بررسی اثر ژنوتیپ بر برخی صفات مورفولوژیکی گیاهچه های درون شیشه ای شیرین بیان

امین پورعابدین[۱]، علاءالدین کردناییچ[۲] و مرتضی ابراهیمی[۳]

۱- دانشجو،کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی،دانشگاه شاهد

۲- استادیار، دکتری نخصصی اصلاح نباتات گرایش بیوتکنولوژی،دانشگاه شاهد

۳- استادیار،دکتری تخصصی مهندسی ژنتیک و زیست مولکولی،پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی

Aminpourabedin@Gmail.com

چکیده:

شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra L*) از جمله مهمترین گیاهان دارویی بوده که دارای طیف وسیعی از کاربردها در صنایع مختلف دارویی، غذایی، آرایشی و بهداشتی می باشد. این گیاه عمدتا به روش رویشی تکثیر می گردد. تکنیک کشت بافت به عنوان ابزاری قدرتمند در تکثیر انبوه ژنوتیپ های برتر شناخته می شود. وجود اثر متقابل ژنوتیپ و محیط کشت بر باززایی گیاهان مختلف نشان داده شده است. لذا این تحقیق با هدف بررسی تاثیر ژنوتیپ بر خصوصیات مورفولوژیکی گیاهچه هایی رشد یافته در شرایط کشت درون شیشه ای شیرین بیان انجام شده است. در این بررسی چهار ژنوتیپ متفاوت از جمعیت های جمع آوری شده از استان های گلستان، کهکیلویه و بویراحمد، خراسان رضوی و ایلام که در بررسی های مقدماتی دارای تفاوت های موفولوژیکی، فیتوشیمیایی و مولکولی بوده اند، مورد بررسی قرار گرفته است. ابتدا ریز نمونه های تک گره از این ژنوتیپ ها در محیط کشت MS به همراه دو ماده تنظیم کننده ی رشد ۶-بنزیل‌آمینوپورین و کینتین در شرایط درون شیشه ای کشت داده شدند. بعد از رشد مناسب گیاهان در یک دوره ۹۰ روزه، صفات مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. مقایسه میانگین داده ها نشان داد که بین ژنوتیپ های مورد بررسی از نظر صفات طول ساقه، تعداد میانگره، طول میانگره، طول ریشه، تعداد ریشه و تعداد برگ تفاوت معنی دار ($p\leq0.05\%$) وجود داشت. ژنوتیپ گلستان۴ به ترتیب با میانگین ۱۰/۳۳و ۱۱ سانتی متر برای طول ساقه و تعداد میانگره از رشد بیشتری نسبت به دیگر ژنوتیپ ها برخوردار بود. طول ریشه، تعداد ریشه و تعداد برگ ژنوتیپ ایلام۱۷ به ترتیب با میانگین ۱/۸۳ سانتی متر، ۱۱ و ۳۴ عدد در مقایسه با دیگر ژنوتیپ ها برتری معنی داری داشت.

واژه های کلیدی: شیرین بیان، درون شیشه ای ،ریز نمونه، محیط کشت MS

The effect of genotype on morphological characteristics of licorice (Glycyrrhiza glabra L.) plantlets in *in vitro* condition

Amin pourabedin[1],Alaedin kordenaeej[2],Morteza ebrahimi[3]
1-Msc Student of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran
2- Faculty Member of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran
3-Faculty Member of Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran, Esfahan, Iran

Aminpourabedin@Gmail.com

Abstract:
Licorice (Glycyrrhiza glabra L) is the most important medicinal plants with a wide range of applications in various industries such as pharmaceutical, food, cosmetics and healthcares. This plant is propagated mainly by vegetative approaches. Tissue culture technique is known as as a powerful tool for mass propagation of superior genotypes. It has been shown that the genotype and medium have interaction on plant regeneration. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of genotype on the morphological characteristics of licorice *in vitro* grown seedlings. In this assay, four different genotypes of the populations collected from Golestan, Kohgiluyeh Boyer Ahmad, Khorasan and Ilam provinces with morphological, molecular and phytochemical differences were studied. First the single node explants of these genotypes were cultured on MS medium containing a combination of two growth regulators 6-Bnzylamynvpvryn and kinetin. Various parameters were recorded after 90-days of culture, when the appropriate growth was achieved. Mean comparison showed that there were significant differences ($p \leq 0.05\%$) among the genotypes for the shoot length, number of internodes, internode length, root length, number of roots and leaves. Among the genotypes, the Golestan 4 was the fast growing one , with an average of 33.10 and 11 cm for the stems length and number of internodes, respectively. The root length, root number and leaves number of the Elam 17 were significantly superior compared with other genotypes, with 1.83 cm, 11 and 34, respectively.
Keywords: licorice, in vitro, explants, MS medium

مقدمه:

گیاهان دارویی یکی از منابع ارزشمند در گستره ی وسیع منابع طبیعی هستند که در صورت شناخت علمی، کشت، توسعه و بهره برداری می توانند نقش مهمی در سلامت جامعه، اشتغال زایی و صادرات غیر نفتی داشته باشند(۱). بر اساس برآوردهای صورت گرفته در سال های اخیر ارزش بازارهای جهانی گیاهان دارویی و فرآورده های حاصل از آن همواره با رشد قابل توجهی همراه بوده است (۵). آمارهای موجود نشان می دهد، ارزش بازار جهانی گیاهان دارویی در سال ۲۰۰۲ با رشد ۶/۲ درصدی نسبت به سال پیش از آن به بیش از ۱۳/۷ میلیارد دلار بالغ گردید (۵). در این میان ارزش تجارت جهانی شیرین بیان در سال۲۰۰۷، حدود ۴۲ میلیون دلار آمریکا تخمین زده شده است که این نشان از اهمیت این گیاه در بین گیاهان دارویی دارد (۴).

شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra L*) متعلق به خانواده ی لگوم ها است و یکی از مهمترین مواد موثره ی آن یعنی گلیسیریزین(Glycyrrhizin) بطور گسترده بعنوان یک شیرین کننده طبیعی و همچنین بخاطر خاصیت ضد التهابی و محافظ کنندگی از کبد بعنوان یک ماده دارویی استفاده می شود. علاوه بر این، مشتقات شیرین بیان بعنوان موارد آرایشی، افزودنی غذاها، طعم دهنده تنباکو و شیرین کننده غذایی کاربرد گسترده ایی دارد (۴). ظرفیت تولید بالای شیرین بیان در کشور (۱۸ هزار و سیصد و پنجاه تن در سال در ۱۴ کارخانه) امری قابل توجه است که با این حال با روند کاهشی میزان صادرات (کاهش از ۴۴ میلیون دلار در سال ۹۰ به ۳۳ میلیون دلار در سال ۹۳) همراه بوده است. یکی از دلایل این امر عدم دسترسی به ماده اولیه این گیاه می باشد. از راهکارهای مهم در زمینه ی افزایش تولید ماده ی اولیه شیرین بیان کمک به زراعی سازی این گیاه و احیای اراضی و رویشگاه های طبیعی آن است. در حوزه ی تاثیرات ژنوتیپ بر صفات مورفولوزیکی در گیاهچه های

حاصل از کشت درون شیشه ای تحقیقاتی در مورد گیاه شیرین بیان انجام نشده است(۶). هر چند که در گیاهان دیگر تحقیقات مشابه وجود دارد. طالبی و همکاران (۱۳۹۴)، بررسی چهار رقم زودرس و دیررس گیاه سیب زمینی از نظر صفات مورفولوژیکی به اختلافات معنی داری دست یافتند. در صفات طول ساقه ،تعداد برگ مرکب در هر گیاه و تعداد استولون رقم ساتینا،تعداد روزهای شکستن خواب غده رقم آگریا،تعداد جوانه،طول و وزن غده رقم آریندا و در صفات تعداد و عرض غده رقم ساتنه در مقایسه با یکدیگر برتری نشان دادند(۸). Marylise Doctrinal و همکاران (۱۹۸۸) ،به بررسی اثرات ژنوتیپ در گیاه چغندر پرداختند. در این تحقیق آنها با بررسی پنج ژنوتیپ s_1,s_2,s_3,s_4,s_5 به این نتیجه دست یافتند که ژنوتیپ s_3 با شاخص عملکرد ۸۱٪ بیشترین میزان رشد را در این میان داشته است(۳).Christopher وهمکاران با بررسی تاثیرات ژنوتیپ بر میزان رشد در گیاه فلفل قرمز به اختلافات معنی داری در این زمینه دست یافتند.آنها با بررسی سه ژنوتیپ C. 260553 annuum, C. praetennissum PI 342947, C. baccatum PI به اختلاف معنی داری در صفت تعداد ساقه دست یافتند. در این میان ژنوتیپ C. praetennissum PI 342947 بیشترین مقدار این صفت را به خود اختصاص داد(۲).

تحقیق انجام شده نیز با هدف بررسی صفات مورفولوژیکی و تاثیر ژنوتیپ بر این صفات در ژنوتیپ های بومی گیاه شیرین بیان انجام شده است.

مواد و روش ها:

تهیه مواد گیاهی

پژوهش حاضر در پژوهشکده متابولیت های ثانویه،واقع در اصفهان، در سال۱۳۹۶-۱۳۹۵ اجرا گردید. از چهار ژنوتیپ مختلف حاصل از بررسی مقدماتی جمعیت های شیرین بیان ایران (اطلاعات نشان داده نشده است) شامل گلستان۴(جمع آوری شده از استان گلستان،گالیکش، فارسیان)، یاسوج۱ (استان کهکیلویه و بویراحمد، شهرستان بویر احمد، منطقه گرگود) ،خراسان۸ (استان خراسان رضوی، ملک آباد، ده سرخ) و ایلام ۱۷(استان ایلام، شهرستان دره شهر،روستا جعفر آباد، چمکان) موجود در کلکسیون پژوهشکده متابولیت های ثانویه (اصفهان)، نمونه برداری شد. در این بررسی از ریز نمونه های جوانه جانبی استفاده شد. ریز نمونه ها ابتدا با الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و سپس هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ حاوی چند قطره توویین ۲۰به مدت ۱۵ دقیقه ضد عفونی و حداقل سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شدند.

کشت ریز نمونه

استقرار: ریز نمونه های جوانه جانبی ضد عفونی شده از ژنوتیپ های فوق در محیط کشت پایه MS[۱] حاوی ترکیبی از تنظیم کننده های رشد BAP[۲](1.5 mg/l) ، Kin[۳](0.5 mg/l)، IBA[۴](0.1 mg/l) و GA3[۵](0.5 mg/l) به همراه ۳۰ گرم در لیترساکارز و ۶ گرم درلیتر آگار و pH برابر ۵/۸ که در تحقیقی مجزا بهینه سازی و مورد ارزیابی قرار گرفته بود، کشت شدند. گیاهچه ها در اتاقک رشد تحت شرایط سترون در دمای ۲±۲۵ درجه ی سانتی گراد و طول روشنایی ۱۶ ساعت با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. پس از رشد جوانه های جانبی، گیاهچه ها به صورت به محیط تکثیر منتقل شدند.

---

۱. Murashige and Skoog medium

۲. 6-Benzylaminopurine

۳. Kinetin

۴. indole-3-acetic acid

۵. Gibberellic acid

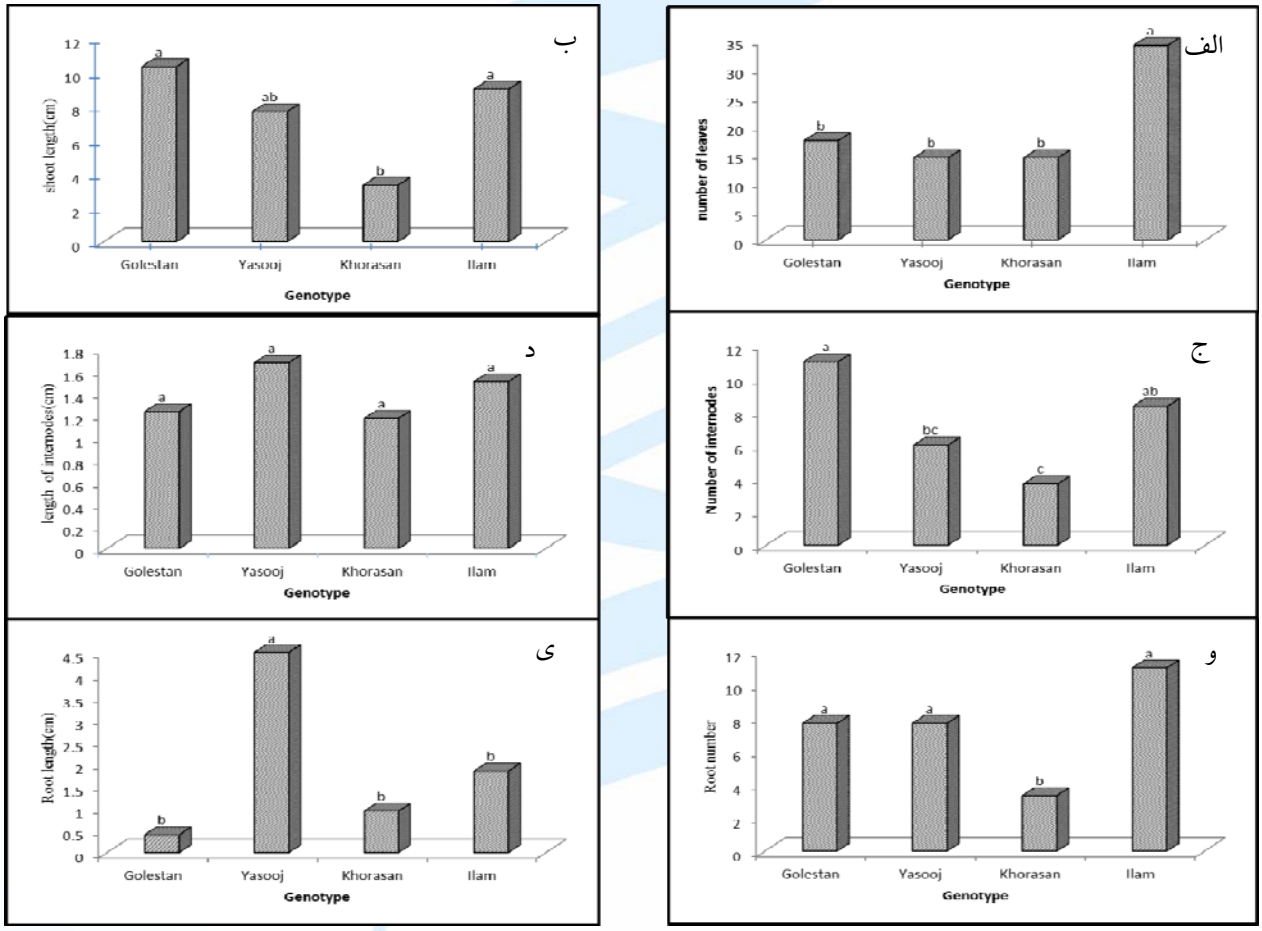
تکثیر: جوانه های جانبی رشد یافته حاصل از استقرار، به محیط کشت پایه ی MS حاوی ترکیبی از تنظیم کننده های رشد BAP (1.5 mg/l) و Kin (0.5 mg/l) انتقال یافتند.در طی سه مرحله به فاصله ی زمان ۴۰ روز واکشت شدند. شرایط نگهداری نمونه ها همانند مرحله قبل بود. در پایان دوره ی ۹۰ روزه، نمونه برداری و بررسی صفات مورفولوژیکی از جمله طول ساقه(cm)،تعداد برگ، طول میانگره، تعداد میانگره، طول ریشه و تعداد ریشه مورد ارزیابی قرار گرفت.

طرح آزمایشی و تجزیه آماری داده ها

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح آماری کاملا تصادفی در سه تکرار انجام پذیرفت. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SAS ۹/۱ و ترسیم نمودارها با نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث:

با توجه به نتایج جدول تجزیه واریانس داده های اندازه گیری شده از گیاهچه های درون شیشه ای در ارقام تحت بررسی، تمامی صفات در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار بودند (نمودار ۱).



نمودار ۱. مقایسه میانگین پارامترهای مرفولوژیکی مختلف بین گیاهچه های درون شیشه ایی چهار ژنوتیپ شیرین بیان. الف: تعداد برگ ها، ب: طول ساقه، ج: تعداد میانگره، د: طول میانگره، و: تعداد ریشه، ی: طول ریشه. (مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن ($P\leq0.05$). میانگین های دارای حروف مشترک اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ ندارند)

نتایج مقایسه میانگین داده ها نشان می دهد که در صفت طول ساقه، نمونه گلستان۴ با میانگین ۱۰/۳۳ سانتی متر، بیشترین میزان رشد را نسبت به سایر ارقام داشته و ژنوتیپ خراسان۸ با میانگین ۳/۳۳ کمترین میزان این صفت را نشان می دهد. در صفت تعداد برگ ایلام۱۷ با میانگین ۳۴ عدد برگ، بیشترین و خراسان۸ با میانگین ۱۴/۳۳ کمترین تعداد برگ را در شرایط درون شیشه ایی تولید کرده اند. در شاخص طول میانگره یاسوج ۱ با میانگین۱/۶۷ سانتی متر بیشترین و خراسان۸ با میانگین۱/۱۷ کمنرین مقدار را داشتند.با بررسی مقایسه میانگین در صفت تعداد میانگره نیز نمونه گلستان۴ با میانگین ۱۱ بیشترین تعداد و خراسان۸ با میانگین۳/۶۷ کمترین تعداد میانگره را درمیان دیگر ژنوتیپ ها تولید کرده اند. بین ژنوتیپ ای مورد برسی از نظر صفات مربوط به ریشه زایی نیز تفاوت معنی داری ($p \leq 0.05\%$) وجود داشت. یاسوج۱با میانگین ۴/۵ سانتی متر بیشترین و گلستان۴ با میانگین۴/. سانتی متر کمترین طول ریشه را داشتند. در شاخص تعداد ریشه نیز ایلام۱۷ با میانگین ۱۱عدد بهترین ژنوتیپ بود (نمودار۱). تحقیق حاضر که با هدف بررسی تاثیر ژنوتیپ بر خصوصیات مورفولوژیکی گیاهچه های درون شیشه ای در چهار ژنوتیپ شیرین بیان انجام شده است، تاییدکننده ی این مطلب است که در شرایط رویشی یکسان، نوع ژنوتیپ می تواند بسیاری ازصفات گیاه را تحت تاثیر قرار دهد. به طور کلی می توان گفت ژنوتیپ های مختلف با سنتز سطوح مختلف مواد رشد داخلی نقش مهمی را ایفا نموده و توازن مابین این مواد، الگوی رشد را تعیین می کند و در نتیجه پاسخ های مختلفی نسبت به شرایط محیط کشت حاصل می شود(۸).

منابع:

1. **Arya. A, Rathi. N, Arya I. D. (2009)**. "Micropropagation Protocol for Glycyrrhiza glabra L. Phytomorphology". 59(1&2):71-76
2. **Christopher. T, Rajam. M. V. (1995).** "Effect of genotype, explant and medium on in vitro regeneration of red Pepper". Plant Cell, Tissue and Organ Culture 46: 2452.50
3. **Doctrinal. M, Sangwan. R. J, Brigtte. S. (1987).** "In vitro gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: Effects of plant growth regulators, temperature, genotypes and season". Plant Cell, Tissue and Organ Culture.17:1-12
4. **Hayashi. H. Sudo. H., (2009).** "Economic importance of licorice". Plant Biotechnology 26:101-104
5. **Kamali. H (2015).** "Licorice outlines the opportunities and challenges facing the country". The fourth national congress on medicinal plants Country
6. **Kashfi Bonab. A (2010).** "Economic comparative advantage the cultivation and trade of medicinal plants in Iran and its value on world markets". Monthly Notices of the Iran Chamber.44:20-28
7. **Oyunbileg. Y, Khorolrragchaa. A, Bayarlkhagva. D (2005).** "Tissue culture and Micropropagation of Mongolian licorice". Mongolian Journal of Biological Sciences.3 (1):21-24
8. **Talebi, M. Farahani, F. Taheri, B. (2016).** "The effect of genotype on some morphological and biochemical traits of culture plantlets in vitro in the early and late potato cultivars under greenhouse conditions". International conference on modern Research Results in sciences, Engineering and Technology: 1-12.
9. **Thengane. S. R, Kulkarni. D. K, Krishnamurthy.K.V (1998).** "Propagation of licorice (*Glycyrrhiza Glabra L.*) Through Shoot Tip and Nodal cultures". Society for In Vitro Biology.34:331-334