریوم‌ها، بر اساس خصوصیات بیماری‌زایی آنها است و شامل:

- *A.tumefaciens*: عامل بیماری گال طوقه

- *A.rhizogenes*: عامل بیماری ریشه مویین

- *A.radiobacter*: نژاد غیر بیماری‌زا (تزفیرا و سیتووسکی، ۲۰۰۸).

ب- ساختار پلاسمید Ri در باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز

سویه بیماری‌زای آگروباکتریوم ریزوژنز حاوی پلاسمید بزرگی با بیش از ۲۰۰ kb به نام Ri (حاوی ژن‌های سنتزکننده اکسین، سیتوکنین و تولیدکننده ریشه) است که موجب تولید گال و ایجاد ریشه مویین می‌شود.

در این پلاسمید دو دسته از ژن‌ها حائز اهمیت هستند، دسته اول ژن‌هایی که بر روی T-DNA قرار دارند، شامل:

- ژن‌های مولد ریشه‌های مویین (آنزیم‌های سنتزکننده اکسین و سیتوکنین)

- ژن‌های کد کننده سنتز اوپین‌ها

ژن‌هایی که در خارج از T-DNA قرار دارند، شامل:

-ژن‌هایی که در پروسه انتقال T-DNA به سلول گیاهی نقش دارند (ناحیه vir شامل virA, virB).

virE, virD, virC

-ژن‌های مسئول کاتابولیسم اوپین‌ها

-ژن‌های شرکت کننده در همیوگی بین دو باکتری (انتقال پلاسمید)

-نواحی که ثبات پلاسمید را حفظ می‌کنند (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۲؛ تزفیرا و سیتووسکی، ۲۰۰۸).

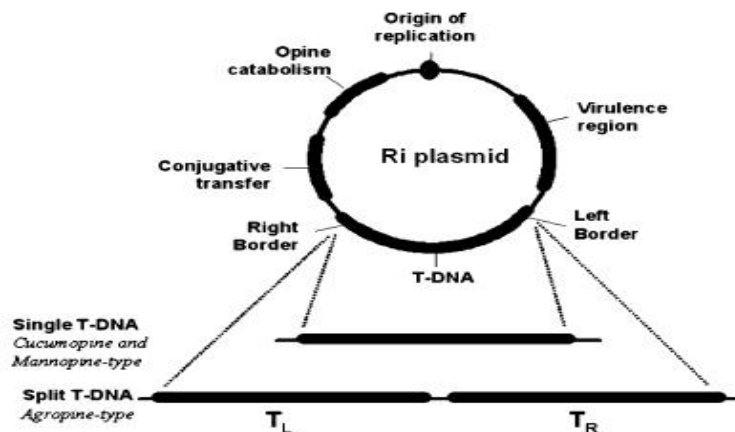
از این پلاسمید باکتریایی، بخش کوچکی از آن (۱۳ تا ۱۷ درصد) تحت عنوان T-DNA به ژنوم هسته‌ای گیاه

میزبان منتقل می‌شود (گایلن و همکاران، ۲۰۰۶). برخی از ژن‌های موجود در T-DNA در سنتز اسیدهای آمینه

غیر عادی به نام اوپین‌ها نقش دارند. اوپین‌ها به وسیله ریشه‌ها سنتز شده و به وسیله باکتری به عنوان منابع

کربن و نیتروژن مورد استفاده قرار می‌گیرند. شناسایی این ترکیبات به عنوان یک شاخص در تایید ورود پلاسمید

Ri آگروباکتریوم به درون گیاه و ایجاد ریشه مویین است (شکل ۴-۱).



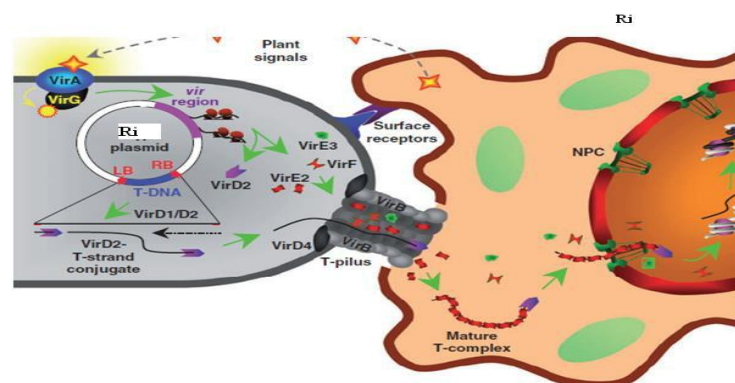
شکل ۴-۱- ساختار پلاسمید آگروباکتریوم ریزوژنز (ونا و تیلر، ۲۰۰۷).

۱-۲۰-۲- مکانیسم انتقال T-DNA به سلول گیاهی

ورود آگروباکتریوم به بافت گیاهی در محل‌های زخمی ایجاد شده توسط حشرات یا آسیب‌های مکانیکی

انجام می‌پذیرد. در محل زخمی ترکیبات فنولی تولید می‌شوند که باعث جذب آگروباکتریوم ریزوژنز می‌گردند

(بانرجی و همکاران، ۱۹۹۵). در پلاسمید Ri دو توالی DNA تکراری به شدت محافظت شده به طول ۲۵bp وجود دارد که در طرفین T-DNA قرار دارند و حدود آن را مشخص می‌کند. این توالی‌ها به عنوان مرزهای T-DNA عمل می‌کنند و آن‌ها را مرزهای چپ و راست می‌نامند و نقش بسیار مهمی در فرایند انتقال ایفا می‌کنند (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۲). تلقیح گیاهان با آگروباکتریوم باعث ورود قسمت چپ یا راست T-DNA و یا هر دو قسمت چپ و راست T-DNA به درون ژنوم گیاهی می‌گردد (رودس و همکاران، ۱۹۹۰). مطالعات ژنتیکی نشان داده که ناحیه مرزی راست برای بیماری زایی ضروری است، ولی ناحیه مرزی سمت چپ ضروری نیست (وانگ و همکاران، ۱۹۸۴). در حضور پروتئین 1 virD و 2 virD توالی مرزی ۲۵ bp در یک جایگاه شکسته می‌شود. برش در توالی سمت راست سبب ایجاد یک انتهای آغازگر می‌گردد و سنتز رشته جدید DNA از محل این بریدگی در جهت ۵ به ۳ آغاز می‌گردد و رشته جدید جایگزین تک رشته قبلی می‌شود. یافته‌های جدید نشان می‌دهد که پروتئین 2 virD، رشته T-strand را با ایجاد پیوند کووالانسی در انتهای خود نگه می‌دارد که باعث جلوگیری از آسیب پذیری انتهای ۵ در برابر حمله آنزیم‌های اگزونوکلاز می‌گردد. بعلاوه این پروتئین دارای یک توالی هدف یاب هسته‌ای است و در هدایت T-DNA به سوی هسته سلول گیاهی عمل می‌کند. T-DNA برای انتقال به بافت زخمی، در درون باکتری مراحل را طی می‌کند و سپس به سلول گیاهی ارسال می‌گردد و در آنجا به ژنوم گیاهی اضافه می‌شود. پروتئین‌های کد شده به وسیله ناحیه بیماری‌زا (vir) در پلاسمید مراحل انتقال T-DNA را تنظیم می‌کنند. ترکیبات فنولی مشتق شده از دیواره سلول گیاهی زخمی شده (از جمله استوسرینگون و بتا استوسرینگون) نیز بیان ژن‌های ناحیه vir را القاء می‌کنند (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۲).



شکل ۱-۵- مکانیسم انتقال T-DNA به ژنوم گیاهی (سیتوسکی و همکاران، ۲۰۰۷).

۱-۲۰-۳- ادغام مولکول T-DNA به داخل ژنوم گیاه

در این فرآیند مولکول T-DNA پس از عبور از غشاء هسته، در ژنوم میزبان ادغام می‌شود. بر خلاف دیگر عناصر، DNA متحرک از قبیل ترانسپوزون‌ها، مولکول T-DNA قادر نیست پروتئین‌های مورد نیاز برای ادغام شدن خود را کد نماید و فرآیند ادغام مولکول به کمک دو دسته از عوامل پروتئینی (پروتئین‌های باکتریایی و گیاهی) انجام می‌شود (ویلسون و همکاران، ۱۹۹۵).

۱-۲۱- عوامل موثر در ایجاد ریشه‌های موپین

۱-۲۱-۱- بیماری‌زایی نژاد آگروباکتریوم ریزوژنز

نژادهای آگروباکتریوم بر اساس نوع اوپین تولیدی، به تیپ‌های مختلف نظیر آگروپین، مانوپین و کوکوموپین طبقه‌بندی می‌شوند. در نژادهای تیپ کوکوموپین و مانوپین، T-DNA تنها یک قسمتی می‌باشد در حالی که در نژادهای تیپ آگروپین، ناحیه T-DNA شامل دو قسمت چپ و راست هستند و از قدرت بیماری‌زایی بیشتری برخوردار می‌باشند. بنابراین برای ایجاد سیستم ریشه موپین بیشتر از تیپ آگروپین استفاده می‌شود (ونا و تیلر، ۲۰۰۷).

۱-۲۱-۲- نوع محیط کشت

محیط رشد دارای تاثیر زیادی در ایجاد ریشه‌های موپین است. محیط‌هایی با مقادیر بالای نمک‌های معدنی از قبیل LS یا MS تشکیل ریشه‌های موپین را در بعضی از گیاهان تشدید می‌کنند. محیط‌هایی با مقادیر پایین نمک از جمله B5 تکثیر بیش از حد باکتری را در محیط فراهم می‌آورند، در نتیجه محیط مناسبی برای ایجاد ریشه‌های موپین در بعضی از گونه‌های گیاهی نیستند (موکاندان و همکاران، ۱۹۹۸).

۱-۲۱-۳- سن و نوع ریزنمونه

سن و نوع ریزنمونه مورد استفاده برای تلقیح نیز، در ایجاد ریشه‌های مویین موثر است (کیسر و کواکس، ۲۰۰۷). در بیشتر موارد ریز نمونه‌هایی با سن پایین فراوانی تراریختی بیشتری را ایجاد می‌کنند (آزلان و همکاران، ۲۰۰۲).

۱-۲۲-۲- تایید تراریختی در ریشه‌های مویین

۱-۲۲-۱- استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیکی

تایید مورفولوژیکی ریشه‌های مویین تراریخت، از طریق کشت‌های ریشه‌ها تعیین می‌شود. فنوتیپ ریشه‌های مویین، افزایش در شاخه دهی جانبی، سرعت رشد زیاد و عدم زمین‌گرایی را نشان می‌دهند (تپر، ۱۹۸۴). همچنین گیاهان باززایی شده از ریشه‌ها نیز، فنوتیپ‌هایی مانند برگ‌های چین وچروک خورده، میان‌گره‌های کوتاه و چندین ویژگی مجزای مورفولوژیکی را در مقایسه با گیاهان تراریخت نشده بروز می‌دهند (چیلتون و همکاران، ۱۹۸۲؛ اومس و همکاران، ۱۹۸۵؛ گورچه و همکاران، ۱۹۸۷).

۱-۲۲-۲- استفاده از نشانگرهای بیوشیمیایی

سنتز اوپین در گیاهان تلقیح شده با آگروباکتریوم ریزوژنز توسط T-DNA پلاسمید Ri کد می‌شود (وایت و همکاران، ۱۹۸۵). اوپین‌ها نشانگرهای بیوشیمیایی موثر برای تایید بافت ریشه تراریخت می‌باشند و تعیین اوپین‌ها به عنوان یک علامت مهم برای تایید ریشه‌های مویین می‌باشند (تپر، ۱۹۸۴). هر چند گاهی اوقات بیان ژن‌های اوپین ناپایدار می‌باشد (کامادا و همکاران، ۱۹۸۶).

۱-۲۲-۳- استفاده از نشانگرهای ژنتیکی

روش‌هایی مختلفی برای تایید اتصال T-DNA بر روی DNA کروموزوم گیاه میزبان بکار می‌روند. این روش

ها شامل Southern Hybridization ، DNA بلات داتینگ (دراپر و اسکوت، ۱۹۸۸)، این Situ Hybridization (امبروس و همکاران، ۱۹۸۶) و استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مرز یا PCR می باشد.

۱-۲۳- روش‌های افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت ریشه‌های مویین

تولید متابولیت‌های ثانویه با استفاده از تکنولوژی کشت بافت گیاهی هنوز هم دچار محدودیت‌های بیولوژیکی و بیوتکنولوژیکی است. یکی از این محدودیت‌ها مقدار پایین متابولیت‌های تولید شده در این تکنیک است. ریشه‌های مویین هم از این قاعده مستثنی نیست، به همین منظور روش‌های متعددی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت ریشه‌های مویین استفاده می‌گردد که برخی از آن‌ها بطور مختصر شرح داده می‌شود (هو و دو، ۲۰۰۰).

۱-۲۳-۱- بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت و شرایط نگهداری

بسیاری از اجزای محیط کشت ریشه‌های مویین مهم و تعیین کننده رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه است (گیری و همکاران، ۲۰۰۰). فاکتورهایی از جمله نوع منبع کربن و غلظت آن، غلظت نمک‌های محیط کشت، pH محیط، فیتوهورمون‌ها، مدت زمان تلقیح، دما و نور محیط نگهداری ریشه‌ها در رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه موثر هستند (کریستن و همکاران، ۱۹۹۲؛ مورگان و همکاران، ۲۰۰۰). همچنین یون‌های فلزی سنگین و غلظت‌های فسفات، نترات و آمونیوم از عوامل تاثیرگذار هستند (پین و همکاران، ۱۹۹۲؛ پاینه و همکاران، ۱۹۸۷). افزایش اکسین و هورمون‌ها نیز در اغلب موارد سطوح متابولیت‌های ثانویه را در ریشه‌های مویین افزایش می‌دهند (وانهلا و همکاران، ۱۹۹۸). از آنجایی که هر یک از لاین‌های ریشه‌های مویین به شرایط تغذیه‌ای مختلفی نیاز دارند، شرایط کشت باید برای هر گونه و هر کلونی منفرد، به صورت جداگانه بهینه سازی شود (هو و دو، ۲۰۰۰).

۱-۲۳-۲- انتخاب لاین و سویه برتر

توان ریشه‌های مویین در تولید متابولیت‌های ثانویه به جایگاه ورود T-DNA به ژنوم گیاه میزبان، وابسته است. ریشه‌های مویین از نظر ژنتیکی پایدار هستند واکشت آن‌ها نیز آسان است. با این وجود، ریشه‌های مویین متفاوت هستند و به منظور دستیابی به لاین‌هایی که دارای تولید بالایی باشند، می‌بایست عمل انتخاب درست انجام شود (هو و دو، ۲۰۰۶). همچنین سویه‌های مختلف آگروباکتریوم ریزوژنز نیز می‌توانند روی تراریختی موثر باشند. همانطور که گیری و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند سویه‌های LAB۹۴۰۲، K۵۹۹، ۱۵۸۳۴، A۴ و ۹۳۴۰ در مقایسه با سویه LAB۹۴۰۲ ریشه‌های مویین با محتوای بیشتری از آرتمیزینین را در *Artemisia annua* تولید کردند (گیری و همکاران، ۲۰۰۱).

۱-۲۳-۳- مهندسی متابولیک

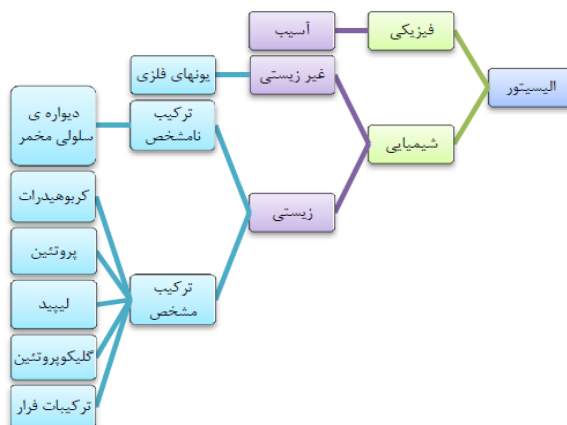
آگروباکتریوم ریزوژنز قادر است که هر ژن خارجی که در وکتور دو گانه قرار می‌گیرد را به کلون ریشه مویین تراریخت نیز انتقال دهد (گیری و همکاران، ۲۰۰۰). مهندسی متابولیک بطور معمول به عنوان تکنیکی برای هدایت یک یا چند واکنش آنزیمی برای تولید ترکیبات جدید در موجودات، بهبود تولید ترکیبات خروجی یا معتدل سازی ترکیبات نزولی تعریف می‌شود. همچنین به عنوان اصطلاحی برای استفاده از تکنولوژی DNA نو ترکیب برای اصلاح فعالیت‌های درون سلولی از طریق دستکاری عملکردهای تنظیمی، آنزیمی داخل سلولی تعریف می‌شود (دلپنا، ۲۰۰۰). مسیرهای بیوشیمیایی مختلفی با استفاده از ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های مهندسی شده و پروتئین‌های تنظیمی بررسی شده‌اند. انتقال ژن لیزین دکربوکسیلاز باکتریایی به ریشه‌های مویین *Nicotina tabacum* متابولیت‌های کاداوآرین و آناآزین را افزایش چشمگیری داد. همچنین تولید آنتراکینون و آلزارین در ریشه‌های مویین با وارد کردن ژن ایزوکروزیماست سنتاز افزایش یافت (حسنلو همکاران، ۱۳۸۷).

۱-۲۳-۴- استفاده از بیوراكتورها در مقياس وسيع

استفاده از بيوراكتورها آخرين مرحله توسعه تكنيك‌هاي توليد متابوليت‌هاي ثانويه در سيستم‌هاي آزمايشگاهي مي‌باشد (گروگيو وهمكاران، ۲۰۰۷). محدوديت اصلي به كارگيري تجاري كشت ريشه‌هاي مويين، كشت وسيع آنها در مقياس صنعتي است. ريشه‌هاي مويين در كشت‌هاي بزرگ مشكلات منحصر به فردي را به وجود مي‌آورند. تكان دادن مكانيكي سبب زخم شدن ريشه‌هاي مويين و توليد كالوس مي‌شود كه اين پديده از نظر توليد متابوليت‌هاي ثانويه نامطلوب مي‌باشد، زيرا كه توليد بافت كالوس معمولا با توليد متابوليت‌هاي ثانويه همبستگي منفي دارد (گيري و همكاران، ۲۰۰۱). بيوراكتورها شرايط مناسبی را برای تولید گیاه در ابعاد بزرگ برای تولید صنعتی ایجاد می‌کنند. بررسی‌های زیادی در بهینه‌سازی این سیستم‌ها جهت تولید و استخراج تركيبات گياهي با ارزش از جمله شيكونين انجام شده است. ريشه‌هاي كشت شده در بيوراكتورها قادر به آزادسازی تركيبات فعال دارويي مختلفی مانند داروهای ضدسرطان از گونه‌های مختلف تاكسول در محيط مایع می‌باشد كه در توليد انبوه جهت استفاده‌هاي دارويي استخراج می‌شود (تريپاتي و تريپاتي، ۲۰۰۳).

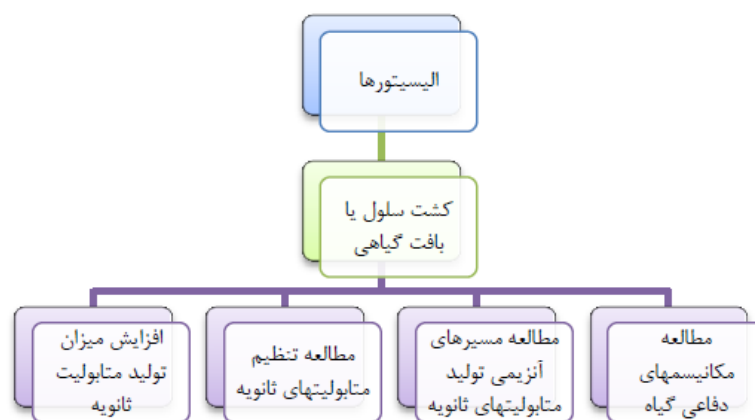
۱-۲۳-۵- اليستورها

طبق تعريف رادمان، اليستورها به دو گروه فيزيكي و شيميايي تقسيم می‌شوند. براساس ماهيت نيز اليستورها به دو گروه اليستورهاي زيستي و اليستورهاي غيرزيستي تقسيم می‌شوند شكل ۱-۶ (پاتل و همكاران ۲۰۱۳).



شكل ۱-۶ طبقه بندی اليستورها (پاتل و همكاران ۲۰۱۳)

الیسیتورها از طریق القای پاسخ های دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت های ثانویه می شوند (زهوا و همکاران ۲۰۰۵). الیسیتورهای زیستی دارای منشأ بیولوژیکی هستند و از پاتوژن ها یا خود گیاه ایجاد می شوند . این الیسیتورها شامل پلی ساکاریدها، پروتئین ها، گلیکوپروتئین ها و یا قطعات دیواره سلول قارچ ها، گیاهان (سلولز و پکتین) و میکروارگانیسم ها (کیتین و گلوکان) می باشند (واسکونسوئال و همکاران ۲۰۰۷) الیسیتورهای زیستی ممکن است دارای ترکیب مشخص باشند مانند کیتین و کیتوزان باشند و یا مانند همگنای قارچ و عصاره مخمر مجموعه ای از ترکیبات زیستی باشند. الیسیتورهای غیر زیستی، منشأ بیولوژیکی ندارند و در گروه فاکتورهای فیزیکی و ترکیبات شیمیایی قرار می گیرند (پاتل و همکاران ۲۰۱۳) به طور کلی استفاده از الیسیتورها در مطالعات مربوط به زیست فناوری متابولیت های گیاهی دو هدف اصلی را دنبال می کند ۱- به دست آوردن اطلاعاتی در زمینه مسیره های بیوسنتزی که منجر به تشکیل و تنظیم متابولیت های ثانویه می شود ۲- افزایش تولید متابولیت های ثانویه برای کاربرد تجاری (شکل ۱-۷) (پاتل و همکاران ۲۰۱۳)



شکل ۱-۷- اهداف استفاده از الیسیتورها در مطالعات مربوط به زیست فناوری متابولیت های گیاهی (پاتل و همکاران ۲۰۱۳)

نتایج مطالعات انجام شده نشان می دهد که هم الیسیتورهای زیستی و هم غیر زیستی سنتز متابولیت های ثانویه را در محیط کشت سلول های گیاهی افزایش می دهند. با این حال، هنوز الیسیتوری یافت نشده است که بر اکثر سیستم های کشت تأثیر کلی داشته باشد و هیچ سیستمی هم یافت نشده است که به تمامی الیسیتورها پاسخ دهد. بنابراین لازم است که الیسیتورهای متعددی برای یک سیستم خاص برای تولید ترکیب مورد نیاز استفاده شود. همچنین، غلظت الیسیتورها و زمان انکوباسیون مورد نیاز برای حداکثر استخراج بر اساس نوع الیسیتور و

سیستم کشت متفاوت است. بنابراین، به نظر می‌رسد برای رسیدن به یک الیسیتور مناسب، تعیین غلظت آن و زمان مورد نیاز برای رسیدن به حداکثر پاسخ برای تجمع متابولیت‌های ثانویه بسیار پراهمیت است. دیگر عامل مهم در این رابطه زمان اضافه کردن الیسیتورها به محیط کشت است. بهترین زمان اضافه کردن الیسیتور به محیط کشت در اواخر یا اوایل مراحل رشد سلول گیاهی می‌باشد. از آنجایی که تأثیر هر الیسیتور برای حداکثر پاسخ، به عمر محیط کشت، غلظت الیسیتورو زمان انکوباسیون با الیسیتور بستگی دارد. با این نگرش، نیاز شدیدی برای کشف الیسیتورهای مفید و روش‌های بصری کردن آن‌ها وجود دارد که توانایی استخراج مواد را با پایش مکرر و ساده امکان پذیر سازد (بونفانتی و همکاران ۲۰۰۹).

۱-۲۳-۶- بهینه‌سازی عناصر غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد محیط کشت

۱-۲۳-۶-۱- قند

مقدار ساکارز بر میزان تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سلولی موثر می‌باشد. به طور مثال، در کشت سلولی گیاه حسن یوسف تیمار شده با $2/5$ و $7/5$ درصد ساکارز، میزان رزمارینیک اسید تولید شده $0/8$ و $3/3$ گرم در لیتر بوده است. و اغلب موارد با افزایش میزان قندها در محیط کشت میزان تولید متابولیت‌های ثانویه افزایش می‌یابد و در برخی موارد نیز عکس این قضیه گزارش شده است (میساوا و همکاران ۱۹۸۵).

۱-۲۳-۶-۲- نیتروژن

نسبت آمونیوم به نترات و همچنین میزان کل نیتروژن در محیط کشت به طور چشمگیری بر میزان تولید متابولیت‌های ثانویه تأثیر دارد. به طور مثال سطوح پایین آمونیوم و سطوح بالای نترات باعث تحریک تولید شیکونین و بتاسیانین می‌شود، در حالی که نسبت بالاتر آمونیوم به نترات، تولید بربرین و اوبیکینون را در کشت‌های سلولی کاهش می‌دهد (بوهم و رینگ ۱۹۸۷).

میزان بالای فسفات در محیط کشت باعث افزایش رشد سلول می‌شود در حالی که می‌تواند تاثیر منفی بر تجمع متابولیت‌های ثانویه داشته باشد و بسته به گونه گیاهی و ترکیب محیط کشت افزایش فسفات می‌تواند تاثیر مثبت یا منفی بر تجمع متابولیت‌های ثانویه داشته باشد (راماچاندرا و همکاران ۲۰۰۲).

۱-۲۴- نانوکربن

نانو مواد، ترکیباتی هستند که در حداقل یکی از ابعادشان اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر دارند و برای کاربردهای مختلف به‌طور اختصاصی مهندسی شده‌اند. این مواد در مقایسه با همتهای توده‌ای (bulk) خود تفاوت‌هایی از نظر مساحت سطحی و واکنش‌پذیری بالاتر دارند. نانومواد مهندسی‌شده عمدتاً شامل انواع زیر هستند. (شکل ۱-۸) (صالح و همکاران ۲۰۱۶):

۱) نانومواد کربنی شامل نانولوله‌های کربنی (CNTs)، فولرن‌ها (C60) و گرافن‌ها (شکل ۱-۱۰).

۲) نانوذرات مبتنی بر فلز شامل فلزهای صفر ظرفیتی (همچون Au، Ag، Fe و غیره)، اکسید فلز (از جمله ZnO، TiO₂، CeO₂ و غیره) و نمک‌های فلزی (مثل نانوسیلیکات، سرامیک و غیره).

۳) نقاط کوانتومی (QDs) (مثل CdSe، CdTe و غیره).

۴) نانوپلیمرها (از قبیل دندریمرها^۱، پلی‌استایرن^۲، لاتکس^۳) و غیره.

Fullerene^۱

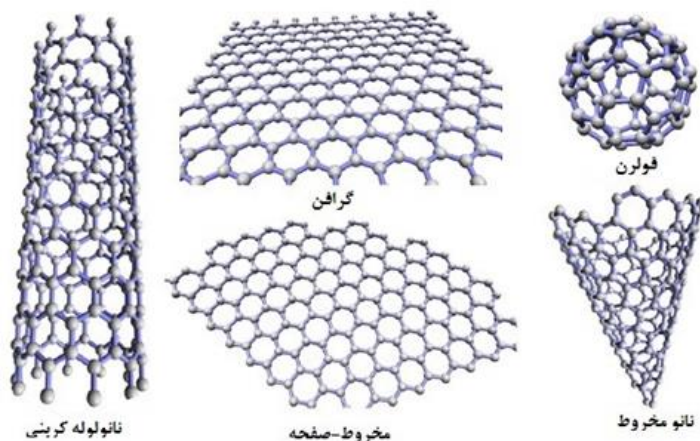
۱ Dendrimer^۲

۲ Polystyrene^۳

۳ latex^۴

نانولوله‌های کربنی که از صفحات کربن به ضخامت یک اتم و به شکل استوانه‌ای توخالی ساخته شده است و از جمله نانوذرات پرکاربرد هستند. این ذرات در سال ۱۹۹۱ توسط لیجایما معرفی شدند و به دلیل خواص ویژه و منحصر بفرد آن‌ها از جمله خواص عالی الکتریکی و استحکام کششی خوب از یک طرف و از طرف دیگر طبیعت کربنی بودن نانولوله‌ها شاهد رشد تحقیقات علمی در دهه گذشته بروی آن‌ها هستیم. کشفیات جدید در حوزه نانو تکنولوژی باعث علاقه در معرفی رویکرد های نانو تکنولوژی در سیستم‌های غذا و کشاورزی شده است. با اتصال دو نقطه گرافیتی به روشهای آرمچیر، زیگزاگ و کایرال نانو لوله بدست می‌آید. از آنجائی که خواص نانولوله‌های کربنی تابع شکل ساختاری آن است، بردارهای کایرال نه تنها در تعیین شکل ساختاری نانولوله‌ها، در تعیین خواص مربوط به آن‌ها نیز اهمیت فراوانی دارد. برای مثال، خواص الکترونیکی و مکانیکی نانولوله‌های کربنی متأثر از بردار کایرال آن است. علاوه بر این، تعداد دیواره‌ها و چگونگی وجود نقص‌ها در ساختار این مواد، در تعیین خواص آنها نقش دارند بعضی نانو مواد کربنی مانند نانو لوله‌های تک جداره و چند جداره کاربرد وسیعی در زمینه های کشاورزی و تغذیه دارند. نتایج تحقیقات جدید نشان داد که نانو لوله‌های چند جداره تاثیر مثبتی بر افزایش جوانه‌زنی و رشد گیاهان گوجه فرنگی داشت (خداخوشاوا و همکاران ۲۰۰۹) این افزایش جوانه‌زنی به افزایش جذب آب بوسیله دانه در حضور نانو لوله‌های چند جداره ارتباط داده شده است. لین و همکاران (۲۰۰۷) آثار مثبت نانولوله‌های چند جداره را بر جوانه‌زنی دانه و رشد ریشه شش گیاه مختلف، تربچه، کلم، چاودار، کاهو و ذرت و همچنین اثر MWCNTs^۱ بر تولید گل و میوه گیاه گوجه فرنگی، دو برابر گیاه شاهد گزارش دادند (لین و همکاران ۲۰۰۷). نتایج تحقیقات خداشوا و همکاران (۲۰۱۲) نشان می‌دهد که مقادیر بسیار کم از نانولوله‌های کربنی قادر است فعالیت برخی ژن‌های مربوط به رشد سلول‌ها را افزایش دهد. از طرفی تحقیقات دیگر این عمل را این گونه توجیه می‌کنند که نانولوله‌های کربنی چند جداره می‌توانند به عنوان کانال، مسیر عبور آب به درون سلول را فراهم کنند که این کار موجب رشد سریع تر و تقسیم سلول می‌شود.

^۴-multi-walled carbon nanotubes



شکل ۱-۸- ساختارهای مختلف نانومواد مبتنی بر کربن بر گرفته از صالح و همکاران ۲۰۱۶

۱-۲۵- هیدروژل

هیدروژل‌ها دسته‌ای از مواد پلیمری با ساختار شبکه‌های (پیوندهای عرضی فیزیکی یا شیمیایی) هستند که قابلیت تورم و جذب آب بالایی دارند. این خصوصیت هیدروژل‌ها را از سایر پلیمرها متمایز می‌سازد. پیوندهای عرضی فیزیکی می‌توانند بوسیله در هم گره خوردگی- زنجیرها، ایجاد بلور در ساختار پلیمر و یا برهم‌کنش‌های ضعیف مثل پیوند هیدروژنی یا واندروالسی تشکیل می‌شوند (حمیدی و همکاران ۲۰۰۸).

۱-۲۵-۱- نقش هیدروژل در کشاورزی

هیدروژل‌ها که شبکه‌های پلیمری آبدوست هستند و هر ذره آن‌ها پس از جذب آب و تورم ضمن دارا بودن قوام مکانیکی، شکل هندسی خود را حفظ می‌کند و در زمان نیاز گیاه، منقبض شده آب و املاح کودی را در اختیار ریشه قرار می‌دهد (الهادی و همکاران ۲۰۰۶)، در صورت اختلاط با بسترهای دانه‌ای مورد استفاده در سیستم‌های بدون خاک می‌توانند، سبب بهبود بافت فیزیکی بستر و افزایش ظرفیت نگهداری آب (اختر و همکاران ۲۰۰۴)، سهولت دسترسی ریشه گیاه به آب و عناصر غذایی، (الهادی و همکاران ۲۰۰۶)، کاهش استرس خشکی، گردند و میزان عملکرد را به ازای واحد آب و کود مصرفی افزایش دهند. از این رو قادرند کارایی، مصرف آب و عناصر غذایی توسط گیاه را بهبود بخشند (اربونا و همکاران ۲۰۰۵).

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تکنیکی جهت آنالیز شیمیایی برای جداسازی، تشخیص و تعیین مقدار اجزای یک مخلوط می‌باشد. در این تکنیک، پمپ‌هایی قرار دارد که با ایجاد فشار قوی، حلال مایع را از مخلوط نمونه از طریق ستون بسیار ریزحاوی مواد جاذب جامد عبور می‌دهد. هر جزء نمونه با تفاوت جزئی از بقیه، با ماده جاذب واکنش می‌دهد که باعث اختلاف سرعت‌های جریان برای اجزای متفاوت شده و باعث جدا کردن اجزا در ستون می‌شود. کروماتوگرافی کاربردی وسیع در پژوهش‌های مختلف علوم پایه دارد و گوناگونی و تکامل شگرفی در غلبه تحقیقات یافته است. در روش‌های مختلف کروماتوگرافی یک فاز متحرک (Mobile phase) و یک فاز ثابت (Statonary phase) وجود دارد. فاز ثابت می‌تواند جامد یا مایع و فاز متحرک مایع یا گاز باشد (صباغ زاده، ۲۰۱۷).

۱-۲۷-اهداف اصلی این تحقیق

تحقیق حاضر با هدف بررسی جوانه‌زنی بذور شیرین‌بیان در محیط MS و کاغذ صافی و همچنین رشد درون شیشه‌ای بذور درون محیط‌های جامد، مایع و هیدروژل در حضور و عدم زغال فعال و تغییرات اسید گلیسیریزیک در گیاه شیرین‌بیان در پاسخ به غلظت‌های متفاوتی از فسفر و نانوکربن انجام شد و بررسی تاثیر هورمون در جهت افزایش حجم ریشه‌ها و میزان تولید ماده موثره اسید گلیسیریزیک مورد بررسی قرار می‌گیرد

^۱ High-performance liquid chromatography

فصل دوم

پیشینه تحقیق

۲-۱- متابولیت‌های ثانویه

با توجه به اینکه سرعت تولید متابولیت‌های ثانویه در طبیعت کند می‌باشد، استفاده از روش‌های کشت بافت این موقعیت را فراهم می‌سازد که تولید در شرایط کنترل شده و در زمان کوتاه‌تری انجام شود (راوشنکار و همکاران ۲۰۰۰، والکو و همکاران ۲۰۰۴). با این حال در برخی از روش‌ها مانند کشت سوسپانسیون سلولی مقدار تولید متابولیت‌های ثانویه به دلیل عدم تمایز بافت اندک است، به طوری که برخی از متابولیت‌ها فقط در بافت‌های تمایز یافته، تجمع می‌یابند. بافت ریشه یکی از بافت‌های تمایز یافته است که بهینه‌سازی تولید درون شیشه‌ای آن برای استحصال متابولیت‌ها مورد توجه است (فارسی و همکاران ۱۳۸۲ و اصغری و همکاران ۱۳۸۵) کشت ریشه بصورت ریشه‌های نابجا و ریشه‌های تراریخت انجام می‌شود (دیکسون و همکاران ۱۹۹۵). سیستم کشت ریشه در گیاهان معمولاً از سرعت رشد پائینی برخوردار است و نیاز به اعمال تیمارهای هورمونی دارد (حسنلو و همکاران ۱۳۸۵). هورمون اکسین در غلظت کم به تشکیل ریشه‌های نابجا می‌انجامد، در حالی که در غلظت زیاد این هورمون، تشکیل ریشه صورت نمی‌گیرد و کالوس تشکیل می‌گردد. به طور کلی هورمون‌های ^۱NAA، ^۲IBA و ^۳IAA از پرکاربردترین اکسین‌ها در کشت بافت هستند. در حالی که استفاده از هورمون 2.4.D به دلیل امکان وقوع موتاسیون محدودتر است (باقری و همکاران ۱۳۸۳). علاوه بر تیمارهای هورمونی روش جایگزین دیگر برای تولید ترکیبات دارویی با منشأ ریشه، تراریختی گیاهان با استفاده از آگروباکتریوم رایزوتنز و ایجاد سیستم کشت ریشه‌ی مویین می‌باشد (واکو و همکاران ۲۰۰۴ و گیولین و همکاران ۲۰۰۶). به منظور افزایش راندمان تولید متابولیت‌ها با استفاده از تکنولوژی کشت بافت، از تیمارهای متعددی جهت تسریع در تولید آن‌ها استفاده می‌گردد (هو و همکاران ۲۰۰۶). در بیشتر موارد اضافه کردن این تیمارها

^۱Naphthylacetic acid

^۲Indole-3-butyric acid

^۳Indole-3-acetic acid

در غلظت‌های کم به سیستم‌های سلولی، بیوسنتز ترکیبات خاصی را تحریک و یا بهبود می‌بخشد (نادوگوپال و همکاران ۲۰۰۷). با توجه به نوع گیاه و نوع متابولیت مورد نظر، می‌توان از عصاره‌های استخراج شده‌ی گیاهی و یا از برخی مواد شیمیایی به عنوان محرک استفاده کرد (راماچاندرا و همکاران ۲۰۰۲).

۲-۲- مروری بر تحقیقات گذشته

خواب بذر حالتی است که علی‌رغم مساعد بودن شرایط محیطی، مانع از جوانه‌زنی می‌گردد. عوامل متعدد فیزیکی (نفوذ ناپذیری نسبت به آب و گازها و مقاومت مکانیکی پوسته بذر در مقابل خروج جوانه) و شیمیایی (عدم توازن ترکیبات تحریک کننده و باز دارنده جوانه زنی درون بذر، نارس بودن جنین و وجود ترکیبات بازدارنده) بر فرآیند خواب بذر تاثیر می‌گذارند (آلیر، ۲۰۰۴). در بین گونه‌های گیاهی، خواب بذر بیشتر از طریق پوشش‌های اطراف جنین ایجاد می‌شود. خواب ناشی از عوامل فیزیکی در بعضی از نهان دانه‌ها مانند گرامینه‌ها، لگوم‌ها و گونه‌های تیره پنیرک به وسیله پوسته نفوذ ناپذیری آن‌ها به آب و یا گازها ایجاد می‌گردد (کاردینا و اسپارو، ۱۹۹۷). سختی بذر در بسیاری از علف‌های هرز مانند گاو پنجه (*Abutilon theophrasti*)، پیچک صحرائی (*Convolvulus arvensis L.*)، اویار سلام (*Cyperus spp.*) و شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra L.*) متداول می‌باشد. به طور کلی، هر تیماری که نفوذ ناپذیری پوسته بذر را از بین ببرد و یا کاهش دهد، خراش‌دهی نامیده می‌شود (فلی، ۲۰۰۱). هدف از تیمارهایی که برای غلبه بر سختی فیزیکی پوسته بذر به کار می‌روند، نرم ساختن، ساییدن و یا ایجاد شکاف در پوسته بذر برای نفوذ پذیری آن‌ها به آب و گازها بدون آسیب رساندن به جنین یا آندوسپرم است. در بسیاری از مطالعات، استفاده از اسید سولفوریک به عنوان روشی ساده و مؤثر جهت شکستن خواب بذور دارای پوسته سخت معرفی شده است. هرون و کلمنز (۲۰۰۱) اعلام کردند که با غوطه ور کردن بذور گیاه *Melicytus ramiflorus* در اسید سولفوریک به دلیل تخریب پوشش بذری و اجازه نفوذ آب به درون بذور، درصد و سرعت جوانه زنی افزایش می‌یابد. تیشلر و همکاران (۱۹۹۴)

دریافتند که تیمار اسید سولفوریک مؤثرترین روش در افزایش سرعت جوانه زنی بذور *Panicum virgatum* می‌باشد. ساچتی و الرااهی (۱۹۹۸) با به کار بردن شش تیمار مختلف برای شکستن خواب بذر چهار گونه دارای پوسته سخت و غیرقابل نفوذ، از خانواده نخودیان، دریافتند که قرار دادن بذور در اسید سولفوریک غلیظ به مدت ۴۵ دقیقه، جوانه زنی را در هر چهارگونه افزایش داده است. تاکنون مطالعات مختلفی در زمینه‌ی کاربرد تنظیم کننده‌های رشدی و تعیین مناسب‌ترین محیط کشت بافت در گیاه شیرین بیان صورت گرفته است. ایاب و همکاران (۱۹۹۰) در تعیین مناسب‌ترین محیط ایجاد کالوس جهت تولید تریترپنوئیدها در گیاه شیرین بیان محیط پایه‌ی MS را به همراه تنظیم کننده‌های رشدی IAA (با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر) و Kinetin (با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) و 2,4-D (با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر) به عنوان مطلوب‌ترین محیط کشت معرفی نمودند. در حالی که موسی و همکاران (۲۰۰۷) در پژوهشی مشابه، کاربرد هورمون 2,4-D (با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر) را در محیط کشت B5 مناسب‌ترین شرایط رشد کالوس در گیاه شیرین بیان معرفی نمودند. در پژوهشی نانداگوپال و کوماری (۲۰۰۷) برای ریشه‌زایی ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل گیاه *Cichorium intybus* L از اکسین‌های IAA، NAA، IBA استفاده کردند. طبق گزارش آنان بیشترین درصد ریشه‌زایی در ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بدست آمد. سپس ریشه‌های بدست آمده از ریزنمونه‌های مذکور برای رشد و القای ریشه‌های نابجا و ریشه‌های موئین در غلظت‌های مختلف اکسین‌های IAA، NAA، IBA مورد بررسی قرار گرفتند و بیشترین وزن تر در ترکیب هورمونی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA گزارش گردید. مطالعه‌ی دیگری توسط بیس و همکاران (۲۰۰۱) با استفاده از تنظیم کننده‌های رشدی IAA، NAA، 2,4-D، KIN و GA (Gibberellic acid) برای رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های موئین گیاه *Cichorium intybus* L انجام شد که جیبرلین را در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بهترین تنظیم کننده برای افزایش رشد ریشه‌ها و تولید متابولیت ثانویه گزارش کردند. تأثیر اکسین‌های IAA، NAA، IBA در غلظت‌های

مختلف برای رشد ریشه‌های موئین گیاه *Nepeta cataria* L. توسط یانگ و همکاران (۲۰۱۰) مورد مطالعه قرار گرفت و بیشترین میزان رشد و بیشترین وزن تر و بیشترین وزن خشک ریشه‌های موئین در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بدست آمد.

با توجه به اهمیت ماده موثره اسید گلیسیریزیک تحقیقات زیادی در کشت این ویترو *G.glabra* صورت گرفته است. هایاشی و همکاران کشت کالوس و سوسپانسیون سلولی *G.glabra* را با استفاده از اندام‌های مختلف ایجاد کردند و پس از بررسی ترپنوئیدهای موجود در این کشت‌ها، دو ترکیب تری ترپنوئیدی سوباساپونین و بتولینیک اسید را تعیین نمودند (هایاشی و همکاران، ۱۹۹۰ و ۱۹۹۸). به دلیل عدم تولید اسید گلیسیریزیک در کشت سلولی *G.glabra*، در تحقیقات مختلف گلیسیریزین را به عنوان پیش ماده ساخت اسید گلیسیریزیک به محیط کشت سلولی اضافه کردند که بررسی‌ها تبدیل گلیسیرهتینیک اسید به ترکیبات مختلف را نشان داد ولی تولید اسید گلیسیریزیک گزارش نشد (هایاشی و همکاران، ۱۹۹۰ و ۱۹۹۲). در تحقیقات مختلف، بررسی فعالیت گیکوزیل ترانسفرازی بر روی گلیسیریزیک اسید در کشت سلولی مشخص نگردید. نتایج یافته‌های اخیر، فعالیت گلیکوزیل ترانسفرازی را در مسیر تولید گلیسیریزین به ریشه‌های ضخیم و استولون‌ها نسبت داده است (هایاشی، ۲۰۰۹). در تحقیق دیگر، در برخی از واکشت‌های کالوس‌های چند ساله *G.glabra* کشت شده در محیط هورمون دار، با بررسی‌های کروماتوگرافی لایه نازک جهت سنجش اسید گلیسیریزیک مشخص شد که واکشت‌های دوم، پنجم و سیزدهم مقدار اسید گلیسیریزیک بیشتری را نشان دادند (شمس اردکانی و همکاران، ۲۰۰۷). ونگویشا و همکاران (۲۰۰۸) غلظت‌های مختلف دو هورمون NAA و BA در محیط کشت MS را بر رشد کالوس در گیاه شیرین بیان مورد بررسی قرار دادند (صفری و همکاران ۱۳۹۲) و گزارش کردند که تنظیم‌کننده‌های رشدی عامل مهمی در تولید متابولیت ثانویه در این گیاه می‌باشند. نوع و غلظت اکسین و نسبت اکسین به سیتوکنین به طور چشمگیری می‌تواند رشد و تولید متابولیت ثانویه را تحت تاثیر قرار دهد (منتل و اسمیت ۱۹۸۴). گزارش شده که تنظیم‌کننده‌های رشد از تولید متابولیت ثانویه در بسیاری از موارد ممانعت به عمل می‌آورد، به عنوان مثال اسید جیبرلیک

و اسید آبسزیک، تولید آنتوسیانین را در برخی از کشت‌های درون شیشه‌ای متوقف می‌سازند (سیزت و هندیر ۱۹۸۸). اگرچه برای رشد گیاه نیازی به استعمال خارجی هورمون نیست ولی تولید متابولیت ثانویه گیاه را تحت تاثیر قرار می‌گیرد. برای مثال، زمانی که ریشه‌ها در محیط کشت حاوی IAA و Kin در تاریکی نگهداری می‌شوند محتوای آلکالوئید کل در گیاه *Hyoscyamus albus* افزایش می‌یابد (سائوروین و همکاران ۱۹۹۲). نوع اسید آمینه نیز می‌تواند بر تولید متابولیت ثانویه و رشد کالوس‌ها موثر باشد. به عنوان مثال اضافه کردن فنیل آلانین در کشت سوسپانسیون گیاه رزماری، تولید رزماریک اسید را در این گیاه افزایش داد (راماچاندرا و راثو ۲۰۰۲). ترکیب‌های محیط کشت از نظر مواد غذایی آن می‌تواند تأثیر زیادی بر تولید متابولیت ثانویه در محیط کشت بگذارد. به عنوان مثال، یون آمونیوم الگوی تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت ریشه موئین *Lithospermum erythrorhizon* را تغییر می‌دهد. گزارش شده است که افزودن فسفات به محیط کشت سطوح متابولیت‌های ثانویه را تحت تاثیر قرار می‌دهد (تایا و همکاران ۱۹۹۴). کاهش فسفات، عامل‌های محرک تولید سزکوئترین را در گیاه *Hyoscyamus muticus* افزایش می‌دهد (دانلوپ و کریس ۱۹۹۱). تعیین غلظت بهینه‌ی فسفر می‌تواند در تولید متابولیت‌های ثانویه تاثیر گذار باشد. افزایش غلظت فسفر علی‌رغم افزایش رشد سلول در برخی موارد می‌تواند تولید متابولیت ثانویه را محدود نماید. به عنوان مثال کاهش سطح فسفات در تولید بتاسیانین‌ها در کشت کالوس چغندر قند گزارش شده است (بهاتیا و بیریا ۲۰۱۵). در مقابل، افزایش فسفات برای تحریک سنتز دیوکسوکسین در گل انگشتانه و بتاسیانین در گیاه سلمک و سرخاب مشاهده شده است (راماچاندرا و همکاران ۲۰۰۲). همچنین، کربن نه تنها رشد، بلکه تولید متابولیت‌های ثانویه در محیط کشت را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد. برای مثال، استفاده از فروکتوز به جای ساکارز تولید کاتارانتین را در گیاه پیروش به میزان دو برابر افزایش داد (جانگ و همکاران ۱۹۹۲). با این حال، نرخ رشد تا حدود ۴۰ درصد کاهش یافت. بنابراین، یک سیستم دو مرحله‌ای مورد استفاده قرار گرفت به گونه‌ای که در ابتدا، ریشه‌ها در ساکارز رشد کردند، سپس به محیط کشت حاوی فروکتوز برای افزایش تولید متابولیت ثانویه منتقل شدند (جانگ و همکاران ۱۹۹۱). گازها، (عمدتا CO_2 ، O_2 و C_2H_4) نیز

می‌توانند در تولید متابولیت ثانویه تاثیر گذار باشند. CO_2 محصول نهایی تنفس است، اگر O_2 کافی نباشد، منجر به اسیدی شدن سیتوپلاسم می‌شود (بوکانان و همکاران ۲۰۰۰). ریشه تراریخت برخی گیاهان در افزایش CO_2 پاسخ مثبت نشان دادند، به عنوان مثال، هنگامی که ریشه توتون در مه غنی شده با CO_2 رشد داده شدند، رشد آن‌ها سریع تر از ریشه های رشد کرده در هوای معمولی بود (ویسلوزیل و همکاران ۲۰۰۰). سینگ و همکاران (۱۹۹۸) گزارش کردند که زمانی که ریشه‌ی گیاه *Hyoscyamus muticus hairy* با متیل جاسمونات تیمار شدند، تولید سزکوئی ترپن افزایش می‌یابد. نور نیز نقش مهمی در رشد و تولید متابولیت ثانویه دارد. در گیاه داتوره تولید بیومس ریشه‌های تراریخت رشد یافته در برابر نور، به میزان دو برابر افزایش یافت (تایا و همکاران ۱۹۹۲) مقدار آلکالوئید ریشه‌های تراریخت و طبیعی گیاه *Hyoscyamus albus was* در برابر نور، رشد بیشتری داشت. (سائورین و همکاران ۱۹۹۲). بسیاری از متابولیت‌های ثانویه سمی هستند و از این رو، به برخی از سکوسترین‌ها نیاز دارند، که اغلب با اتصال این ترکیب‌ها با قند، سموم خنثی می‌شوند (دانلوپ و کرتیس ۱۹۹۱). کاهش غلظت کلسیم در محیط کشت B5 باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز گردید و در مقابل رشد ریشه‌های تراریخت کاهش یافت (تایا و همکاران ۱۹۹۴).

۲-۳- استفاده از نانوکربن‌ها در کشت بافت

گزارش‌های سمیت نانومواد کربنی برای طیفی از گونه‌های گیاهی منتشر شده است اما به علت شرایط آزمایشی و گونه‌های گیاهی مختلف، نتایج متناقضی حاصل شده است. در این که درجه بالای عامل‌دار کردن (Functionalization) نانولوله‌های کربنی سبب کاهش چشمگیر اثرات سمی آن‌ها می‌شود، اجماع همگانی وجود دارد. برای مثال، کاناس و همکاران (۲۰۰۸)، اثرات نانولوله‌های کربنی عامل‌دار و غیرعامل‌دار را بر طویل شدن ریشه شش گونه گیاهی (کلم، هویج، خیار، کاهو، پیاز و گوجه‌فرنگی) مطالعه کردند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که سمیت گیاهی نانولوله‌های کربنی غیرعامل‌دار

بیشتر از نوع عامل دار است. ضمناً با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM^۱ مشخص شد که نانولوله‌های کربنی روی سطح ریشه جذب می‌شوند اما در گیاه تجمع نمی‌یابند. استامپولیس و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که کاربرد نانولوله‌های کربنی چند دیواره با غلظت ۱ گرم در لیتر در شرایط کشت آبکشت اثری بر میزان جوانه‌زنی کدوی سبز (*C. pepo*) نداشت، اما باعث کاهش ۶۰ درصدی زیست‌توده (BioMass) نسبت به شاهد گردید. لیو و همکاران (۲۰۱۰) دریافتند که Fullerene موجب مهار طویل شدن ریشه در آرابیدوپسس و القاء زمین‌گرایی غیرنرمال ریشه گردید. لین و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که C70 و نانولوله کربنی چند دیواره با منشأ مواد آلی طبیعی، سبب تأخیر یک ماهه گل‌دهی در برنج می‌شوند، که حکایت از تداخل نانومواد کربنی با جذب آب و مواد غذایی دارد. لیو و همکاران (۲۰۱۳) تغییر دیواره سلولی گیاه توتون (*Nicotiana tabacum L*) در معرض کربوکسی فولرن‌های محلول در آب را بررسی کردند. رسوب این نانومواد روی دیواره سلولی منجر به مهار رشد سلول و اختلال در دیواره و غشای سلولی شد. با این مطالعه شواهد مستقیمی از تغییر ترکیب دیواره سلولی سلول‌های زنده گیاهی توسط فولرن‌ها به دست آمد. آواناسی و همکاران (۲۰۱۴) نیز با استفاده از محلول‌های C60 نشان‌دار با کربن 14 (C14)، جذب خاکی، تجزیه و جذب گیاهی فولرن را بررسی کردند. آن‌ها نشان دادند که C60 آزادشده در محیط، خیلی در دسترس زیستی گیاهان نیست (حدود ۷ درصد)، اما ممکن است بیش از یک سال در خاک ماندگاری داشته باشد. طبق گزارش بگوم و همکاران (۲۰۱۱)، اعمال گرافن در مقایسه با شاهد (عدم اعمال آن) به‌طور محسوسی از رشد گیاهان و تولید زیست‌توده در گیاهان (کلم، گوجه‌فرنگی، اسفناج قرمز و کاهو) جلوگیری کرد. سازوکار این سمیت گیاهی شامل استرس اکسیداتیو بود. از طرف دیگر، اثر مثبت نانومواد کربنی بر گیاهان نیز گزارش شده است. برای مثال، میرالس و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که غلظت ۲۵۶۰ میلی‌گرم در لیتر نانولوله کربنی چنددیواره سبب افزایش جوانه‌زنی و طویل شدن ریشه گندم و یونجه می‌شود. در برخی از گونه‌های

^۱ -Scanning Electron Microscope

گیاهی تأیید شده است که نانوذرات در غلظت های کم ایمن هستند و قادر به افزایش فتوسنتز و متابولیسم نیتروژن می باشد و بنابراین می توانند رشد گیاه را بهبود بخشند (کلین و همکاران، ۲۰۰۸). تاکنون مطالعات زیادی در زمینه تاثیر کاربرد نانوکربن MWCNT در گیاهان صورت گرفته است. ولی تاکنون مطالعه ای در گیاه شیرین بیان و بر تولید ریشه های تراریخت آن انجام نشده است. در تحقیقی دیگر تیواری و همکاران (۲۰۱۴) در نتایج خود فرایند تأثیر نانولوله های کربنی را این طور بیان کردند که استفاده از مقدار کم نانولوله های کربن می تواند باعث بهبود و افزایش عملکرد جذب آب، بیوماس گیاهی و جذب بهتر و بیشتر عناصر شود. آنان همچنین با بررسی تصاویر تهیه شده به وسیله میکروسکوپ الکترونی نشان دادند که نانولوله های کربنی چند جداره (SEM) از لایه های سخت پوسته بذر عبور کرده و (MWCNTs) راه رسیدن و جذب آب را هموار می کنند. نتایج خداشاوا و همکاران، (۲۰۱۲) نشان داد. که نانولوله کربنی چند جداره در غلظت ۵ تا ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر می تواند ۵۵ تا ۶۴ درصد سرعت رشد سلول های تنباکو را افزایش دهد، این در حالی است که کربن فعال در غلظت ۵ میکروگرم در میلی لیتر تنها ۱۶ درصد رشد سلول ها را افزایش داد. اگر غلظت کربن فعال به ۱۰۰ تا ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر برسد رشد سلول به شدت کاهش می یابد.

۲-۴- القای ریشه های تراریخت در شیرین بیان

تیونن و رزکویست در سال ۱۹۹۵، با استفاده از آگروباکتریوم سویه C58C18 دارای پلاسمید Ri در گیاه *Glycyrrhiza glabra* ریشه تراریخت تولید کردند. در این تحقیق اسید گلیسیریزیک قابل توجهی تشخیص داده نشد (تیونن و رزکویست، ۱۹۹۵). لی و همکاران در سال ۲۰۰۰، با ایجاد ریشه های تراریخت در گیاه *G. glabra* توانستند چندین ترکیب (فلاونوئیدی) را مشخص کنند. کوالنکو و همکاران (۲۰۰۰) پروتوپلاست گیاه *G. glabra* را با آگروباکتریوم ریزوژنز سویه AR15834 تلقیح کردند پس از القاء ریشه های تراریخت در *G. glabra*، مقدار ترکیبات فنولی دو برابر بیشتر از سلول های غیرتراریخت گزارش شد. شبانی و همکاران (۲۰۰۹) با کشت درون شیشه ای گیاهچه های

شیرین بیان، مقدار تولید اسید گلیسیریزیک در ریشه های معمولی بدست آمده از گیاهچه‌ها، را بر اثر تیمار با متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک بررسی کردند. بیشترین مقدار گلیسیریزین تولید شده در این تحقیق بر اثر تیمار با اسید سالیسیلیک گزارش شد. در آزمایشی دیگر که توسط شیرازی و همکاران در سال ۱۳۹۱ انجام شد از سویه AR15834 برای القای ریشه تراریخت در گیاه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabr L*) استفاده شد و این سویه باعث القای ریشه تراریخت در این گیاه شد (شیرازی و همکاران، ۲۰۱۲)، تحقیقات چن و هودو (۱۹۹۱) و مهروترا و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد بهترین ریز نمونه‌ها جهت القای ریشه تراریخت کوتیلدون و هیپوکوتیل و برگ می‌باشد. شجاعی و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای تاثیر ژن‌های rol به خصوص ژن rolB در ریشه‌زایی سه گیاه سرخارگل، سنبل الطیب و رازیانه را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج بدست آمده نشان داد که بهترین ریشه‌زایی در گیاه سنبل الطیب و در شرایط کشت ریزنمونه‌های برگی در محیط کشت جامد MS صورت گرفت و تلقیح باکتری بر روی گیاهچه‌های کامل تاثیری در القای ریشه‌زایی نداشت. در این تحقیق از سویه LBA4404 حامل هر سه ژن rolA، rolB و rolC و سویه A985 به عنوان شاهد مثبت، اگروباکتریوم حامل ژن rolB (A847) و اگروباکتریوم حامل وکتور خالی (A826) به عنوان شاهد منفی استفاده شد. نتایج نشان داد در گیاه رازیانه ریزنمونه‌های برگی آغشته به باکتری‌های A985 و A847 بعد از گذشت ۵ تا ۷ روز زرد و از بین رفتند. در ریزنمونه‌های سرخارگل تنها سویه A985 قادر به ریشه‌زایی بود. در گیاهان سنبل الطیب و دو هفته پس از آلودگی با سویه A985 ریشه‌های تراریخت تولید شد. در پژوهشی کبیر نتاج و همکاران (۲۰۱۳) از سویه‌های 11325، A4، A13 و 15834 برای القای ریشه تراریخت در گیاه کاسنی (*Cichorium intybus L.*) در سه محیط MS، LS و B5 استفاده کردند. نتایج آنان داد که اگرچه هر سه سویه موفق به القای ریشه تراریخت شدند، ولی سویه A13 و محیط MS بالاترین درصد تراریختی (۶۳/۱۵ درصد) را نشان دادند. سویه 11325 تنها موفق به ایجاد کالوس در محل زخم شد و درصد ریشه‌زایی در آن صفر بود، در حالی که سویه‌های 15834 و A4 به ترتیب به میزان ۱۸/۲ و ۳۶/۴۷ درصد موفق به ریشه‌زایی در نمونه‌ها شدند. در میان محیط‌های کشت مختلف MS با تولید ۴۵/۳۴

درصد بهترین ترکیب برای ریشه‌زایی در کاسنی معرفی گردید. در حالی که محیط LS با تولید ۳۵/۹۴ و محیط B5 با تولید ۲۲/۲۲ درصد کمترین میزان ریشه‌زایی را نشان دادند (کبیرنتاج و همکاران، ۲۰۱۳). در گیاه *Karel Perovskia abrotanoides* برای اولین بار تولید ریشه تراریخت و تاثیر استوسرینگون در آن مورد مطالعه قرار گرفت. در این پژوهش از سه سویه‌ی R1000، TR105 و ATCC15834 در دو حالت کاربرد و عدم کاربرد ماده استوسرینگون استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که بیشترین میزان تولید ریشه‌ی تراریخت پس از آلودگی با سویه ATCC15834 به دست آمد (۴۷/۳۳ درصد). سویه‌های R1000 و TR105 به ترتیب با ۳۸/۱۶ و ۲۸/۹۹ درصد موجب القای ریشه‌های تراریخت گردیدند. استفاده از استوسرینگون در سویه‌ی ATCC15834 تولید ریشه‌های تراریخت را به طرز معنی داری افزایش داد (۶۰/۹۹ درصد). در سویه‌های R1000 و TR105 نیز استفاده از استوسرینگون موجب تقویت تولید ریشه‌های تراریخت (به ترتیب ۴۹/۴۹ و ۳۶/۳۳ درصد) گردید (ابراهیمی و همکاران، ۲۰۱۵).

فصل سوم

مواد و روش‌ها

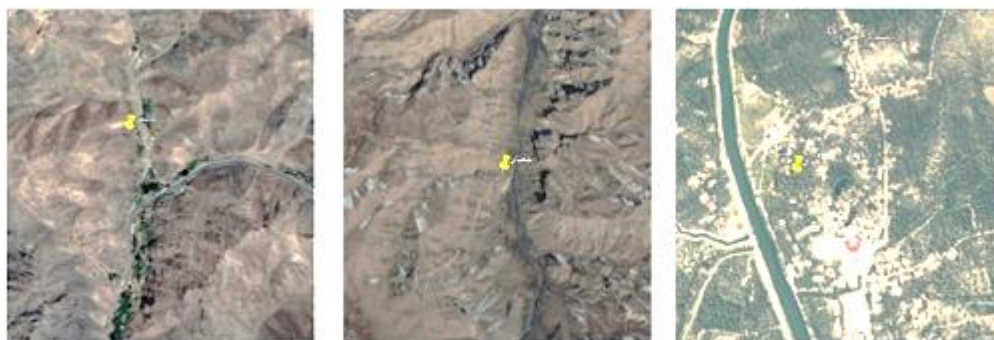
۳-۱- محل و زمان اجرای پژوهش

این پژوهش با هدف سنجش میزان گلسیریزیک اسید در ریشه‌های سه اکوتیپ گیاه شیرین بیان، تحت تأثیر الیسیتورهای فسفر و نانوکربن در قالب آزمایش فاکتوریل برپایه‌ی طرح پایه‌ی کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه صنعتی شاهرود در سال تحصیلی ۱۳۹۶-۱۳۹۷ انجام شد.

۳-۲- مواد مورد استفاده

۳-۲-۱- مواد گیاهی

بذور گیاه شیرین بیان از سه منطقه کاشمر با مختصات جغرافیایی (۶۳۳۱۱۹,۶۴ شرقی و ۳۹۱۹۳۶۶,۵۹ شمالی)، جغتای با مختصات جغرافیایی (۵۰۷۹۴۷,۶۳ شرقی و ۴۰۴۷۱۴۹,۲۴ شمالی) و منطقه مسیب واقع در شهر کربلا با مختصات جغرافیایی (۴۳۵۸۴۸,۳۷ شرقی و ۳۶۲۷۷۹۳,۷۴ شمالی) جمع آوری (شکل ۳-۱) و جهت شناسایی به آزمایشگاه گیاهشناسی جهاد دانشگاهی شهرستان کاشمر منتقل و بعد از شناسایی به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود منتقل شد.



شکل ۳-۱: محل جمع آوری نمونه بذر گیاه شیرین بیان الف: عراق ب: جغتای ج: کاشمر

۳-۲-۲- باکتری

در این تحقیق دو سویه باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز A13 و AR15834 مورد بررسی قرار گرفتند و پس کسب نتایج، به دلیل عدم تولید ریشه توسط سویه A13، تنها از سویه AR15834 که از پژوهشگاه بیوتکنولوژی تهیه شده بود، استفاده گردید.

۳-۳- تهیه محیط کشت‌های گیاهی و باکتریایی مورد استفاده

۳-۳-۱- تهیه محیط کشت گیاهی

محیط‌های کشت مورد استفاده برای کشت بذور شامل، کاغذ صافی مرطوب، کشت محیط MS^۱ (موراشیگ و اسکوگ ۱۹۶۲) بود که در مراحل مختلف تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند.

۳-۳-۱-۱- تهیه محلول‌های ذخیره^۲ عناصر پرمصرف

نمک‌های پرمصرف در غلظت‌های ۱۰ برابر نسبت به غلظت نهایی خود تهیه شدند. به این صورت که برای تهیه محلول مادری از عناصر ماکرو، میزان هر نمک (مطابق جدول ۳-۱) به صورت جداگانه وزن و داخل بشر ریخته شد و سپس و در آب مقطر حل شدند. محلول مادری تهیه شده، در یخچال نگهداری شد، برای نمک‌های کلسیم محلول جداگانه‌ای (طبق جدول ۳-۱) جهت جلوگیری از رسوب آن ساخته شد.

^۱ Murashige and SKoog (1962)

^۲ stock

جدول ۳-۱: غلظت نمک‌های پر مصرف محیط کشت پایه MS (mg/l)

نمک	مقدار (میلی‌گرم) 10X
NH ₄ NO ₃	۱۶۵۰
KH ₂ PO ₄	۱۷۰
MgSO ₄ . 7H ₂ O	۳۷۰
CaCl ₂ . 2H ₂ O	۴۴۰
KNO ₃	۱۹۰۰

۳-۳-۱-۲-تهیه محلول ذخیره عناصر کم مصرف

محلول‌های عناصر کم مصرف به طور معمول ۱۰۰ برابر غلظت نهایی محیط کشت تهیه شدند. برای تهیه محلول مادری نمک‌های میکرو، نمک‌ها مطابق جدول ۳-۲ وزن شدند و جداگانه در آب مقطر حل گردیدند و در پایان محتویات تمام بشرهای حاوی نمک‌ها به یک بشر منتقل شد و با افزودن آب مقطر به حجم رسانده شد و سپس در یخچال نگهداری گردید.

جدول ۳-۲: غلظت نمک‌های کم مصرف محیط کشت پایه MS (mg/l)

نمک	مقدار (میلی‌گرم) 100X
CuSO ₄ . 5H ₂ O	۰/۰۲۵
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	۸/۶
KI	۰/۸۳
COCl ₂ . 6H ₂ O	۰/۰۲۵
H ₃ BO ₃	۶/۲

۳-۳-۱-۳-تهیه محلول ذخیره آهن

محلول مادری آهن با غلظت ۱۰۰ برابر تهیه شد (X ۱۰۰). از هر یک از مواد Na₂EDTA و FeSO₄ 7 H₂O مقادیر مشخصی مطابق جدول ۳-۳ بطور جداگانه وزن شد و در آب مقطر حل گردید. در نهایت هر محلول جداگانه به حجم رسانده شد. محلول تهیه شده با فویل آلومینیومی پوشیده شد تا در برابر نور تجزیه نگردد. در پایان محلول حاصل در یخچال ذخیره شد.

جدول ۳-۳: غلظت آهن محیط کشت پایه MS (mg/l)

نمک	مقدار (میلی‌گرم) 100x
FeSO ₄ .7H ₂ O	۲۷/۸
Na ₂ EDTA	۳۷/۳

۳-۳-۱-۴- تهیه محلول ذخیره ویتامین‌ها

ویتامین‌ها در غلظت‌های ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر به صورت محلول ذخیره تهیه گردیدند و در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) تا هنگام مصرف نگهداری شدند. مقادیر هر یک از ویتامین‌ها مطابق جدول ۳-۴ در آب مقطر حل و در نهایت به حجم نهایی رسانده شدند.

جدول ۳-۴: غلظت ویتامین‌های محیط کشت پایه MS (mg/l)

ویتامین	مقدار (میلی‌گرم) 100x
Glycine	۲
Nicotinic acid	۰/۵
Pyridoxine	۰/۵
Thiamine	۰/۵

۳-۳-۱-۵- تهیه محلول‌های ذخیره تنظیم‌کننده‌های رشد

تمام تنظیم‌کننده‌های رشد، در آب محلول نیستند. برای تهیه محلول‌های ذخیره تنظیم‌کننده-های اکسین IAA و NAA، مقدار ۰/۰۵ گرم به طور جداگانه در مقدار کمی حلال (۱ نرمال) NaOH حل گردید، سپس به آرامی تا حجم ۵۰ سی‌سی، به آن آب اضافه شد.

۳-۱-۵- تهیه یک لیتر محیط کشت

برای تهیه یک لیتر محیط کشت MS جهت جوانه‌زنی بذر، ابتدا مقداری آب مقطر (۱۰۰۰ میلی‌لیتر) در داخل ارلن ریخته شد، سپس ترکیبات مورد نیاز (عناصر ماکرو، میکرو و ویتامین‌ها) افزوده شدند. پس از اضافه کردن ۳۰ گرم ساکارز و ۱۰۰ میلی‌گرم میواینوزیتول، در محیط‌های حاوی ۲ گرم بر لیتر زغال فعال، محلول به حجم نهایی رسانده شد. جهت تنظیم pH محیط کشت به ۵/۸ از NaOH و HCL یک نرمال استفاده شد. مقدار مصرف آگار برای یک لیتر محیط ۷ تا ۸ گرم است. در این آزمایش، ۸ گرم آگار وزن شد و به محیط کشت افزوده شد. محیط کشت جهت استریل شدن در داخل اتوکلاو قرار گرفت. زمان لازم برای سترون کردن بستگی به حجم محیط کشت درون ظرف کشت دارد. مواد ناپایدار در برابر گرما باید با فیلتر، سترون شوند. در نهایت محیط کشت درون لوله‌های کشت توزیع شد.

۳-۲-۳- تهیه محیط کشت باکتری

از محیط کشت جامد و مایع LB برای کشت باکتری استفاده شد، که محیط کشت اختصاصی باکتری، محسوب می‌شود (سمبروک و همکاران، ۱۹۸۹). به منظور نگهداری کوتاه مدت و واکشت باکتری‌ها از محیط کشت LB جامد استفاده شد. برای کشت سوسپانسیون باکتری، از کشت‌های جامد، تک کلونی گرفته شد و در محیط LB مایع کشت گردید. برای تهیه یک لیتر محیط LB، بعد از اضافه کردن ترکیبات بر اساس جدول ۳-۵ pH محیط با سود یک نرمال روی عدد ۷ تنظیم شد و در صورت نیاز به محیط کشت LB جامد، ۱۵ گرم در لیتر آگار (بعد از تنظیم pH) اضافه شد. محیط تهیه شده اتمسفر اتوکلاو گردید. به منظور رشد گزینشی آگروباکتریوم رایزوژنز، پس از خنک شدن محیط، ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی بیوتیک ریفامپسین^۱ در متانول حل شد و به محیط کشت اضافه گردید.

^۱ Rifampicini

جدول ۳-۵: ترکیبات مورد نیاز، برای تهیه یک لیتر محیط کشت LB

اجزاء محیط کشت	غلظت (گرم در لیتر)
عصاره مخمر	۵
تریپتون	۱۰
کلرید سدیم	۱۰

۳-۴- تهیه سوسپانسیون باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز

برای تهیه کشت سوسپانسیونی، یک کلونی از باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز، سویه AR15834، کشت شده در محیط کشت جامد LB در شرایط استریل انتخاب شد و در ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع LB دارای ۵۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک ریفامپسین، کشت داده شد. در مرحله بعد محیط LB مایع آلوده شده به باکتری، به اتاق رشد با دمای ۲۸ درجه سانتیگراد منتقل گردید و روی شیکر با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت در شرایط تاریکی قرار گرفت، تا باکتری رشد کند و فعال شود. بعد از سپری شدن این مدت، غلظت سوسپانسیون باکتری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در $OD=600$ تعیین شد. برای تراریختی، OD محیط در طول موج ۶۰۰ نانومتر بین ۰/۵ تا ۱ تنظیم گردید و سپس برای تلقیح ریزنمونه های گیاهی، مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۵- تهیه محلول ذخیره آنتی بیوتیک و دیگر ترکیبات مورد نیاز جهت تراریختی

به منظور تهیه ذخیره آنتی بیوتیک ریفامپسین، ۵۰ میلی گرم از پودر آنتی بیوتیک در یک میلی لیتر آب مقطر حل و استوک تهیه شده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید. آنتی بیوتیک مورد نظر در حالی که دمای محیط کشت LB اتوکلاو شده تا حدود ۶۰ درجه سانتیگراد سرد شده بود به آن افزوده شد. غلظت آنتی بیوتیک در محیط کشت باید ۵۰ میلی گرم در لیتر باشد.

برای کسب این غلظت، به ازای هر لیتر محیط کشت، یک میلی لیتر از استوک آنتی بیوتیک با آن مخلوط شد.

۳-۵-۱- محلول استوک آنتی بیوتیک سفوتاکسیم^۱

مقدار ۵۰۰ میلی گرم از این ماده در ۵ میلی لیتر آب دیونیزه حل و سپس از فیلتر استریل عبور داده شد.

۳-۵-۲- محلول استوک استوسرینگون^۲

برای تهیه این محلول ۵۰ میلی گرم از این ترکیب در یک میلی لیتر آب مقطر استریل حل شد. سپس این محلول توسط فیلتر ۰٫۲۲ میکرون فیلتر شده و در فریزر ۲۰- درجه حداکثر تا یک ماه نگهداری شد.

۳-۶- تهیه محلول ذخیره نانوکربن

نانوکربن MWCNTs-COOH از شرکت نانو پیشگام واقع در شهرستان مشهد تهیه شد (پیوست شماره ۱)، جهت تهیه استوک حاصله ابتدا ۲ گرم از این ماده وزن شد و سپس درون یک لیتر آب مقطر استریل ریخته بعد از آن، محلول به مدت ۶۰ دقیقه و دمای ۳۰ درجه و فرکانس ۸۰ کیلوهرتز اولتراسونیک^۳ شد.

۳-۷- زغال فعال

در این پژوهش زغال فعال مورد نظر از شرکت سیگما تهیه شد و به ازای هر لیتر محیط کشت ۲ گرم زغال فعال استفاده شد.

^۱ Cefotaxime

^۲ Acetosyringone

^۳ Ultrasonic

۳-۸- سترون کردن وسایل و محیط کشت

کلیه شیشه‌های حاوی محیط کشت و وسایل مورد نیاز مانند ظروف آب مقطر، تیغ، اسکالپل، پنس و پتری دیش توسط اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه سترون شدند. قبل از شروع کشت، سطح کار هود با الکل ۷۰ درصد تمیز و سپس با استفاده از لامپ UV به مدت ۲۰ دقیقه سترون گردید. مراحل کشت در زیر هود لامینار و سترون کردن مداوم آن‌ها در زیر هود با الکل ۷۰ درصد انجام شد.

۳-۹- ضدعفونی بذور

ابتدا بذور با آب مقطراستریل شسته شدند و بعد با آب مقطر استریل، به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد (۷/۷) قرار گرفتند و بعد از شستشوی مجدد با آب مقطر استریل، به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت ۵ درصد (۷/۷) قرار داده شدند. در نهایت شستشوی بذور سه بار با آب مقطر استریل (هر بار یک دقیقه) انجام گرفت (بیس و همکاران، ۲۰۰۰).

۳-۱۰- بررسی اثر تیمارهای شیمیایی بر جوانه زنی بذور اکوتیپ‌های شیرین بیان

بذور شیرین بیان دارای خواب بذر ناشی از پوسته سخت بذر می‌باشند و جوانه زنی طبیعی در این بذور پایین است. بنابراین برای جوانه زنی مطلوب، لازم است در ابتدا (با استفاده از روش‌های فیزیکی و یا شیمیایی) خواب بذر ناشی از این پوسته را از بین برد. با توجه به سختی پوسته بذور شیرین بیان از اسید سولفوریک (شرکت مرک) به منظور خراش دهی استفاده شد. ابتدا بذور به مدت ۴۰ دقیقه در پیش تیمار اسید سولفوریک ۷۰ و ۹۸ درصد (نمونه شاهد در آب مقطر) قرار داده شدند. بعد از آن درون آب مقطر ریخته و پس از شستشو روی کاغذ صافی خشک شدند.

۳-۱۱- بررسی اثر جوانه‌زنی در محیط‌های مختلف

بذور پس از شستشوی مجدد با آب مقطر استریل، و بعد از جذب آب اضافی اطراف بذور با استفاده از کاغذ صافی، به زیر هود منتقل و پس از ضد عفونی درون پتری کشت شدند.

۳-۱۱-۱- کشت بذور روی کاغذ صافی

پس از استریل شدن کاغذ صافی درون اتوکلاو، کشت بذور روی آن انجام شد. بعد از آن آب مقطر استریل درون هر پتری به مقدار مساوی ریخته شد.

۳-۱۱-۲- کشت بذور روی محیط جامد MS

پس از ریختن محیط جامد MS استریل درون پتری اتوکلاو شده کشت بذور روی آن انجام گردید.

۳-۱۱-۳- صفات اندازه‌گیری شده در این آزمایش

در این آزمایش صفاتی چون زمان شروع جوانه زنی بذور، درصد جوانه زنی بذور و اطلاع از آلودگی یا عدم آلودگی گیاهان مورد نظر، به صورت ثبت روزانه اندازه‌گیری گردید. همچنین نتایج حداکثر جوانه زنی (GMX^۱) بذور شیرین بیان طبق فرمول بدست آمد.

$$GMX = \frac{\text{تعداد کل بذور جوانه‌زده (در آخرین روز شمارش)}}{\text{تعداد بذور}} \times 100$$

^۱ Germinated seeds

۳-۱۲-۱- کشت بذور شیرین بیان در محیط‌های کشت متفاوت MS

۳-۱۲-۱-۱- کشت بذور در محیط جامد

دهانه لوله های آزمایش با پنبه و فویل بسته شد، بعد از اتوکلاو در زیر هود لامینار درون هر لوله ۱۰ ml محیط کشت استریل جامد ریخته و بعد از آن کشت بذور انجام گردید.

۳-۱۲-۲- کشت مایع

ابتدا کاغذ صافی‌هایی به طول ۲۰ سانتی‌متر و عرض ۱ سانتی‌متر تهیه شد سپس به شکل M تا گردیدند و به کمک لوپ در انتهای لوله‌های آزمایش قرار داده شدند و دهانه لوله‌ها با پنبه و فویل بسته و درون اتوکلاو قرار گرفتند و پس از اتمام استریل شدن، درون هر لوله ۱۰ ml محیط MS بدون آگار ریخته شد و بعد از آن بذور استریل در وسط خط تالی کاغذ صافی قرار داده شد.

۳-۱۲-۳- کشت درون هیدروژل

ابتدا درون هر لوله آزمایش ۱۰ ml محیط کشت MS بدون آگار ریخته شد. سپس ۱۰۰ میلی گرم هیدروژل پتاسیمی (تهیه شده از شرکت آتیه انرژی تهران) به آن اضافه گردید. سپس محیط به مدت ۲ دقیقه ورتکس شد. دهانه لوله با پنبه و فویل بسته شدند. درون اتوکلاو استریل گردیدند تا کشت بذور روی بستر هیدروژل درون لوله انجام شود.

۳-۱۲-۴- اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیک و مورفولوژیک

در ۱۴ روز بعد از کشت بذور، صفات فیزیولوژیک و مورفولوژیک گیاهچه‌های تولید شده

اندازه‌گیری گردیدند. این صفات شامل شامل: تعداد برگ، قطر ساقه و ریشه، طول ساقه و ریشه، وزن خشک و تر ریشه، تعداد ریشه جانبی و قند احیا کننده، میزان فنول، فلاونوئید و اسید گلیسیریزیک (توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UNICO) بودند.

۳-۱۲-۴-۱- استخراج عصاره

استخراج عصاره طبق روش تغییر یافته همتی و همکاران (۱۳۹۴) صورت گرفت به این صورت که پس از خشک شدن نمونه‌ها در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، نمونه‌ها پودر شدند. به ازای ۵۰۰ میلی‌گرم نمونه‌ی پودر شده ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به آن اضافه گردید و به مدت ۸ ساعت روی شیکر قرار داده شد و پس از صاف شدن میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئید کل به‌صورت زیر اندازه‌گیری شد.

۳-۱۲-۴-۲- اندازه‌گیری فنل کل

برای اندازه‌گیری فنل کل ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی با پنج میلی‌لیتر فولین سیوکالتیو به نسبت (۱ به ۱۰ رقیق شده با آب مقطر) مخلوط گردید. سپس به آن ۴ میلی‌لیتر کربنات سدیم یک مولار اضافه شد. برای شاهد بجای عصاره، تنها از متانول استفاده شد و بعد فولین سیوکالتیو و کربنات سدیم اضافه گردید. جذب محلول فوق بعد از قرار گرفتن در تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه و حمام بخار ۴۰ درجه سانتی‌گراد، در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد (سلینکارد و سینگلتن ۱۹۷۷). برای رسم منحنی کالیبراسیون از غلظت‌های متفاوت استاندارد گالیک‌اسید استفاده شد و بر طبق معادله خط $y = 0.0055x - 0.0029$ محاسبه شد.

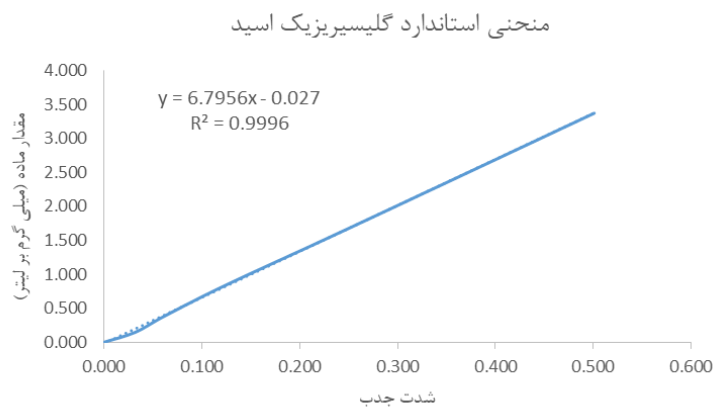
۳-۱۲-۴-۳-اندازه‌گیری فلاونوئید کل

به این منظور ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد در اتانول (۱۰ گرم آلومینیوم کلرید در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول)، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شدند. برای تهیه شاهد به جای عصاره متانولی، تنها از متانول خالص استفاده شد. سپس مخلوط در نیم ساعت تاریکی قرار داده شده و سپس جذب آن بلافاصله در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت شد (چان و همکاران ۲۰۰۲). جهت تعیین میزان فلاونوئید کل از منحنی استاندارد استفاده شد. به این منظور غلظت‌های مختلفی از کوئرستین تهیه و بعد از خوانده شدن عدد جذب، منحنی استاندارد رسم شد. از معادله خط بدست آمده از منحنی استاندارد جهت تعیین غلظت فلاونوئید کل استفاده گشت و بر طبق معادله خط $y = 0.0007x - 0.0053$ محاسبه شد.

۳-۱۲-۴-۴-اندازه‌گیری محتوای اسید گلیسیریزیک

برای سنجش میزان اسید گلیسیریزیک از روش تغییر یافته جفری و همکاران (۱۹۸۳) و اسلینکارد و سینگلتن (۲۰۰۸) استفاده گردید به این صورت که ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم از ریشه‌های خشک شده گیاه در دمای ۷۰ برداشته شد و پس از پودر شدن، ۲ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد اضافه شد تیوپ‌ها به مدت ۸ ساعت در حمام آب گرم و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. و محلول روئی جدا و شدت جذب در طول موج ۲۵۴ نانومتر، با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. با استفاده از منحنی استاندارد این ماده، غلظت گلیسیریزین محاسبه گردید. برای رسم منحنی استاندارد مقدار ۱۰ میلی‌گرم از پودر نمک آمونیوم گلیسیریزیک اسید با متانول ۸۰ درصد به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. بنابراین، محلول استاندارد با غلظت یک میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر تهیه گردید (شبانی و همکاران ۲۰۰۹). سپس، از این محلول

استانداردهایی با غلظت‌های ۱۰/۵، ۲۱، ۴۲، ۸۳ و ۱۶۷ میلی‌گرم در لیتر تهیه شدند و شدت جذب محلول‌های استاندارد و نمونه‌های گیاهی در طول موج ۲۴۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر خوانده شد و منحنی جذب بر حسب غلظت رسم شدند.



۳-۱۲-۴-۵- اندازه‌گیری محتوای قندهای احیا

میزان قندهای احیا در گیاهچه با روش نلسون و سومیگی (۱۹۵۲) اندازه‌گیری شد. مقدار ۰/۰۲ گرم بافت تر گیاهچه در ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر ساییده شد. سپس، محتوای هاون به بشر کوچکی منتقل شد تا عصاره گیاهی بدست آید. شدت جذب محلول‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و با منحنی استاندارد، غلظت قندهای احیا در نمونه‌های مختلف بر حسب میلی‌گرم در لیتر محاسبه شد.

۳-۱۳- شرایط اتاق رشد

بذور کشت شده در دمای ۲۳ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در دستگاه فیتوترون تحت نور فلورسنت سفید با ۱۴ ساعت دوره نوری و ۱۰ ساعت دوره تاریکی نگه‌داری شدند.

۳-۱۴- بهینه سازی رشد ریشه تحت تیمارهای هورمونی NAA و IAA اکوتیپ‌های مختلف

گیاه شیرین بیان

به منظور بررسی تاثیر هورمون‌های NAA و IAA از محور ریشه قطعاتی به اندازه ۱۰ میلی‌متر و در محیط کشت MS تغییر یافته حاوی ترکیب‌های هورمونی NAA با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و IAA با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر شدند. در این آزمایش صفاتی چون تعداد ریشه جانبی، طول و قطر ریشه، وزن تر و خشک ریشه و همچنین میزان اسید گلیسیریزیک با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید.

۳-۱۵- بررسی اثر فسفر و نانوکربن بر صفات فیزیولوژیک و مورفولوژیک اکوتیپ‌های

مختلف گیاه شیرین بیان

به منظور بررسی رفتار مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاهچه‌های اکوتیپ‌های مختلف شیرین‌بیان تحت تیمارهای فسفر و نانو، به محیط کشت MS جامد تغییر یافته تیمارهای فسفر با غلظت ۰، ۲/۲ و ۳ گرم در لیتر و نانوکربن MWCNT با غلظت ۰، ۱۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم اضافه گردید. پس از ۱۴ روز از کشت بذور در لوله‌های آزمایش، صفات فیزیولوژیک و مورفولوژیک گیاهچه‌های حاصل اندازه‌گیری شدند. این صفات شامل: تعداد برگ، قطر ساقه و ریشه، طول ساقه و ریشه، وزن خشک و تر ریشه، تعداد ریشه جانبی و اسید گلیسیریزیک ریشه (توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UNICO) بودند.

۳-۱۶- القای ریشه‌های تراریخت در ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه اکوتیپ‌های

شیرین بیان در شرایط مصرف و عدم مصرف استوسرینگون

از گیاهچه‌های بدست آمده در سنین ۲ الی ۸ هفته‌ای ریز نمونه‌ی برگ، ساقه و ریشه قطعه‌های کوچک ۱-۲ سانتی متر برش داده شد و روی هر ریزنمونه ۲-۳ خراش سطحی ایجاد گردید. ریز نمونه‌های مختلف به مدت ۲۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری قرارگرفتند. بعد از حذف سوسپانسیون اضافی باکتریایی اطراف ریز نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی، ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS نیمه جامد حاوی ۲۰۰ میکرومولار استوسرینگون منتقل شدند (در محیط عدم مصرف، هیچ استوسرینگونی اضافه نشد) و به مدت ۴۸ ساعت در اتاق رشد، در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری گردیدند. تعدادی ریز نمونه نیز به عنوان شاهد به همین روش آماده گردید با این تفاوت که بجای سوسپانسیون باکتریایی به مدت ۲۰ دقیقه در آب مقطر استریل قرارگرفتند و سپس در شرایط یکسان با نمونه های تلقیحی کشت و نگهداری شدند.

۳-۱۷- القای ریشه‌های مویین تراریخت در از گیاهچه‌های چند روزه اکوتیپ‌های شیرین بیان

در شرایط مصرف و عدم مصرف استوسرینگون

ابتدا بذور شیرین بیان پس از ضد عفونی درون محیط MS کشت گردیدند. و پس از ۲ الی ۸ روز ناحیه هیپوکوتیل گیاهچه آن‌ها با تیغ خراش سطحی داده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری قرارگرفتند. بعداز حذف سوسپانسیون اضافی باکتریایی اطراف ریز نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی، ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS نیمه جامد حاوی ۲۰۰ میکرومولار استوسرینگون منتقل شدند (در محیط عدم مصرف استوسرینگونی اضافه نشد) و به مدت ۴۸ ساعت در اتاق رشد، در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. تعدادی ریز نمونه نیز به عنوان شاهد به همین روش آماده شدند با این تفاوت که بجای سوسپانسیون باکتریایی به مدت

۲۰ دقیقه در آب مقطر استریل قرار گرفتند و سپس در شرایط یکسان با نمونه های تلقیحی کشت و نگهداری گردیدند.

۱۸-۳- انتقال ریزنمونه های گیاه شیرین بیان به محیط کشت دارای آنتی بیوتیک

۴۸ ساعت بعد از هم کشتی، برای حذف باکتری، ریزنمونه ها ۲-۳ مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شدند و بر روی کاغذ صافی قرار گرفتند. بعد از حذف آب اضافی، ریز نمونه ها به محیط نیمه جامد MS دارای ۴۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم (حل شده در آب مقطر و فیلتر شده توسط فیلتر ۰/۲ میکرون) منتقل شدند. برای حذف کامل باکتری در واکشت های بعدی از غلظت های پائین تر (۱۰۰-۲۰۰-۳۰۰ میلی گرم در لیتر) سفوتاکسیم استفاده گردید. واکشت ریز نمونه ها هر ۱۰ روز یکبار انجام شد. تولید ریشه های تراریخت در این مرحله مشاهده گردید.

۱۹-۳- مشاهده ماکروسکوپی ظهور ریشه های تراریخت

بعد از انتقال نمونه ها به محیط دارای سفوتاکسیم، مشاهدات روزانه به منظور بررسی ظهور ریشه های تراریخت، در ریزنمونه های تلقیح شده با باکتری انجام شود. بعد از رشد کافی و مطلوب، نمونه ها برای آزمایشات مختلف از جمله: تایید تراریختی ریشه های ایجاد شده و مقدار تولید متابولیت های ثانویه در لاین های ریشه تراریخت و تاثیر تیمار با محرک ها مورد استفاده قرار گرفتند.

۲۰-۳- بررسی مورفولوژیکی فراوانی تولید ریشه های تراریخت

برای بدست آوردن فراوانی تولید ریشه های تراریخت در سنین مختلف تلقیح و با استفاده از ریز نمونه های متفاوت و همچنین مقایسه آن با نمونه شاهد از فرمول زیر استفاده گردید.

$$\text{فراوانی تراریختی} = \frac{\text{تعداد ریز نمونه های تلقیح شده مولد ریشه}}{\text{تعداد کل ریزنمونه های تلقیح شده}} * 100$$

۳-۲۱- نحوه اطمینان از حذف کامل باکتری

به منظور اطمینان از حذف کامل باکتری، ریشه‌ها به محیط کشت مایع بدون سفوتاکسیم منتقل شدند. همچنین مقداری از محیط مایع و ریشه‌ها برداشته شدند و در محیط LB مایع روی شیکر در اتاق رشد قرار گرفتند. پس از ۷۲ ساعت، حضور باکتری در محیط کشت بررسی شد. از ریشه‌هایی که بدون هیچ گونه آلودگی باکتریایی به رشد خود ادامه داده بودند، برای آزمایشات بعدی استفاده گردید (کومار و همکاران، ۲۰۰۶).

۳-۲۲- تأیید تراریختی ریشه‌های تراریخت شیرین بیان از طریق PCR

برای تأیید تراریختی ریشه‌های تراریخت ابتدا استخراج DNA از ریشه‌های تراریخت و طبیعی گیاه بر پایه روش ادوارد و همکاران (۱۹۹۱) به صورت زیر انجام شد:

الف- محلول‌های مورد نیاز

بافر استخراج شامل (تریس ۲۰۰ میلی‌مولار با $\text{pH}=7.5$ ، کلرید سدیم ۲۵۰ میلی‌مولار، اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید (EDTA) ۲۵ میلی‌مولار، سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۰/۵ درصد)، ایزوپروپانول. بافر TE شامل: (تریس ۱۰ میلی‌مولار با $\text{pH}=8$ ، اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید (EDTA) ۱ میلی‌مولار با $\text{pH}=8$).

ب- روش کار:

ابتدا به مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه گیاهی از محیط کشت جدا شد و بعد از شستشو با آب مقطر استریل روی دستمال کاغذی استریل خشک گردید و درون یک ویال ۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده

شد. از ریزهاون (میکروپیستیل) برای کوبیدن نمونه استفاده شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج به نمونه‌ها اضافه شد و به مدت ۱ دقیقه هم‌زده شد تا یک محلول هموزن بدست بیاید. در مرحله بعد ۱۵۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۳ مولار اضافه و به آرامی تکان داده شد. سپس به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق با سرعت ۱۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد و محلول رویی به ویال جدید منتقل گردید. سپس ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شد و به خوبی مخلوط گردید و ۱۰-۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و با سرعت ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. در مرحله شستشو به مقدار ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۸۰ درصد به آن اضافه شد و مجدداً سانتریفیوژ به مدت ۲ دقیقه در دمای ۱۳۰۰۰ rpm در دمای اتاق انجام شد. روی شناور حذف گردید و تیوپ به صورت وارونه برای مدت کوتاهی روی دستمال کاغذی قرار گرفت. سپس رسوب به طور کامل در ۲۰ میکرولیتر بافر TE حل شد.

۳-۲۳- تعیین غلظت DNA ژنومی ریشه‌ها با نانودراپ

برای بررسی کمیت DNA، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانودراپ انجام شد. در این روش در صورتی نسبت جذب نوری DNA ژنومی ریشه‌های مورد نظر بین ۲-۱/۸ باشد، نشان‌دهنده کیفیت مطلوب DNA استخراج شده است. در صورتی که نسبت جذب کمتر از ۱/۸ باشد، بیانگر وجود بیش از حد پروتئین و سایر ناخالصی‌های جاذب اشعه ماورای بنفش است.

۳-۲۴- الکتروفورز DNA ژنومی استخراج شده از ریشه‌ها

برای بررسی کیفیت DNA از نظر شکستگی رشته DNA یا وجود آلودگی RNA از الکتروفورز ژل افقی استفاده شد. برای این منظور ابتدا ژل آگارز ۱ درصد تهیه گردید و در سینی مخصوص

الکتروفورز ریخته شد. پس از خنک شدن ژل و ایجاد چاهک‌های مورد نظر، سینی حاوی ژل در تانک الکتروفورز قرار گرفت. ژل تا حدود ۰/۵ سانتی‌متر بالای آن، در بافر TAE (1X) غوطه ور شد. ۳ میکرولیتر از مارکر DNA در چاهک اول ریخته شد. سپس بارگذاری محصولات DNA در چاهک‌های بعدی انجام شد. برای هر نمونه ۵ میکرولیتر از محصول استخراج DNA همراه با ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری در چاهک‌ها جداگانه تزریق شد. تانک به دستگاه تأمین‌کننده جریان الکتریکی با ولتاژ ۷۰ ولت متصل گردید. پس از یک ساعت، ژل در دستگاه عکسبرداری از ژل^۱ قرار داده شد و به وسیله اشعه ماورای بنفش مشاهده گردید.

۳-۲۴-۱-تهیه بافر TAE(1X)

ابتدا ۲۴۲ گرم تریس در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد، سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر Na-EDTA نیم مولار با pH=۸ به آن اضافه شد در نهایت ۵۷/۱ میلی‌لیتر استیک اسید به آن اضافه گردید و به کمک آب مقطر حجم نهایی محلول به یک لیتر رسانده شد (این محلول بافر TAE (50x) است). با افزودن ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر به هر ۲۰ میلی‌لیتر این محلول، بافر TAE (1x) به دست می‌آید که برای انجام الکتروفورز^۲ قابل استفاده است.

۳-۲۵-تهیه ژل آگارز برای الکتروفورز محصولات PCR

برای تهیه ژل ۱ درصد، ۰/۳ گرم آگارز وزن شد و در ۳۰ میلی‌لیتر بافر TAE (1X) حل شد. آگارز به وسیله حرارت مایکروفر در بافر حل گردید. پس از رسیدن محلول به دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد،

^۱ Gel Documentation System

^۲ Electrophoresis

۱۰ میکرولیتر محلول اتیدیوم بروماید^۱ (10 mg/ml) به آن افزوده و مخلوط گردیدند. سپس در قالب ژل الکتروفورز ریخته شد. پس از قرار دادن شانه چاهک و سرد شدن و بستن ژل، این ژل درون تانک حاوی بافر قرار می‌گیرد. در اولین چاهک ۳ میکرولیتر از DNA ladder 1kb بارگذاری شد. از هر یک از محصولات PCR، ۱۰ میکرولیتر به همراه ۰/۵ میکرولیتر بافر رنگی، در چاهک‌های ژل بارگذاری شد. نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه با ولتاژ ۴۵ ولت، الکتروفورز شد. سپس ژل در دستگاه ژل داک قرار گرفته، تصویر آن مشاهده شد.

۳-۲۶- استخراج پلاسمید از باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز

به منظور استفاده از DNA پلاسمید به عنوان شاهد مثبت در PCR، استخراج پلاسمید از باکتری به روش تغییر یافته سامبوروک و همکاران، (۲۰۰۱) به ترتیب با تهیه محلول‌های زیر انجام گردید (سامبوروک و همکاران، ۱۹۸۹).

۱. محلول (GTE buffer): شامل گلوکز ۵۰ میلی‌مولار، تریس ۲۵ میلی‌مولار با pH = ۸، اتیلن دی‌آمین

تترااستیک اسید (EDTA) ۱۰ میلی‌مولار با pH=۸

۲. محلول (Alkaline buffer): ۶۰ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۵ مولار، ۱۱/۵ میلی‌لیتر اسیداستیک خالص،

۲۸/۵ میلی‌لیتر آب مقطر

۳. محلول: استات سدیم ۳ مولار

۴. ایزوپروپانول

۵. اتانول ۹۶ درصد

^۱ Ethidium bromide

۶. بافر TE شامل: تریس ۱۰ میلی مولار با pH=۸، اتیلن دی آمین تترااستیک اسید (EDTA) ۱ میلی مولار با

pH=۸

روش کار:

کشت آگروباکتریوم رایزوزنز در محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک ریفامپسین به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۸۰ rpm صورت گرفت. سپس ویال های ۱/۵ میلی لیتری از محیط کشت حاوی باکتری پر شده و ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. محلول روشنار حذف و ویال ها به صورت وارونه بر روی دستمال کاغذی قرار گرفتند تا در حد امکان خشک شوند. در مرحله بعد ۲۰۰ میکرولیتر از محلول شماره ۱ سرد شده به رسوب اضافه گردید. پس از ورتکس کردن، خشک شدند. سپس ۴۰۰ میکرولیتر از محلول شماره ۲ تازه تهیه شده به تیوپ اضافه شد و به آرامی مخلوط و به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار گرفت. ۳۰۰ میکرولیتر از محلول شماره ۳ سرد شده به ویال ها اضافه شد. در این مرحله توده ابر ماندی در داخل ویال تشکیل گردید که تا حد امکان از ویال خارج شد. در ادامه ویال برای ۲۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. سپس ۶۰۰ میکرولیتر از محلول بالایی به تیوپ جدید منتقل گردید. به تیوپ ۶۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول نیز اضافه شد از آنجایی که ایزوپروپانول یک رسوب دهنده قوی است بهتر است دمای آن پایین نباشد تا از رسوب بیش از حد پروتئین ها جلوگیری شود. پس از ورتکس کردن، تیوپ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. ویال ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. روشنار حذف شد و رسوب در ۲۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه حل گردید. ۵۰۰ میکرولیتر اتانول خالص و ۲۰ میکرولیتر استات سدیم ۳ مولار اضافه شد و پس از ورتکس کردن، به مدت ۱ ساعت در فریزر -۲۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. ویال ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شده و رسوب حاصله در ۵۰ میکرولیتر بافر TE حل گردید و در دمای -۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

۳-۲۷- آزمون PCR برای تأیید تراریختی ریشه‌های شیرین بیان

ریشه‌های تراریخت، حاصل از انتقال T-DNA پلاسمید Ri اگروباکتریوم رایزوزنز به سلول‌های گیاهی می‌باشد. تأیید تراریختی ریشه‌های تراریخت می‌تواند با ردیابی ژن‌های rol A,B,C موجود T-DNA این باکتری انجام شود. در این تحقیق برای تأیید مولکولی ریشه‌های تراریخت از تکنیک PCR ریشه‌های تراریخت با آغازگرهای اختصاصی تکثیر ژن rolB استفاده شد. DNAهای استخراج شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن rolB با توالی‌های جدول ۳-۶ تکثیر شد (کبیرنتاج و همکاران، ۲۰۱۳).

۳-۲۷-۱- واکنش PCR

مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش PCR شامل یک میکرولیتر از هر آغازگر، ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix PCR و یک میکرولیتر DNA بود که با آب مقطر استریل به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. به تیوپ کنترل منفی از نمونه DNA استخراج شده از نمونه شاهد اضافه شد و کنترل مثبت هم DNA پلاسمید باکتری بود. شرایط دمایی PCR شامل واسرشته سازی اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، واسرشته سازی DNA الگو به مدت ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به DNA تک رشته‌ای به مدت ۴۵ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد و بسط آغازگر ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر شرکت Corbet ساخت کشور هلند انجام شد. محصولات PCR را می‌توان در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری نمود.

جدول ۳-۶: توالی آغازگرهای اختصاصی ژن rolB

آغازگر	توالی پرایمر 3'.....5'	دمای اتصال (C°)	طول قطعه تکثیری
آغازگر پیشرو	GCTCTTGCAGTGCTAGATTT	۵۵	۴۳۰bp
آغازگر برگشتی	GAAGGTGCAAGCTACCTCTC		

۳-۲۸- سنجش اسید گلیسیریزیک تولید شده در ریشه‌های تراریخت

پس از انتخاب بهترین روش جهت تلقیح و تایید ملکولی ریشه‌های تراریخت، نمونه‌ها به محیط MS نیمه جامد به منظور بررسی میزان تولید ماده موثره اسید گلیسیریزیک انتقال داده شدند، در این محیط از تیمارهای نانوکربن MWCNTs با غلظت‌های (۴۵۰-۱۰۰-۰ میلی گرم) و فسفر KH_2PO_4 در ۳ غلظت (۲/۲-۳-۰ گرم) استفاده شد. سپس هر ۷ روز گیاهان در همان محیط واکشت می‌شدند و ۱۴ روز بعد از شروع اعمال تیمارها، نمونه برداری انجام و صفات وزن تر و خشک ریشه‌های تراریخت و میزان اسید گلیسیریزیک آن‌ها اندازه‌گیری گردید.

۳-۲۹- مراحل سنجش اسید گلیسیریزیک در ریشه‌های تراریخت با دستگاه HPLC

اندازه‌گیری اسید گلیسیریزیک ریشه‌ها مطابق مراحل ذیل انجام شد. ریشه‌ها توسط دستگاه فریز درایر خشک شده تا زمان عصاره‌گیری داخل شیشه‌های پنی سیلین در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، به منظور بررسی تولید این ماده موثره در ابتدا ریشه‌ها عصاره‌گیری شدند و بررسی کمی آن‌ها به وسیله دستگاه HPLC انجام گرفت.

۳-۲۹-۱- عصاره‌گیری از ریشه‌ها

عصاره‌گیری از ریشه‌ها برای ماده موثره به روش هایاشی و همکاران (۱۹۹۸)، انجام شد. طبق روش ذیل صورت گرفت:

۱-۱۰۰ میلی گرم از ریشه‌های مربوط به هر نمونه به وسیله همزن شیشه‌ای و درون شیشه پنی سیلین کاملاً پودر شد.

۲- ریشه‌های پودر شده به داخل تیوپ‌های ۲ میلی لیتری منتقل گردیدند و یک میلی لیتر متانول ۸۰ درصد (v/v) شرکت مرک به آن‌ها افزوده شد.

۳- تیوپ‌ها به مدت ۶ ساعت در حمام آب گرم و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی با سر سمپلر استریل به شیشه پنی سیلین منتقل شد.

۴- به منظور تغلیظ عصاره بدست آمده، از گاز ازت استفاده گردید و رسوب‌های به جای مانده تا زمان اندازه‌گیری با دستگاه HPLC در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۳-۲۹-۲- روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

اندازه‌گیری اسید گلیسیریزیک با استفاده از دستگاه HPLC در آزمایشگاه دانشگاه صنعتی شاهرود انجام شد. به منظور تعیین مقدار اسید گلیسیریزیک، کلیه نمونه‌ها در یک روز و در شرایط مشابه به دستگاه HPLC، مدل VP10A ژاپن و دتکتور UV (40D) تزریق گردیدند. استاندارد اسید گلیسیریزیک از شرکت فلوکا تهیه گردید و طبق روش هارست و همکاران (۱۹۸۳) و بعد از حل شدن در محلول فاز متحرک HPLC (فاز متحرک شامل اسید استیک: آب: متانول به ترتیب به نسبت ۶: ۳۴: ۶۰ بود) به دستگاه تزریق شد. هر یک از نمونه‌ها نیز در یک میلی لیتر فاز متحرک حل شده و با حجم ۲۰ میکرولیتر و سرعت جریان یک میلی لیتر در دقیقه در ستون (RPC۱۸(۱۵۰*۳/۹mm) با اندازه منافذ ۵ میکرومتر تزریق شدند، مدت زمان جریان ۷ دقیقه تعیین شد. پیک مربوط به اسید گلیسیریزیک در دقیقه ۱۳ و طول موج ۲۵۴ نانومتر ظاهر شد. در نهایت با مقایسه پیک بدست آمده از تزریق هر نمونه با پیک استاندارد (پیوست ۲)، مقادیر ماده موثره موجود در عصاره‌ها تعیین گردید.

فصل چهارم

نتایج و بحث

۴-۱- آزمایش اول: بررسی اثرپیش تیمار و نوع محیط کشت بر جوانه‌زنی بذور مختلف

اکوتیپ‌های شیرین بیان

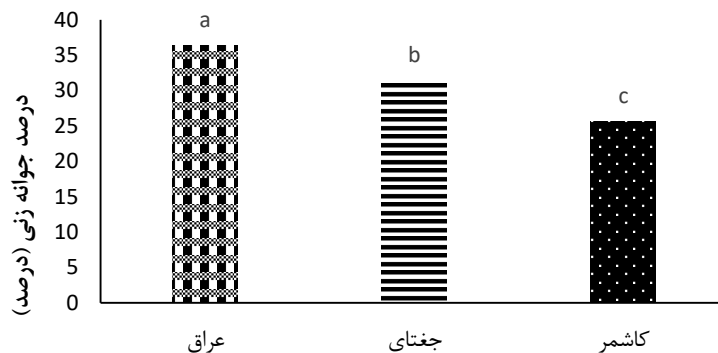
جدول ۴-۱ نتایج تجزیه واریانس حداکثر جوانه‌زنی بذور اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان تحت سطوح مختلف پیش تیمار و نوع محیط کشت

منابع تغییرات	درجه آزادی	حداکثر جوانه‌زنی (GMX)
اکوتیپ	۲	۵۱۳/۱۸ **
پیش تیمار	۲	۲۸۴۱۶/۶۸ **
محیط کشت	۱	۳/۶۲ ^{ns}
اکوتیپ×پیش تیمار	۴	۷۶۹/۷۴ **
اکوتیپ×محیط کشت	۲	۱/۰۳ ^{ns}
پیش تیمار×محیط کشت	۲	۳/۳۷ ^{ns}
اکوتیپ×پیش تیمار×محیط کشت	۴	۳/۲۹ ^{ns}
خطا	۳۶	۰/۸۸
ضریب تغییرات(%)		۳/۰۲

* و ** به ترتیب بیانگر معنی داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و NS عدم معنی داری را نشان می‌دهد.

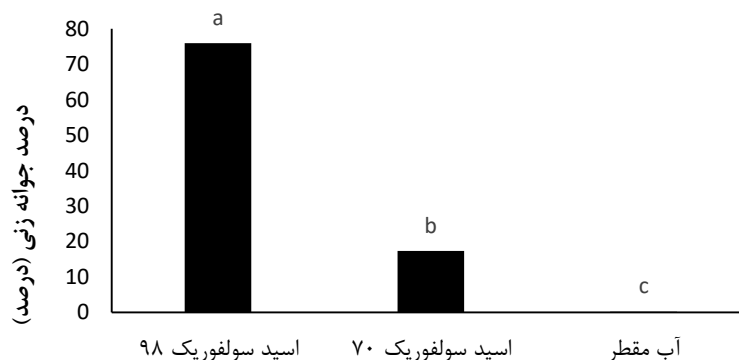
جوانه زنی بذر معمولاً بحرانی‌ترین عامل تعیین کننده موفقیت یا شکست استقرار گیاه است (کادر و جوتز ۲۰۰۴). نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌های حداکثر جوانه زنی نشان داد که فقط اثر ساده اکوتیپ و پیش تیمار و اثر متقابل این دو عامل معنی دار بود (جدول ۴-۱). متوسط درصد جوانه‌زنی در اکوتیپ‌های تحت بررسی ۳۱/۴۴ درصد بود. بیشترین و کمترین درصد جوانه‌زنی به ترتیب به اکوتیپ-های عراقی با متوسط ۳۶/۳۳ درصد و اکوتیپ کاشمر با متوسط سرعت ۲۵/۶۶ درصد تعلق داشت (شکل ۴-۱). قنبری و همکاران (۱۳۸۴) نیز در بررسی جوانه‌زنی اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان تفاوت‌های ژنتیکی معنی داری را در درصد جوانه‌زنی بذور اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان گزارش کردند. این محققین بالاتر بودن درصد جوانه‌زنی بذور اکوتیپ فارس را نسبت به اکوتیپ کرمانشاه به اندازه بزرگتر

این بذور مرتبط دانستند. نتایج پژوهش حاضر نیز حاکی از تاثیرگذاری شرایط اکولوژیکی محل جمع-آوری بذور و نیز اندازه‌ی بذر در میزان جوانه‌زنی بذور بود. به‌طوری‌که بذور درشت جمع‌آوری شده از منطقه معتدل و پرآب مسیب در کشور عراق از میزان جوانه‌زنی بیشتری نسبت به بذور ایرانی جمع‌آوری شده از مناطق خشک استان خراسان رضوی برخوردار بودند.



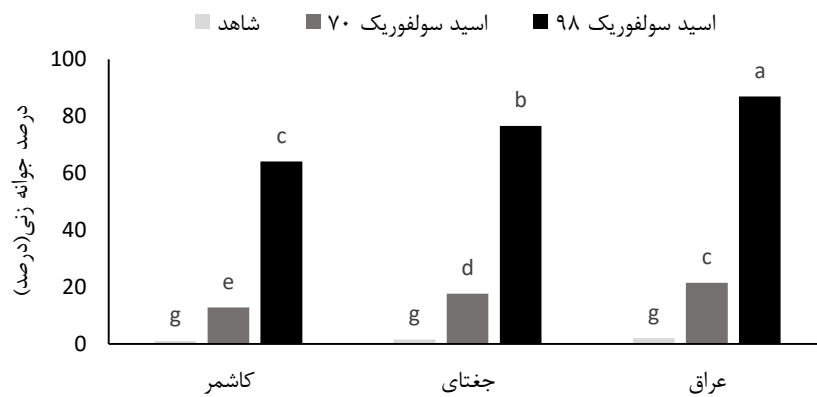
شکل ۴-۱. مقایسه میانگین حداکثر جوانه‌زنی بذور شیرین بیان اکوتیپ‌های مختلف

بیشترین و کمترین درصد جوانه‌زنی به ترتیب به تیمارهای اسید سولفوریک ۹۸ درصد با متوسط ۷۵/۹۴ درصد و آب مقطر با متوسط ۰/۱۶ درصد تعلق داشت (شکل ۴-۲). در نتایج قدیری و باقرانی ترشیز (۲۰۰۰)، ۷۵ درصد از بذور شیرین بیان با غوطه ور شدن در اسید سولفوریک ۷۰ درصد به مدت ۲۵ دقیقه جوانه زنی داشتند. هایاشی و همکاران (۲۰۰۴) نیز مشاهده حداکثر جوانه زنی بذور شیرین بیان را به مدت ۴۰ دقیقه در اسید سولفوریک غلیظ گزارش کردند.



شکل ۴-۲. مقایسه میانگین حداکثر جوانه‌زنی بذور شیرین بیان تحت پیش تیمار غلظت‌های مختلف اسیدسولفوریک و آب مقطر

بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل دو جانبه اکوتیپ و تیمار در شرایط استفاده از تیمار آب مقطر، جوانه زنی بذور اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان در اکوتیپ عراقی با ۰/۵ درصد بیشترین و دو اکوتیپ دیگر بدون جوانه‌زنی، کمترین مقدار را داشتند. همچنین در بالاترین سطح اسید سولفوریک متوسط درصد جوانه‌زنی بذور ۷۴/۵۸ درصد بود که در دامنه‌ای بین ۶۳/۷۵ تا ۸۵ درصد قرار داشت. کمترین میزان جوانه‌زنی به اکوتیپ ایرانی جمع آوری شده از کاشمر (۶۳/۷۵ درصد) و بیشترین میزان آن (۸۵ درصد) به اکوتیپ عراقی تعلق داشت (شکل ۳-۴).



شکل ۳-۴. اثر متقابل درصد جوانه زنی اکوتیپ‌های مختلف تحت پیش تیمار غلظت‌های مختلف اسیدسولفوریک و آب مقطر

نتایج فوق نشان داد هر دو محیط کشت مورد استفاده و تمامی بذور کشت شده سبز شدند و هیچ گونه آلودگی نیز بعد از تیمار با اسید و ضدعفونی مشاهده نشد. بذور کشت شده روی محیط MS جامد در طولانی مدت رشد بهتری را نشان دادند. مهروترا وهمکاران (۲۰۰۸) نیز برای کشت بذور شیرین بیان از محیط MS جامد استفاده کردند.

۴-۲- آزمایش دوم: بررسی کاربرد و عدم کاربرد زغال فعال و انواع محیط کشت بر صفات

فیزیولوژیک و مورفولوژیک اکوتیپ‌های مختلف گیاه شیرین بیان

جدول ۴-۲ نتایج تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان تحت تیمارهای مصرف و عدم

مصرف زغال فعال و انواع محیط کشت

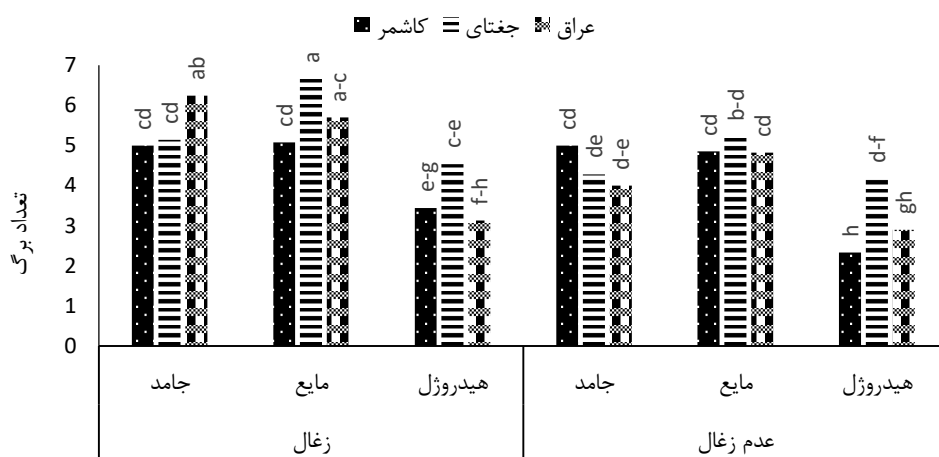
منابع تغییرات	درجه آزادی	تعداد برگ	طول ساقه	طول ریشه اصلی	قطر ساقه	قطر ریشه اصلی	تعداد ریشه فرعی	وزن تر گیاهچه (mg)	وزن خشک گیاهچه (mg)
زغال	۱	۱/۵۸*	۲/۴۸*	۰/۰۷۹ ^{ns}	۰/۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۰۰۲ ^{ns}	۰/۰۷۴ ^{ns}	۱۵۴۳۶/۴۶**	۵/۷۵ ^{ns}
محیط	۲	۱۱/۶۵**	۱۵/۸۷**	۱۵۴/۲۸**	۰/۰۰۵۱**	۰/۰۰۴۳**	۷۹/۰۵**	۳۶۰۶۴/۱۲**	۱۲۴/۳۳**
اکوتیپ	۲	۰/۱۲ ^{ns}	۱/۲۲*	۲/۲۶ ^{ns}	۰/۰۰۳۳**	۰/۰۰۰۷ ^{ns}	۱۷۱/۱۶**	۱۸۱۴۷۳/۱۲**	۱۰۷۲/۸۰**
زغال × محیط	۲	۱/۳۷**	۴/۰۹**	۶/۳۲**	۰/۰۰۲۰*	۰/۰۰۱ ^{ns}	۰/۱۲ ^{ns}	۶۵/۶۸ ^{ns}	۱/۸۱ ^{ns}
زغال × اکوتیپ	۲	۱/۳۲**	۱/۶۷*	۰/۱۹ ^{ns}	۰/۰۰۰۳۵ ^{ns}	۰/۰۰۰۴۵ ^{ns}	۰/۹ ^{ns}	۹۲/۱۲ ^{ns}	۰/۲۳۱ ^{ns}
محیط × اکوتیپ	۴	۰/۴۵ ^{ns}	۱/۹۶**	۲/۱۸۳ ^{ns}	۰/۰۰۰۷۱ ^{ns}	۰/۰۰۰۱۵**	۳/۴۷**	۱۹۴۷/۵۴**	۶/۸۳**
زغال × محیط × اکوتیپ	۴	۰/۸۸**	۲/۳۵**	۱/۶۳ ^{ns}	۰/۰۰۰۵۸ ^{ns}	۰/۰۰۰۹۷*	۰/۸۷ ^{ns}	۲۸۶/۷۶ ^{ns}	۱/۷۹ ^{ns}
خطا آزمایش	۳۶	۰/۲۱۹	۰/۳۳۸	۰/۹۱۴	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۳	۰/۶۶۶	۰/۶۸۵	۱/۷۴
ضریب تغییرات(%)		۱۱/۹۴	۱۱/۸	۱۹/۳۵	۱۰/۸۶	۱۴/۶۳	۱۱/۶۶	۶/۸۳	۷/۲۶

* و ** به ترتیب بیانگر معنی داری در سطح ۵ و ۱ درصد و ns عدم معنی دار را نشان می‌دهد.

۴-۲-۱- تعداد برگ

نتایج جدول تجزیه واریانس صفت تعداد برگ بیانگر معنی داری اثر ساده زغال فعال و محیط کشت به ترتیب در سطح ۵ و ۱ درصد و همچنین آثار متقابل دو و سه جانبه زغال فعال × محیط کشت، زغال فعال × اکوتیپ و زغال فعال × محیط × اکوتیپ در سطح ۱ درصد بود (جدول ۴-۲). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سه جانبه (زغال × محیط × اکوتیپ) بر تعداد برگ گیاه شیرین بیان نشان داد که اکوتیپ‌های رشد یافته در محیط‌های مختلف روند تولید برگ متفاوتی را در شرایط مصرف و عدم مصرف زغال فعال نشان دادند (شکل ۴-۴). بر این اساس اکوتیپ جغتای در محیط مایع و اکوتیپ عراقی بطور مشترک در محیط‌های مایع و جامد حاوی زغال فعال، از بالاترین تعداد برگ تولیدی برخوردار بودند. در حالی که این میزان تعداد برگ در شرایط عدم مصرف زغال فعال مشاهده نشد، بطوری که تعداد

برگ تولید شده توسط اکوتیپ عراقی در محیط جامد و اکوتیپ جغتای در محیط مایع به ترتیب کاهش ۳۲/۲۵ و ۲۲/۳۸ درصدی را در میزان این صفت نشان دادند. با این حال اکوتیپ عراقی که در محیط‌های جامد و مایع حاوی زغال فعال برترین اکوتیپ از نظر تعداد برگ بود، این میزان تعداد برگ را در شرایط عدم مصرف زغال فعال، بدون هیچ کاهش معنی‌داری حفظ نماید (شکل ۴-۴). علی‌رغم نتیجه‌ی ذکر شده، این اکوتیپ از روند متفاوتی در محیط حاوی هیدروژل برخوردار بود و در شرایط مصرف زغال فعال افزایش معنی‌داری در تعداد برگ تولید شده نسبت به شرایط عدم مصرف زغال فعال نشان داد. مینصولی و همکاران (۱۹۹۳) نشان دادند که حضور زغال فعال در محیط کشت MS گیاه *Anemone coronaria* با جذب اتیلن محیط و محدود کردن اثرهای زیانبار فنل‌های اکسید و آزاد شده توسط بافت گیاهی، باعث افزایش تعداد برگ و طول ساقه و کیفیت گیاهچه شده است.

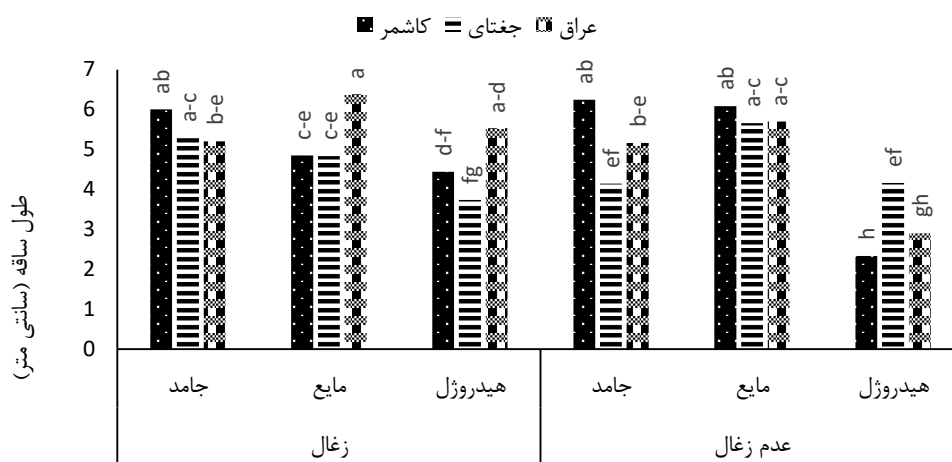


شکل ۴-۴ مقایسه میانگین تعداد برگ تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین‌بیان رشد یافته در سه محیط کشت MS متفاوت در حضور و عدم حضور زغال فعال

۴-۲-۲- طول ساقه

نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌های طول ساقه نشان داد که همه آثار ساده، متقابل دو و سه جانبه تیمارهای مورد بررسی (زغال، محیط کشت و اکوتیپ) بر صفت طول ساقه معنی‌دار بود (جدول ۴-۲). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سه جانبه زغال×محیط×اکوتیپ بر رشد طولی ساقه گیاه شیرین‌بیان

در اکوتیپ‌های کاشمر و عراقی رکورد دار ساقه‌های طولی‌تر در شرایط متفاوت بوده‌اند (شکل ۴-۵). به گونه‌ای که در حضور زغال فعال، اکوتیپ عراقی در هر دو محیط مایع (۶/۳ سانتی‌متر) و هیدروژل (۵/۵۳ سانتی‌متر) بلندترین ساقه‌ها را تولید کرد. در حالی که این اکوتیپ این برتری را در شرایط عدم حضور زغال فعال تنها در محیط مایع (۵/۷ سانتی‌متر) حفظ کرد. اکوتیپ کاشمر روند متفاوتی را از نظر این صفت نشان داد، به گونه‌ای که این اکوتیپ در هر دو شرایط حضور و عدم حضور زغال فعال طولی‌ترین ساقه‌ها را در محیط جامد (به ترتیب با متوسط ۶ و ۶/۲۴ سانتی‌متر) تولید کرد. این اکوتیپ همچنین این برتری در شرایط عدم مصرف زغال در محیط کشت مایع نیز حفظ کرد (شکل ۴-۵).

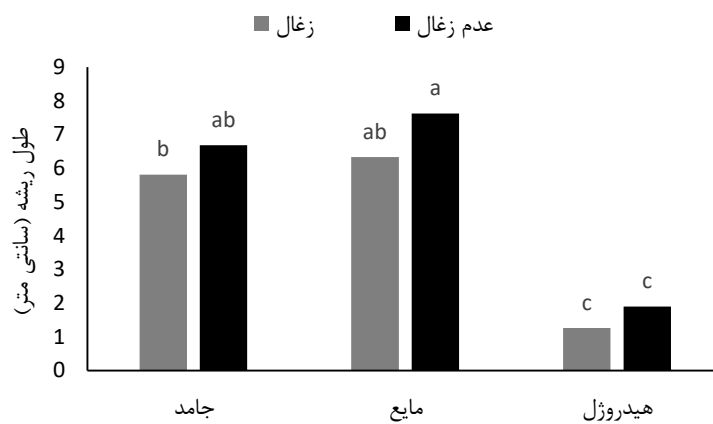


شکل ۴-۵ مقایسه میانگین طول ساقه تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان رشد یافته در سه محیط کشت MS متفاوت در حضور و عدم حضور زغال فعال

۴-۲-۳- طول ریشه اصلی

نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌های طول ریشه‌های اصلی تولید شده در تیمارهای مختلف نشان داد که اثر ساده محیط کشت و نیز اثر متقابل دوجانبه زغال و محیط کشت در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۴-۲). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل دو جانبه‌ی زغال × محیط بر صفت طول ریشه اصلی گیاه شیرین بیان نشان داد که طولی‌ترین ریشه‌ها در محیط مایع در هر دو شرایط کاربرد (۶/۳۳ سانتی‌متر) و عدم کاربرد (۷/۶۲ سانتی‌متر) زغال فعال و نیز در محیط جامد منحصراً در شرایط عدم مصرف زغال

فعال (۶/۶۸ سانتی متر) تولید شد. همچنین محیط کشت MS حاوی هیدروژل صرف نظر از کاربرد یا عدم کاربرد زغال فعال، به صورت مشترک کمترین طول ریشه اصلی را در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان تولید کردند. پان و وان (۲۰۰۲) بیان کردند در محیط حاوی زغال فعال در گیاه *Daucus carota* گیاهچه به سرعت ریشه تولید می‌کند، و استقرار خوبی دارند، آن‌ها دلیل این امر را نقش زغال فعال در جذب فیتوهورمون‌های اضافی و دیگر مواد ساخته شده در محیط که مانع ریشه‌زایی می‌شود دانستند. همچنین بیان کردند که کاربرد زغال فعال موجب تولید محیطی تاریک مشابه محیط طبیعی (خاک) برای رشد ریشه می‌شود. در پژوهش حاضر به نظر می‌رسد که این ویژگی‌ها تحت تاثیر غلظت محیط کشت قرار گرفته و در محیط مایع قابل رویت است (شکل ۴-۶).

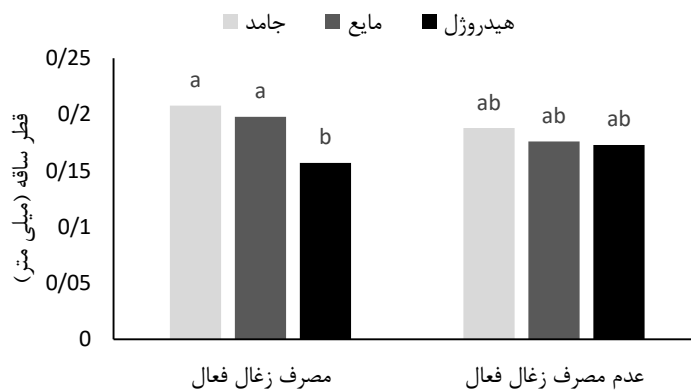


شکل ۴-۶ مقایسه میانگین طول ریشه‌های اصلی تولید شده در محیط‌های MS مختلف در شرایط کاربرد و عدم کاربرد زغال فعال

۴-۲-۴- قطر ساقه

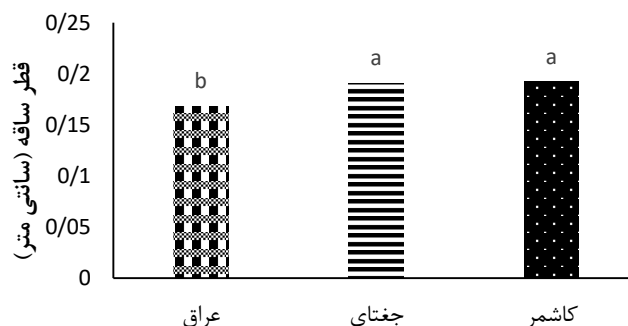
نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌های قطر ساقه نشان داد که اثر ساده محیط و اکوتیپ (در سطح ۱ درصد) همچنین اثر متقابل دوجانبه‌ی زغال محیط (در سطح ۵ درصد) بر این صفت معنی‌دار بودند (جدول ۲-۴). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل زغال و محیط نشان داد که در شرایط عدم مصرف زغال فعال هیچ تفاوتی از نظر قطر ساقه در محیط‌های جامد، مایع و هیدروژل وجود ندارد. به طوری که هر سه محیط توانستند به صورت مشترک قوتورترین ساقه‌ها را تولید کنند. با این حال در شرایط مصرف

زغال فعال اگرچه الگوی مشابهی در محیط‌های جامد و مایع مبتنی بر برتری این محیط‌ها در تولید قطورترین ساقه‌ها (به ترتیب با متوسط ۰/۲۰۸ و ۰/۱۹۸ سانتی‌متر) مشاهده گردید، با این حال روند در محیط هیدروژل صادق نبود به گونه‌ای که در این محیط در شرایط مصرف زغال فعال کاهش معنی‌دار ۱۱ درصدی در قطر ساقه دیده شد (شکل ۴-۷).



شکل ۴-۷ مقایسه میانگین قطر ساقه تولید شده در محیط‌های MS مختلف در شرایط کاربرد و عدم کاربرد زغال فعال

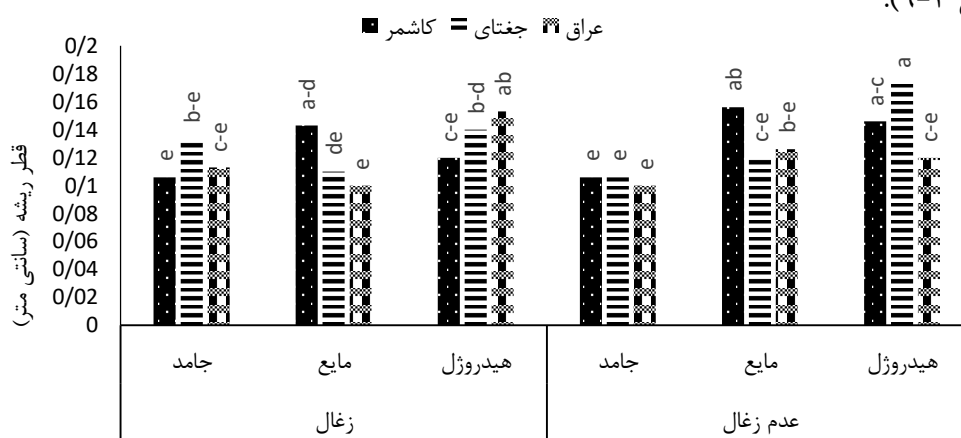
با توجه به نتایج حاصله از صفت طول ساقه به نظر می‌رسد که در شرایط عدم مصرف زغال فعال در محیط هیدروژل، اکوتیپ‌های مختلف شیرین‌بیان به طور متوسط به جای تولید ساقه‌های طولی‌تر، ساقه‌های قطورتری را تولید کردند. با این حال وجود روند معنی‌داری در مورد سایر محیط‌ها مشاهده نگردید و این موضوع بسته به نوع اکوتیپ مورد بررسی تفاوت داشت. در بین اکوتیپ‌های مورد بررسی نیز در مجموع دو اکوتیپ ایرانی کاشمر و جغتای عریض‌ترین ساقه‌ها را (به ترتیب ۰/۱۹۲ و ۰/۱۹۱ سانتی‌متر) نسبت به اکوتیپ خارجی عراقی (۰/۱۶۸ سانتی‌متر) تولید کردند (شکل ۴-۸).



شکل ۴-۸ مقایسه میانگین قطر ساقه تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف گیاه شیرین‌بیان

۴-۲-۵- قطر ریشه

در پژوهش حاضر نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌های قطر ریشه نشان داد که اثر ساده محیط و نیز اثر متقابل دوجانبه‌ی محیط با اکوتیپ در سطح ۱ درصد و اثر سه جانبه‌ی هر سه تیمار محیط، اکوتیپ و زغال فعال در سطح ۵ درصد بر صفت قطر ریشه معنی‌دار بود (جدول ۴-۲). مقایسه میانگین برهمکنش سه جانبه تیمارها نشان داد که اکوتیپ‌های مختلف کشت شده در محیط‌های MS متفاوت، در هر دو شرایط مصرف و عدم مصرف زغال فعال، دارای الگوهای بسیار متفاوتی را از نظر صفت قطر ساقه بودند (شکل ۴-۹).

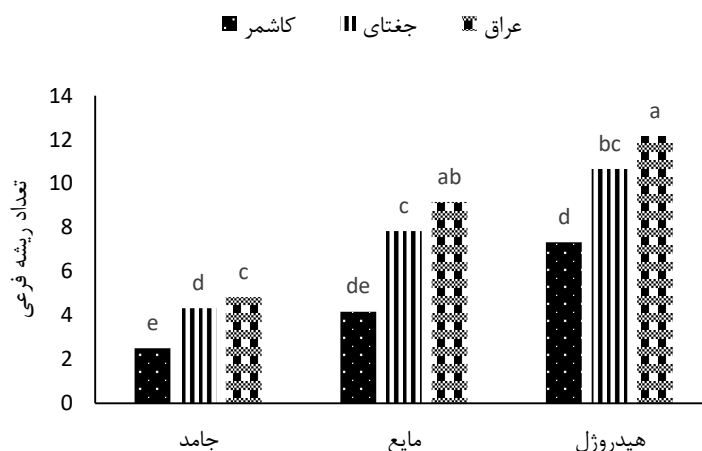


شکل ۴-۹ مقایسه میانگین قطر ریشه تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان رشد یافته در سه محیط کشت MS متفاوت در حضور و عدم حضور زغال فعال

به طوری که در شرایط عدم مصرف زغال فعال اکوتیپ ایرانی، کاشمر در هر دو محیط مایع (۰/۱۵ سانتی‌متر) و هیدروژل (۰/۱۳ سانتی‌متر) و جغتای (۰/۲ سانتی‌متر) منحصراً در محیط هیدروژل قطورترین ریشه‌ها را تولید کردند. در حالی که در شرایط مصرف زغال فعال اکوتیپ ایرانی کاشمر در محیط کشت مایع و اکوتیپ عراقی در محیط هیدروژل به صورت مشترک دارای قطورترین ریشه‌ها بودند (شکل ۴-۹).

۴-۲-۶- تعداد ریشه فرعی

نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌های تعداد ریشه نشان داد که اثر ساده و دوجانبه‌ی تیمارهای محیط و اکوتیپ در سطح ۱ درصد بر تولید ریشه‌های فرعی معنی‌دار بود (جدول ۴-۲). براساس نتایج مقایسه میانگین اثرهای متقابل دو جانبه محیط×اکوتیپ مشخص شد که اکوتیپ عراقی در هر دو محیط هیدروژل (۱۲/۱۶ عدد) و مایع (۹/۱۶ عدد) بیشترین تعداد ریشه فرعی را تولید کردند. این اکوتیپ اگرچه از تعداد کمتر (۴/۸ عدد) تولید ریشه در محیط جامد برخوردار بود با این حال توانست در این محیط نیز برتری معنی‌دار خود را نسبت به دو اکوتیپ داخلی حفظ نماید. این در حالی است که اکوتیپ کاشمر که موفق به تولید قطورترین ریشه‌ها در بین سایر اکوتیپ‌ها بود از نظر تعداد ریشه‌ی فرعی تولید شده در پایین‌ترین جایگاه قرار گرفت. به‌گونه‌ای که این اکوتیپ کمترین تعداد ریشه فرعی را مشترکاً در محیط جامد (۲/۵ عدد) و مایع (۴/۱۶ عدد) تولید کردند (شکل ۴-۱۰).

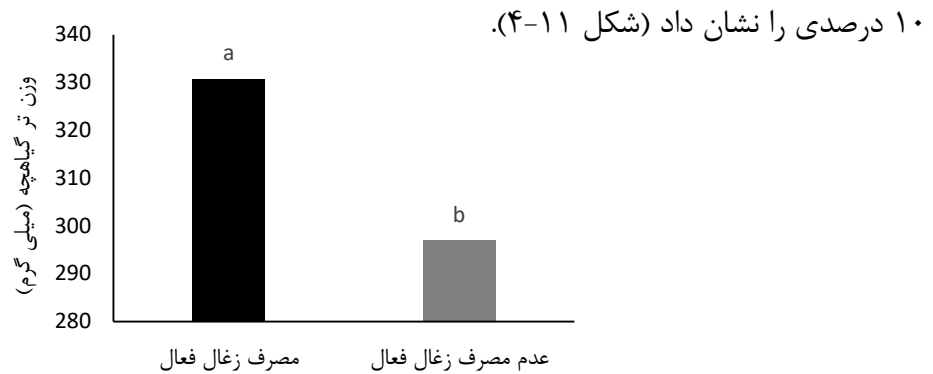


شکل ۴-۱۰ مقایسه میانگین تعداد ریشه‌های فرعی تولید شده توسط اکوتیپ‌های مختلف شیرین‌بیان در سه محیط کشت MS مختلف

۴-۲-۷- وزن تر گیاهچه

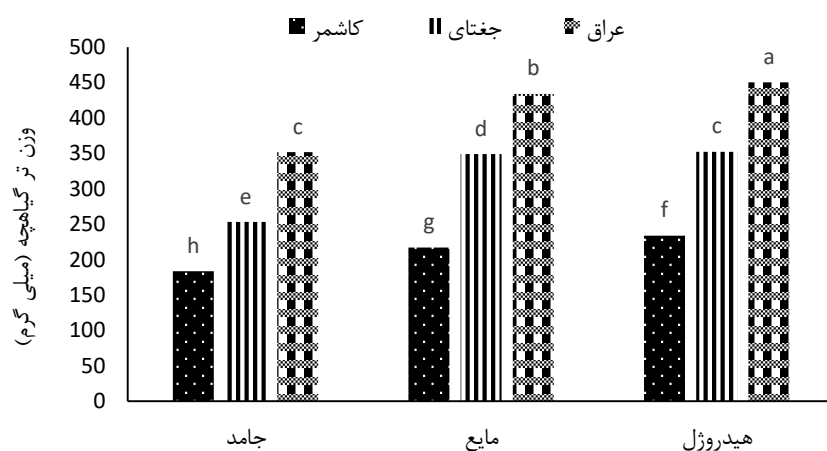
نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌های وزن تر گیاهچه نشان داد که همه آثار ساده‌ی تیمارها و اثر دوجانبه‌ی محیط و اکوتیپ بر صفت وزن تر گیاهچه (در سطح ۱ درصد) معنی‌دار بودند (جدول ۴-۲). بر اساس نتایج مقایسه میانگین وزن تر گیاهچه‌ها در شرایط مصرف و عدم زغال فعال مشخص

گردید که بهترین گیاهچه‌ها از نظر این صفت در مجموع، در محیط‌های حاوی زغال فعال با میانگین ۳۳۰ میلی‌گرم تولید گردید. به‌طوری‌که بیشترین وزن گیاهچه مربوط به محیط‌های حاوی زغال فعال با میانگین ۳۳۰ میلی‌گرم درحالی‌که میانگین این صفت در شرایط عدم کاربرد زغال فعال کاهش معنی‌دار



شکل ۱۱-۴ مقایسه میانگین وزن تر گیاهچه‌ی اکوتیپ‌های مختلف گیاه شیرین‌بیان در شرایط مصرف و عدم مصرف زغال فعال

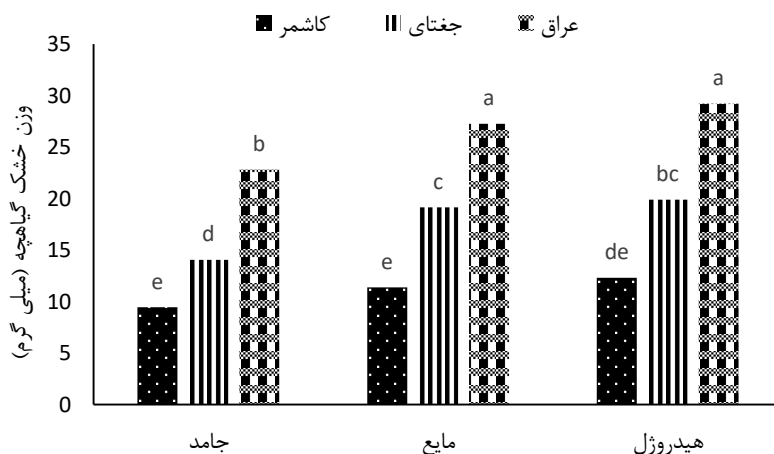
شکل ۱۲-۴ مقایسه میانگین اثر متقابل محیط × اکوتیپ را نشان می‌دهد. بر این اساس، اکوتیپ عراقی علاوه بر تولید بهترین گیاهچه‌ها (با وزن تر ۴۵۰ میلی‌گرم) در محیط هیدروژل، توانست این برتری را به طور معنی‌داری در سایر محیط‌ها نیز حفظ نماید (شکل ۱۲-۴). درحالی‌که اکوتیپ کاشمر از این نظر در پایین‌ترین رتبه قرار داشت. به‌طوری‌که این اکوتیپ کمترین وزن تر گیاهچه را (۱۸۳ میلی‌گرم) در محیط جامد و نیز در این محیط‌ها تولید کرد.



شکل ۱۲-۴ مقایسه میانگین وزن تر گیاهچه‌های تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف گیاه شیرین‌بیان رشد یافته در محیط‌های کشت MS متفاوت

۴-۲-۸- وزن خشک گیاهچه

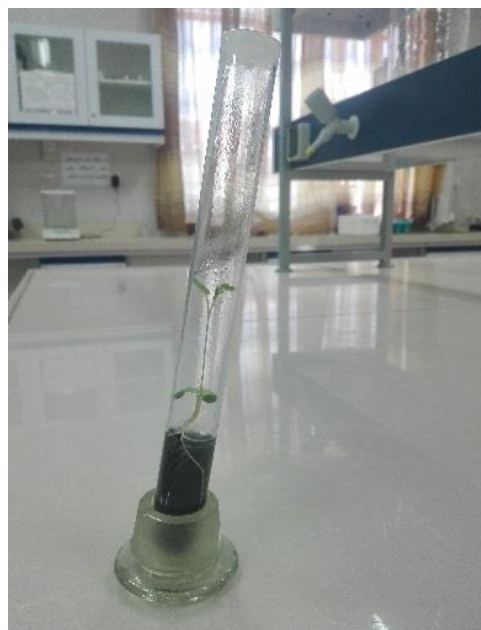
نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌های وزن خشک گیاهچه نشان داد که آثار ساده محیط و اکوتیپ و نیز اثر متقابل دوجانبه آن‌ها (در سطح ۱ درصد) معنی‌دار بود. بر اساس نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل دوجانبه محیط × اکوتیپ برای این صفت، الگوی مشابهی را با وزن تر گیاهچه نشان داد. به طوری که اکوتیپ عراقی با تولید بیشترین وزن خشک گیاهچه در محیط هیدروژل (۲۹ میلی‌گرم) و مایع (۲۷/۲۷ میلی‌گرم) توانست این برتری معنی‌دار را در محیط جامد نیز حفظ نماید. در حالی که اکوتیپ کاشمر در هر سه محیط کشت جامد (۹/۴۵ میلی‌گرم)، مایع (۱۱/۳۷ میلی‌گرم) و هیدروژل (۱۲/۳۱ میلی‌گرم) از کمترین وزن خشک گیاهچه برخوردار بود (شکل ۱۳-۴).



شکل ۴-۱۳ مقایسه میانگین وزن خشک گیاهچه‌های تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف گیاه شیرین بیان رشد یافته در محیط‌های کشت MS متفاوت



ب



الف



د



ج

شکل ۴-۱۴ رشد گیاهان درون بسترهای متفاوت محیط کشت MS پس از ۱۴ روز الف: محیط جامد دارای زغال
 ب: محیط جامد بدون زغال ج: محیط مایع بدون زغال د: محیط هیدروژل بدون زغال

جدول ۳-۴ نتایج تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیک ریشه‌ی اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان رشد یافته تحت تیمارهای زغال

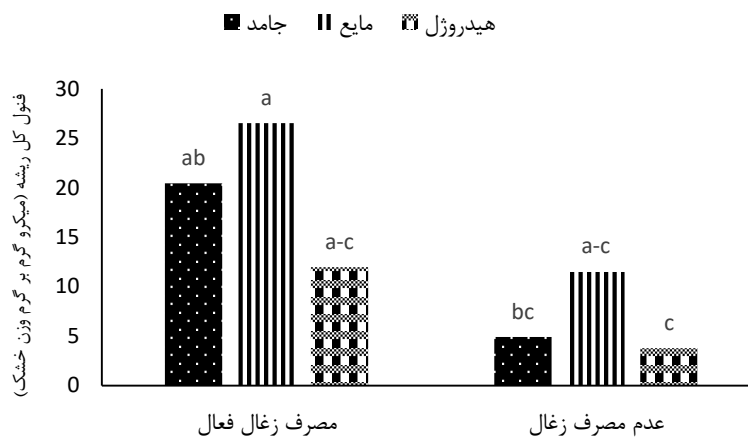
فعال و انواع محیط کشت

منابع تغییرات	درجه آزادی	فنول کل	فلاونوئید کل	قند احیا	اسید گلیسیریزیک
زغال فعال	۱	۲۲۵۶/۸۶**	۰/۹۸ ^{ns}	۵/۳۶ ^{ns}	۰/۰۰۱۱ ^{ns}
محیط	۲	۵۶۰/۹۹**	۳۸۳/۰۷**	۶۴۵/۴۹**	۰/۴۹۴**
اکوتیپ	۲	۳۳۷/۶۹**	۵۴۰/۲۲**	۹۹۴/۱۶**	۰/۷۰۲**
زغال × محیط	۲	۷۵/۷۶*	۰/۱۳۲ ^{ns}	۰/۲۳ ^{ns}	۰/۰۰۰۳۱ ^{ns}
زغال × اکوتیپ	۲	۲۳۸/۷۲**	۰/۲۴۶ ^{ns}	۰/۴۹ ^{ns}	۰/۰۰۰۲۷ ^{ns}
تیمار × وارینه	۴	۳۴/۲۷ ^{ns}	۷/۷۱**	۸۷/۵۴**	۰/۰۰۰۹۵**
زغال × محیط × اکوتیپ	۴	۳۰/۴۹ ^{ns}	۰/۴۰۱ ^{ns}	۰/۵۲ ^{ns}	۰/۰۰۰۵۶ ^{ns}
خطا آزمایش	۳۶	۲۱/۱۷	۱/۷۶	۵/۳۵	۰/۰۰۲
ضریب تغییرات (%)		۳۴/۸۷	۱۳/۷۵	۱۲/۲۲	۴/۹۷

* و ** به ترتیب بیانگر معنی داری در سطح ۵ و ۱ درصد و ns عدم معنی داری را نشان می‌دهد.

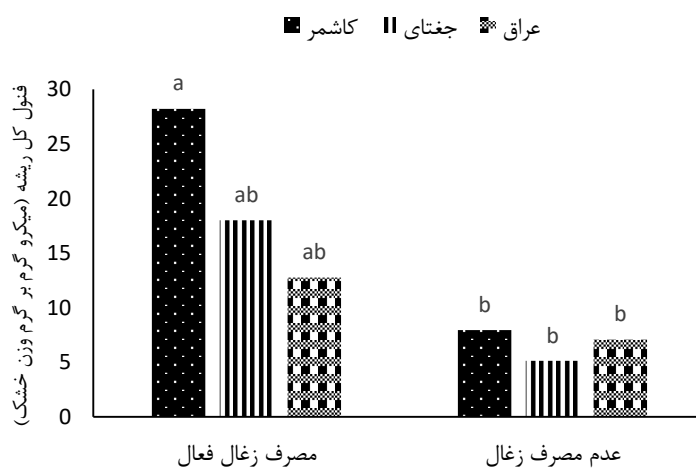
۴-۲-۹- فنول کل

نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌های میزان فنول کل ریشه نشان داد که همه آثار ساده و آثار متقابل دو جانبه‌ی زغال با محیط و اکوتیپ بر تغییرات فنول کل معنی‌دار بودند (جدول ۳-۴). مقایسه میانگین اثر متقابل زغال × محیط کشت نشان داد که هر سه محیط کشت مورد بررسی در شرایط مصرف زغال فعال از بالاترین میزان ترکیبات فنولی در ریشه برخوردار بودند. در حالی که در شرایط عدم مصرف زغال فعال، تنها محیط کشت مایع، این برتری را در تولید ترکیبات فنولی در ریشه حفظ کرد. علی‌رغم حصول کمترین میزان تولید ترکیبات فنولی (۳/۷۸ میکروگرم بر گرم وزن خشک) در محیط هیدروژل تحت شرایط عدم مصرف زغال فعال، این کاهش تولید با سایر محیط‌های کشت مورد بررسی در شرایط عدم حضور زغال فعال نیز اختلاف معنی داری نشان داد (شکل ۴-۱۵).



شکل ۴-۱۵ مقایسه میانگین فنول کل تولید شده در محیط‌های MS مختلف در شرایط کاربرد و عدم کاربرد زغال فعال

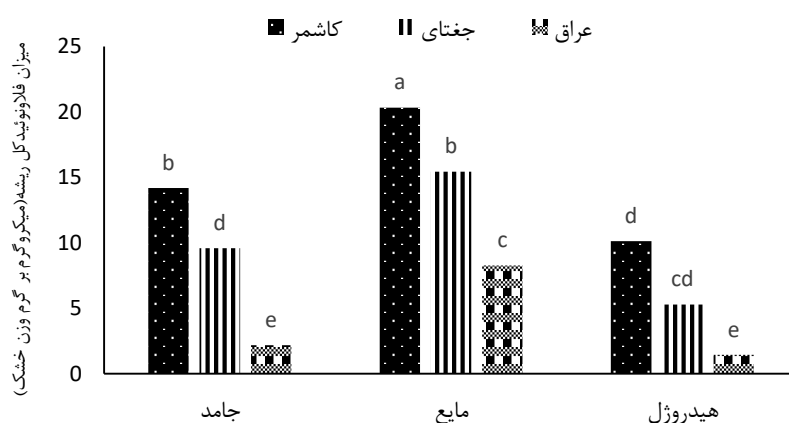
در شکل ۴-۱۶ نتایج مقایسه میانگین ترکیبات فنولی ریشه تولید شده توسط اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان را در شرایط حضور و عدم حضور زغال فعال نشان می‌دهد. بر این اساس، اکوتیپ کاشمر در مجموع از بالاترین میزان ترکیبات فنولی (۲۸/۲۲ میکروگرم بر گرم وزن خشک) در شرایط حضور زغال در محیط‌های مختلف کشت مختلف برخوردار بود. با این حال این برتری تفاوت معنی‌داری با میزان تولید ترکیبات فنولی در ریشه‌ی سایر اکوتیپ‌های مورد بررسی (جغتای و عراقی) نشان نداد. در تایید نتایج قبل، هر ۳ اکوتیپ مورد بررسی در شرایط مصرف زغال فعال، ترکیبات فنولی بیشتری در ریشه تولید کردند. که این میزان تنها در اکوتیپ کاشمر تفاوت معنی‌داری با شرایط عدم مصرف زغال فعال نشان داد (شکل ۴-۱۶).



شکل ۴-۱۶ مقایسه میانگین فنول کل تولید شده در ریشه اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان در شرایط کاربرد و عدم کاربرد زغال فعال

۴-۲-۱۰- میزان فلاونوئید کل ریشه

نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌های میزان فلاونوئید ریشه بیانگر تاثیر معنی‌دار اثرات ساده محیط و اکوتیپ و نیز اثر متقابل این دو تیمار بر این صفت بود (جدول ۴-۳). نتایج مقایسه میانگین بر همکنش محیط با اکوتیپ، نشانگر برتری اکوتیپ کاشمر کشت شده در محیط مایع از نظر تولید بیشترین میزان فلاونوئید (۲۰/۳۲ میکروگرم بر گرم وزن خشک) در ریشه بود. این اکوتیپ علی‌رغم کاهش تولید فلاونوئید در ریشه در سایر محیط‌ها برتری خود را نسبت به سایر اکوتیپ‌ها حفظ کرد. با این وجود، اکوتیپ خارجی عراقی در هر ۳ محیط MS جامد، مایع و هیدروژل، از کمترین میزان تولید فلاونوئید ریشه به طور متوسط (۱/۴۳ میکروگرم بر گرم وزن خشک) برخوردار بود.

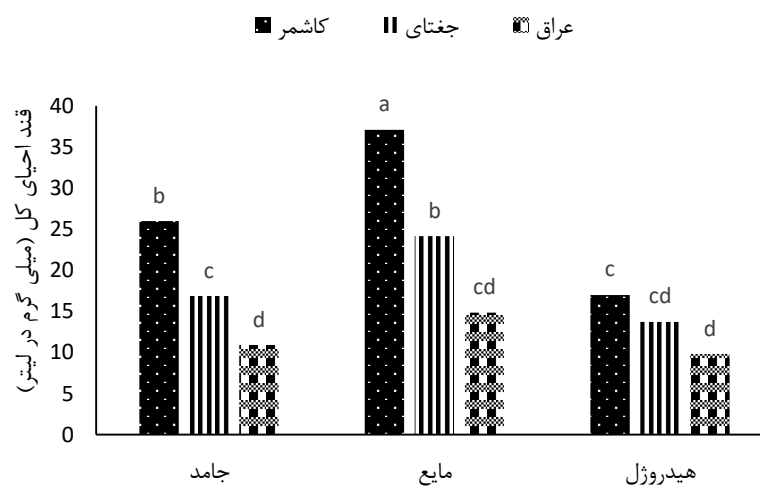


شکل ۴-۱۷ مقایسه میانگین میزان کل فلاونوئید کل تولید شده در ریشه اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان کشت شده در محیط‌های MS مختلف

۴-۲-۱۱- میزان قند احیای کل

نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌های میزان قند احیای تولید شده در ریشه نشان داد که آثار ساده محیط و اکوتیپ و نیز اثر متقابل آن‌ها در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۴-۳). مقایسه میانگین‌های اثر متقابل اکوتیپ×محیط برای این صفت نشان داد که بیشترین میزان قند احیای ریشه به اکوتیپ کاشمر در محیط MS مایع با میانگین ۳۷/۰۸ (میلی‌گرم در لیتر) تعلق داشت. این اکوتیپ

در محیط جامد نیز از برتری معنی‌داری نسبت به سایر اکوتیپ‌ها برخوردار بود. درحالی‌که تفاوت معنی‌داری در میزان قند احیای تولید شده در ریشه این اکوتیپ با دیگر اکوتیپ ایرانی جغتای در محیط MS حاوی هیدروژل مشاهده نگردید. اکوتیپ عراقی در هر سه محیط کشت مورد بررسی از پایین‌ترین میزان قند احیایی تولید شده در ریشه برخوردار بود. اگرچه در محیط کشت حاوی هیدروژل تفاوت معنی‌داری بین دو اکوتیپ عراقی و جغتای دیده نشد (شکل ۴-۱۸).

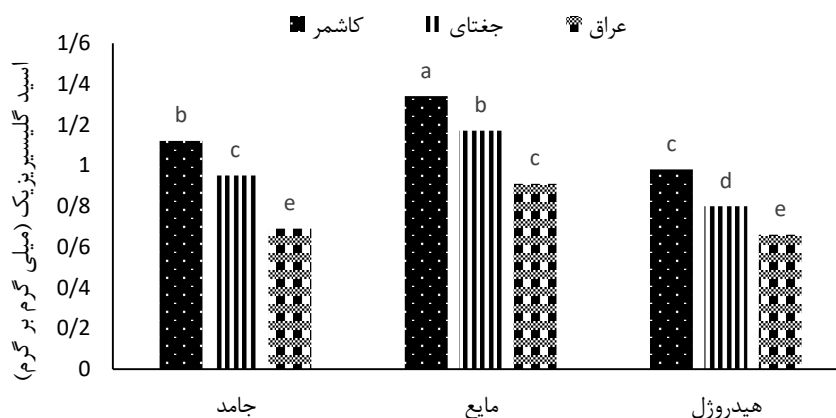


شکل ۴-۱۸ مقایسه میانگین میزان کل قند احیا تولید شده در ریشه اکوتیپ‌های مختلف شیرین‌بیان کشت شده در محیط‌های MS مختلف

۴-۲-۱۲-اسید گلیسیریزیک

نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌های اسید گلیسیریزیک ریشه نشان داد که آثار ساده محیط و اکوتیپ و برهم کنش دوجانبه این دو عامل در تولید اسید گلیسیریزیک بسیار معنی‌دار بود (جدول ۴-۳). در نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل محیط×اکوتیپ نشان داد که همه اکوتیپ‌ها در هر یک از محیط کشت دارای، تفاوت معنی‌داری در تولید اسید گلیسیریزیک ریشه بودند. ریشه‌های اکوتیپ کاشمر رشد یافته در محیط کشت MS مایع با متوسط ۱/۳۴ (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) بیشترین میزان اسید گلیسیریزیک را تولید کردند. این اکوتیپ در سایر محیط‌های کشت، اگرچه اسید گلیسیریزیک کمتری

تولید کرد، با این حال جایگاه برتر خود را در تولید اسید گلیسیریزیک نسبت به سایر اکوتیپ‌ها (به طور معنی داری) حفظ کرد. اکوتیپ عراقی نیز که در همه محیط‌های کشت در پایین‌ترین رتبه از نظر این صفت قرار داشت و کمترین میزان اسید گلیسیریزیک را با میانگین ۰/۶۶ (میلی گرم بر گرم وزن خشک) به طور مشترک در محیط‌های MS جامد و حاوی هیدروژل تولید کرد. در بررسی اجمالی صفات ارزیابی شده قبل به نظر می‌رسد که اکوتیپ عراقی اگرچه با داشتن بذور درشت‌تر و درصد جوانه‌زنی بیشتر از وزن تر و خشک گیاهچه بالاتر و نیز تعداد ریشه‌های فرعی بیشتری برخوردار بود، در مقابل، میزان ترکیبات کیفی و بخصوص اسید گلیسیریزیک پایین‌تری نیز تولید کرد. با این حال اکوتیپ ایرانی کاشمر نیز، اگرچه در موارد فوق برتر نبود، اما با تولید گیاهچه‌های دارای ساقه و ریشه اصلی قطورتر ماده موثره گلیسیریزیک اسید بیشتری را تولید کرد.



شکل ۴-۱۹ مقایسه میانگین میزان اسید گلیسیریزیک کل تولید شده در ریشه اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان کشت شده در محیط‌های MS مختلف

۳-۴- آزمایش سوم: بهینه سازی رشد ریشه تحت تیمارهای هورمونی NAA و IAA در

اکوتیپ‌های مختلف گیاه شیرین بیان

جدول ۴-۴ نتایج تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک ریشه‌ی اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان رشد یافته در محیط

کشت MS نیمه جامد حاوی تیمارهای هورمونی NAA و IAA

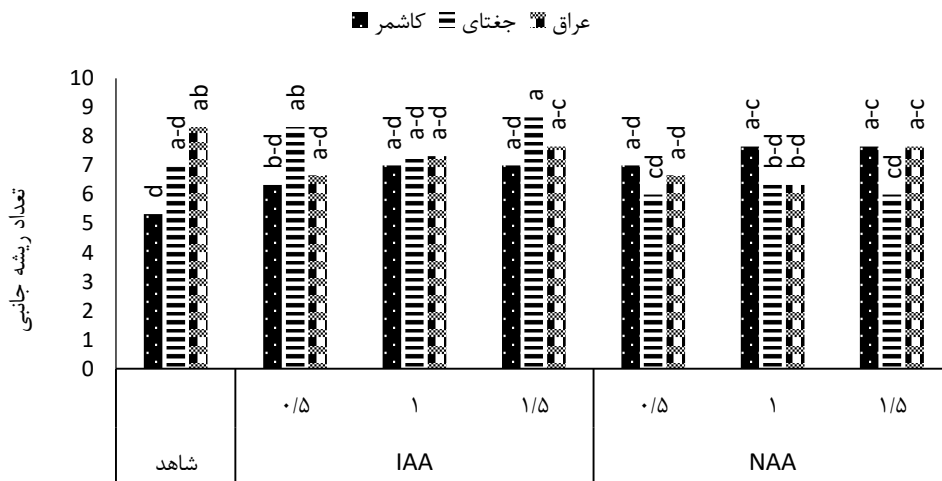
منابع تغییرات	درجه آزادی	تعداد ریشه جانبی	طول ریشه	قطر ریشه	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه	اسید گلیسیریزیک
اکوتیپ	۲	۰/۷۷ ^{ns}	۱۰/۲۸ ^{ns}	۰/۰۴۷ ^{ns}	۱۰۵۷/۹۶ ^{ns}	۰/۰۴ ^{ns}	۰/۴ ^{**}
هورمون	۶	۱/۳۶ ^{ns}	۱۰/۵۱ ^{**}	۰/۱۷۴ ^{ns}	۹۰۱/۸۳ ^{ns}	۶/۱۳ ^{**}	۰/۱۶ ^{**}
اکوتیپ × هورمون	۱۲	۲/۸۳ [*]	۱۱/۵۴ ^{**}	۰/۲۱۴ [*]	۲۰۵۳/۶۱ ^{**}	۷/۲۲ ^{**}	۰/۰۷ ^{**}
خطا آزمایش	۴۲	۱/۳۳	۲/۹۲	۰/۰۹۵	۵۵۰/۴۴	۱/۱۸	۰/۰۱۵
ضریب تغییرات (%)		۱۶/۳۴	۳۶/۲۵	۲۷	۴۵/۲۲	۵/۲۳	۱۲/۲۹

* و ** به ترتیب بیانگر معنی داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns عدم معنی دار را نشان می‌دهد.

۳-۴-۱- تعداد ریشه فرعی

نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۴-۴) نشان داد که صفت تعداد ریشه به طور معنی داری برهمکنش دو تیمار اکوتیپ × هورمون قرار گرفت. نتایج مقایسه میانگین آثار متقابل تیمارها بر این صفت بیانگر روند متفاوت تولید ریشه‌های جانبی در اکوتیپ‌ها در پاسخ به تیمارهای هورمونی بود (شکل ۴-۲۰). بر این اساس با اعمال هورمون IAA با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر اکوتیپ جغتای منشعب ترین ریشه‌ها را (با تعداد ریشه جانبی ۸/۳۳ عدد) تولید کرد. اگرچه به نظر می‌رسد اعمال تیمارهای هورمونی و افزایش تولید ریشه‌های جانبی منجر شد که آثار تفاوت معنی دار بین اکوتیپ‌ها از نظر این صفت گردید. با این حال، نتایج نشان داد که اکوتیپ کاشمر در پایین ترین رتبه از نظر این صفت قرار داشت (شکل ۴-۲۰). در تیمار شاهد نیز این اکوتیپ دارای ریشه‌های جانبی کمتر معنی داری نسبت به اکوتیپ عراقی بود. بر اساس نتایج مشاهده می‌شود کاربرد سطوح ۱ و ۱/۵ میلی گرم هورمون NAA به افزایش

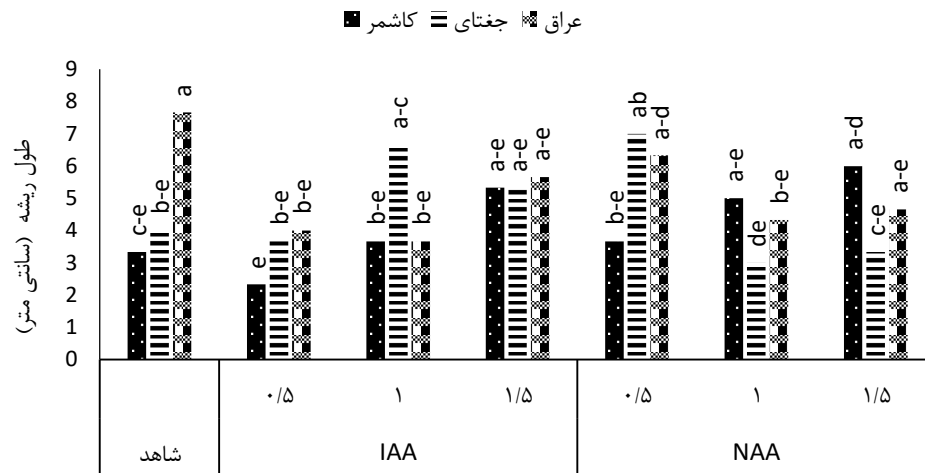
معنی دار این صفت در اکوتیپ عراقی منجر شده است. با این وجود این روند در سایر اکوتیپها معکوس بود (شکل ۴-۲۰).



شکل ۴-۲۰ مقایسه میانگین تعداد ریشه‌های تولید شده در محیط کشت MS غنی شده با سطوح متفاوت هورمون‌های اکسینی IAA و NAA در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان

۴-۳-۲- طول ریشه

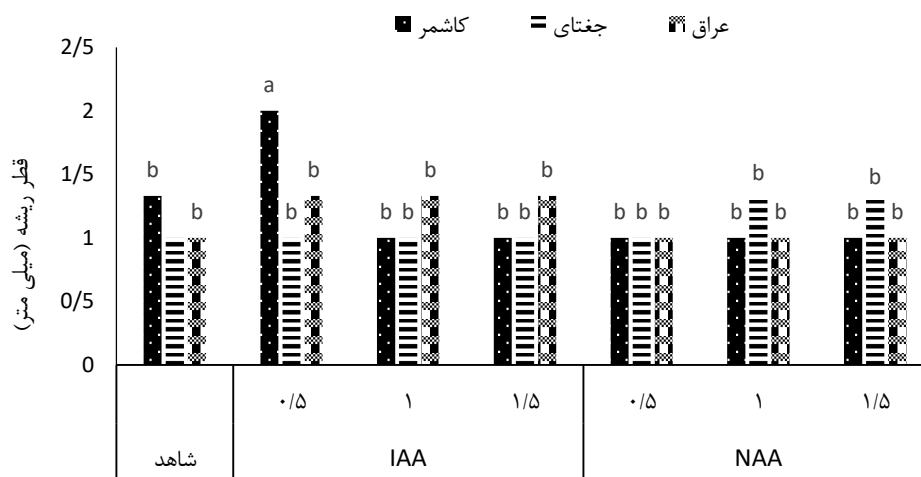
تجزیه واریانس صفت طول ریشه بیانگر معنی داری اثر ساده تیمار هورمون نیز و اثر متقابل دو تیمار اکوتیپ×هورمون بر این صفت بود (جدول ۴-۴). بر این اساس نتایج مقایسه میانگین این صفت تحت تاثیر اثر متقابل اکوتیپ×هورمون نشان داد که اکوتیپ عراقی در شرایط عدم کاربرد هورمون (شاهد) توانست با تولید ریشه‌هایی با طول متوسط ۷/۶۶ سانتی‌متر، طول‌ترین ریشه‌ها را تولید کند. به خوبی که اعمال سطوح مختلف تیمارهای هورمونی افزایش معنی داری را نسبت به این عدد در پی نداشت (شکل ۴-۲۱). بر اساس نتایج، مشاهده می‌گردد که اکوتیپ‌های مختلف پاسخ متفاوتی به اعمال سطوح هورمونی مختلف در افزایش معنی دار این صفت نشان دادند. به عنوان مثال، در اکوتیپ کاشمر اعمال هورمون NAA با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم توانست طول ریشه‌های تولید شده را نسبت به اعمال غلظت ۰/۵ میلی‌گرم از هورمون IAA به طور معنی داری افزایش دهد.



شکل ۴-۲۱ مقایسه میانگین طول ریشه‌های تولید شده در محیط کشت MS غنی شده با سطوح متفاوت هورمون‌های اکسینی IAA و NAA در اکوتیپ‌های مختلف شیرین‌بیان

۴-۳-۳- قطر ریشه

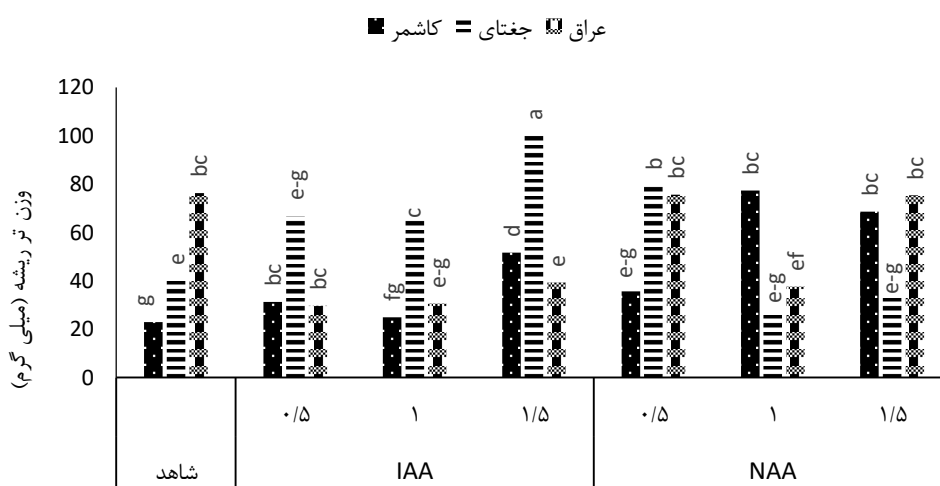
نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌های قطر ریشه نشان داد که در بین تیمارهای مورد بررسی، فقط اثر متقابل دوجانبه‌ی اکوتیپ و هورمون در سطح ۵ درصد اختلافات معنی‌داری در این صفت بودند (جدول ۴-۴). (شکل ۴-۲۲) نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل اکوتیپ × هورمون را بر این صفت نشان می‌دهد. بر این اساس، اکوتیپ کاشمر رشد یافته در محیط MS نیمه جامد غنی شده با ۰/۵ میلی‌گرم هورمون IAA، با افزایش معنی‌دار ۳۵ درصدی نسبت به شرایط شاهد (عدم مصرف هورمون) توانست قشورترین ریشه را تولید کند. سایر اکوتیپ‌ها در سطوح هورمونی مختلف اختلاف معنی‌داری را از نظر این صفت نشان ندادند. نتایج این آزمایش با یافته‌های آزمایش قبل مبنی بر برتری این اکوتیپ در تولید ریشه‌های قشور مطابقت داشت.



شکل ۴-۲۲ مقایسه میانگین قطر ریشه‌های تولید شده در محیط کشت MS غنی شده با سطوح متفاوت هورمون‌های اکسینی IAA و NAA در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان

۴-۳-۴- وزن تر ریشه

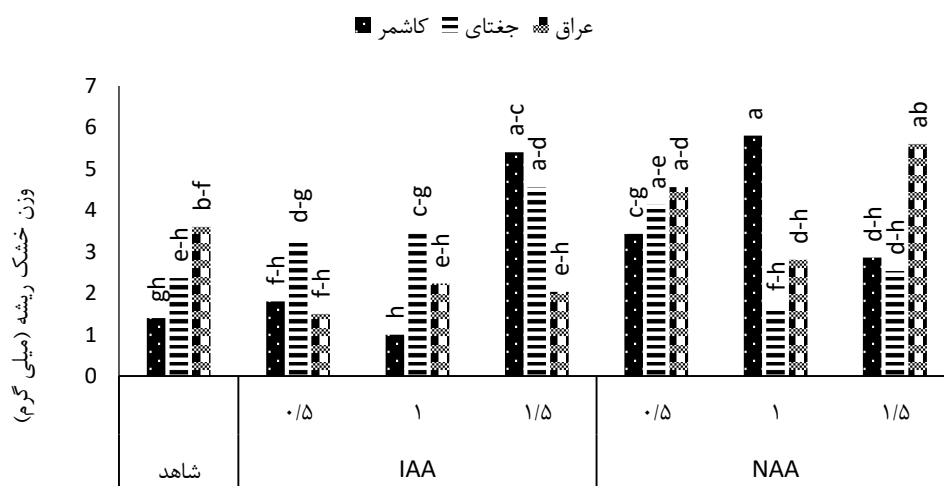
نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌های وزن تر ریشه نیز مبین اثر متقابل و معنی‌دار و دوجانبه‌ی اکوتیپ×هورمون بر تغییرات وزن تر ریشه در ترکیبات تیماری مختلف بود (جدول ۴-۴). با توجه به نتایج مقایسه میانگین این اثر متقابل، اکوتیپ جغتای تیمار شده با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم هورمون IAA بیشترین وزن تر ریشه (۱۰۰ میلی‌گرم) را تولید کرد. در حالی که کمترین وزن تر ریشه (میلی‌گرم) توسط اکوتیپ کاشمر رشد یافته در شرایط عدم مصرف هورمون مشاهده گردید (شکل ۴-۲۳). این اکوتیپ (کاشمر) در آزمایشات قبلی نیز از مقادیر پایین این صفت برخوردار بود.



شکل ۴-۲۳ مقایسه میانگین وزن تر ریشه‌های تولید شده در محیط کشت MS غنی شده با سطوح متفاوت هورمون‌های اکسینی IAA و NAA در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان

۴-۳-۵- وزن خشک ریشه

وزن خشک ریشه به طور معنی داری تحت تاثیر سطوح مختلف تیمار هورمونی و نیز برهمکنش دو تیمار اکوتیپ و هورمون قرار گرفت (جدول ۴-۴). با توجه به معنی داری آثار متقابل دو جانبه اکوتیپ و هورمون، مشاهده می‌گردد که اکوتیپ‌های مختلف رشد یافته تحت سطوح مختلف هورمون‌های اکسینی اعمال شده پاسخ متفاوتی را به تولید و تجمع ماده خشک در ریشه از خود نشان داد (شکل ۴-۲۴). همچنین مشاهده می‌گردد که اعمال غلظت‌های مختلف هورمون‌های اکسینی در برخی اکوتیپ‌ها به افزایش معنی دار تولید ماده خشک در ریشه منجر شده است. بر این اساس، کاربرد غلظت‌های ۱/۵ و ۱ میلی‌گرم از هورمون‌های IAA و NAA توانست علاوه بر افزایش معنی دار نسبت به شاهد به تولید بالاترین میزان ماده خشک در ریشه در اکوتیپ کاشمر منجر گردد (شکل ۴-۲۴). نتیجه مشابهی با کاربرد ۱/۵ و ۰/۵ میلی‌گرم از هورمون NAA در اکوتیپ عراقی نیز حاصل گردید (شکل ۴-۲۴) تولید ماده خشک ریشه‌ای اکوتیپ جغتای سطح هورمون IAA (۱/۵ میلی‌گرم) به طور معنی داری نسبت به شاهد افزایش یافت (شکل ۴-۲۴).

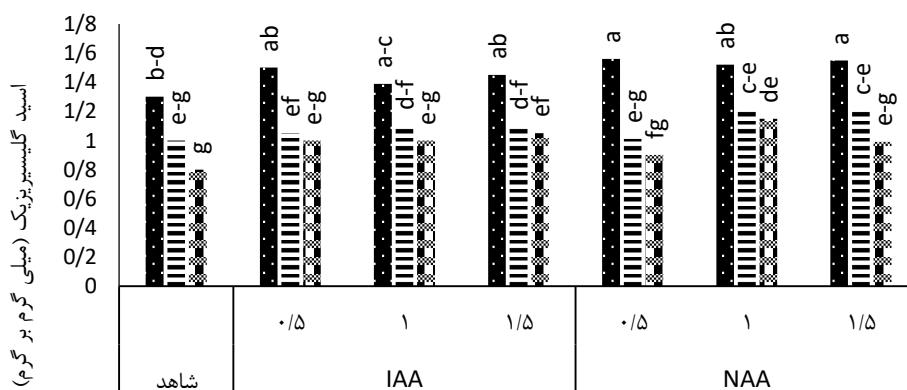


شکل ۴-۲۴ مقایسه میانگین وزن خشک ریشه‌های تولید شده در محیط کشت MS غنی شده با سطوح متفاوت هورمون‌های اکسینی IAA و NAA در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان

۴-۳-۶- محتوای اسید گلیسیریزیک

هر تیمارهای مورد بررسی اعم از اکوتیپ‌های مختلف و سطوح مختلف هورمون‌های اکسین و اثر متقابل آن‌ها بر تنوع تولید ماده موثره اسید گلیسیریزیک در ریشه‌ها به طور معنی‌داری تاثیرگذار بودند (جدول ۴-۴). نتایج مقایسات میانگین اثر متقابل فاکتورها، به وضوح بیانگر برتری اکوتیپ کاشمر در تمامی سطوح تیمارهای هورمونی IAA و NAA بود (شکل ۴-۲۵). این اکوتیپ اگرچه با مقدار کمتر ولی در تیمار شاهد (عدم مصرف هورمون) نیز به عنوان برترین اکوتیپ در تولید این ماده موثره شناسایی گردید (شکل ۴-۲۵). با توجه به نتایج، هرچند اکوتیپ کاشمر در شرایط عدم مصرف هورمون نیز نسبت به سایر اکوتیپ‌های مورد بررسی اسید گلیسیریزیک بیشتری را در ریشه تولید کرد، با این حال اعمال تیمارهای هورمونی به ویژه هورمون NAA در سطوح ۰/۵ و ۱/۵ آن توانست میزان تولید اسید گلیسیریزیک را به طور معنی‌داری در ریشه این اکوتیپ افزایش دهد. همچنین اکوتیپ عراقی اگرچه در پایین‌ترین رتبه از نظر تولید این ماده موثره در شرایط شاهد و کلیه سطوح هورمونی بود، با این حال اعمال تیمارهای هورمونی مورد استفاده در این آزمایش به خصوص تیمار NAA در غلظت ۱ میلی‌گرم و نیز تیمار IAA در بالاترین سطح آن (غلظت ۱/۵ میلی‌گرم) توانست، به افزایش معنی‌دار تولید اسید گلیسیریزیک در ریشه‌های این اکوتیپ نیز منجر گردد (شکل ۴-۲۵).

عراقی █ جغتای █ = کاشمر █



شکل ۴-۲۵ مقایسه میانگین میزان اسید گلیسیریزیک تولید شده در محیط کشت MS غنی شده با سطوح متفاوت هورمون‌های اکسینی IAA و NAA در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان

۴-۴-آزمایش چهارم: بررسی اثر فسفر و نانوکربن بر صفات فیزیولوژیک و مورفولوژیک

اکوتیپ‌های مختلف گیاه شیرین بیان

جدول ۴-۵ نتایج تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان رشد یافته تحت در

محیط کشت MS حاوی تیمارهای فسفر و نانوکربن

منابع تغییرات	درجه آزادی	تعداد برگ	طول ساقه	طول ریشه	قطر ریشه	تعداد ریشه جانبی	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه	محتوای اسید گلیسیریزیک ریشه
فسفر	۲	۲/۳۸**	۱/۹۲ ^{NS}	۱۳/۹۹**	۰/۱۴۴*	۲۴۱**	۴۸۶/۴۵*	۱/۲۸ ^{NS}	۲۱۱۳/۲۱**
نانوکربن	۲	۴/۴۹**	۰/۶۸ ^{NS}	۱۴/۸۴**	۰/۱۴۲*	۴۲/۴۸**	۲۳۰۸۴۹/۴۹**	۱۶/۷۵**	۳۰۰/۴۵**
اکوتیپ	۲	۱۳/۴۹**	۱۳/۱۹**	۱۲/۲۰**	۰/۹۱۳**	۸۵۹**	۱۶۱۴۱/۴۹**	۴۷/۵۵**	۹۸۲۴/۸۳**
فسفر × نانو	۴	۲/۵۸**	۴/۲۲**	۱۹/۳۳**	۰/۲۱۸**	۱۲۲/۰۳**	۱۱۳۰/۷۹**	۱۲/۹۷**	۱۲/۴۲**
فسفر × اکوتیپ	۴	۰/۶۴ ^{NS}	۱/۸۶*	۱۰/۱۹**	۰/۱۴۴*	۸۵/۲۲**	۲۱۷۹/۷۳**	۹/۹**	۱۲۰/۹۲**
نانو × اکوتیپ	۴	۰/۰۳ ^{NS}	۱۱/۴۵**	۱۴/۲۸**	۰/۱۴۲*	۷/۷۰ ^{NS}	۹۹۰/۱۶**	۱۲/۳۳**	۱۹/۷۵**
فسفر × نانو × اکوتیپ	۸	۱/۲۶**	۱/۹۰*	۱۳/۷۴**	۰/۲۱۸**	۷۰/۶۷**	۱۵۱۴/۸۱**	۹/۱۹**	۸/۳۰**
خطا آزمایش	۵۴	۰/۳۸۲	۰/۸۴۰	۲/۰۴	۰/۰۴	۳/۲۴	۱۷/۶۸	۱/۳۸	۰/۰۰۰۱
ضریب تغییرات (%)		۱۴/۶۰	۱۲/۶۹	۲۵/۲۷	۱۸/۱۳	۲۳/۹۵	۲۱/۳۸	۳۵/۲۳	۱/۱۷

* و ** به ترتیب بیانگر معنی داری در سطح ۵ و ۱ درصد و NS عدم معنی دار را نشان می‌دهد.

۴-۴-۱-تعداد برگ

نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌های تعداد برگ نشان داد که هر آثار ساده تیمارهای فسفر،

نانوکربن و اکوتیپ و نیز اثر متقابل دوگانه فسفر × نانو و نیز اثر متقابل سه جانبه این تیمارها در سطح ۱

درصد معنی دار بودند (جدول ۴-۵). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سه جانبه تیمارها بر تعداد برگ

گیاه شیرین بیان نشان داد که اکوتیپ‌های مختلف تاثیر پذیری یکسانی را در تولید برگ تحت سطوح

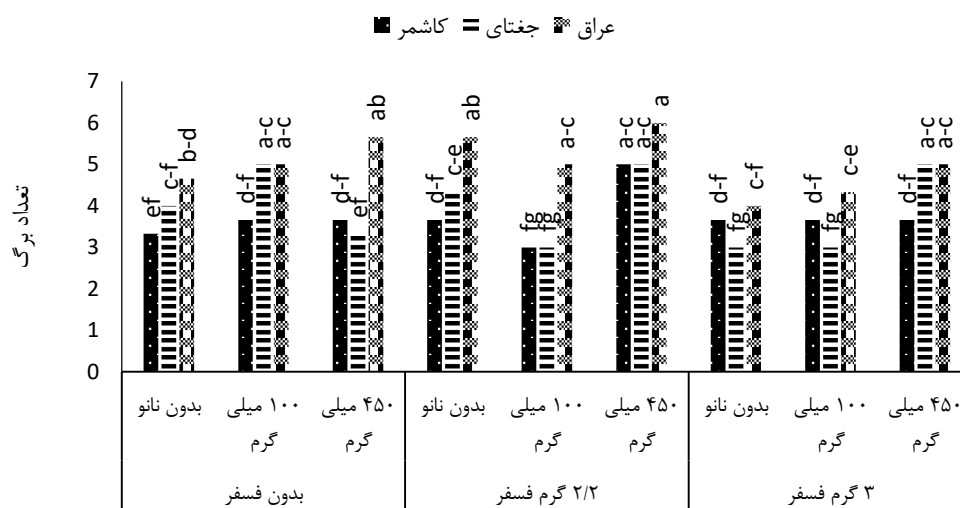
مختلف تیمارهای فسفر و نانوکربن نشان ندادند (شکل ۴-۲۶). بر این اساس اکوتیپ عراقی در همه

ترکیبات تیمارهای فسفر و نانوکربن به استثنای بالاترین سطح فسفر (۳ گرم) همراه با عدم مصرف و

مصرف ۱۰۰ میلی گرم نانوکربن، در این بیشتر تعداد برگ نسبت به سایر اکوتیپ‌ها بود. در بین ترکیبات

تیماری، اعمال ۲/۲ گرم فسفر به همراه ۴۵۰ میلی گرم نانوکربن توانست به افزایش معنی دار ۲۰ درصدی

تولید برگ در این اکوتیپ (عراقی) نسبت به تیمار شاهد (عدم مصرف فسفر و نانوکربن) منجر گردد (شکل ۴-۲۶). اکوتیپ جغتای اگرچه در برخی از سطوح ترکیبات تیماری برتر بود، ولی این افزایش در تعداد برگ در این اکوتیپ نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار نبود. در حالی که اکوتیپ کاشمر که در پایین‌ترین رتبه از نظر تولید برگ، نسبت به سایر اکوتیپ‌ها قرار داشت. توانست تحت تاثیر تیمار ۲/۲ گرم فسفر و ۴۵۰ میلی‌گرم نانوکربن افزایش معنی‌دار ۳۴ درصدی را نسبت به تیمار شاهد نشان دهد (شکل ۴-۲۶).

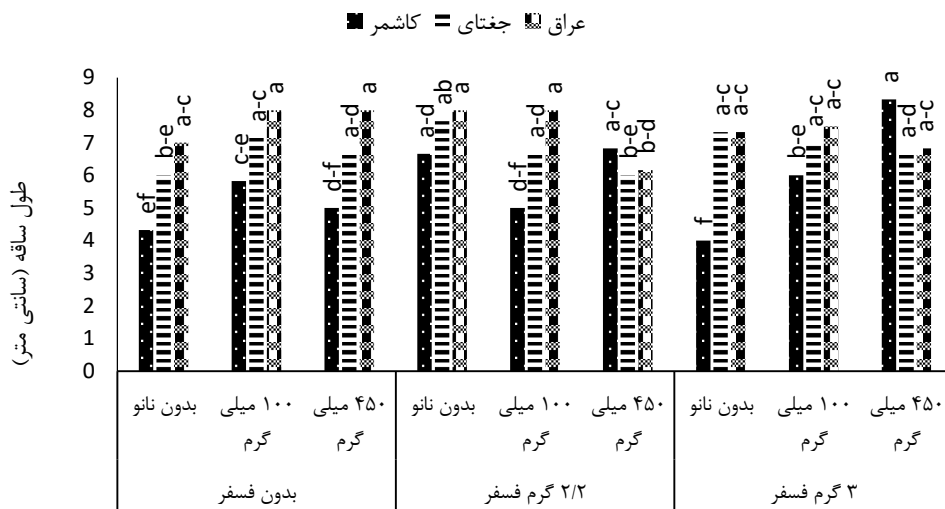


شکل ۴-۲۶ مقایسه میانگین تعداد برگ تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان رشد یافته در محیط‌های MS غنی شده با سطوح مختلف فسفر (۰، ۲/۲ و ۳ گرم) و نانوکربن (۰، ۱۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم)

۴-۲-۴- طول ساقه

نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌های طول ساقه نشان داد که در بین تیمارهای مورد بررسی تنها اثر ساده اکوتیپ بر رشد طولی ساقه معنی‌دار بود (جدول ۴-۵). همچنین آثار متقابل دوجانبه و سه جانبه تیمارهای فسفر، نانوکربن و اکوتیپ ایرانی بر این صفت معنی‌دار بودند (جدول ۴-۵). مقایسه میانگین اثر متقابل سه جانبه تیمارها نشان داد که اکوتیپ عراقی اگرچه در تمامی سطوح ترکیبات تیماری به استثنای ترکیب تیماری ۲/۲ گرم فسفر همراه با ۴۵۰ میلی‌گرم نانوکربن، دارای بالاترین طول

ساقه بود، با این حال این افزایش و کاهش در طول ساقه نسبت به تیمار شاهد معنی دار نبود (شکل ۴-۲۷). روند مشابهی نیز در اکوتیپ جغتای مشاهده گردید. در حالی که اکوتیپ کاشمر توانست با تاثیر پذیری معنی دار از برخی ترکیبات تیماری نظیر کاربرد ۲/۲ گرم فسفر به تنهایی و همراه با مصرف ۴۵۰ میلی گرم نانوکربن و به ویژه ترکیب ۳ گرم فسفر همراه با ۴۵۰ میلی گرم افزایش معنی داری را به ترتیب به میزان ۳۵، ۳۶ و ۴۹/۵ درصد در طول ساقه تولید کند.

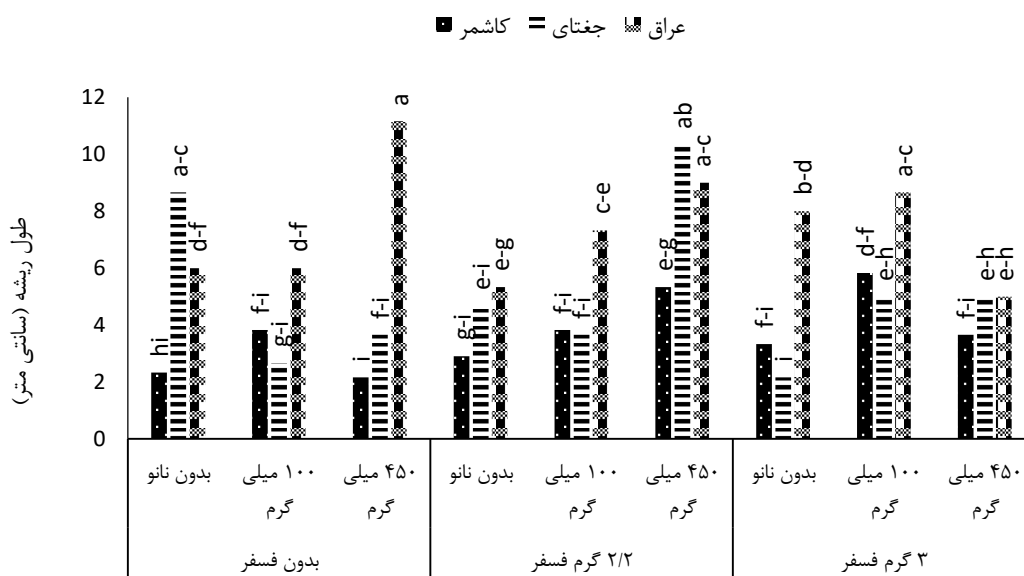


شکل ۴-۲۷ مقایسه میانگین طول ساقه تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان رشد یافته در محیط‌های MS غنی شده با سطوح مختلف فسفر (۰، ۲/۲ و ۳ گرم) و نانوکربن (۰، ۱۰۰ و ۴۵۰ میلی گرم)

۴-۳-۴ طول ریشه

طول ریشه به طور معنی داری (سطح احتمال ۱ درصد) تمامی آثار ساده و متقابل تیمارهای فسفر، نانوکربن و اکوتیپ قرار گرفت (جدول ۴-۵). مقایسه میانگین برهمکنش سه جانبه ترکیبات فسفر، نانوکربن و اکوتیپ نشان داد که در این آزمایش اکوتیپ عراقی با تولید ریشه‌هایی به طول ۱۱/۶ سانتی متر در محیط کشت حاوی ۴۵۰ میلی گرم نانوکربن و فاقد فسفر بالاترین رتبه را به خود اختصاص داد (شکل ۴-۲۸). این درحالی است که همین اکوتیپ در ترکیبات تیماری دیگری نظیر کاربرد همزمان ۲/۲ گرم فسفر با ۴۵۰ میلی گرم نانوکربن و نیز ترکیب ۳ گرم فسفر با ۱۰۰ میلی گرم نانوکربن دارای بالاترین میزان از نظر این صفت بود (شکل ۴-۲۸). اکوتیپ جغتای نیز اگرچه توانست

در ترکیب تیماری ۲/۲ گرم فسفر به همراه ۴۵۰ میلی گرم نانوکربن طول ریشه مناسبی را تولید کند، با این حال این برتری افزایش معنی داری را نسبت به تیمار شاهد نشان نداد (شکل ۴-۲۸). اکوتیپ کاشمر اگرچه در پایین ترین جایگاه از نظر تولید ریشه های طویل قرار داشت، با این حال در ترکیبات تیماری ۲/۲ گرم فسفر و ۴۵۰ میلی گرم نانوکربن و نیز ۳ گرم فسفر به همراه ۱۰۰ میلی گرم به ترتیب افزایش ۵۴ و ۵۶ درصدی طول ریشه را نسبت به تیمار شاهد از خود نشان داد.

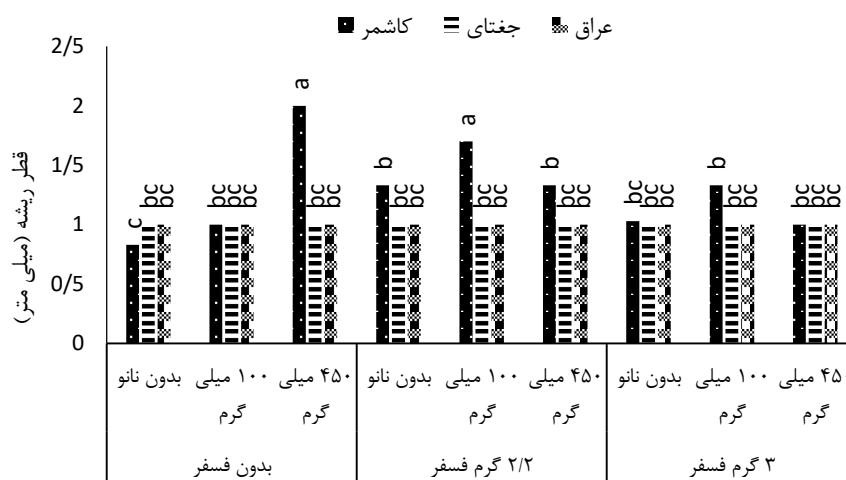


شکل ۴-۲۸ مقایسه میانگین طول ریشه تولید شده در اکوتیپ های مختلف شیرین بیان رشد یافته در محیط های MS غنی شده با سطوح مختلف فسفر (۰، ۲/۲ و ۳ گرم) و نانوکربن (۰، ۱۰۰ و ۴۵۰ میلی گرم)

۴-۴-۴ قطر ریشه

قطر ریشه نیز به طور معنی داری تحت همه آثار ساده، متقابل دوجانبه و سه جانبه هر سه تیمار، فسفر، نانوکربن و اکوتیپ قرار گرفت (جدول ۴-۵). با توجه به معنی دار شدن اثر متقابل سه جانبه، بررسی میانگین های حاصل نشان داد که اکوتیپ کاشمر دریافت ۴۵۰ میلی گرم نانوکربن بدون دریافت فسفر و نیز ۱۰۰ میلی گرم نانوکربن به همراه ۲/۲ گرم فسفر به ترتیب با تولید ریشه هایی به قطر ۱/۷۵ و ۲ میلی متر دارای اختلاف معنی داری با سایر اکوتیپ ها بود (شکل ۴-۲۹). قطر ریشه در

این اکوتیپ در ترکیبات تیماری دیگری نظیر ۲/۲ فسفر به همراه ۴۵۰ میلی گرم نانوکربن و عدم مصرف آن و همچنین ترکیب ۳ گرم فسفر با ۱۰۰ میلی گرم نانوکربن، نیز نسبت به شرایط شاهد افزایش یافت که البته این افزایش با مقادیر تولید شده در دو اکوتیپ دیگر تفاوت معنی داری نداشت (شکل ۴-۲۹). در این آزمایش دو اکوتیپ جغتای و عراقی روند مشابه و غیر معنی داری را در همه سطوح تیماری نسبت به شاهد از خود نشان دادند.

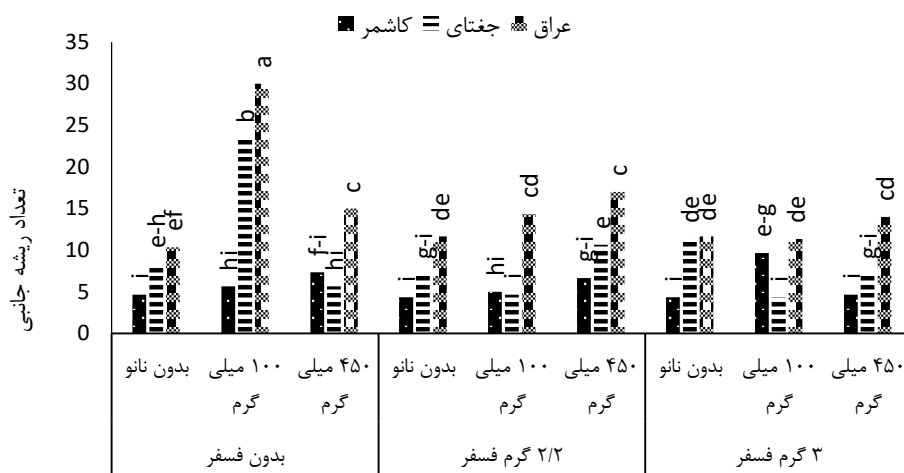


شکل ۴-۲۹ مقایسه میانگین قطر ریشه تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان رشد یافته در محیط‌های MS غنی شده با سطوح مختلف فسفر (۰، ۲/۲ و ۳ گرم) و نانوکربن (۰، ۱۰۰ و ۴۵۰ میلی گرم)

۴-۴-۵- تعداد ریشه فرعی

نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌های تعداد ریشه نشان داد که همه تیمارها و آثار متقابل آنها به جز اثر متقابل نانوکربن × اکوتیپ بر صفت تعداد ریشه جانبی به طور معنی داری تاثیر گذار بودند. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سه جانبه تیمارها بر این صفت نشان داد که اکوتیپ عراقی در مجموع بیشترین تعداد ریشه‌های جانبی را نسبت به اکوتیپ‌های ایرانی کاشمر و جغتای تولید کرد (شکل ۴-۳۰). این اکوتیپ در آزمایشات قبلی نیز از نظر تولید ریشه جانبی نسبت به سایر اکوتیپ‌ها برتر بود، در این آزمایش نیز در تیمار ۱۰۰ میلی گرم نانوکربن در شرایط عدم فسفر با تولید ۳۱ عدد ریشه جانبی جزء بهترین اکوتیپ مورد مطالعه بود. تیمار مذکور (کاربرد ۱۰۰ میلی گرم نانوکربن بدون فسفر) توانست

علاوه بر اکوتیپ عراقی، تعداد ریشه‌های جانبی اکوتیپ جغتای را نیز به طور معنی‌داری تا حدود ۷۰ درصد نسبت به شاهد افزایش دهد. (شکل ۴-۳۰). اکوتیپ کاشمر از نظر تعداد ریشه جانبی در پایین‌ترین رتبه نسبت به دو اکوتیپ دیگر قرار گرفت. در بین سطوح تیماری مختلف، این اکوتیپ تنها پس از دریافت ترکیب تیماری ۳ گرم فسفر به همراه ۱۰۰ میلی‌گرم نانوکربن توانست افزایش معنی‌داری در تولید ریشه‌های جانبی نسبت به شاهد نشان دهد (شکل ۴-۳۰).



شکل ۴-۳۰ مقایسه میانگین تعداد ریشه جانبی تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان رشد یافته در محیط - های MS غنی شده با سطوح مختلف فسفر (۰، ۲/۲ و ۳ گرم) و نانوکربن (۰، ۱۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم)

۴-۴-۶- وزن تر ریشه

بر اساس نتایج حاصل از آنالیز واریانس، همه تیمارهای مورد بررسی و آثار متقابل آن‌ها بر تغییرات وزن تر ریشه تاثیر گذار بودند (جدول ۴-۵). نظر به معنی‌داری برهمکنش سه جانبه تیمارها، نتایج مقایسه میانگین نشان داد در تیمار ۲/۲ گرم فسفر به تنهایی، با تولید ۱۱۰ میلی‌گرم وزن تر ریشه، بیشترین وزن تر ریشه را نسبت به سایر تیمارها تولید کرد (شکل ۴-۳۱).



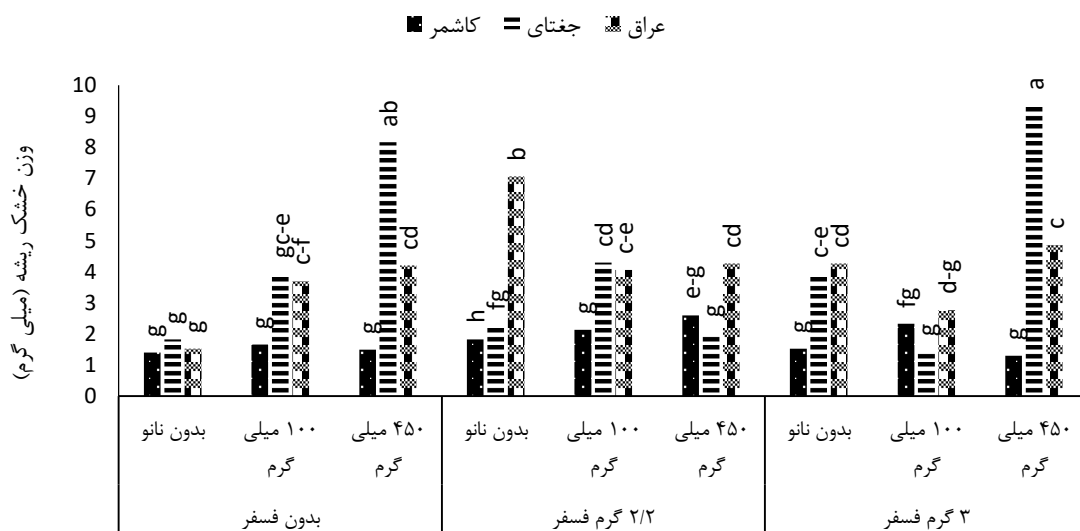
شکل ۴-۳۱ مقایسه میانگین وزن تر ریشه تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان رشد یافته در محیط‌های MS غنی شده با سطوح مختلف فسفر (۰، ۲/۲ و ۳ گرم) و نانوکربن (۰، ۱۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم).

اکوتیپ جغتای که در تیمار شاهد از بیشترین تعداد ریشه جانبی برخوردار بود، در بین سایر ترکیبات تیماری تنها در تیمارهای ۳ گرم فسفر به همراه ۴۵۰ میلی‌گرم نانوکربن و ۳ گرم فسفر بدون کاربرد نانو توانست این برتری را نسبت به دیگر اکوتیپ‌ها حفظ نماید. همانطور که در نتایج شکل ۴-۳۱ مشاهده می‌شود تیمارهای مورد استفاده در اغلب سطوح تیماری افزایش معنی‌داری را در تولید وزن تر ریشه نشان می‌دهند. اکوتیپ کاشمر نیز اگرچه در تمامی سطوح تیماری بجز کاربرد ۲/۲ گرم فسفر به تنهایی (بدون حضور نانوکربن) توانست افزایش معنی‌داری در تولید ریشه‌های وزین‌تر نسبت به شاهد کسب کند، با این حال میزان این افزایش از دو اکوتیپ دیگر کمتر بود. بنابراین این اکوتیپ از نظر تولید ریشه‌های با وزن تر بالا در پایین‌ترین رتبه نسبت به سایرین قرار گرفت (شکل ۴-۳۱).

۴-۴-۷- وزن خشک ریشه

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس، بجز اثر ساده فسفر، تمامی تیمارها (نانوکربن و اکوتیپ) و آثار متقابل آنها تاثیر معنی‌داری بر صفت وزن خشک ریشه داشتند (جدول ۴-۵). مقایسه میانگین اثر متقابل فسفر، نانوکربن و اکوتیپ نشان داد که علی‌رغم وجود تفاوت معنی‌دار بین اکوتیپ‌ها از نظر تولید و تجمع ماده خشک ریشه در شرایط شاهد (عدم فسفر و مصرف نانوکربن)، اکوتیپ جغتای توانست

تحت تیمارهای ۴۵۰ میلی‌گرم نانوکربن به همراه کاربرد ۳ گرم فسفر، بالاترین وزن خشک ریشه را تولید نماید (شکل ۴-۳۲). اکوتیپ عراقی با تاثیر پذیری مثبت از بیشتر ترکیبات تیماری به جر ترکیب ۳ گرم فسفر همراه با ۱۰۰ میلی‌گرم نانوکربن توانست افزایش معنی‌داری را در وزن خشک ریشه نسبت به شاهد ایجاد نماید. این افزایش به گونه‌ای بود که در برخی تیمارها شامل کاربرد ۲/۲ گرم فسفر به تنهایی و نیز به همراه ۴۵۰ میلی‌گرم نانوکربن، جایگاه این اکوتیپ را به بالاترین سطح نسبت به دو اکوتیپ دیگر ارتقا داد (شکل ۴-۳۲). در حالی که اکوتیپ کاشمر به طور معنی‌داری تحت تاثیر ترکیبات تیماری سطوح مختلف فسفر و نانوکربن قرار نگرفت و در هیچ ترکیبی افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان نداد. ضمن اینکه در این آزمایش در مجموع، پایین‌ترین میزان وزن خشک ریشه را نسبت به دو اکوتیپ دیگر تولید کرد (شکل ۴-۳۲).

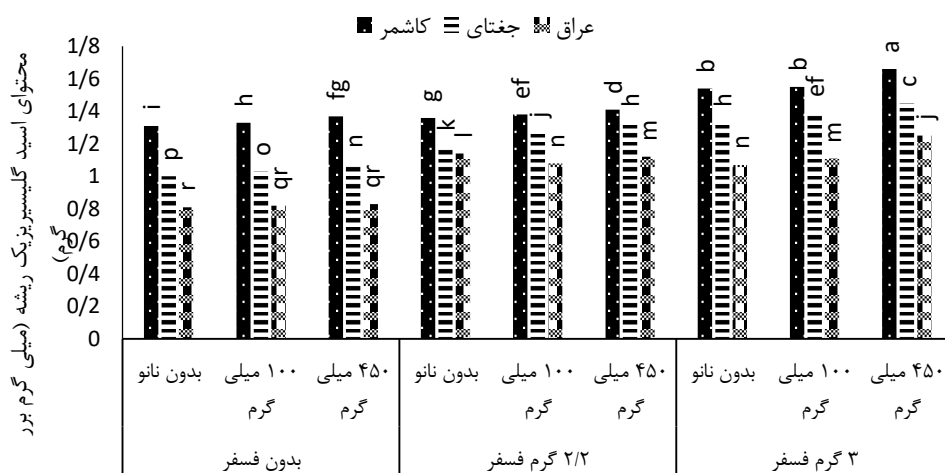


شکل ۴-۳۲ مقایسه میانگین وزن خشک ریشه تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان رشد یافته در محیط-های MS غنی شده با سطوح مختلف فسفر (۰، ۲/۲ و ۳ گرم) و نانوکربن (۰، ۱۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم).

۴-۴-۸- محتوای اسید گلیسیریزیک ریشه

با توجه به نتایج جدول تجزیه واریانس، محتوای اسید گلیسیریزیک ریشه از آثار ساده و متقابل تمامی تیمارهای مورد بررسی به طور معنی‌داری تاثیر پذیرفت (جدول ۴-۵). نتایج مقایسه میانگین برهمکنش سه تیمار فسفر، نانوکربن و اکوتیپ بر این صفت بیانگر این امر بود که اگرچه روند یکسانی

در تمامی سطوح تیماری و نیز شرایط شاهد از نظر تولید این ماده موثره وجود داشت، ولی این روند با تفاوت‌های مقادیر معنی‌داری بین سطوح مختلف همراه بود (شکل ۴-۳۳). بر اساس نتایج حاصله در بالاترین سطح تیمارهای فسفر و نانوکربن (کاربرد ۳ گرم فسفر و ۴۵۰ میلی‌گرم نانوکربن)، اکوتیپ کاشمر توانست بیشترین میزان اسید گلیسیریزیک $1/66$ (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) ریشه را نسبت به سایر اکوتیپ‌ها تولید نماید. همچنین این اکوتیپ توانست در تمامی سطوح ترکیبات تیماری این برتری را نسبت به دو اکوتیپ دیگر حفظ نماید و در مجموع دارای بیشترین مقدار اسید گلیسیریزیک بود. این نتیجه با یافته‌های قبلی این تحقیق نیز مطابقت داشت. بر اساس نتایج حاصله در شکل ۴-۳۳ مشاهده می‌گردد که دو اکوتیپ ایرانی کاشمر و پس از آن جغتای با تاثیر پذیری مثبت از تمامی ترکیبات تیماری فسفر و نانوکربن افزایش معنی‌داری در محتوای اسید گلیسیریزیک ریشه نسبت به شرایط شاهد داشته‌اند. در حالی که این نتیجه در اکوتیپ عراقی در شرایط بدون فسفر حاصل نگردید. به گونه‌ای که در شرایط عدم مصرف فسفر با کاربرد ۱۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم نانوکربن افزایش ناچیز و غیر معنی‌داری در ماده موثره این اکوتیپ نسبت به تیمار شاهد حاصل گردید. بنابراین به نظر می‌رسد که تاثیر گذاری تیمارهای نانوکربنی در افزایش ماده موثره به سطوح مختلف اعمال آن و نوع اکوتیپ و نیز تقابل آن با سایر تیمارها بستگی دارد.



شکل ۴-۳۳ مقایسه میانگین محتوای اسید گلیسیریزیک ریشه تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان رشد یافته در محیط‌های MS غنی شده با سطوح مختلف فسفر (۰، ۲/۲ و ۳ گرم) و نانوکربن (۰، ۱۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم). (گرم).

۴-۵- آزمایش پنجم: القای ریشه‌های تراریخت در ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه

اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان در شرایط کاربرد و عدم کاربرد استوسرینگون

جدول ۴-۶ نتایج تجزیه واریانس درصد تولید ریشه‌های تراریخت از ریز نمونه‌های برگ، ساقه و ریشه‌ی اکوتیپ‌های

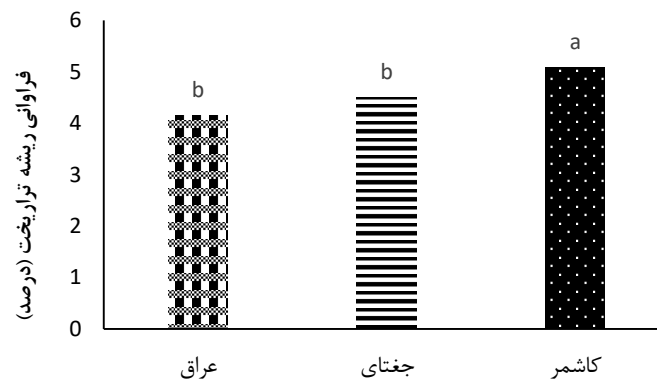
مختلف شیرین بیان با سنین مختلف در شرایط کاربرد و عدم کاربرد استوسرینگون

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد تولید ریشه‌های تراریخت
اکوتیپ	۲	۴۱/۱۷**
استوسرینگون	۱	۲۵۱۴/۵۸**
سن ریزنمونه	۳	۱۳۲۵/۰۳**
نوع ریز نمونه	۲	۲۲۱۳/۸۶**
اکوتیپ* استوسرینگون	۲	۱۲**
اکوتیپ* سن ریزنمونه	۶	۶/۰۷ ^{ns}
اکوتیپ* نوع ریز نمونه	۴	۱۶/۸۸**
استوسرینگون* سن ریزنمونه	۳	۵۰۷/۲۳**
استوسرینگون* نوع ریزنمونه	۲	۸۶۷/۶۹**
سن ریزنمونه* نوع ریز نمونه	۶	۱۰۶۸/۳۸**
اکوتیپ* استوسرینگون* سن ریزنمونه	۶	۶/۶۴ ^{ns}
اکوتیپ* استوسرینگون* نوع ریز نمونه	۴	۳/۶۸ ^{ns}
اکوتیپ* نوع ریز نمونه* سن ریزنمونه	۱۲	۷/۲۷ ^{ns}
استوسرینگون* سن ریزنمونه* نوع ریزنمونه	۶	۳۸۸/۰۹۶**
اکوتیپ* استوسرینگون* سن ریزنمونه* نوع ریزنمونه	۱۸	۴۳۸/۲**
خطا	۲۱۶	۰/۷
ضریب تغییرات (/.)		۱۸/۲۴

* و ** به ترتیب بیانگر معنی داری در سطح ۵ و ۱ درصد و ns عدم معنی دار را نشان می‌دهد

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که درصد تولید ریشه‌های تراریخت به طور معنی‌داری تحت تاثیر هریک از تیمارهای اکوتیپ، استوسرینگون، سن و نوع ریز نمونه قرار گرفت (جدول ۴-۶). در بین آثار متقابل دوجانبه تنها اثر اکوتیپ و سن ریز نمونه معنی‌دار نبود. در حالی‌که در آثار متقابل سه جانبه

فقط اثر توام استوسرینگون با سن و نوع ریزنمونه معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین این صفت در اکوتیپ‌های مختلف نشان داد که متوسط درصد تولید ریشه‌های تراریخت در اکوتیپ‌ها ۴/۵۸ درصد و دامنه‌ی تغییرات این صفت از ۵/۰۸ درصد تا ۴/۱۶ درصد متغیر بود (شکل ۴-۳۴)، اکوتیپ ایرانی کاشمر بالاترین درصد تراریختی را نشان داد در حالی که دو اکوتیپ عراقی و جغتای به صورت مشترک از پایین‌ترین میزان این صفت برخوردار بودند (شکل ۴-۳۴).

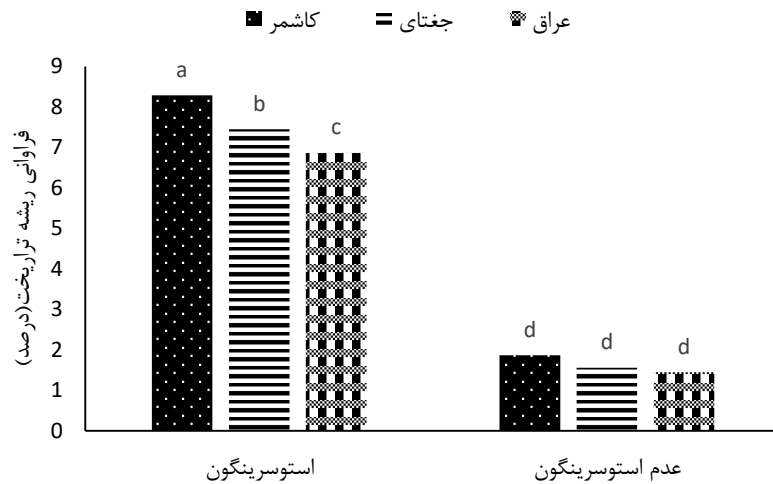


شکل ۴-۳۴ مقایسه میانگین درصد تولید ریشه‌های تراریخت اکوتیپ‌های مختلف شیرین‌بیان

تاکنون گزارشات زیادی از ایجاد ریشه‌های تراریخت در ریزنمونه‌های تلقیح شده با باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز، در گیاهان دارویی *Glycyrrhiza glabra* (مهروترا و همکاران، ۲۰۰۸)، *Silybum marianum* (رهنما و همکاران، ۲۰۰۸)، *Gynostemma pentaphyllum* (چانگ و همکاران، ۲۰۰۵)، *Scopolia japonica* (مانو و همکاران، ۱۹۸۶)، *Saussurea medusa* (لی و همکاران، ۲۰۰۶)، *Atropa belladonna* (آکی و همکاران، ۱۹۹۷) و *Artemisia annua* (پوتالون و همکاران، ۲۰۰۷) ارائه شده است. دهاکولکار و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعات خود، نوع سویه باکتری و حساسیت گونه‌ها را به عنوان عوامل موثر در ایجاد ریشه‌های تراریخت بیان کردند. در مطالعات کوالنکو و همکاران (۲۰۰۶) و تنا و همکاران (۲۰۰۸)، سویه‌های A4 و LBA9402 قادر به تلقیح شیرین بیان نبودند. مطالعات نشان داده است که میزان هورمون در گیاه نقش مهمی در تشکیل ریشه‌های تراریخت و خصوصیات مورفولوژیکی آن‌ها دارد. در مطالعه سودها و همکاران (۲۰۰۳) گیاه *Rauvolfia micrantha* ریشه‌های موبین با خصوصیات رشد کند و رو به بالا تولید شدند، که دلیل این امر را به

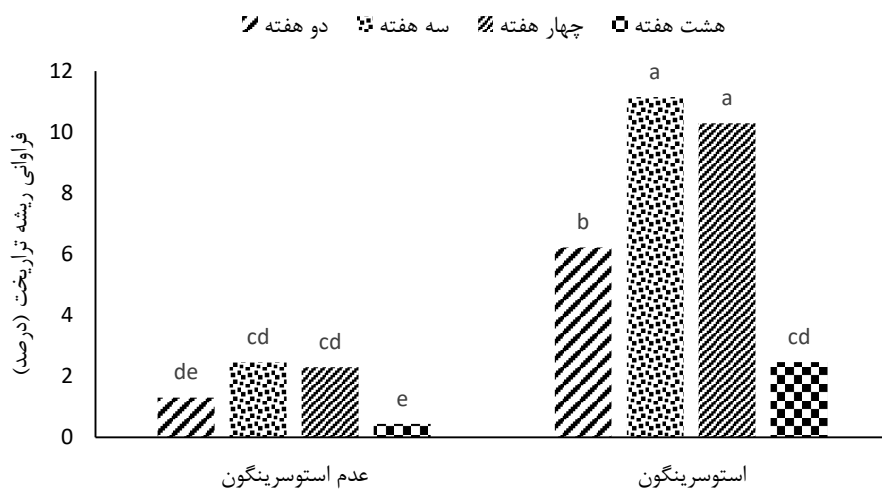
میزان اکسین و تعادل هورمونی داخلی نسبت دادند. آلیپزار و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که ریشه‌های تراریخت تولید شده در گیاه قهوه بسیاری از خصوصیات ریشه‌های تراریخت مانند داشتن کرک، انشعابات فراوان و عدم زمین گرایی را نداشتند و دلیل این ویژگی را به بیان متفاوت ژن‌های کد کننده اکسین و ژن‌های rol وارد شده به ژنوم گیاهی نسبت دادند. تنا و همکاران (۲۰۰۸) نیز گزارشی مشابه با تحقیق حاضر در مورد ویژگی متفاوت ریشه‌های تراریخت شیرین بیان در مقایسه با *Atropa Solanum tuberosum .belladonna* و *Lycopersicon esculentum* ارائه کردند. با توجه به اینکه قهوه و شیرین بیان بر خلاف درمنه خزری، شاهبیزک و عروسک پشت پرده، هر دو از جمله گیاهان چندساله و دارای ریشه‌های قطور می‌باشند، تا حدودی خصوصیت متفاوت ریشه‌های تراریخت آن‌ها را می‌توان به ژنوتیپ گیاه میزبان نسبت داد.

نتایج مقایسه‌ی میانگین اثر متقابل اکوتیپ‌ها با استوسرینگون نشان داد اکوتیپ‌های مختلف در محیط‌های حاوی استوسرینگون، بالاترین مقدار فراوانی ریشه تراریخت را داشتند (شکل ۴-۳۵). اکوتیپ‌های مختلف در محیط MS حاوی استوسرینگون تفاوت معنی‌داری را در نرخ تولید ریشه‌های تراریخت نشان دادند. در حالی که در شرایط عدم مصرف استوسرینگون تفاوت معنی‌داری از این نظر وجود نداشت. در بین اکوتیپ‌های رشد یافته در محیط MS حاوی استوسرینگون اکوتیپ کاشمر بالاترین درصد (۸/۲۹ درصد) تولید ریشه‌های تراریخت را به خود اختصاص داد (شکل ۴-۳۵). در حالی که اکوتیپ عراقی در همین شرایط از پایین‌ترین رتبه برخوردار بود. کومار و همکاران (۲۰۰۶) نیز به نقش مثبت استوسرینگون در محیط هم کشتی گیاهان توتون با باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز در افزایش چهار برابری فراوانی القای ریشه‌های تراریخت تاکید کردند. در گیاه در معرض انقراض *Berberis aristata* نیز کاربرد استوسرینگون افزایش القای ریشه‌های مویین را در پی داشت (بریجاوال و تامو ۲۰۱۵). دوپر و همکاران (۲۰۰۰)، دلیل اختلاف فراوانی تراریختی بین ریزنمونه‌های مختلف یک گیاه را تفاوت خصوصیات فیزیولوژیکی سلول‌ها بیان کردند.



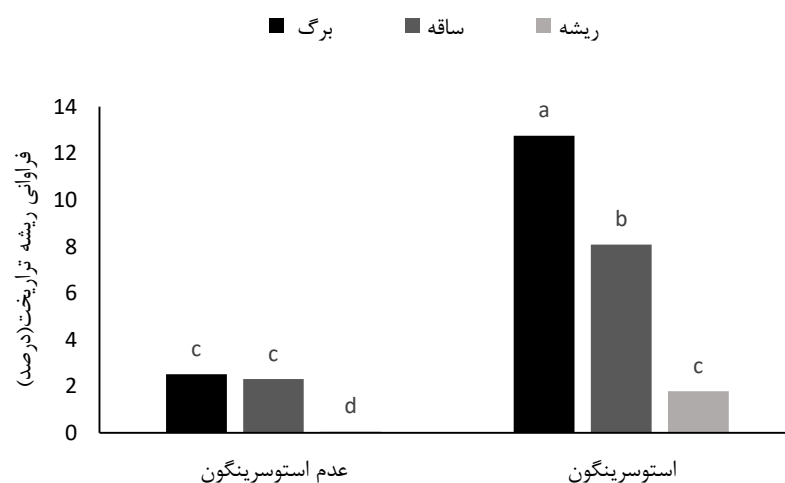
شکل ۴-۳۵ مقایسه میانگین درصد تولید ریشه‌های تراریخت در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان در شرایط مصرف و عدم مصرف استوسرینگون

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل استوسرینگون با سن ریز نمونه نشان داد که ریز نمونه‌های حاصل از گیاهچه‌های سه و چهار هفته‌ای در شرایط مصرف استوسرینگون، دارای بالاترین کارایی (به ترتیب ۱۱/۱۶ و ۱۰/۳ درصد) در تولید ریشه‌های تراریخت بودند (شکل ۴-۳۶). در حالی که در همین شرایط گیاهچه‌های ۸ هفته‌ای از پایین‌ترین راندمان تولید ریشه تراریخت برخوردار بودند. با توجه به نتایج حاصل از شکل ۴-۳۶، مشاهده شد که گیاهچه‌های ۲ و ۸ هفته‌ای در شرایط عدم مصرف استوسرینگون، به طور مشترک پایین‌ترین نرخ تولید ریشه‌های تراریخت را دارا بودند.



شکل ۴-۳۶ مقایسه میانگین درصد تولید ریشه‌های تراریخت در سنین مختلف گیاهچه‌ای در اکوتیپ‌های متفاوت شیرین بیان در شرایط حضور و عدم حضور استوسرینگون

همچنین مقایسه‌ی میانگین برهمکنش استوسرینگون با نوع ریز نمونه نشان داد که ریزنمونه برگی در شرایط مصرف استوسرینگون از بالاترین درصد تولید ریشه‌ی تراریخت (۱۲/۷۵ درصد) برخوردار بود و ریزنمونه‌های ساقه و برگ به ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار داشتند (شکل ۴-۳۷). اما در شرایط عدم مصرف استوسرینگون هر دو ریزنمونه ساقه و ریشه از کارایی یکسانی در تولید ریشه تراریخت برخوردار بودند. نتایج نشان داد، که تولید ریشه‌های تراریخت از ریز نمونه‌ی ریشه در شرایط عدم مصرف استوسرینگون تقریباً هیچ موفقیتی در پی نداشت. مهر و ترا و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که سن ریزنمونه می‌تواند روی فراوانی ریشه‌های تراریخت تاثیر داشته باشد، زیرا سن ریزنمونه بر روی ویژگی‌های فیزیولوژیکی سلول و در نتیجه توانایی تراریختی آن موثر است از آنجایی که استوسرینگون به عنوان عامل تحریک‌کننده‌ی ژن‌های بیماری‌زای آگروباکتریوم مطرح است، افزایش کارایی ترانسفورماسیون در حضور آن دور از انتظار نیست (مرادی و همکاران ۲۰۱۹).

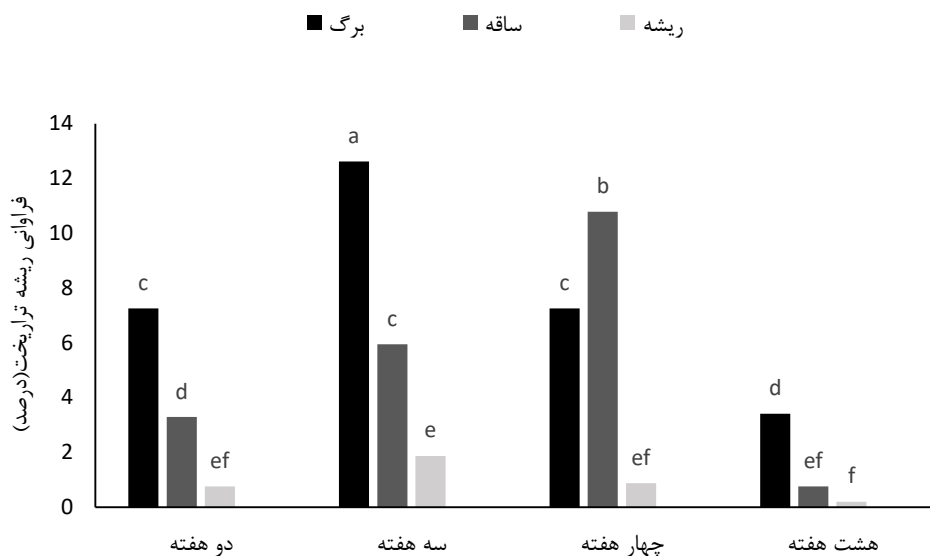


شکل ۴-۳۷ مقایسه میانگین درصد تولید ریشه‌های تراریخت از ریزنمونه‌های مختلف گیاه شیرین بیان در شرایط حضور و عدم حضور استوسرینگون

سن و نوع ریزنمونه مورد استفاده تاثیر عمده‌ای در القای ریشه‌های تراریخت دارند و افزایش سن ریزنمونه به دلیل تغییر در ویژگی فیزیولوژیکی سلول از مهم‌ترین فاکتورهای موثر در تراریختی می‌باشد (دایر و همکاران، ۲۰۰۰). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل نوع و سن ریز نمونه نشان داد که

ریز نمونه‌های مختلف (برگ، ساقه و ریشه) حاصل از گیاهچه‌های با سنین مختلف، کارایی متفاوتی را در تولید ریشه‌های تراریخت داشتند (شکل ۴-۳۸). بر این اساس بالاترین درصد تولید ریشه‌های تراریخت (۱۲/۶۲ درصد) به ریز نمونه‌های برگ‌ی تهیه شده از گیاهچه‌های سه هفته‌ای تعلق داشت. به طور کلی ریز نمونه‌های برگ‌ی حاصل از گیاهچه‌های دو، سه و هشت هفته‌ای، به طور معنی‌داری از کارایی بالاتری نسبت به ریزنمونه‌های ساقه و ریشه، در تولید ریشه‌های تراریخت برخوردار بودند. در حالی که گیاهچه‌های ۴ هفته‌ای روند متفاوتی مشاهده شد و در این گیاهچه‌ها ریزنمونه‌های ساقه در تولید ریشه‌های تراریخت موفق‌تر عمل نمودند. در حالی که در همه سنین مختلف گیاهچه‌ای ریزنمونه‌های ریشه از پایین‌ترین رتبه از نظر این ویژگی برخوردار بودند. در تحقیقات پاستری و همکاران (۲۰۰۰) ارتباط زیادی بین فراوانی تراریختی و سن جنین‌های نارس حاصل از گیاهچه‌ها به وسیله تراریختی با آگروباکتریوم مشاهده شد و با کاهش سن گیاهچه‌ها، فراوانی تراریختی از ۰/۲ به ۵ درصد افزایش یافت. دهاکولکار و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه اثر سنین مختلف گیاهچه‌های گیاه *Gmelina arborea* جهت تلقیح با آگروباکتریوم ریزوژنز نتایج مشابهی را گزارش کردند. در تحقیق مذکور، ریز نمونه‌های حاصل از گیاهچه‌های ۵، ۱۵ تا ۲۰ و ۲۵ تا ۳۰ روزه برای تلقیح انتخاب شده بودند و، ریزنمونه‌های حاصل از گیاهچه‌های ۵ روزه بیشترین القای ریشه (۳۲ درصد) را نشان دادند.

معمولاً بافت‌ها و بخش‌های جوان‌تر گیاه دارای توان تکثیری بالاتری می‌باشند و بنابراین برای رشد در شرایط این ویترو و تراریختی مطلوب‌تر هستند. با افزایش سن گیاه توان تکثیر آن نیز کاهش می‌یابد. در این صورت تراریختی حاصل می‌گردد، اما ممکن است سلول تراریخت توان تکثیر را نداشته باشد. افزایش سن گیاه و اندام‌های گیاهی باعث تمایز بیشتر بافت‌ها و سلول‌ها می‌شود و در نتیجه از این طریق بر قابلیت تکثیر و مقابله سلول با عوامل بیماری‌زا (از جمله آگروباکتریوم) تاثیر می‌گذارد (باقری و صفار، ۱۳۸۷). در گزارشات تنا و همکاران (۲۰۰۸) در تراریختی ریشه‌های شش هفته‌ای در مقایسه با ریشه‌های سه هفته‌ای، ریشه‌های مسن‌تر به عنوان ریزنمونه‌های مناسب برای تلقیح گزارش شدند.

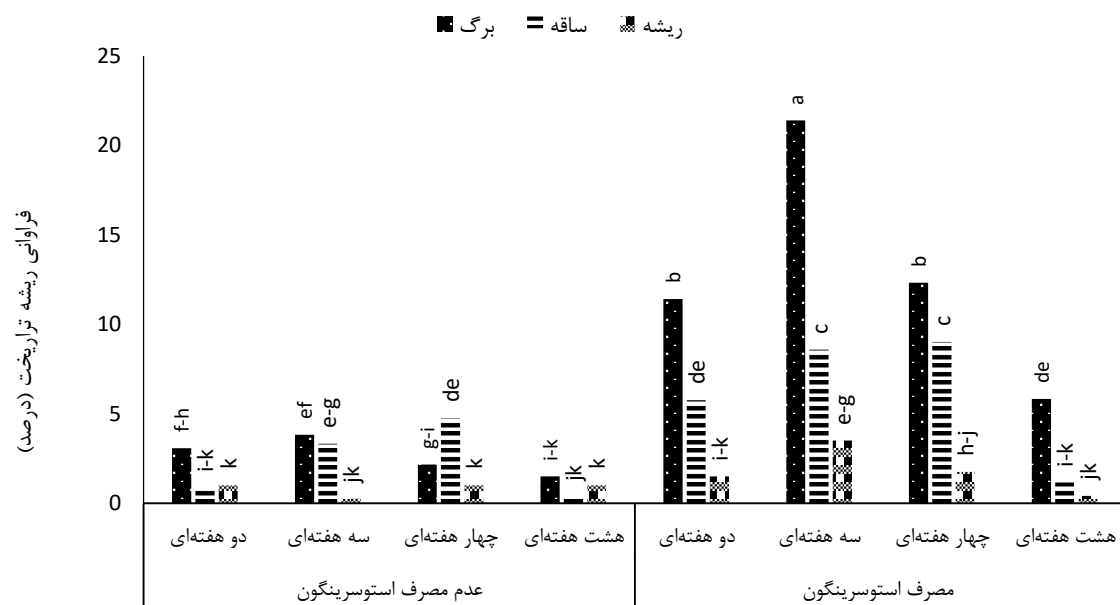


شکل ۴-۳۸ مقایسه میانگین درصد تولید ریشه‌های تراریخت حاصل از ریزنمونه‌های مختلف در سنین متفاوت گیاهچه‌ای در گیاه شیرین بیان

نتایج نشان داد که زمان و نوع ریزنمونه مناسب جهت تلقیح، برگ دو هفته‌ای با میانگین ۲۳ درصد در حضور استوسرینگون بود که در مقایسه با سایر سنین، بیشترین درصد تراریختی این ریزنمونه‌ها در این سن ایجاد شد و با افزایش سن از میزان تولید ریشه‌های مویین کاسته شد، به گونه‌ای که در ریزنمونه‌های هشت هفته‌ای برگ و ساقه کمترین درصد تولید ریشه‌های مویین بعد از جوانه زنی گزارش شد، اکثر ریزنمونه‌های ریشه‌های جوان تر در اثر تلقیح با آگروباکتریوم قهوه‌ای شدند و از بین رفتند، دلیل این امر احتمالاً به علت بیماری زردی آگروباکتریوم است. این پدیده را می‌توان به مکانیسم دفاعی گیاه در مقابل آلودگی با آگروباکتریوم ریزوژنز در شرایط طبیعی نسبت داد که منجر به مرگ برنامه ریزی شده سلول و ایجاد سدی از سلول‌های مرده در بافت زخمی می‌شود (سریرامانان و همکاران، ۲۰۰۸).

نتایج مقایسه میانگین اثر سه جانبه‌ی استوسرینگون، سن و نوع ریزنمونه بر درصد تولید ریشه‌های تراریخت نشان داد که ریز نمونه برگ حاصل از گیاهچه سه هفته‌ای شیرین بیان، در مجموع از بالاترین راندمان ریشه‌های تراریخت برخوردار بودند (شکل ۴-۳۹). علاوه بر این ترکیب تیماری، سایر ترکیبات

تیماری مبین برتری ریزنمونه‌های برگ‌گی شیرین بیان در تولید ریشه‌های تراریخته از سایر سنین گیاهچه-ای در شرایط مصرف استوسرینگون نیز بود و ریزنمونه‌های ساقه و برگ در همین شرایط به ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. با این حال در شرایط عدم مصرف استوسرینگون در اغلب سنین مختلف گیاهچه‌ای (به استثنای گیاهچه‌های دو هفته‌ای) تفاوت معنی‌داری بین ریزنمونه برگ، ساقه و تولید ریشه‌های تراریخت وجود داشت. با این وجود در این شرایط نیز همانند شرایط مصرف استوسرینگون، ریزنمونه‌های ریشه از پایین‌ترین کارایی تولید ریشه‌های تراریخت برخوردار بودند. بنابر نتایج حاصله به نظر می‌رسد علی‌رغم تاثیر پذیری همه ریز نمونه‌ها، ریزنمونه برگ‌گی به میزان بیشتری از مصرف استوسرینگون، در راستای تولید ریشه‌های تراریخت تاثیر پذیرفتند.



شکل ۴-۳۹ مقایسه میانگین درصد تولید ریشه‌های تراریخت حاصل از ریزنمونه‌های مختلف در سنین متفاوت گیاهچه‌ای در گیاه شیرین بیان در شرایط مصرف و عدم استوسرینگون

۴-۶- آزمایش ششم: القای ریشه‌های تراریخت از ناحیه هیپوکوتیل در گیاهچه‌های چند روزه

در اکوتیپ‌های شیرین بیان تحت تیمار و عدم با استوسرینگون و فاقد آن

جدول ۴-۷. نتایج تجزیه واریانس تلقیح ناحیه هیپوکوتیل گیاهچه‌های با سنین مختلف از اکوتیپ‌های کاشمر،

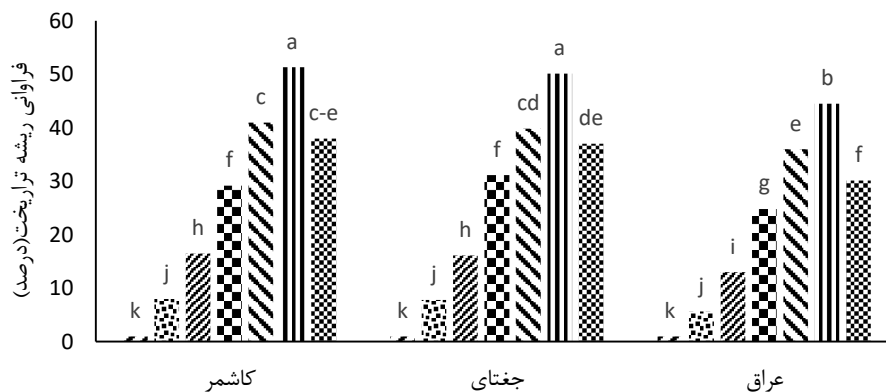
جغتای و عراقی شیرین بیان تحت شرایط مصرف و عدم مصرف استوسرینگون

منابع تغییرات	درجه آزادی	تولید ریشه‌های تراریخت
اکوتیپ	۲	۴۹۴/۷۳ **
استوسرینگون	۱	۲۲۰۴/۱۹ **
سن گیاهچه	۶	۳۴۴۰.۱/۹۶ **
اکوتیپ* استوسرینگون	۲	۶۱/۹۶**
اکوتیپ* سن گیاهچه	۱۲	۱۸۸/۹۳**
استوسرینگون* سن گیاهچه	۶	۴۹۴/۴۱ **
اکوتیپ* استوسرینگون * زمان	۱۲	۱۶۵/۹۲**
خطا	۸۴	۳/۳۴
ضریب تغییرات(%)		۷/۳۶

* و ** به ترتیب بیانگر معنی‌داری در سطح ۵ و ۱ درصد و NS عدم معنی دار را نشان می‌دهد

با توجه به نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، درصد تولید ریشه‌های تراریخت، از تمامی تیمارهای اکوتیپ، استوسرینگون و سن گیاهچه و آثار متقابل آن‌ها به طور معنی‌داری تاثیر پذیرفت (جدول ۴-۷). نتایج مقایسه میانگین برهمکنش اکوتیپ و سن گیاهچه، نشان داد که تیمار گیاهچه‌های هفت روزه‌ی دو اکوتیپ ایرانی کاشمر و جغتای، بالاترین درصد (۵۱/۳۳ درصد) ریشه‌های تراریخت را تولید کردند. در حالی که تیمار گیاهچه‌های دو روزه، از پایین‌ترین کارایی تولید ریشه‌های تراریخت در همه اکوتیپ‌ها برخوردار بودند (شکل ۴-۴۱).

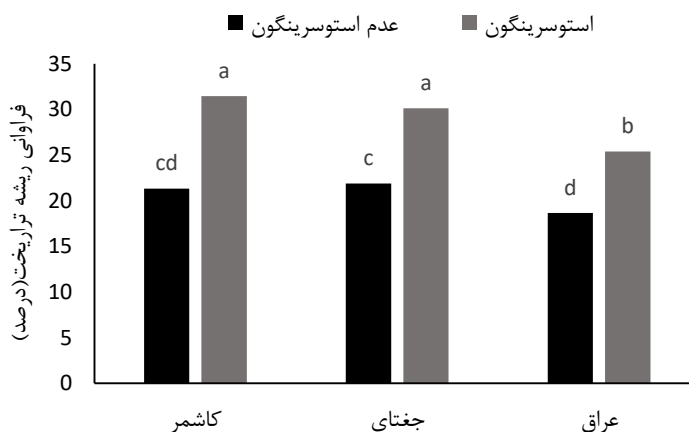
هشت روزه ☒ هفت روزه ☐ پنج روزه ☑ چهار روزه ☒ سه روزه ☑ دو روزه ☑



شکل ۴-۴۰ مقایسه میانگین درصد ریشه‌های تراپیخت تولید شده از گیاهچه‌های با سنین مختلف در اکوتیپ‌های کاشمر، جغتای و عراقی

بررسی میانگین تولید ریشه‌های تراپیخت تحت برهمکنش استوسرینگون و اکوتیپ نشان داد که همانگونه که انتظار می‌رفت تیمار با استوسرینگون منجر به افزایش معنی‌دار تولید ریشه‌های تراپیخت در کلیه اکوتیپ‌ها گردید. در بین اکوتیپ‌های مورد بررسی دو اکوتیپ ایرانی کاشمر و جغتای به صورت مشترک بالاترین درصد تولید ریشه‌های تراپیخت را در حضور استوسرینگون به خود اختصاص دادند

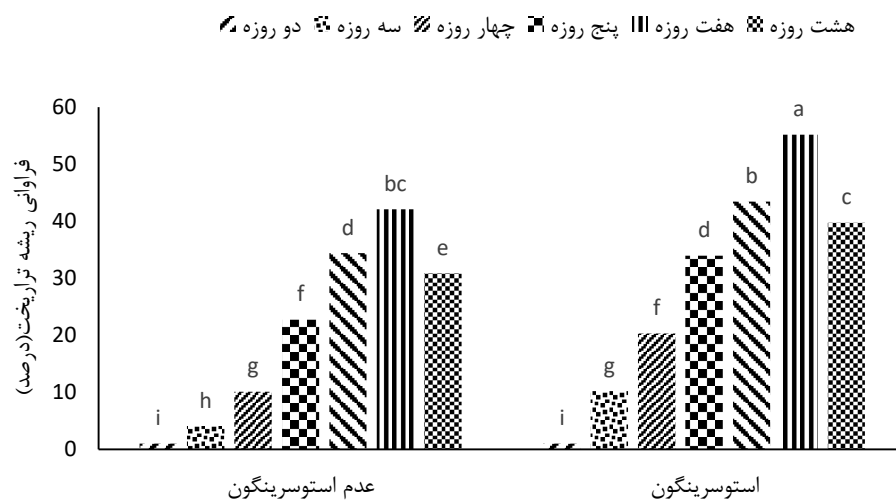
(شکل ۴-۴۱)



شکل ۴-۴۱ مقایسه میانگین درصد میانگین ریشه‌های تراپیخت تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین‌بیان در حضور و عدم حضور استوسرینگون

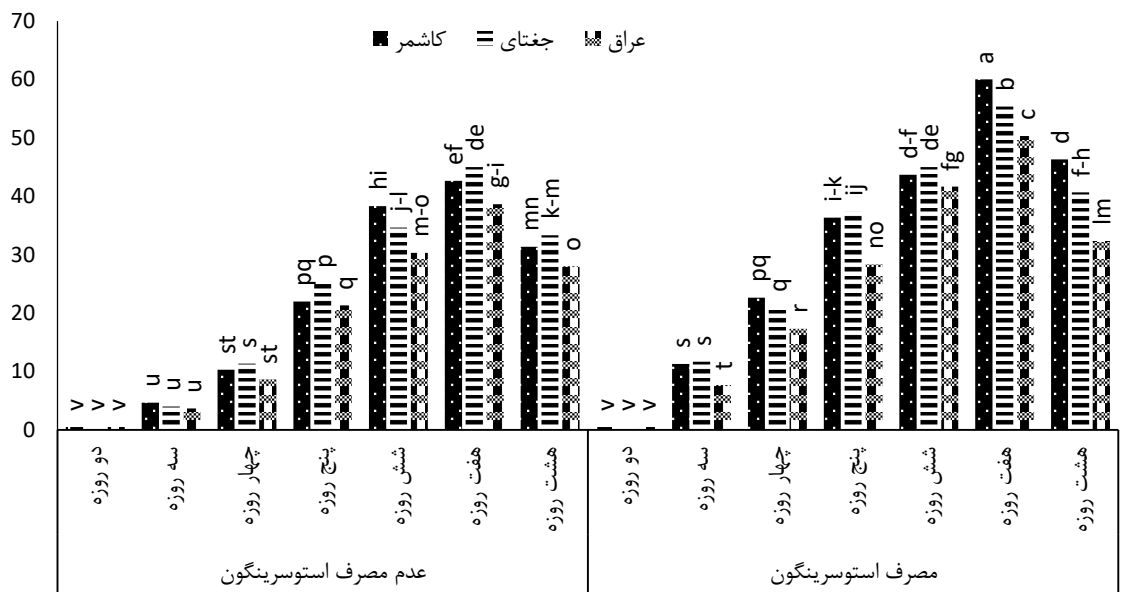
نتایج مقایسه میانگین این صفت، در برهمکنش سطوح مختلف استوسرینگون و سن گیاهچه نشان داد

که تیمار گیاهچه‌های هفت روزه در حضور استوسرینگون، نسبت به سایر تیمارها بیشترین درصد (۵۰/۳۳) تراریختی را به دنبال داشت. در حالی که گیاهچه‌های دو روزه در حضور یا عدم حضور استوسرینگون در محیط کشت، میزان ریشه‌های تراریخت قابل ملاحظه‌ای را تولید نکردند (شکل ۴-۴۲).



شکل ۴-۴۲ مقایسه میانگین درصد ریشه‌های تراریخت تولید شده از گیاهچه‌های با سنین مختلف در شرایط حضور و عدم حضور استوسرینگون در گیاه شیرین بیان

نتایج مقایسه میانگین بر همکنش سه جانبه سنین گیاهچه‌های اکوتیپ‌های مختلف در شرایط مصرف و عدم مصرف استوسرینگون نشان داد که گیاهچه هفت روزه اکوتیپ کاشمر در شرایط مصرف استوسرینگون از بالاترین نرخ تولید ریشه‌های تراریخت برخوردار بودند (شکل ۴-۴۳). همچنین گیاهچه‌های سنین مختلف این اکوتیپ به استثنای گیاهچه دو روزه، در شرایط مصرف استوسرینگون افزایش معنی‌داری را در تولید ریشه‌های تراریخت نسبت به شرایط عدم مصرف استوسرینگون نشان دادند. بر اساس نتایج مشخص شد که علاوه بر اکوتیپ کاشمر، گیاهچه‌های ۷ روزه‌ی دو اکوتیپ دیگر (جغتای و عراقی) نیز در شرایط مصرف استوسرینگون راندمان تولید ریشه‌های تراریخت بالاتری نسبت به سایر سنین گیاهچه‌ای نشان دادند. با این حال این افزایش در این ترکیب تیماری در اکوتیپ‌های جغتای و عراقی کمتر از اکوتیپ کاشمر بود و به ترتیب در رتبه‌های بعدی (دوم و سوم) پس از اکوتیپ کاشمر قرار گرفتند.



شکل ۴-۴۳ مقایسه میانگین درصد ریشه‌های تراریخت تولید شده از گیاهچه‌هایی با سنین مختلف در شرایط حضور و عدم حضور استوسرینگون در اکوتیپ‌های مختلف گیاه شیرین‌بیان

شکل ۴-۴۴، تصویری از مقایسه میزان تولید ریشه در گیاهچه‌های هفت روزه‌ی اکوتیپ جغتای در شرایط تلقیح و عدم تلقیح با باکتری را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود ریشه‌ی از ناحیه هیپوکوتیل گیاهچه‌های تلقیح نشده پس از سه هفته تولید نگردید. هامیل و همکاران (۱۹۹۳) گزارش نمودند که انتقال ژن‌های درگیر در القای ریشه (ژن‌های rol) از قطعه TDNA اگروباکتریوم به ژنوم گیاهی و بیان آن‌ها، بر تبدیل مسیر غیر فعال اکسین و سایتوکینین به مسیر فعال تاثیرگذار است.



ب: گیاهچه هفت روزه



الف: شاهد

شکل ۴-۴۴ نرخ تولید ریشه از گیاهچه هفت روزه اکوتیپ جغتای تلقیح شده با سویه باکتری اگروباکتریوم

در مقایسه با نمونه تلقیح نشده .

۷-۴- بررسی حذف باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز از ریشه‌های مویین گیاهان دارویی شیرین

بیان

بدین منظور مقدار کمی از ریشه‌های مویین موجود در محیط کشت جامد به محیط LB مایع منتقل شود. در صورت عدم رشد باکتری در محیط LB، دیگر نیازی به استفاده از آنتی بیوتیک سفوتاکسیم نمی‌باشد. در نمونه‌های تست شده بعد از ۷۲ ساعت، اثری از رشد باکتری مشاهده نشد و در نتیجه ریشه‌ها به محیط مایع بدون آنتی بیوتیک منتقل شدند (شکل ۴-۴۵).



شکل ۴-۴۵ کشت نوک ریشه‌های مویین در محیط LB، نمونه بدون باکتری (سمت راست) و نمونه آلوده (سمت چپ)

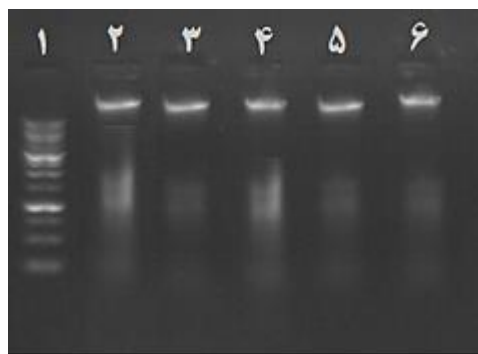
۸-۴- تایید تراریختی ریشه‌های شیرین بیان با انجام واکنش PCR

در این تحقیق، علاوه بر تائید تولید ریشه‌های تراریخت بر اساس مورفولوژی ظاهری، برای اطمینان از انجام موفق تراریختگی، از تکنیک PCR نیز استفاده شد.

۸-۴-۱- کیفیت DNA استخراج شده از ریشه‌های تراریخت و ریشه‌های طبیعی شیرین بیان

نتایج ژل آگارز DNA استخراج شده از ریشه‌های تراریخت و ریشه‌های طبیعی گیاه شیرین بیان برای نمونه تزریق شده در هر چاهک، یک تک باند را نشان داد (شکل ۴-۴۶) تک باند مشاهده شده به دلیل سنگینی DNA ژنومی، حرکت زیادی روی ژل نداشته و به همین دلیل در قسمت بالای

ژل الکتروفورز قرار گرفت. همچنین حالت اسمیری که نشان دهنده وجود RNA یا DNA تخریب شده باشد، نیز مشاهده نشد. وجود اسمیر بر روی ژل آگارز نشان دهنده کیفیت پایین DNA استخراج شده می‌باشد. بر اساس وجود تک باندهای واضح و نتایج حاصل از اسپکتروفتومتری DNA استخراج شده، کیفیت آن برای واکنش PCR مناسب بود. در روش غلظت سنجی با استفاده از دستگاه نانودراپ میزان جذب نور در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر برای بررسی کیفیت DNA اندازه گیری شد. در نمونه‌های مورد مطالعه این نسبت بین ۱/۸ تا ۲ بود. نتایج حاصل از الکتروفورز مربوط به ژل پلاسمید استخراج شده از باکتری نیز با ایجاد تک باندهای بدون اسمیر موفقیت آمیز بودن مراحل استخراج پلاسمید را بیان کرد (شکل ۴-۴۷).

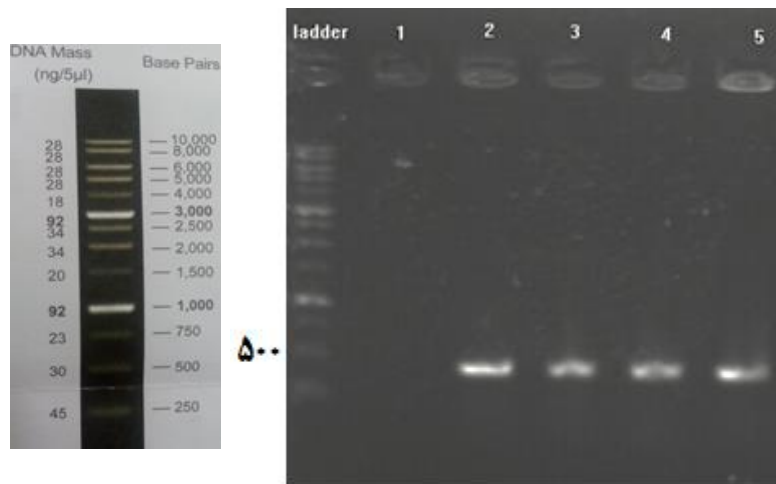


شکل ۴-۴۶ الکتروفورز ژل یک درصد آگارز DNA ژنومی استخراج شده از ریشه‌های تراریخت شیرین بیان. چاهک ۱ نشانگر یک کیلو باز. چاهک ۲ و ۳ ریشه‌های طبیعی و ۴ تا ۶ به ترتیب ریشه‌های تراریخت کاشمر، جغتای و عراقی

۴-۸-۲- بررسی وجود ژن roIB توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای DNA ژنومی استخراج شده شیرین بیان

تایید تراریختی ریشه‌های گیاه شیرین بیان با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن roIB و از طریق تکنیک PCR انجام شد. نتایج الکتروفورز محصولات PCR ریشه‌های گیاه شیرین بیان در شکل ۴-۴۷ مشاهده می‌شود. برای هر یک از نمونه‌های ریشه تراریخت و پلاسمید باکتری (شاهد مثبت)، تک

باند مشاهده گردید. تک باندهای بدست آمده از هر یک از چاهک‌های مربوط به ریشه‌های تراریخت و پلاسمید باکتری در مقایسه با باندهای بدست آمده از مارکر مولکولی ۱ Kb موجود در چاهک اول، در ناحیه ۴۳۰ bp قرار گرفتند. چاهک مربوط به نمونه شاهد منفی نیز بدون باند باقی ماند. نتایج الکتروفورز محصولات PCR ریشه‌های تراریخت گیاه شیرین بیان در شکل (۴-۴۷) مشاهده می‌شود.



شکل ۴-۴۷ نتایج ژل محصولات PCR ریشه‌های تراریخت شیرین بیان. چاهک ladder مارکر مولکولی (۱Kb)، شماره ۱ آب مقطر (کنترل منفی)، شماره ۲ تا ۴ به ترتیب ریشه‌های تراریخت گیاهچه‌های ۲۱ روزه کاشمر، جغتای و عراق، چاهک شماره ۵ تکثیر از پلاسمید باکتری (کنترل مثبت)

نتایج این قسمت از تحقیق با نتایج مطالعات استیلر و همکاران (۱۹۹۷)، دهاکولکار و همکاران (۲۰۰۵)، رهنما و همکاران (۲۰۰۸) و یوگانانت و جتی باسو (۲۰۰۹)، که به ترتیب تراریخت بودن ریشه‌های تولید شده در گیاهان *Plumbago rosea* و *Silybum marianum*، *Gmelina arborea*، *Lotus japonicus* را با استفاده از تکنیک PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن roIB (۴۳۰ bp) تایید کردند، مطابقت دارد.

۹-۴- ارزیابی میزان اسید گلیسیریزیک تولید شده در ریشه‌های تراریخت گیاهچه‌های هفت روزه در اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان

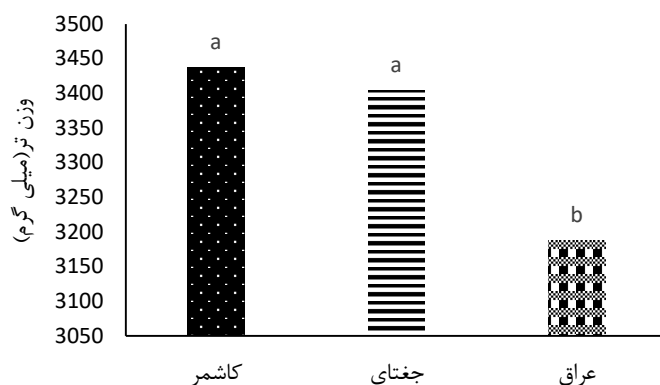
جدول ۸-۴ نتایج تجزیه واریانس وزن تر و خشک و میزان اسید گلیسیریزیک تولید شده در ریشه‌های تراریخت اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان تحت تیمارهای فسفر و نانوکربن

منابع تغییرات	درجه آزادی	وزن تر ریشه تراریخت	وزن خشک ریشه تراریخت	اسید گلیسیریزیک ریشه تراریخت
اکوتیپ	۲	۶۵۶۵۵۱/۴۴ **	۹۹۵۱/۳۷ **	۴۴۴/۵۲ **
نانو	۲	۱۰۱۲۴/۳۳ ^{ns}	۸۹/۹۲ ^{ns}	۴۶۱/۹۱ **
فسفر	۲	۶۸۱۴۱/۷۷ ^{ns}	۱۲۲۲۸۴/۹۲ **	۵۴/۷۴ **
اکوتیپ* نانو	۴	۲۲۸۰۵/۵۵ ^{ns}	۳۸۸/۸۵ ^{ns}	۸۲/۴۳ **
اکوتیپ* فسفر	۴	۱۰۱۵/۱۱ ^{ns}	۴۶۴/۵۱ *	۹/۷۵ ^{ns}
نانو* فسفر	۴	۴۷۴۰۴/۸۸ ^{ns}	۱/۲۹ ^{ns}	۱۰/۱۴ ^{ns}
اکوتیپ* نانو* فسفر	۸	۴۵۹۶۳/۲۲ ^{ns}	۱۸/۵۹ ^{ns}	۱/۸۱ ^{ns}
خطا	۲۷	۱۰۲۸۰/۰۳	۳۷/۷۷	۱/۳۷
ضریب تغییرات(%)		۳/۰۲	۲/۴۵	۲۲/۶۸

* و ** به ترتیب بیانگر معنی داری در سطح ۵ و ۱ درصد و ns عدم معنی دار را نشان می‌دهد.

۹-۴-۱- وزن تر ریشه‌های تراریخت

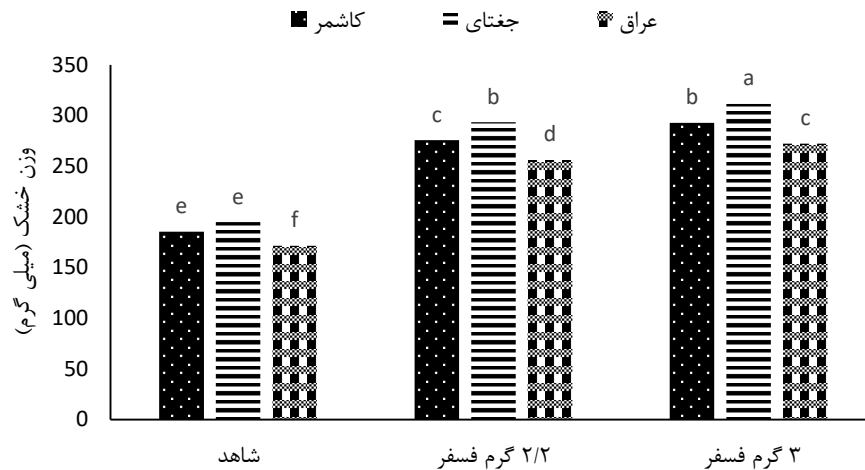
نتایج تجزیه واریانس داده‌های وزن تر ریشه‌های تراریخت شیرین بیان نشان داد که فقط اثر ساده اکوتیپ در سطح ۱ درصد معنی دار بود (جدول ۸-۴). مقایسه میانگین وزن تر ریشه‌های تراریخت نشان داد که بیشترین وزن تر ریشه‌های تراریخت به طور مشترک متعلق به اکوتیپ‌های کاشمر (با میانگین ۳۴۳۶/۶۱ میلی گرم) و اکوتیپ جغتای (با میانگین ۳۴۱۰/۵۵ میلی گرم) بود (شکل ۴-۴۸). اکوتیپ عراقی با تولید ریشه‌هایی به وزن ۳۱۸۸ میلی گرم در پایین‌ترین رتبه قرار گرفت.



شکل ۴-۴۸ مقایسه میانگین وزن تر ریشه‌های تراریخت اکوتیپ‌های مختلف گیاه شیرین بیان

۴-۱۰-۲- وزن خشک ریشه‌های تراریخت

نتایج تجزیه واریانس داده‌های وزن خشک ریشه‌های تراریخت شیرین بیان نشان داد که آثار ساده‌ی اکوتیپ و فسفر در سطح ۱ درصد و اثر متقابل اکوتیپ و فسفر در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۴-۸). مقایسه میانگین اثر متقابل وزن خشک ریشه‌های تراریخت نشان داد که اکوتیپ جغتای تیمار شده با بالاترین سطح فسفر (۳ گرم در لیتر) با تولید ۳۱۱/۶۶ میلی‌گرم وزن خشک ریشه، نسبت به سایر تیمارها در گروه برتر آماری قرار گرفت. نتایج نشان داد که اکوتیپ‌های مورد بررسی با افزایش سطح فسفر، افزایش معنی‌داری در وزن خشک ریشه‌های تراریخت از خود نشان دادند که این یافته با نتایج حاصل از ریشه‌های اصلی در آزمایش قبل مطابقت دارد (شکل ۴-۴۹). نتایج میسر و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد افزایش غلظت فسفر به ۳۷۱۰ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت B5 باعث افزایش بیوماس و میزان آلکالوئیدهای گل پرپوش *Catharanthus roseus* می‌شود.



شکل ۴-۴۹ مقایسه میانگین وزن خشک ریشه‌های تراریخت تولید شده از اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان تحت تیمار با سطوح مختلف فسفر

۴-۱۰-۳- میزان اسید گلیسیریزیک

نتایج جدول تجزیه واریانس میزان اسید گلیسیریزیک تولید شده در ریشه‌های تراریخت نشان داد و آثار اصلی اکوتیپ، فسفر و نانوکربن و نیز اثر متقابل اکوتیپ و نانوکربن بر این صفت معنی دار بود (جدول ۴-۸). در این پژوهش، میزان اسید گلیسیریزیک اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان به لحاظ آماری بسیار متفاوت بود. بیشترین و کمترین میزان اسید گلیسیریزیک به ترتیب به اکوتیپ‌های کاشمر با متوسط ۱۰/۸۱ (میلی گرم بر گرم وزن خشک) و اکوتیپ عراقی با متوسط ۴/۳۴ (میلی گرم بر گرم وزن خشک) اختصاص داشت (شکل ۴-۵۰). ساتو و همکاران (۲۰۰۴) در تحقیقی تاثیر منطقه برداشت ریشه شیرین بیان را بر میزان مواد مؤثره و فعالیت‌های بیولوژیک آن بررسی کردند و نتیجه گرفتند که میزان اسید گلیسیریزیک ریشه‌های شیرین بیان برداشت شده از ۹ منطقه بین ۰/۴۲ تا ۲/۰۸ درصد وزن مرطوب متغیر بود و اثر منطقه بر میزان اسید گلیسیریزیک معنی دار بود. آن‌ها علت این موضوع را شرایط محیطی متفاوت مانند میزان تابش خورشید، ارتفاع از سطح دریا و عرض جغرافیایی ذکر کردند. خلیلی و همکاران نیز (۲۰۰۹) با بکار بردن محرک اسید سالیسیلیک بر ریشه‌ی تراریخت گیاه

Silybum marianum، کاهش وزن ریشه‌ها و در مقابل افزایش ماده موثر سیلیمارین^۱ و همچنین افزایش فلاونولیگنان^۲ های تاکسیفلین^۳ و سیلیبین^۴ و کاهش ایزوسیلیبین^۵ را گزارش نمودند.



شکل ۴-۵۰ مقایسه میانگین میزان اسید گلیسیریزیک تولید شده در ریشه ترا ریخت اکوتیپ‌های مختلف گیاه شیرین بیان

اسماعیلی و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که استفاده از نانوکربن MWCNT باعث تنش اکسیداتیو و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در برخی از گیاهان می‌گردد، در پژوهش حاضر، میانگین اسید گلیسیریزیک اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان در غلظت‌های متفاوت نانوکربن ۶/۸۷ درصد بود که این میزان در محدوده ۱۰/۶۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک (در تیمار ۴۵۰ میلی‌گرم نانوکربن) تا ۳/۵۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک (در تیمار عدم مصرف نانوکربن) قرار داشت (شکل ۴-۵۱).

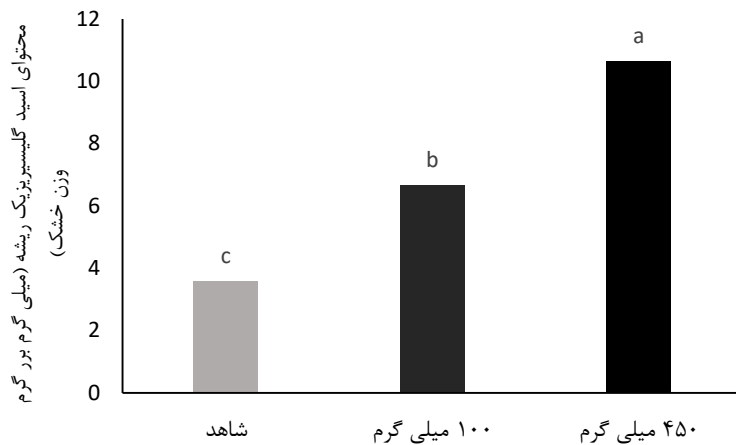
^۱ Silymarin

^۲ Flavonolignan

^۳ Taksyflyn

^۴ Silybin

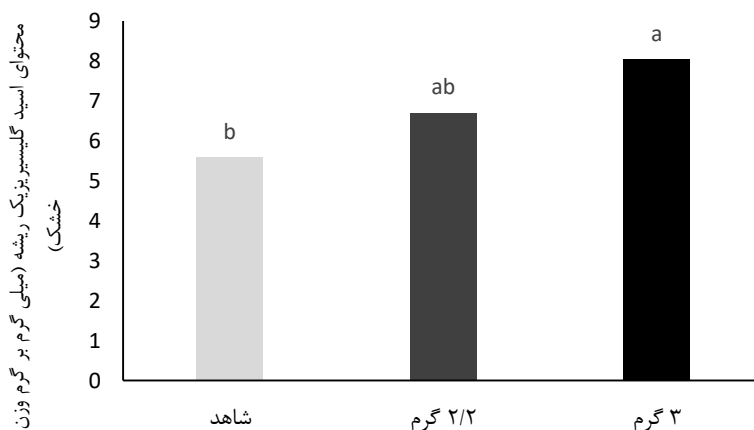
^۵ Ayzvsylybyn



شکل ۴-۵۱ مقایسه میزان اسید گلیسیریزیک تولید شده در ریشه‌های تراریخت تحت غلظت‌های مختلف نانوکربن MWCNT در گیاه شیرین بیان

بر اساس نتایج مشاهده می‌گردد که با اعمال تیمار نانوکربن و افزایش غلظت آن در محیط کشت، تولید ماده اسید گلیسیریزیک در ریشه‌های تراریخت افزایش معنی‌داری یافته است.

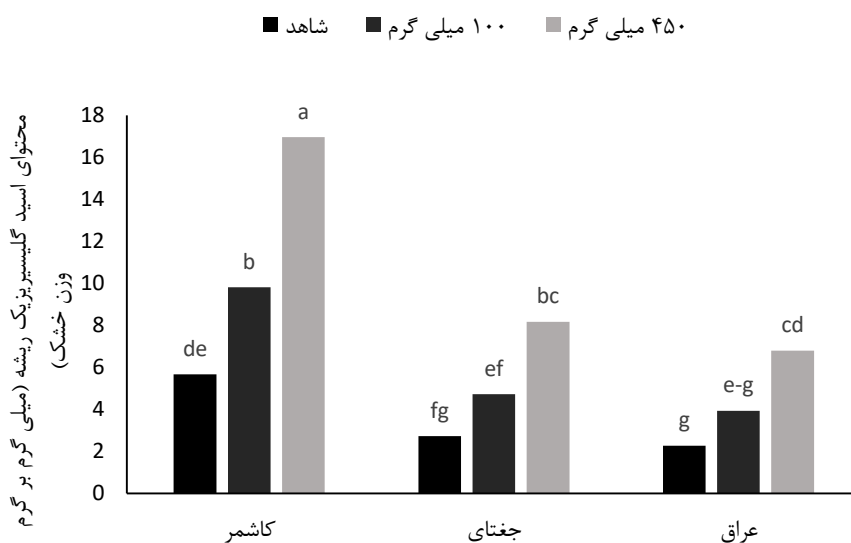
در پژوهش حاضر، مقدار اسید گلیسیریزیک تولید شده در غلظت‌های متفاوت فسفر تفاوت معنی‌داری داشت (شکل ۴-۵۲). بیشترین (۸/۰۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و کمترین (۵/۵۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) میزان اسید گلیسیریزیک به ترتیب در تیمارهای ۳ گرم فسفر و تیمار عدم مصرف آن بدست آمد.



شکل ۴-۵۲ مقایسه میزان اسید گلیسیریزیک تولید شده در ریشه‌های تراریخت تحت تیمار با غلظت‌های مختلف فسفر در گیاه شیرین بیان

دامنه‌ی تغییرات درصد اسید گلیسیریزیک تولید شده از برهمکنش تیمارهای اکوتیپ و نانوکربن در محدوده‌ی ۲/۲۷ تا ۱۶/۹۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک متغیر بود (شکل ۴-۵۳). بالاترین میزان این

صفت (۱۶/۹۵ میلی گرم بر گرم وزن خشک) در ریشه‌های تراریخت تولید شده از اکوتیپ کاشمر تیمار شده با ۴۵۰ میلی گرم نانوکربن تولید گردید. این اکوتیپ پیشتر نیز موفق به تولید بالاترین درصد اسید گلیسیریزیک در ریشه‌های اصلی شده بود. اکوتیپ‌های جغتای و عراقی تیمار شده با نانوکربن، تفاوت معنی داری با یکدیگر از نظر این صفت نداشتند. با این حال در هر یک از این اکوتیپ‌ها نیز با افزایش سطوح تیماری نانوکربن، افزایش معنی داری در تولید اسید گلیسیریزیک در ریشه‌های تراریخت آن‌ها حاصل نگردید.



شکل ۴-۵۳ مقایسه اثر متقابل میزان اسید گلیسیریزیک تولید شده در ریشه‌های تراریخت تحت تیمار با غلظت‌های مختلف نانوکربن در اکوتیپ‌های مختلف گیاه شیرین بیان

۴-۱۱- نتیجه گیری کلی

در پژوهش حاضر تفاوت‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی دو اکوتیپ ایرانی شیرین بیان به نام‌های کاشمر و جغتای و یک اکوتیپ خارجی از کشور عراق در پاسخ به تیمارهای مورد استفاده در شرایط کشت درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. در گام نخست، کاربرد پیش تیمارهای آب مقطر و اسید سولفوریک جهت رفع خواب بذور نشان داد که بیشترین درصد جوانه‌زنی در بذور شیرین بیان تیمار شده با اسید سولفوریک ۹۸ درصد اتفاق افتاد. اکوتیپ‌های مختلف خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی متفاوتی را در شرایط کاربرد و عدم کاربرد زغال فعال در محیط‌های کشت MS جامد، مایع

و هیدوژل نشان دادند. در اغلب صفات، افزایش یا کاهش خصوصیات مورفولوژیک گیاهچه‌های هر اکوتیپ بسته به اینکه در چه محیطی و تحت چه شرایطی از مصرف یا عدم مصرف زغال فعال رشد یافته اند، متفاوت بود. همچنین بیشترین میزان صفات فیزیولوژیک فنول، فلاونوئید، قند محلول و اسید گلیسیریزیک در گیاهچه‌های اکوتیپ کاشمر رشد یافته در محیط مایع مشاهده گردید. اگرچه اعمال تیمارهای هورمونی و افزایش تعداد و طول ریشه‌ها، آثار تفاوت معنی‌دار بین اکوتیپ‌ها را از نظر این صفات تا حدودی پوشاند، با این حال اکوتیپ کاشمر رشد یافته در محیط غنی شده با ۰/۵ میلی‌گرم هورمون IAA توانست قشورترین ریشه‌ها را تولید نماید. اکوتیپ جغتای در بالاترین غلظت هورمون IAA (۱/۵ میلی‌گرم) بیشترین وزن تر ریشه را تولید کرد. همچنین نتایج نشان داد اکوتیپ کاشمر در کلیه سطوح تیمارهای هورمونی IAA و NAA بالاترین میزان اسید گلیسیریزیک ریشه را تولید نمود. بر اساس نتایج اعمال تیمارهای فسفری و نانوکربنی اکوتیپ عراقی در کلیه ترکیبات تیماری بجز بالاترین سطح فسفر به همراه عدم مصرف و مصرف ۱۰۰ میلی‌گرم نانوکربن توانست رتبه نخست تولید برگ را نسبت به سایر اکوتیپ‌ها کسب نماید. این اکوتیپ همچنین توانست طویل‌ترین و بیشترین تعداد و وزن تر ریشه را نسبت به سایر اکوتیپ‌ها تولید نماید. با این حال این اکوتیپ به همراه اکوتیپ جغتای نتوانستند در اغلب ترکیبات تیماری افزایش معنی‌داری در طول ساقه نسبت به تیمار شاهد ایجاد نمایند اما اکوتیپ کاشمر به ویژه در ترکیب ۳ گرم فسفر همراه با ۴۵۰ میلی‌گرم نانوکربن توانست افزایش ۴۹/۵ درصدی در طول ساقه ایجاد نماید. این اکوتیپ همچنین با دریافت ۴۵۰ میلی‌گرم نانوکربن بدون دریافت فسفر و نیز ۱۰۰ میلی‌گرم نانوکربن به همراه ۲/۲ گرم فسفر از نظر صفت تولید ریشه‌های قشور قرار از سایر اکوتیپ‌ها برتر بود. بر اساس نتایج حاصله، در بالاترین سطح تیمارهای فسفر و نانوکربن (کاربرد ۳ گرم فسفر و ۴۵۰ میلی‌گرم نانوکربن)، اکوتیپ کاشمر توانست بیشترین میزان اسید گلیسیریزیک ریشه را نسبت به سایر اکوتیپ‌ها تولید نماید. این نتیجه با یافته‌های قبلی این تحقیق مبنی بر برتری این اکوتیپ در تولید این ماده موثره در سایر آزمایشات نیز مطابقت داشت.

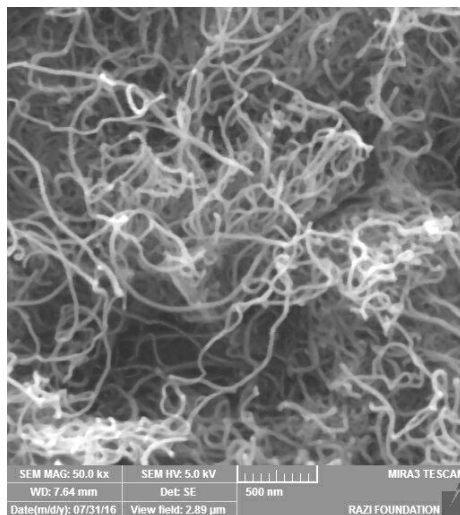
در این تحقیق به وضوح روشن گردید که سن و نوع ریز نمونه می‌تواند بر میزان تولید ریشه‌های تراریخت تاثیر بگذارد. همچنین می‌توان با کاربرد استوسرینگون نرخ این تراریختی را افزایش داد. در این راستا درصد تولید ریشه‌های تراریخت در ریز نمونه‌های برگ حاصل از گیاهچه‌های ۳ هفته‌ای شیرین بیان بیشتر از ریزنمونه‌های ساقه و ریشه بود. همچنین تلقیح ناحیه‌ی هیپوکوتیل گیاهچه‌های خراش داده شده که تحت تیمار استوسرینگون نیز قرار گرفتند، راندمان تولید ریشه‌های تراریخت را روی بافت زنده گیاه شیرین بیان افزایش داد. استفاده از الیسیتورهای فسفر و نانوکربن در ریشه‌های تراریخت بیانگر افزایش معنی‌دار وزن خشک این ریشه‌ها با افزایش سطح فسفر بود. همچنین اعمال تیمار نانوکربن و افزایش غلظت آن در محیط کشت، تولید ماده موثره‌ی اسید گلیسیریزیک را در ریشه‌های تراریخت شیرین بیان بطور معنی‌داری افزایش داد.

۴-۱۲- پیشنهادات

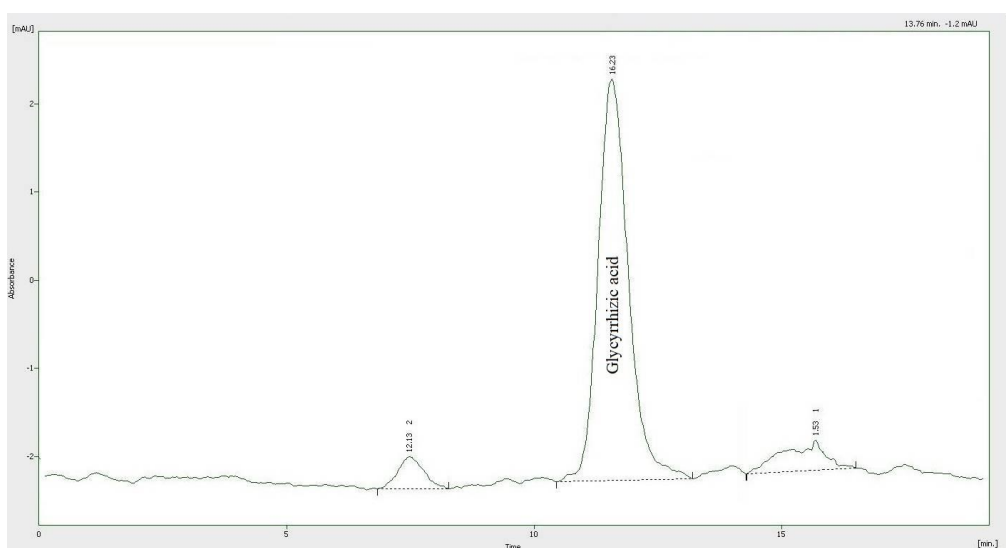
بر اساس ارزیابی‌های انجام شده در این پژوهش، پیشنهاد می‌شود موارد ذیل در تحقیقات آینده در این گیاه مورد بررسی قرار گیرند:

۱. بررسی اکوتیپ‌های دیگر شیرین بیان
۲. بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف استوسرینگون
۳. ارزیابی تغییر در الیسیتورها برخی مواد به کار رفته در ساخت محیط کشت MS
۴. تلقیح به طریق کامپوزیت و بررسی تیمارها
۵. کاربرد نانو و دیگر مواد در محیط کشت و ارزیابی و تاثیر آنها

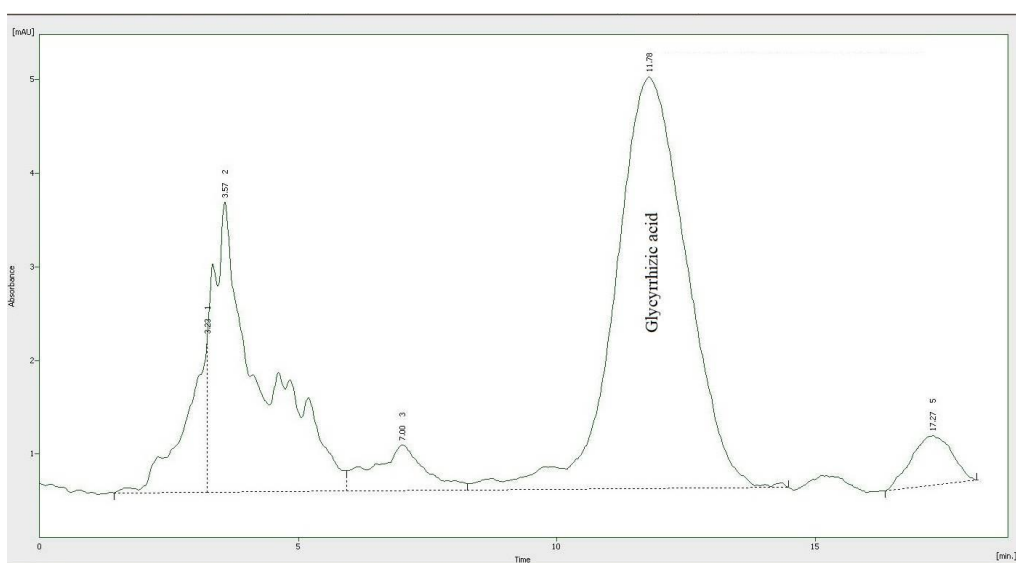
پیوست‌ها



پیوست شماره ۱ تصویر نانو لوله کربنی MWCNTs گرفته شده با میکروسکوپ الکترونی



پیوست شماره ۲ نمایه HPLC مربوط به نمونه استاندارد ۵ میلی گرم در لیتر



پیوست شماره ۳ ریشه تراریخت اکوتیپ کاشمر تیمار شده با ۳ گرم فسفر و ۴۵۰ میلی گرم در لیتر

فصل پنجم

منابع

ابراهیمی، ثریا. ابریشمچی، پروانه. بهرامی، گنجعلی. سوداگران (۲۰۱۵). بررسی تاثیر استوسیرینگون در القای ریشه موئین در گیاه برازمل (*Perovskia abrotanoides Karel*). چهارمین کنفرانس ملی فیزیولوژی گیاهی ایران.

اثنی عشری، م (۱۳۸۸). "راهنمای جامع کشت بافت گیاهی". انتشارات دانشگاه ابوعلی سینا. چاپ اول. ۴۵۱ صفحه.

اصغری، غلامرضا (۱۳۸۵). "بیوتکنولوژی گیاهان دارویی و تولید داروهای گیاهی". انتشارات جهاد دانشگاهی اصفهان. ۲۸۷ صفحه.

باقری، عبدالرضا و صفار، مهری (۱۳۸۷). "مبانی کشت بافت گیاهی". انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ۴۰۶ صفحه.

حاجی مهدی پور، هما، امن زاده، یعقوب، حسنلو، شکرچی، مریم، عابدی، زهرا و پیر علی همدانی، مرتضی (۱۳۸۷). "بررسی کیفیت ریشه های شیرین بیان جمع آوری شده از رویشگاه های مختلف ایران" فصل نامه گیاهان دارویی. سال هفتم. دوره سوم. صفحه ۱۱۴-۱۰۶.

حسنلو، طاهره، رضازاده، شمسعلی و رهنما، حسن (۱۳۸۷). "ریشه های موئین منبعی برای تولید ترکیبات با ارزش دارویی". فصل نامه گیاهان دارویی، شماره ۲۹. صفحه ۱-۱۷.

خوشخوی، م. (ج ۱۳۸۲). "گیاه افزائی (ازدیاد نباتات): مبانی و روشها". جلد سوم. انتشارات دانشگاه شیراز. چاپ چهارم. ۱۴۶۷-۹۰۵.

صباغ زاده، ر (۲۰۱۷). "اصول عمومی روش تجزیه ای کروماتوگرافی HPLC". فصلنامه رویکردهای نوین در آزمایشگاه های علمی ایران ۴۵-۵۰ (۲) ۱.

صفری، معصومه؛ علیرضا زیرجدی و کیانوش چقامیرزا، ۱۳۹۲، مطالعه کالوس زایی در گیاه دارویی شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*)، هشتمین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران و چهارمین همایش ملی امنیت زیستی، تهران، انجمن بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، دانشگاه تهران.

عادل مسیب، ف. (۱۳۷۸). نقش کشت بافت در توسعه کشاورزی. رویان: مجله نوین کشاورزی.

فارسی، محمد و ذوالعلی، جعفر (۱۳۸۲). "اصول بیوتکنولوژی گیاهی". انتشارات دانشگاه مشهد. ترجمه. ۴۹۵ صفحه.

قاسمی، عبدالله (۱۳۸۸) "گیاهان دارویی و معطر شناخت و بررسی آنها". انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد. ۵۴۱ صفحه.

قنبری، ع.، رحیمیان، ح.، صدقی، م.، نصیری، م.، کافی، م. و راستگو، ا. ۱۳۸۴. جنبه‌های اکوفیزیولوژیکی جوانه‌زنی شیرین بیان *Glycyrrhiza glabra* در واکنش به دما. مجله پژوهش‌های زراعی ایران، ۳ (۲): ۲۶۳-۲۷۵.

کافی، محمد، زند، اسکندر، کامکار، بهنام، شریفی، حمیدرضا و گلدانی، مرتضی (۱۳۸۲) "فیزیولوژی گیاهی" جلد دوم، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۳۷۹ صفحه.

خان احمدی، م.، ح. نقدی‌بادی، ش. آخوندزاده، ف. خلیقی سیگارودی، ع. مهرآفرین، س. شهریار و ر. حاجی‌آقایی. ۱۳۹۲. مروری بر گیاه دارویی شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*) فصلنامه گیاهان دارویی ۱۲(۲): ۱-۱۳.

معینی، احمد و کهریزی، دانیال (۱۳۸۲) "کشت بافت گیاهی". انتشارات سازمان بسیج دانشجویی. ۳۶۱ صفحه.

همتی خ، همتی ن، قانیدی ا (۱۳۹۴) "تاثیر رویش‌گاه، قطر ریشه و نوع بافت بر میزان برخی مواد ثانویه شیرین‌بیان در خراسان رضوی (قوچان)". نشریه فیزیولوژی مواد گیاهی، شماره ۳۹. صفحه ۱-۱۰.

Akhter J., K. Mahmood K.A. Malik Mardan A.M. Ahmad, and Iqbal M.M. 2004. Effects of hydrogel amendment on water storage of sandy loam and loam soils and seedling growth of barley, wheat and chickpea. **Plant soil environ**, 50(10):463- 469.

Aliero, B.L. (2004) "Effects of sulphuric acid, mechanical scarification and wet heat treatments on germination of seeds of *Parkia biolobosa*". **African Journal of Biotechnology** 3: 179-181.

Alpizar, E., Dechamp, E., Espeout, S., Royer, M., Lecouls, A.C., Nicole, M., Bertrand, B., Lashermes, P. and Etienne, H. (2006) "Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes* –transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots". **Plant Cell Reports** 26: 959-967.

Ambros, P. F., Matizke, A. J. M and Matzke, M. A. (1986) "Localization of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in plant chromosomes by in situ hybridization". **EMBO** 5: 2073-2077.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists, Official method 982.19. 2002.

Aoki, T., Toda, Y. and Shimomura, K. (1994) "Characteristics of green hairy root of *Hyoscyamus albus* transformed with *Agrobacterium rhizogenes* strain A4" **Plant Tissue Culture** 9(3): 214-219.

Arbona V., Iglesias D.J., Jacas J., Primo- Millo E., Talon M. and Gomez – Cadenas A. 2005. Hydrogel substrate amendment alleviates drought effects on young citrus plants. **Plant and soil**, 270(1):73 – 82.

Arikat, N.A., Jawad, F.M., Karam, N.S. and Shibli, R.A. (2004). Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). **scientia horticulturae**. **100:193-202**.

Armanini D, Bonanini G and Palermo M. Reduction of serum testosterone in men by licorice. **N. Engel. J. Med.** **1999; 341: 1158**.

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: 323-326**.

Avanasi, R., W.A. Jackson, B. Sherwin, J.F. Mudge, and T.A. Anderson; “C60 Fullerene Soil Sorption, Biodegradation, and Plant Uptake”, **Environmental Science & Technology**, **Vol.48, I.5, p. 2792-2797, (2014)**.

Ayabe, S., Takano, H., Fujita, T., Hirota, H. and Takahashi, T. (1990). Triterpenoid biosynthesis in tissue cultures of *Glycyrrhiza glabra* var. *glandulifera*. **Plant Cell Reports**. **9: 181-184**.

Azlan, G. J., Marziah, M., Radzali, M., Johari, R. (2002)“Establishment of *Physalis minima* hairy roots culture for the production of physalins”. **Plant Cell Tissue Organ Culture** **69: 271–278**.

Bais, H.P., Govindaswamy, S. and Ravishankar, G.A. (2000)“Enhancement of growth and coumarin production in hairy root cultures of Witloof chicory (*Cichorium intybus* L.cv. Lucknowlocal) under the influence of fungal elicitors”. **Journal of Bioscience and Biotechnology** **90(6): 648-653**.

Begum, P., R. Ikhtari, and B. Fugetsu; “Graphene phytotoxicity in the seedling stage of cabbage, tomato, red spinach, and lettuce”, **Carbon**, **Vol.49, I.12, p. 3907-3919, (2011)**.

Bhatia, S., Bera, T., Dahiya, R., Bera, T., Bhatia, S., & Bera, T. (2015). Classical and nonclassical techniques for secondary metabolite production in plant cell cultures. **Acad Press**, **1, 231-291**.

Blumenthal, M., Goldberg, A. and Brinckmann, J. (2000). Herbal Medicine, Expanded Commission E Monographs. 1 ed. **Integrative Medicine Communications**.USA. **pp: 233 - 235**.

Bohn H, Rink E. Betalaines. In: Constabel F, Vasil I, editors. Cell culture and somatic cell genetics of plants. New York: **Academic Press**. **1988; 5: 449-463**.

Bonfante, P. **2009**. Symbiotic fungi: principles and practice. vol. 18. **Springer Heidelberg Dordrecht London New York**. **pp 373**

BP. Stationery Office. **London**. **2004, Vol: 2, pp: 1175 - 6**.

Brijwal, L. and Tamta, S. (2015). Agrobacterium rhizogenes mediated hairy root induction in endangered *Berberis aristata* DC. **Springer Plus**, **4, 443-453**.

Buchanan, R. B. Gruissem, W. Jones, R. L.(2000). Biochemistry and molecular biology of plants. Rockville: **American Society of Plant Physiologists**.**1177– 1189**.

Canas, J.E., M. Long, S. Nations, R. Vadan, L. Dai, M. Luo, R. Ambikapathi, E.H. Lee, and D. Olszyk; “Effects of functionalized and nonfunctionalized single-walled carbon

nanotubes on root elongation of select crop species”, **Environmental Toxicology and Chemistry**, Vol.27, I.9, p. 1922-1931, (2008).

Cardina, J. and Sparrow, D.H. (1997)“Temporal changes in velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) seed dormancy”. **Weed Science** 45: 61-66.

Chaieb, I., Ben Hamouda, A., Trabelsi, M., Ben Halima, M., and Ben Hamouda, M.H. 2010. Toxicity investigation of *Cestrum parqui* saponins to *Culex pipiens* larvae. **Pest Tech.** 3: 73-75.

Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. and Chern, J.C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis.** 10(3):178-82.

Chang, C.K., Chang, K.S., Lin, Y.C., Liu, S.Y. and Chen, C.Y. (2005)“Hairy root cultures of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino: a promising approach for the production of gypenosides as an alternative of ginseng saponins”. **Biotechnology Letters** 27: 1165–1169.

Chen S and Hou S 1991. In vitro transformation of cotyledons and hypocotyls of *glycyrrhiza uralensis* fishch by *Agrobacterium rhizogenes*. **J. Wuhan Bot. Res.** 4:301-304. (in Chinese).

Chilton, M .D., Tepfer, D .A., Petit, A., David, C., Casse-Delbart, F. and Tempe, J. (1982) “*Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells”. **Nature.** 295: 432–434.

Christensen, J. H., Bauw, G., Welinder, K. G., Montagu, M. V. and Boerjan, W. (1998)“Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar zylem”. **Plant Physiology** 118: 125-135.

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.

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.

Colalto C. Herbal in traction on absorbtion of drugs: Mechanisms of action and clinical risk assessment. **Pharmacol Res.** 2010; 62: 207 - 27.

Csuk R, Schwarz S and Kluge R. Synthesis and biological activity of some anti tumora active deraiveties from glycyrrhetic acid. **European Journal of Medicinal Chem.** 2010; 45: 5718 - 23.

DellaPenna, D. (2000)“Plant Metabolic Engineering”. **Plant Physiology** 125: 160-163.

Dhakulkar, S., Ganapathi, T. R., Bhargava, S. and Bapat, V. A. (2005)“Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. And production of verbascoside in hairy roots”. **Plant Science** 169: 812–818.

Dixon,R.A and Gonzales,R.A. (2005)“plant cell culture a partical approach”.Second edition.**Oxfordord university press.**

Draper, J and Scott, R. (1988)“The isolation of plant nucleic acids”. In: Plant Genetic Transformation and Gene Expression A Laboratory Manual **PP: 192-239.**

Dunlop, D. S. Curtis, W. R. (1991). Synergistic response of plant hairy root cultures to phosphate limitation and fungal elicitation. **Biotechnol. Prog. 7:434–438.**

Dunlop, D. S. Curtis, W. R. (1991). Synergistic response of plant hairy root cultures to phosphate limitation and fungal elicitation. **Biotechnol. Prog. 7:434–438.**

Dupre, P., Lacoux, J., Neutelings, G., Mattar-Laurain, D., Fliniaux, M. A., David, A. and Jacquin-Dubreuil, A. (2000)“Genetic transformation of Ginkgo biloba by *A. tumefaciens*”. **Physiologia Plantarum 108(4): 413-419.**

Edwards, k., C. Johnstone and C. Thompson (1991). "A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis." **Nucleic acids research 19(6): 1349.**

El-Hady O.A., and Wanas Sh.A. 2006. Water and fertilizer use efficiency by cucumber grown under stress on sandy soil treated with acrylamid hydrogels. **J.App.Sci.Res., 2(12):1293- 1297.**

Esmaeili H, Hadian J, Mirjalili MH, Rezaadoost H (2015) The effect of activated charcoal and multi-walled carbon nanotubes on the growth, rosmarinic and caffeic acid content, total phenol, total flavonoid and antioxidant activity of *Satureja rechingeri* calluses. **J Biodivers Environ Sci 6:297–304.**

Fiore C, Eisenhut M, Krausse R, Ragazzi E, Pellati D, Armanini D and Bielenberg J. Antiuiriial effects of *Glycyrrhiza* species`. *Phytotherapy Res.*2008; 22: 141 - 8.

Foley, M.E. (2001)“Review article: seed dormancy: an update on terminology, physiological, genetics, and quantitative trait loci regulating germinability". **Weed Science 49: 305-317.**

Fuhrman B, Volkova N, Kaplan M, Presser D, Attias J, Hayek T and Aviram M. Antiatherosclerotic effects of licorice extract supplementation on hypercholesterolemic patients: increased resistance of LDL to atherogenic modifications, reduced plasma lipid levels, and decreased systolic blood pressure. **Nutrition 2002;18 (3): 268 - 73.**

Georgive, M. L., Pavlov, A.I. and Bley, T. (2007)“Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances”. **Applied Microbiol and Biotechnology 74: 1175-1185.**

Ghadiri, H. and Bagherani Torshiz, N. (2000)“*Effects of Scarification and Temperature on Germination of Licorice (Glycyrrhiza glabra L.) Seeds*”. **Journal of Agriculture Science Technology 2 : 257 -262 .**

Ghahraman A. Basic Botany: Anatomy and Morphology, Vol. 1. University of Tehran Press.1999, pp: 539.

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

Guerche, P., Jouanin, L., Tefer, D and Pelletier, G. (1987) "Genetic transformation of oil seed rape (*Brassica napus*). By the Ri T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* and analysis of inheritance of the transformed phenotype". **Molecular and General Genetics** 206: 382-386.

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.

Hamidi, M., Azadi, A., Rafiei, P. "Hydrogel Nanoparticles in Drug Delivery", *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 60, pp. 1638-1649, (2008).

Hamill, J. D. (1993) "Alterations in auxin and cytokinin metabolism of higher plants due to expression of specific genes from pathogenic bacteria: a review". **Australian Journal. Plant. Physiology** 20: 405-423.

Hayashi H, Hiraoka N, Ikeshiro Y, Yamamoto H and Yoshikawa T. Seasonal variation of glycyrrhizin and isoliquiritigenin glycosides in the root of *Glycyrrhiza glabra* L. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. 2009; 21 (9): 987 - 9.

Hayashi, H., Hanaoka, S., Tanaka, S., Fukui, H. and Tabata, M. (1993) "Glycyrrhetic acid 24-hydroxylase activity in microsomes of cultured licorice cells". **Phytochemistry** 34: -1307.

Hayashi, H., Sudo, H., 2009. Economic importance of licorice. **Plant Biotechnol.** 26, 101-104.

Hayashi, H., Yamada, K., Fukui, H. and Tabata, M. (2009) "Metabolism of exogenous 18 β -glycyrrhetic acid in cultured cells of *Glycyrrhiza glabra*". **Phytochemistry** 31: 2729-2733.

Herron, H., and Clemens, J. (2001) "Seed dormancy and germination in *Meliccytus ramiflorus* (violaceae)". **New Zealand Journal of Botany** 39:2 45-249.

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

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

Iijima, S., 1991. Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature (London)*, 354, 56-58.

Isbrucker, R., Burdock, G., 2006. Risk and safety assessment on the consumption of Licorice root (*Glycyrrhiza* sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **46**, 167-192.

Jeffrey, H. W., Michael, M. J., Robert, A. and Martin, J. R. (1983) High performance liquid chromatographic determination of glycyrrhizin in licorice products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 31: 387-389.

Jenner, H., Townsend, B. and Osbourn, A. (2005) "Unravelling triterpene glycoside synthesis in plants; phytochemistry and functional genomics join forces". **Planta** **220**: 503-506.

Jesus-Gonzalez, L.D.E. and Weathers, P.J. (2003) "Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids". **Plant Cell Reports** **21**: 809-813.

Jiang, J., Zhang, X., True, A.D., Zhou, L., Xiong, Y.L., 2013. Inhibition of lipid oxidation and rancidity in precooked pork patties by Radical-Scavenging licorice (*Glycyrrhiza glabra*) extract. **J. Food Sci.** **78**, C1686–C1694.

Johnson T, Ravishankar GA, Venkataraman LV (1990) In vitro capsaicin production by immobilized cells and placental tissues of *Capsicum annuum* L. grown in liquid medium. **Plant Science Asia** **70**: 223-229.

Jung, K. H. Kwak, S. S. Kim, S. W. Lee, H. Choi, C. Y. Lin, J. R. (1992). Improvement of the catharanthine productivity in hairy root cultures of *Catharanthus roseus* by using monosaccharides as a carbon source. **Biotechnol. Lett.** **14**:695–700.

Kabirataj, s., E. G. Ravandi. and B. S. Kaleybar. (Summer 2013). "The Effect of Different Strains of *Agrobacterium rhizogenes* on Production of Chlorogenic Acid and Phenolic Compounds in Hairy Root Cultures of *Cichorium intybus* L." **Journal of Biotechnology of Crops** **3(4)**: 69-76.

Kader, M. A., and S. C. Jutzi. 2004. Effects of thermal and salt treatments during imbibition on germination and seedling growth of sorghum at 42/19°C. **J. Agron. Crop Sci.** **190**: 35-38.

Kamada, H., Okamura, N., Satake, M., Harada, H. And Shimomura, K. (1986) "Alkaloid production by hairy root culture in *Atropa belladonna*". **Plant Cell Report** **5**: 239-242.

Karimi, H. 2003. Encyclopedia of Iran plants. 1th volume, Parcham Press, 1200p. (In Persian).

Kayser, O. and Quax, W. (2007) "Medicinal Plant Biotechnology". 574 PP.

Khalili, M., Hasanloo, T., Kazemi Tabar, S.K. and Rahnema, 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.

Khodakovskaya, M., Dervishi, E., Mohammad, M., Xu, Y., Li, Z., Watanabe, F. and Biris, A.S., 2009. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. **ACS Nano**, **3**:

Khodakovskaya, M., Kanishka d.S., Alexandru S.B., Dervishi, E., and Villagarcia, H., 2012. Enhancement of Tobacco Cells, **In: ACS Nano**. **6(3)**: 2128-2135.

Khodakovskaya, M., et al., Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth, **ACS Nano** **3(2009)** 3221–3227.

Klaine SJ, Alvarez PJ, Batley GE, Fernandes TF, Handry RD, Lyon DY, Manendra S, McKaughlin MJ, Lead JR. 2008. Nanomaterials in the Environment: Behavior, Fate Bioavailability, and Effects. **Environmental Toxicology and Chemistry** **27**, 1825–1851.

Kobaya shi M, Fujita K, Katakura T, Utsunomiya T, Pollard RB and Suzuki F. Inhibitory effect of glycyrrhizin on experimental pulmonary metastas: in mice inoculated with B16 melanoma. **Anti Cancer Res.** **2002; 22: 4053 - 8.**

Kokate, C.K. (2006)“Medicinal plant biotechnology”.**CBS publisher and distributors 506PP.**

Kovalenko, P.G., Antonjuk, V.P. and Maliuta, S.S. (2003)“Secondary metabolites production from transformation cells pf *Glycyrrhiza glabra* and *potentilla alba* as productions of radioprotective compounds”. **Ukrainica Bioorganica Acta** **1: 21-32.**

Krausse R, Bielenberg G et al. Invitro anti-*Helicobacter pylori* activity of Extractum *Liquiritrae*, glycyrrhizin and its metabolites. **J. Antimicrob Chemother.** **2004; 54: 243 - 6.**

Kubasek, W. L., Shirley, B. W., Mckillop, A., Goodman, H. M., Briggs, W. and Ausbe, F. A. (1992)“Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating *Arabidopsis* seedlings”. **The Plant Cell** **4: 1229-1239.**

Lentihet M and Nygren A. Licorice an old drug and currently a candy with metabolic effects. **J. oral Pathol. Med.** **1997; 26 (1): 36 - 9.**

Li YJ, Chen J, Li Y, Li Q, Zheng YF, Fu Y and Li P. Screeing and haracterization of natural antioxidants in four *Glycyrrhiza* species by liquid chromatography coupied with electrospray ionization quadropole time of flight tanden mass spectrometry. **J. Chromatogr A.** **2011; 1218 (45):8181 - 91.**

Li, L. J., Khlobystov, A. N., Wiltshire, J. G., Briggs, G.A., Nicholas, R.J., **2005.** Diametersselective encapsulation of metallocenes in single-walled carbon nanotubes. **Nature Materials.** **4: 481–485.**

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

Lin, S., J. Reppert, Q. Hu, J.S. Hudson, M.L. Reid, T.A. Ratnikova, A.M. Rao, H. Luo, and P.C. Ke; “Uptake, translocation, and transmission of carbon nanomaterials in rice plants”, *Small*, **Vol.5, I.10, p. 1128-1132, (2009).**

Liu, Q., X. Zhang, Y. Zhao, J. Lin, C. Shu, C. Wang, and X. Fang; “Fullerene-Induced Increase of Glycosyl Residue on Living Plant Cell Wall”, *Environmental Science & Technology*, **Vol.47, I.13, p. 7490-7498, (2013).**

Liu, Q., Y. Zhao, Y. Wan, J. Zheng, X. Zhang, C. Wang, X. Fang, and J. Lin; “Study of the Inhibitory Effect of Water-Soluble Fullerenes on Plant Growth at the Cellular Level”, *ACS Nano*, **Vol.4, I.10, p. 5743-5748, (2010).**

Maha M, Gazial A and Nermeen M. Effect of Glabridin on the Structure of Ileum and Pancreas in Diabetic Rats: A histological, Immunohistochemical and Ultrastructural Study. **Nature and Sci.** 2012; 10 (3): 78 - 90.

Mano, H., Nabeshima, S., Matsui, C. and Ohkawa, H. (1986)“Production of Tropane Alkaloids by Hairy Root Cultures of *Scopolia japonica*”. **Agricultural and. Biological Chemistry** 50: 2715-2722.

Mantell SH, Smith H. Cultural factors that influence secondary metabolite accumulation in plant cell and tissue cultures. In: Mantell SH, Smith H, editors. Plant biotechnology. Cambridge: **Cambridge Univ. Press, 1984.pp. 75–108.**

Mehrotra S, Kumar Kukreja A, Singh Khanuja S and Nath Mishra B 2008. Genetic transformation studies and scal up of hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra* in bioreactor. **Electronic J. biotech.** 11.

Mehrotra, S., Kukeja, A., Khanuja, S.P.S. and Mishra, B.N. (2008)“Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra* in bioreactor”. **Electronic Journal of Biotechnology .ISSN:0711-3458.**

Mensuali-Sodi, A., Panizza, M., Serra, G. and Tognoni, F., 1993. Involvement of activated charcoal in the modulation of abiotic and biotic ethylene levels in tissue cultures. **Scientia Horticulture, 54: 49-57.**

Miralles, P., T.L. Church, and A.T. Harris; “Toxicity, Uptake, and Translocation of Engineered Nanomaterials in Vascular plants”,**Environmental Science & Technology, Vol.46, I.17, p. 9224-9239, (2012).**

Mirhaidar H. Licorice, Herbal plants used in the treatment of diseases and education. **Office of Islamic culture publication. 1373, Volume 3, pp:12 - 6.**

Misava M. Production of useful plant metabolites.In: **Flechter A, editors. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. Berlin: springer-Verlag. 1985; 59-88.**

Mishra, M. R. M., Srivastava, R. K., & Akhtar, N. (2019). Effect of Nitrogen, Phosphorus and Medium pH to Enhance Alkaloid Production from *Catharanthus roseus* Cell Suspension Culture. **International Journal of Secondary Metabolite, 6(2), 137-153.**

Mohammad Saleem MMN, Mohammad AAW, Al-Tameemi JA and Ghassan MS. Biological study of the effect of licorice roots extract on serum lipid profile, liver enzymes and kidney function tests in albino mice. **AJB. 2011; 10 (59): 12702 – 6.**

Moradi, F., Mehrjerdi, M. Z., Vahdati, K., & Hasanloo, T. (2019). Effect of different factors on induction of hairy roots in Iranian garlic. **Journal of Plant Productions (Scientific Journal of Agriculture), 41(4), 43.**

Morgan, J. A., Barney, C. S., Penn, A. H., Shanks, J. V. (2000)“Effects of buffered media upon growth and alkaloid production of *Catharanthus roseus* hairy roots”. **Applied Microbiol Biotechnology** 53: 262–65.

Mousa, N. A., Siaguru, E., Wiryowidagdo, S. and Wagih, M. E. (2007). Establishment of regenerative callus and cell suspension system of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) for the production. **Sugar Tech. 9(1): 72-82.**

Mrinalini S· Gaurav S· Swati S· Sudhir S· Pratibha M. (2018)“ Elicitation Enhanced the Yield of Glycyrrhizin and Antioxidant Activities in Hairy Root Cultures of *Glycyrrhiza glabra* L.”. **Journal of Plant Growth Regulation 68: 859-868.**

Mukundan, U., Rai, A., Dawda, H., Ratnaparkhi, S. and Bhide, V. (1998)“Secondary metabolites in *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformed root cultures”. **Plant Tissue Culture and Molecular Biology Applications and Prospects 302–31.**

Mulabagal V, Tsay HS (2004) Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. **International Journal of Applied Science and Engineering 2: 29-48.**

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

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

Nandagopal, S. and Ranjitha Kumari, B.D., 2007. Effectiveness of auxin induced in vitro root culture in chicory. *Journal of Central European Agriculture*, 8(1):73-80.

Nelson-Somogyi, M. (1952) Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry 195: 19-29.**

Ooms, G., Karp, A., Burrell, M. M., Twell, D. and Roberts, J. (1985)“Genetic modification of potato development using Ri-T-DNA”. **Theoretical and Applied Genetics. 70: 440-446.**

Pastori, G.M., Wilkinson, M.D., Steele, S.H., Sparks, C., Jones, H.D. and Parry, M.A.G. (2001)“Age dependent transformation frequency in elite wheat varieties”. **Journal of Experimental Botany 52(357): 857-863.**

Patel, H. and Krishnamurthy, R. 2013. Elicitors in Plant Tissue Culture. **Pharmacognosy and Phytochemistry, 2: 60-65.**

Payne, J., Hamill, J. D., Robins, R. J., Rhodes, M. J. C. (1987)“Production of hyoscyamine by “hairy root” cultures of *Datura stramonium*”. **Planta Med 53:474–**
Pierik, R.L.M. (1987). *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff, Dordrecht, **The Netherlands. p. 335.**

Putalun, W., Luealon, W., De-Eknamkul, W., Tanaka, H. and Shoyama, Y. (2007)“Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. ” **Biotechnol Letters 29: 1143-1149.**

Rahnama, H., Hasanloo, T., Shams, M. and Sepehrifar, R. (2008)“Silymarin production by hairy root culture of *Silybum marianum* (L.) Gaertn”. **Iranian Journal of Biotechnology 6:113-118.**

Ramachandra Rao S, Ravishankar GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances** 2002; 20: 101-153.

Rao SR, Ravishankar GA (2002) Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances** 20: 101-153.

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

Rhodes, M. J. C., Robins, R. J., Hamill, J. D., Parr, A. J., Hilton, M. H. and Walton, N. J. (1990) "Properties of transformed root culture". **Proceedings of the Phytochemical Society of Europe Secondary Product from Plant Tissue Culture** 201–225.

Roberts, S. (2007) "Production and engineering of terpenoids in plant cell culture". **Nature Chemical biology** 3(7): 387-395.

Russo, M., Serra, D., Suraci, F., Sanzo, R.D., Fuda, S., Postorino, S., 2014. The potential of e-nose aroma profiling for identifying the geographical origin of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) roots. **Food Chem.**

Sacheti, U. and Al-Rawahy, S. H (1998) "The effect of various pretreatments on the germination of important leguminous shrub-tree species of the Sultanate of Oman". **Seed Science. and Technol.** 26: 691-699.

Sahoo, Y., Remien, Y.N. and Yao, R.S. (1997). *In vitro* clonal propagation of an aromatic medicinal herb *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) by axillary shoot proliferation. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. **Largo**. 33: 293-296.

Saleh TA; "Nanomaterials for Pharmaceuticals Determination" (2016)., **Bioenergetics** 5:226. doi:10.4172/2167-7662.1000226.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". **Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring, Harbor, NY.**

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". **Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring, Harbor, NY.**

Samsam Shariat, H. 2004. Cultivation and propagation of medicinal plant. **2th Edition, Mani Press, 419p. (In Persian).**

Sauerwein, M. Wink, M. Shimomura, K. (1992). Influence of light and phytohormones on alkaloid production in transformed root cultures of *Hyoscyamus albus*. **J. Plant Physiol.** 140:147–152.

Sauerwein, M. Wink, M. Shimomura, K. (1992). Influence of light and phytohormones on alkaloid production in transformed root cultures of *Hyoscyamus albus*. **J. Plant Physiol.** 140:147–152.

Sato, S., Ikeda, H., Furukawa, H., Murata, Y. and Tomoda, M. (2004). Effect of nutrient solution concentration on inorganic and glycyrrhizin content *Glycyrrhiza glabra*. **Yakugaku Zasshi.** 124(10): 705-709.

Seitz HU, Hinderer W. Anthocyanins. In: constabeb F, Vasil I, editors. Cell culture and somatic cell genetics of plants. San Diego: **Academic Press.** 1988; 5: 49-76.

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 .

Shirazi, Z., K. Piri, A. M. Asl and T. Hasanloo (2012). "Glycyrrhizin and isoliquiritigenin production by hairy root culture of Glycyrrhiza glabra." **Journal of Medicinal Plants Research** 6(31): 4640-4646

Shojaei, T. R., Salari, V., Ramazan, D., Ehyaei, M., Gharechahi, J., & Chaleshtori, R. M. (2014). The effect of plant growth regulators, explants and cultivars on spinach (*Spinacia oleracea* L.) tissue culture. **African Journal of Biotechnology**, 9(27), 4179-4185.

Singh, G. Gavrielli, J. Oakey, J. S. Curtis, W. R. (1998). Interaction of methyl jasmonate, wounding, and fungal elicitation during sesquiterpene induction in *Hoscyamus muticus* root cultures. **Plant Cell Rep.** 17:391–395.

Slinkard, K. and Singleton, V.L. (1977). Total phenolic analysis: automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology and Viticulture**. 28: 49-55.ch

Soltani N, Karami R and Ranjbar M. The interaction of salicylic acid and cold stress on antioxidant enzyme activities in licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.). **J. Herbal Medicines** 1390; 2 (1): 1 - 13.

Stampoulis, D., S.K. Sinha, and J.C. White; "Assay-Dependent Phytotoxicity of Nanoparticles to Plants", **Environmental Science & Technology**, Vol.43, I.24, p. 9473-9479, (2009).

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.

Stiller, J., Martirani, L., Tuppale, S., Chian, R.J., Chiurazzi, M. and Gresshoff, P.M. (1997) "High frequency transformation and regeneration of transgenic plants in the model legume *Lotus japonicus*". **Journal of Experimental Botany** 4 (312): 1357 -1365 .

Sudha, C. G., Obul Reddy, B., Ravishankar, G. A. and Seeni, S. (2003) "Production of ajmalicine and ajmaline in hairy root cultures of *Rauvolfia micrantha* Hook f., a rare and endemic medicinal plant". **Biotechnology Letters** 25: 631–636.

Taya, M. Sato, H. Masahiro, K. Tone, S. (1994b). Characterization of pak-bung green hairy roots cultivated under light irradiation. **J. Ferment. Bioeng.** 78:42–48.

Taya, M. Yakura, K. Kino-Oka, M. Tone, S. (1994). Influence of medium constituents on enhancement of pigment production by batch cultures of red beet hairy roots. **J. Ferment. Bioeng.** 77:215–217.

Tenea, G., Calin, A., Gavrila, L. and Cucu, N. (2008) "Manipulation of root biomass and biosynthetic potential of *Glycyrrhiza glabra* L. plants by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation". **Roumanian Biotechnological Letters** 13 (5): 3922-3932.

Teoh, K.H., Polichuk, D.R., Reed, D.W., Now K, G., Covello, P.S. (2006) "Artemisia annua L. (Asteraceae) trichome-specific cDNAs reveal CYP71v1, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the antimalarial sesquiterpene lactone artemisinin". **FEBS Letters** 580:1411-1416.

Tepfer, D. (1984)“Genetic transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: Sexual transmission of the transformed genotype and phenotype”. **Cell** **37**: 959–967.

Tischler, C.R., Young, B.A and Sanderson, M.A.)1994(“Techniques for reducing seed dormancy in switchgrass””.**Seed Science. and Technology** **22**: 19-26.

Tiwari DK, Dasgupta-Schubert N, Cendejas LMV, Villegas J, Montoya LC, et al. Interfacing carbon nanotubes (CNT) with plants: enhancement of growth, water and ionic nutrient uptake in maize (*Zea mays*) and implications for nanoagriculture. **Appl Nanosci** **2014**;**4**:577–91.

Toivonen L, Rosenqvist H (1995) Establishment and growth-characteristics of *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. **Plant Cell Tissue Organ Cult** **41**:249–258.

Tripathi L, Tripathi JN (2003) Role of biotechnology in medicinal plants. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research** **2**: 243-253.

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

USP 28/ NF 23. The united States Pharmacopeial Convention. **Toronto. 2005, Vol: 3,pp: 2109 – 10.**

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.

Vasconsuelo, A. and Boland, R. 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. **Plant Sci**, **172**: 861-875.

Veena, V. and Taylor, C. G. (2007)“*Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications””. In *Vitro Cellular and .Development .Biology.Plant* **43**: 383–403.

Wang ZY, Athar M, Bickers DR (2000). Licorice in foods and herbal drugs: Chemistry, pharmacology, toxicology and uses.In *Herbs, Botanicals & Teas*, Mezza G, Oomah BD (eds).**Technomic Publishing Co. Inc: Lancaster, PP. 321-353.**

Wilson, M., Savka, M. A., Hwang, I., Farrand, S. K and Lindow, S. E. (1995)“Altered Epiphytic Colonization of Mannityl Opine-Producing Transgenic Tobacco Plants by a Mannityl Opine-Catabolizing Strain of *Pseudomonas syringae*””. **Appleid and environmental microbiology** **61**: 2151-5158.

Wongwicha, W., Tanaka, H., Shoyama, Y., Tuvshintogtokh, I. and Putalun, W. (2008). Production of Glycyrrhizin in Callus Cultures of Licorice. *Z. Naturforsch.* **63c**: 413-417.

Wyslouzil, B. E. Waterbury, R. G. Weathers, P. J. (2000).The growth of single roots of *Artemisia annuain* nutrient mist reactors. **Biotechnol. Bioeng.** **72**:143–150.

Xitong Su, L.Wu, M.Hu, W.Dong, M.Xu, P.Zhang. Glycyrrhizic acid: A promising carrier material for anticancer therapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy** **95** (2017) **670–678**.

Yang, K.Y., Lee, S.Y., Park, W.T., Park, N.I. and Park, S.U., **2010**. Exogenous auxins and polyamines enhance growth and rosmarinic acid production in hairy root cultures of *Nepeta cataria* L. **Plant Omics Journal**, **3(6)**: **190-193**.

Yoganant, N. and Jothi Basu, M. (2009) "TLC Method for the Determination of Plumbagin in Hairy Root Culture of *Plumbago rosea* L." **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry** **4 (1)**: **66-69**.

Zhao, J., Davis, L.C. and Verpoorte, R. **2005**. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnol Adv**, **23**: **283-333**.

Zheng, L., Hong, F., Lu, S., and Liu, C. (2005). Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. **Biological trace element research**, **104(1)**, **83-91**.

Ziemienowicz.A. (2001)"Odyssey of *Agrobacterium* T-DNA". **Acta Biochemica Polonica**.**48(3)**: **623-6350**.

Abstract

Licorice is an important medicinal plant containing glycyrrhizic acid as a secondary metabolite. In this study, the germination of three licorice ecotypes including Iraqi, Kashmar and Joghtay showed that the highest germination rate (80%) was obtained in Iraqi ecotype using 98% sulfuric acid. In vitro evaluation of seedling growth in solid, liquid, and hydrogel media with and without activated charcoal emphasized that the most of the morphological and physiological traits evaluated in liquid medium containing activated charcoal (2 g / l) were improved. The effects of IAA and NAA on rooting of different ecotypes and secondary metabolite content showed that the highest fresh weight and diameter of roots were obtained in Kashmar ecotype under 1.5 and 0.5 mg / l IAA, respectively. The highest amount of glycyrrhizic acid (1.33 mg/g DW) was also produced on medium supplemented with 1 mg/l IAA in Kashmar ecotype. The effect of carbon nanotubes (0, 100 and 450 mg) and KH₂PO₄ (0, 2.2 and 3 g) different levels on growth of in vitro seedlings showed that increasing phosphorus and nano-carbon increased morphological and physiological traits such as Leaf, stem and root length, fresh and dry root weight and glycyrrhizic acid content in three ecotypes. The production of transgenic roots using *Agrobacterium rhizogenes* strain AR15834 showed the superiority of the root production in the 3-week-old of leaf explants treated with 200 micro molar acetosringone in Kashmar ecotype. In addition to these results, the highest frequency of hairy root production (60%) was also observed in 7-day-old seedling with acetosringone in Kashmar ecotype and the genetic transformation of hairy roots were validated by rolB gene PCR. Based on the findings of the previous steps, seedlings with transgenic roots attached to their hypocotyl were isolated and were transferred to the MS semi-solid medium containing different levels of carbon nanotubes MWCNTs (0, 100 and 450 mg) and KH₂PO₄ phosphorus (0, 2.2 and 3 g). The assay of Glycyrrhizic acid measured by HPLC in 14-day-old seedlings showed that Kashmar ecotype treated with 450 mg / L MWCNTs produced the highest amount of this active ingredient with an average of 16.951.33 mg/g DW.

Keywords: Licorice, Glycyrrhizic acid, Morphological traits, Transgenic Root, , Nanocarbon MWCNT, Phosphorus.



Shahrood University Of Technology
Faculty Of Agriculture
Msc thesis in Agricultural Biotchnology

optimization of glycyrrhizic acid's production culture in vitro in
Glycyrrhiza glabra .L

By: Ali Akbar Alizadeh Evare

Supervisor:

Dr. Mahdieh. Parsaeian

Advisores

Dr. Ziba Ghasimi Hagh

Dr. Ehsan Qodusi

2020