مقاله پژوهشی

Research Article

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۹، شماره ۲، صفحه ۲۸۴-۲۶۵ (۱۴۰۲)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2023.360403.3245
شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350905.1402.39.2.9.6

اثر محرک‌های اکسینی بر مورفولوژی ریشه و بیوسنتز گلیسیریزین در اکوتیپ‌های شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.)

علی‌اکبر علیزاده ایوری[۱]، مهدیه پارسائیان[۲*] و زیبا قسیمی حق[۳]

۱- کارشناس ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

پست الکترونیک: mahparsa.cb@shahroodut.ac.ir

۳- استادیار، گروه باغبانی و گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۱ تاریخ اصلاح نهایی: دی ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۴۰۱

چکیده

شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) یکی از گیاهان دارویی ارزشمند جهان است که گلیسیریزین، مهم‌ترین متابولیت تری‌ترپنوئیدی موجود در ریشه آن، در صنایع غذایی و داروسازی نوین کاربردهای فراوانی دارد. برای غلبه بر مشکلات جوانه‌زنی بذرها، خطر انقراض گیاه ناشی از برداشت بی‌رویه ریشه و سرعت کند بیوسنتز طبیعی متابولیت‌های ثانویه، توجه به کشت بافت ریشه این گیاه و کاربرد محرک‌ها جهت افزایش بیوسنتز گلیسیریزین آن، ضروری است. در پژوهش حاضر، نرخ جوانه‌زنی بذرهای دو اکوتیپ شیرین‌بیان ایرانی (کاشمر و جغتای) و یک اکوتیپ عراقی در سطوح مختلف پیش‌تیمار اسیدسولفوریک ارزیابی شد. همچنین، تفاوت‌های مورفولوژیک و محتوای گلیسیریزین ریشه اکوتیپ‌ها در پاسخ به محرک‌های اکسینی IAA و NAA با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر، در محیط پایه MS ½ با استفاده از ریزنمونه ریشه بررسی گردید. نتایج نشان داد که حداکثر جوانه‌زنی بذرهای هر سه اکوتیپ، در پیش‌تیمار اسیدسولفوریک ۹۸ درصد به‌مدت ۴۰ دقیقه حاصل گردید. اکوتیپ عراقی در شرایط شاهد و برخی سطوح هورمونی (به‌ویژه NAA) از نظر کلیه صفات به‌جز محتوای گلیسیریزین در گروه برتر آماری قرار داشت. در اکوتیپ‌های ایرانی، کاربرد محرک‌های اکسینی صفات ریشه و محتوای گلیسیریزین را به‌طور معنی‌دار بهبود بخشید. اکوتیپ کاشمر با دریافت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA قطورترین ریشه‌ها و در سطوح متوسط و بالای NAA و IAA ریشه‌هایی با وزن خشک بالا (به‌ترتیب ۵/۸ و ۵/۴ میلی‌گرم) تولید نمود. اکوتیپ جغتای نیز با کاربرد ۱/۵ و ۰/۵ میلی‌گرم IAA و NAA ریشه‌هایی وزین (به‌ترتیب ۱۰۰ و ۷۹ میلی‌گرم) تولید نمود. در مجموع، کاربرد سطوح متوسط و بالای هر یک از هورمون‌های IAA و NAA (۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر)، بالاترین بازدهی تولید گلیسیریزین (به‌ترتیب ۸/۸۲ و۷/۸۳ میکروگرم در گرم ماده خشک) در ریشه اکوتیپ کاشمر را در پی داشت. بنابراین، گزینش اکوتیپ مناسب و کاربرد محرک‌های اکسینی می‌تواند تولید درون شیشه‌ای ریشه و محتوی گلیسیریزین را در گیاه شیرین بیان افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: تنظیم‌کننده‌های رشد، شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.)، کشت ریشه، متابولیت ثانویه.

Copyright: © 2023 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijmapr.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

مقدمه

کشور ایران با تنوع اقلیمی بسیار گسترده، رویشگاه گونه‌های بی‌شمار گیاهیست که تعداد زیادی از این گونه‌ها و ذخایر ژنتیکی ارزشمند به لحاظ دارویی در گروه پرارزش‌ترین و منحصر به‌فردترین گونه‌های جهان هستند. تولید یک چهارم داروها بر پایه عصاره‌ها یا ترکیب‌های استخراج شده از مواد گیاهی و یا مدل‌سازی از آنها، بیانگر تقاضای رو به رشد کاربرد داروهایی با منشأ طبیعی برای پیشگیری و درمان بیماری‌هاست (Tripathi & Tripathi, 2003) شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) یکی از مهمترین و قدیمی‌ترین گیاهان دارویی جهان با قدمت کاربردی دو هزار ساله است که در داروسازی نوین نیز موارد مصرف فراوانی برای آن ذکر شده است (Hayashi & Sudo, 2009؛ Russo *et al*., 2014).

شیرین‌بیان گیاهی علفی و پایا از خانواده Leguminosae است و در دسته گیاهان دولپه‌ای جدا گلبرگ قرار دارد (Shaheen *et al*., 2020). این گیاه بومی آسیا و منطقه مدیترانه است و تاکنون ۳۰ گونه مختلف از جنس *Glycyrrhiza* در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری کشورهای مختلف رشد می‌کند که در میان آنها دو گونه *G. uralensis* و *G. glabra* از لحاظ تغذیه‌ای و دارویی اهمیت فراوانی دارند (Isbruckerd & Burdock, 2006). گستره رشد شیرین‌بیان از جنوب اروپا و منطقه مدیترانه تا غرب چین گزارش شده است (Shaheen *et al*., 2020). بااین‌حال، در کشورهای انگلستان، اسپانیا، آلمان، چین و هند (منطقه پنجاب) به‌صورت تجاری با متوسط عملکرد ۲ تن ریشه خشک در هکتار کشت می‌شود (Vispute & Khopade, 2011). در ایران نیز این گیاه به‌صورت خودرو در دیم‌زارهای استان‌های کرمانشاه، ایلام، فارس و در برخی مزارع نخود و گندم استان‌های اصفهان و اراک وجود دارد (Ghahraman, 1999).

ریشه‌های شیرین بیان به مقدار زیاد در صنعت داروسازی استفاده می‌شوند و حاوی متابولیت‌هایی هستند که پیش‌بینی می‌شود ارزش اقتصادی آنها از ۱/۷ میلیارد دلار در سال ۲۰۱۶ به ۲/۳ میلیارد دلار در سال ۲۰۲۵ برسد (Srivastava *et al*., 2019). بااین‌حال، برداشت بی‌رویه ریشه با از بین بردن کل بوته، شیرین بیان را در گروه گیاهان در خطر انقراض قرار داده است (Sharma & Thokchom, 2014). ازجمله مهمترین موادی که از ریشه این گیاه استخراج می‌شود، ساپونینی تری ترپنوئیدی از نوع اولئانان به نام گلیسیریزین است، علاوه بر اینکه به‌عنوان یک طعم‌دهنده و شیرین کننده در داروها و صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد، خواص ضد سرطانی، ضد التهابی و ملینی آن نیز توجه محققان را به خود جلب کرده است (Srivastava *et al*., 2019). گلیسیریزین با توانایی مهار باکتری *H. Pillory* در درمان ورم، مشکلات مخاطی و زخم‌های معده و دوازدهه و کاهش اسید معده مؤثر است (Celik & Nizami, 2019). آثار استفاده از عصاره شیرین‌بیان بر ممانعت از تکثیر ویروس HIV و درمان سندرم حاد تنفسی ناشی از ویروس سارس (SARS) تأیید شده است (Cintal *et al*., 2003). امروزه نیز عصاره شیرین بیان یکی از اجزای ترکیبی شربت سرفه به‌شمار می‌رود، همچنین به‌عنوان داروی مسکن در التهاب‌های پوستی و برای درمان برخی بیماری‌های کبدی (هپاتیت c)، آلرژیک و روماتیسم کاربرد دارد (Hayashi & Sudo, 2009). با توجه به ارزش دارویی گلیسیریزین به‌نظر می‌رسد بهره‌گیری از کشت بافت راهکار مناسبی برای حصول مقادیر بیشتر این ماده از ریشه شیرین بیان باشد. ضمن اینکه سرعت تولید متابولیت‌های ثانویه در طبیعت کُند بوده و استفاده از روش‌های کشت بافت این موقعیت را فراهم می‌کند که تولید در شرایط کنترل شده و در زمان کوتاه‌تری انجام شود (Ravishankar & Ramachandra, 2000). بااین‌حال، در برخی از روش‌ها مانند کشت سوسپانسیون سلولی مقدار تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه به دلیل عدم تمایز بافت کم است. بافت ریشه یکی از بافت‌های تمایزیافته است که بهینه‌سازی تولید درون شیشه‌ای آن برای استحصال متابولیت‌ها مورد توجه است و نیاز به اعمال تیمارهای هورمونی دارد (Khanam *et al*.,

2022). القای ریشه و کشت آنها برای استحصال متابولیت‌های ثانویه در گیاهانی مانند *Artemisia vulgaris*، *Astragalus membranaceus*، *Echinacea purpurea*، *Hypericum perforatum* و *Glycyrrhiza uralensis* با استفاده از ریزنمونه ریشه و تیمارهای اکسینی مورد مطالعه قرار گرفته است (Sujatha & Ranjitha Kumari, 2012؛ Jeong *et al.*, 2009؛ Wu *et al*, 2014؛ Jing *et al.*, 2016؛ Wu *et al.*, 2011). در این مطالعات از هورمون‌های NAA، IBA و IAA به‌عنوان پرکاربردترین اکسین‌ها در کشت بافت استفاده شده است، زیرا این هورمون‌ها در غلظت کم سبب القای ریشه‌های نابجا می‌شوند. علاوه بر تیمارهای هورمونی، نوع محیط کشت و اضافه کردن برخی تیمارها به سیستم‌های کشت درون شیشه‌ای در غلظت‌های کم، باتوجه به نوع گیاه، بیوسنتز متابولیت‌های خاصی را تحریک کرده یا بهبود می‌بخشد (Hu & Du, 2006؛ Namdeo, 2007). مطالعات اندکی در جنس *Glycyrrhiza* در راستای تولید و تکثیر ریشه‌های درون شیشه ای انجام شده است. استفاده از ریزنمونه ریشه در گونه *G. uralensis* نشان داد که این راهکار در تولید چند متابولیت ثانویه با ارزش در این گونه در شرایط درون شیشه‌ای موفق بوده است (Jing *et al.*, 2016). Ayabe و همکاران (۱۹۹۰) نیز در تعیین مناسب‌ترین محیط ایجاد کالوس برای تولید تری‌ترپنوئیدها در گیاه شیرین بیان (واریته glandulifera) محیط پایه MS را به‌همراه تنظیم کننده‌های رشدی IAA (با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر)، Kinetin (با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) و 2,4-D (با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر) به‌عنوان مطلوب‌ترین محیط کشت معرفی کردند. در حالی که Mousa و همکاران (۲۰۰۷) در پژوهشی مشابه، کاربرد هورمون 2,4-D (با غلظت ۱ میلی گرم بر لیتر) را در محیط کشت B5 مناسب‌ترین شرایط رشد کالوس در گیاه شیرین بیان معرفی نمودند. Wongwicha و همکاران (۲۰۰۸) غلظت‌های مختلف دو هورمون NAA و BA را در محیط کشت MS بر رشد کالوس در گیاه شیرین بیان بررسی و گزارش کردند که تنظیم کننده‌های رشدی عامل مهمی در تولید متابولیت‌های ثانویه در این گیاه هستند.

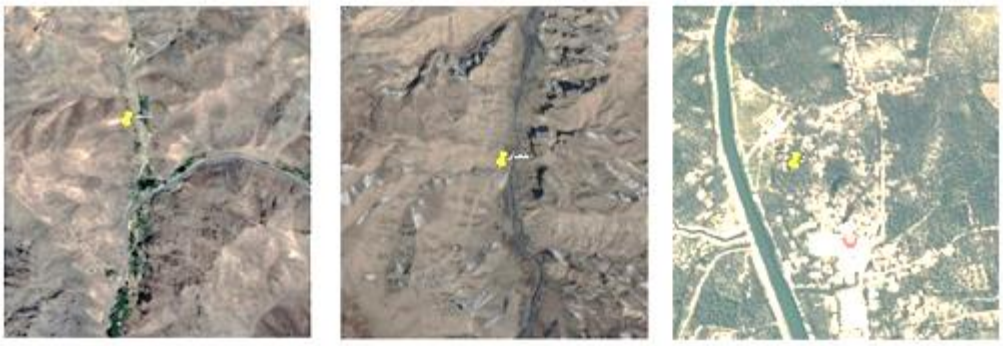
خواص دارویی و ارزش اقتصادی گلیسیریزین از یک سو و برداشت بی‌رویه این گیاه و مشکلات تکثیر کلاسیک آن ازجمله مشکل جوانه‌زنی بذرها و رشد کُند گیاهچه از سوی دیگر، لزوم توجه به کشت درون شیشه‌ای این گیاه را مورد تأکید قرار می‌دهد. به‌طوری که بیشترین میزان تولید ریشه در شرایط آزمایشگاهی در کمترین زمان ممکن انجام شود و گزینش مناسب‌ترین تیمارها در محیط کشت، افزایش این ماده مؤثره را به‌دنبال داشته باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه بذر اکوتیپ‌های شیرین‌بیان و تولید گیاهان استریل درون شیشه‌ای

ماده گیاهی مورد استفاده در این پژوهش از جمع‌آوری و کشت بذرهای شیرین‌بیان دو منطقه در ایران و یک منطقه در کشور عراق تهیه شد. این مناطق در ایران شامل کاشمر (با مختصات جغرافیایی ۳۵ درجه، ۲۴ دقیقه و ۳۰ ثانیه شمالی و ۵۸ درجه، ۲۷ دقیقه و ۵۹ ثانیه شرقی) واقع در جنوب غربی استان خراسان رضوی و جغتای (با مختصات جغرافیایی ۳۶ درجه، ۳۳ دقیقه و ۲۱ ثانیه شمالی و ۵۷ درجه، ۴ دقیقه و ۹ ثانیه شرقی) واقع در غرب استان خراسان رضوی و در کشور عراق منطقه مسیّب (با مختصات جغرافیایی ۳۲ درجه، ۴۷ دقیقه و ۷ ثانیه شمالی و ۴۴ درجه، ۱۸ دقیقه و ۳۴ ثانیه شرقی) واقع در استان نینوا بود (شکل ۱).

ضدعفونی بذرهای شیرین‌بیان طبق روش Bais و همکاران (۲۰۰۰) در زیر هود ایرفلولامینار انجام شد. پس از شستشوی بذرها با آب مقطر استریل (به مدت ۲ دقیقه)، این بذرها به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰٪ (حجمی/حجمی) غوطه‌ور گردیدند. سپس با آب مقطر استریل آبشویی انجام گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت ۵٪ (حجمی/حجمی) قرار داده شدند. در نهایت، بذرها سه بار با آب مقطر استریل (هر بار یک دقیقه) شسته شدند.



شکل ۱- محل جمع‌آوری بذرهای گیاه شیرین‌بیان؛ A: کاشمر، B: جغتای و C: عراق

Figure 1. *Glycyrrhiza glabra* seeds collection sites; A: Kashmar, B: Joghtai, and C: Iraq

رفع خواب فیزیکی بذرهای شیرین‌بیان

به‌منظور رفع خواب فیزیکی ناشی از پوسته سخت بذرهای شیرین‌بیان، پیش از استریل شدن، بذرها در محلول‌های اسید سولفوریک (شرکت مرک، آلمان) با غلظت‌های صفر (شاهد، آب مقطر استریل)، ۷۰٪ و ۹۸٪ به‌مدت ۴۰ دقیقه غوطه‌ور شدند. پس از اعمال تیمارها، بذرها با آب مقطر شسته شده و در زیر هود ایرفلولامینار طبق روش ارائه شده در این پژوهش استریل گردیدند.

بررسی جوانه‌زنی بذر اکوتیپ‌های شیرین‌بیان

بذرهای شیرین‌بیان استریل و تیمار شده (با اسید سولفوریک) در دو محیط کشت MS جامد و نیمه جامد، درون پتری‌دیش با سه تکرار و در هر تکرار به میزان ۳۰ عدد کشت گردیدند. پتری‌دیش‌ها به اتاق رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال داده شدند. سپس تعداد بذرهای جوانه زده و ایجاد آلودگی یا عدم آلودگی محیط کشت به صورت روزانه ارزیابی و ثبت گردید و در نهایت حداکثر جوانه‌زنی (GMX) بذرهای شیرین‌بیان طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$GMax = \frac{\text{تعداد کل بذرهای جوانه زده (در آخرین روز شمارش)}}{\text{تعداد بذرها}} \times 100$$

تیمارهای هورمونی (NAA و IAA)

به‌منظور بررسی تأثیر پالسی هورمون‌های اکسینی NAA و IAA، قطعاتی به اندازه ۱۰ میلی‌متر از محور ریشه جدا شدند و در محیط‌های کشت MS نیمه جامد حاوی سطوح مصرف (با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و عدم مصرف (سطح صفر) هر یک از هورمون‌های NAA و IAA کشت گردیدند. دو هفته بعد، قطعات ریشه به محیط بدون هورمون انتقال و پس از گذشت سه هفته اندازه‌گیری صفات انجام شد.

اندازه‌گیری صفات

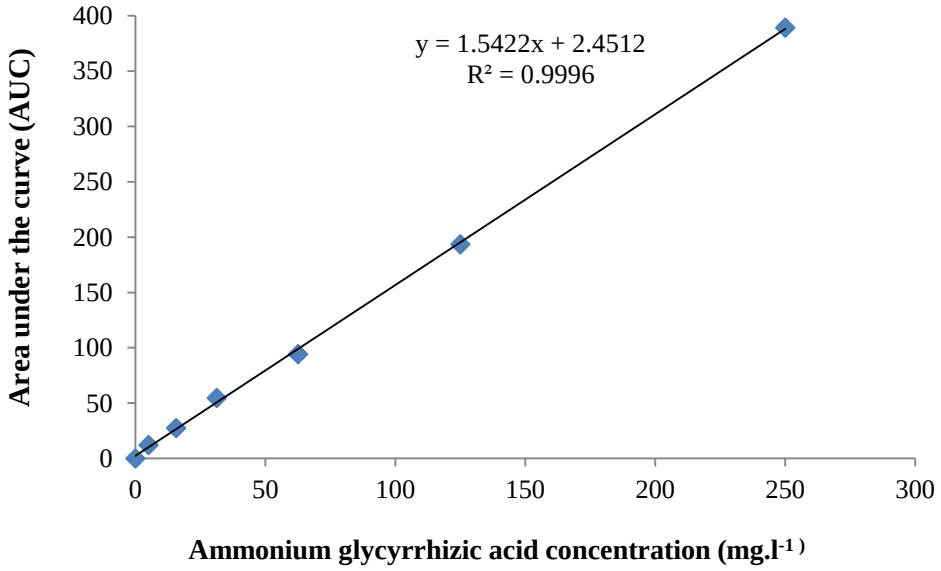
در این پژوهش صفاتی مانند تعداد ریشه جانبی، طول و قطر

ریشه (توسط کولیس)، وزن تر و خشک ریشه (با ترازوی با دقت ده هزارم) و محتوای گلیسیریزین ریشه‌ها با دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری محتوای گلیسیریزین

ابتدا ریشه‌ها توسط دستگاه فریز درایر (مدل Alpha 1-2 LD PLUS آلمان) خشک شده و تا زمان عصاره‌گیری در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس عصاره‌گیری از ریشه‌ها طبق روش Shabani و همکاران (۲۰۰۹) با مراحل زیر انجام شد.

۱۰۰ میلی‌گرم از ریشه‌های پودر شده به تیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل گردید و ۱ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ (v/v) شرکت مرک آلمان به آنها افزوده شد. تیوپ‌ها به مدت ۶ ساعت در حمام آب گرم و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ گردیدند. مایع رویی با سر سمپلر استریل به یک شیشه جدید منتقل شد. به‌منظور تغلیظ عصاره بدست آمده، از گاز ازت استفاده گردید و رسوب‌های باقی‌مانده تا زمان اندازه‌گیری با دستگاه HPLC در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای سنجش میزان گلیسیریزین نمونه‌ها از دستگاه HPLC موجود در گروه صنایع غذایی دانشگاه صنعتی شاهرود، با مدل VP10A ژاپن دارای آشکارساز UV (40D) استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا استاندارد گلیسیریزین (در قالب نمک آمونیوم اسید گلیسیریزیک) از شرکت فلوکا (سوئیس) خریداری شد و پس از حل شدن مقادیر مختلف (۵ تا ۲۵۰ میلی‌گرم) در محلول فاز متحرک HPLC (شامل اسید استیک: آب: متانول به‌ترتیب به نسبت ۶: ۳۴ :۶۰) به دستگاه تزریق گردید. هر یک از نمونه‌ها نیز در ۱ میلی‌لیتر فاز متحرک حل شده و با حجم ۲۰ میکرولیتر و سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه در ستون RPC_{18} (150 × 3.9 mm) با اندازه منافذ ۵ میکرومتر تزریق شدند. پیک مربوط به گلیسیریزین تقریباً در دقیقه ۱۳ و طول موج ۲۵۴ نانومتر ظاهر شد. در نهایت با مقایسه سطح زیر پیک بدست آمده از تزریق هر نمونه با مقادیر ثبت شده در منحنی کالیبراسیون (شکل ۲)، مقادیر این متابولیت در عصاره‌ها تعیین گردید (Hurst *et al.*, 1983).



شکل ۲- منحنی کالیبراسیون گلیسیریزین با استفاده از محلول‌های استاندارد نمک آمونیوم گلیسریزیک اسید

تجزیه آماری

در قسمت جوانه‌زنی، آزمایش به‌صورت فاکتوریل سه فاکتوره در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۳ تکرار اجرا گردید. فاکتورها شامل اکوتیپ (کاشمر، جغتای و عراقی)، پیش‌تیمار (عدم مصرف (آب مقطر) و مصرف غلظت‌های ۷۰٪ و ۹۸٪ از اسید سولفوریک) و نوع محیط کشت (MS جامد و نیمه جامد) بودند. تجزیه آماری با نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۲) و مقایسات میانگین به روش LSD در سطح معنی‌دار ۵٪ انجام شد.

در بخش دوم پژوهش برای ارزیابی تیمارهای هورمونی و سنجش محتوای گلیسیریزین، آزمایشی در قالب فاکتوریل دو فاکتوره با طرح پایه کاملاً تصادفی و احتساب ۳ تکرار اجرا شد. در این آزمایش، فاکتور اول اکوتیپ (با ۳ سطح) و فاکتور دوم سطوح مختلف عدم مصرف و مصرف هورمون‌های اکسینی (در مجموع ۷ سطح) بودند. تجزیه آماری با نرم افزار SAS (نسخه ۹/۲) و مقایسات میانگین به روش LSD در سطح معنی‌دار ۵٪ انجام شد.

نتایج

آزمایش اول: بررسی اثر پیش‌تیمار و نوع محیط کشت بر جوانه‌زنی بذرهای اکوتیپ‌های مختلف شیرین‌بیان

نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌های درصد جوانه‌زنی نشان داد که این صفت از آثار ساده اکوتیپ و پیش‌تیمار بذرها و اثر متقابل این دو عامل به‌طور معنی‌داری تأثیر پذیرفت (جدول ۱).

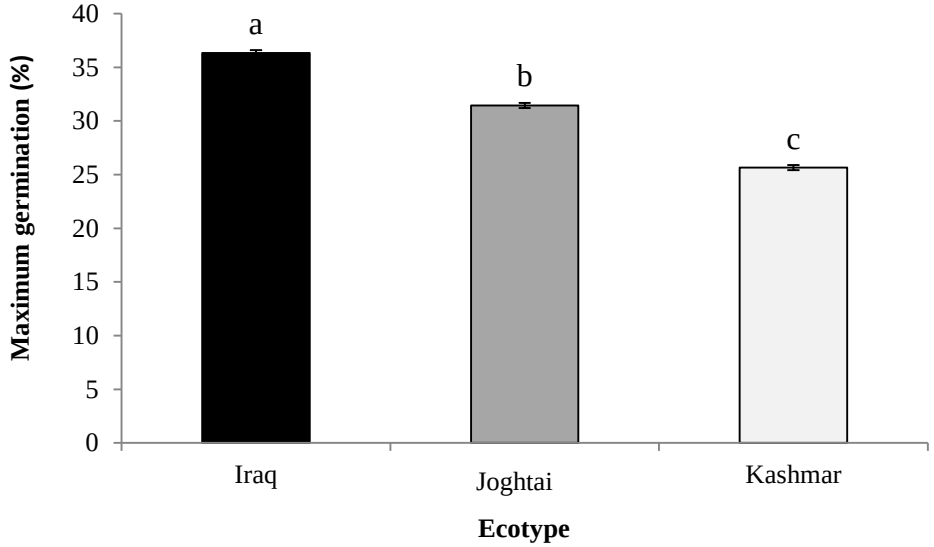
جدول ۱- تجزیه واریانس جوانه‌زنی بذرهای اکوتیپ‌های مختلف شیرین‌بیان تحت سطوح مختلف پیش‌تیمار و محیط کشت

Table 1. ANOVA of different *Glycyrrhiza glabra* ecotypes seed germination under different levels of pretreatment and culture medium

Source of variation	DF	Maximum Germination
Ecotype	2	513.18**
Pretreatment	2	2841.68**
Culture medium	1	2.62 ns
Pretreatment × Ecotype	4	192.43**
Culture medium × Ecotype	2	0.51 ns
Culture medium × Pretreatment	2	1.68 ns
Culture medium × Pretreatment × Ecotype	2	0.82 ns
Experimental error	36	0.88
C.V. (%)		3.02

n.s. and **: non-significant and significant at 1% probability level, respectively

متوسط درصد جوانه‌زنی در اکوتیپ‌های تحت بررسی ۳۱/۴۴٪ بود. بیشترین و کمترین درصد جوانه‌زنی به‌ترتیب به اکوتیپ‌های عراقی با میانگین ۳۶/۳۳٪ و اکوتیپ کاشمر با متوسط ۲۵/۶۶٪ تعلق داشت (شکل ۳).

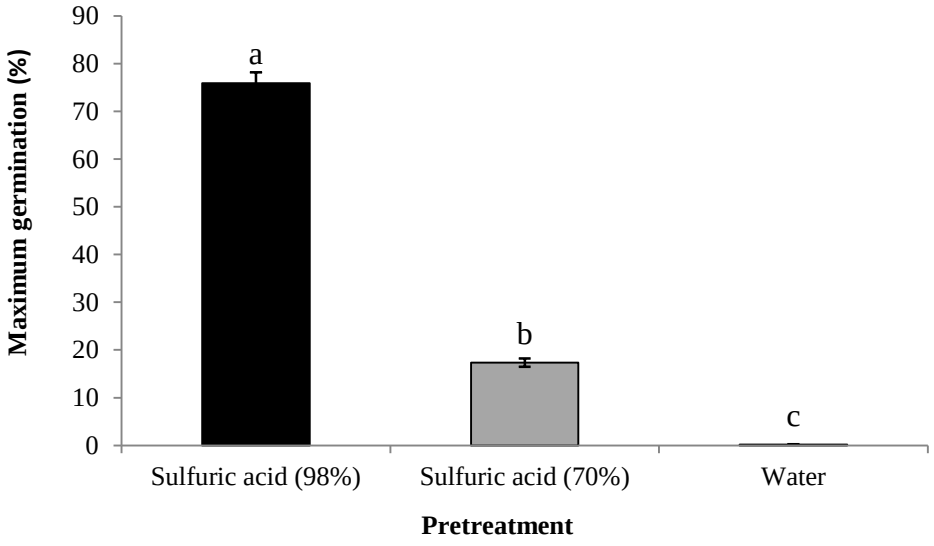


شکل ۳- مقایسه میانگین حداکثر جوانه‌زنی بذرهای اکوتیپ‌های مختلف شیرین‌بیان

Figure 3. Means comparison of maximum seed germination in different *Glycyrrhiza glabra* ecotypes

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

در بین پیش‌تیمارهای اعمال شده برای جوانه‌زنی بذرهای اکوتیپ‌های مختلف، پیش‌تیمار اسید سولفوریک ۹۸٪ با متوسط جوانه‌زنی ۷۵/۹۴٪ و پیش‌تیمار بذرهای با آب مقطر با متوسط جوانه‌زنی ۰/۱۶٪ به‌ترتیب بیشترین و کمترین تأثیرگذاری را در جوانه‌زنی بذرهای شیرین‌بیان نشان دادند (شکل ۴).

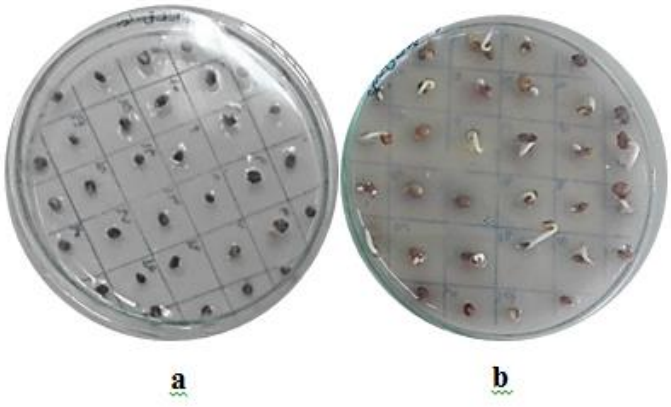


شکل ۴- مقایسه میانگین حداکثر جوانه‌زنی بذرهای شیرین‌بیان تحت غلظت‌های مختلف اسیدسولفوریک و آب مقطر

Figure 4. Means comparison of maximum seed germination in different *Glycyrrhiza glabra* ecotypes under different sulfuric acid concentrations and distilled water

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

براساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل دو جانبه اکوتیپ و پیش‌تیمار، اگرچه الگوی هم‌روندی به لحاظ درصد جوانه‌زنی بذرهای اکوتیپ‌های مورد بررسی در اثر اعمال پیش‌تیمارهای مختلف مشاهده شد، با این حال مقادیر حداکثر جوانه‌زنی ثبت شده برای این اکوتیپ‌ها، به‌ویژه با کاربرد سطوح مختلف پیش‌تیمار اسید سولفوریک تفاوت‌های معنی‌داری را نشان داد (شکل‌های ۴ و ۵). در این راستا در شرایط استفاده از پیش‌تیمار آب مقطر، اکوتیپ عراقی با تنها ۲٪ جوانه‌زنی از بالاترین رکورد این صفت برخوردار بود که البته این میزان، با جوانه‌زنی ثبت شده برای سایر اکوتیپ‌ها در شرایط مذکور تفاوت معنی‌داری نداشت. با کاربرد پیش‌تیمار اسید سولفوریک، درصد جوانه‌زنی‌های ثبت شده در کلیه اکوتیپ‌ها ارتقاء یافت، به‌طوری که در بالاترین سطح مصرف این پیش‌تیمار، متوسط درصد جوانه‌زنی بذرها به ۷۴/۵۸٪ رسید که در دامنه‌ای بین ۶۴/۱۶٪ تا ۸۷٪ قرار داشت. در این شرایط، کمترین میزان جوانه‌زنی به اکوتیپ ایرانی جمع آوری شده از کاشمر (۶۴/۱۶٪) و بیشترین میزان آن (۸۷٪) به اکوتیپ عراقی تعلق داشت (شکل ۶).



شکل ۵- درصد جوانه‌زنی بذرهای گیاه شیرین بیان (اکوتیپ عراقی) در شرایط عدم پیش‌تیمار (**a**) و پیش‌تیمار با اسیدسولفوریک ۹۸٪ (**b**)

Figure 5. Seed germination percentage of *Glycyrrhiza glabra* (Iraqi ecotype) under no pretreatment (a) and 98% sulfuric acid pretreatment (b)

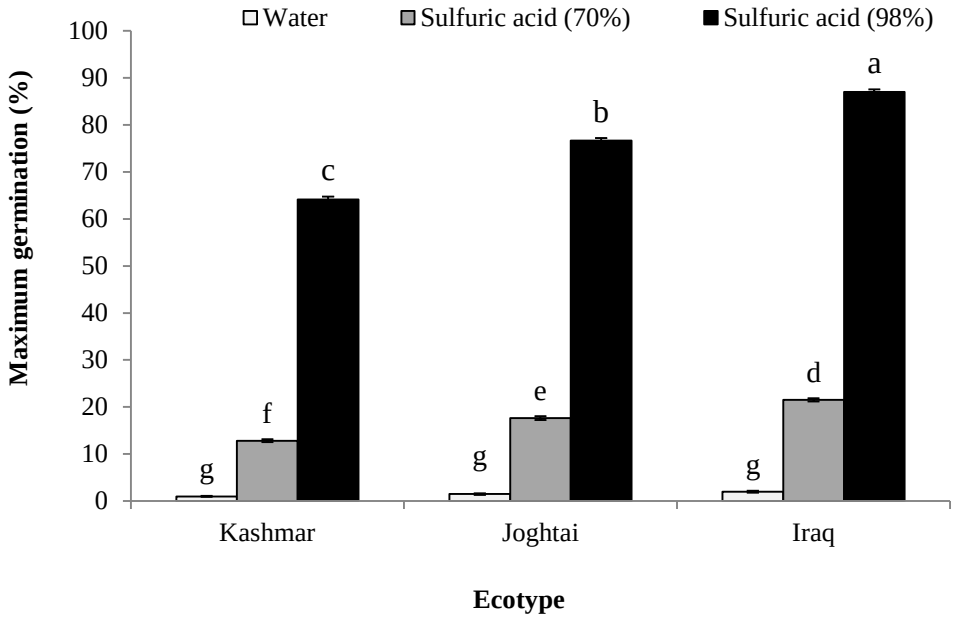
آزمایش دوم: بهینه‌سازی رشد ریشه تحت تیمارهای هورمونی NAA و IAA در اکوتیپ‌های مختلف گیاه شیرین‌بیان

تعداد ریشه جانبی

نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که تعداد ریشه‌های تولید شده در این پژوهش به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر برهم‌کنش دو تیمار اکوتیپ و هورمون قرار گرفت.

به این ترتیب، مقایسه میانگین آثار متقابل تیمارها بر این صفت بیانگر روند متفاوت تولید ریشه‌های جانبی در اکوتیپ‌ها در پاسخ به تیمارهای هورمونی بود (شکل ۷). بر این اساس با اعمال هورمون IAA با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر، اکوتیپ جغتای منشعب‌ترین ریشه‌ها را (با تعداد ریشه جانبی ۸/۶۶ عدد) تولید کرد. در حالی که تعداد ریشه‌های جانبی تولید شده در همین اکوتیپ با تغییر نوع هورمون از IAA به NAA، تا حدودی نسبت به شاهد اُفت داشت. اگرچه به نظر می‌رسد اعمال تیمارهای هورمونی نسبت به شرایط عدم مصرف این تیمارها به افزایش تولید ریشه‌های جانبی در اکوتیپ کاشمر منجر شد، با این حال نتایج حاصل نشان داد

که این اکوتیپ در شرایط کاربرد هورمون IAA از متوسط تعداد ریشه جانبی کمتری نسبت به سایر اکوتیپ‌ها برخوردار بود. در شرایط عدم مصرف هورمون (تیمار شاهد) نیز اکوتیپ کاشمر دارای ریشه‌های جانبی کمتر و معنی‌داری نسبت به اکوتیپ عراقی بود (شکل ۷).



شکل ۶- مقایسه میانگین اثر متقابل اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان و پیش‌تیمار غلظت‌های مختلف اسیدسولفوریک و آب مقطر روی درصد جوانه‌زنی بذرها

Figure 6. Means comparison of different *Glycyrrhiza glabra* ecotypes × different sulfuric acid concentrations and distilled water pretreatments effects on seed germination percentage

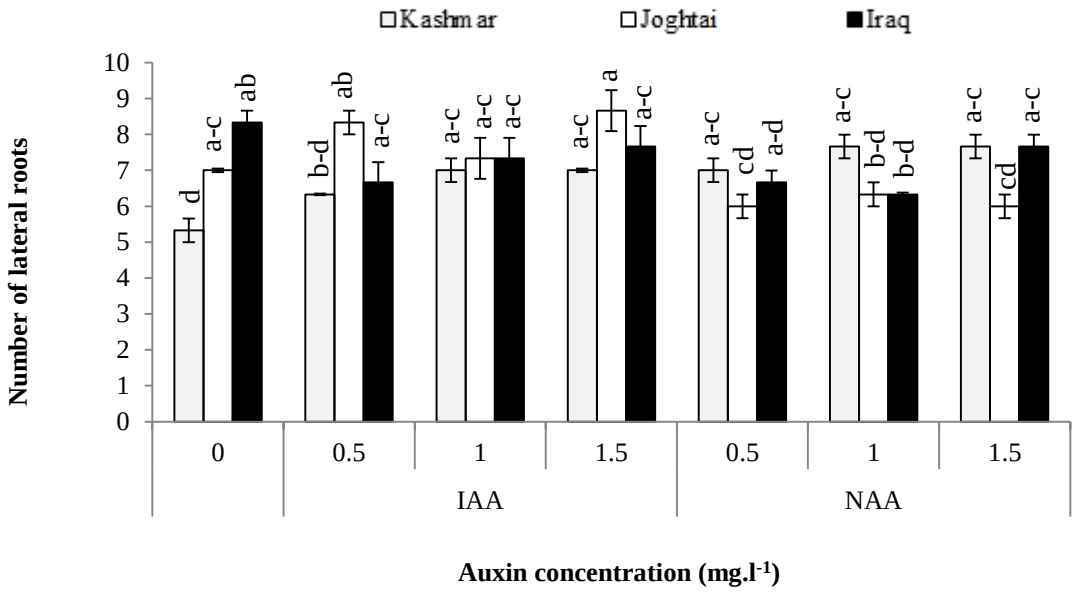
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک و میزان گلیسیریزین ریشه اکوتیپ‌های مختلف شیرین‌بیان رشدیافته در محیط کشت MS ½ حاوی تیمارهای هورمونی NAA و IAA

Table 2. ANOVA of morphological traits and root glycyrrhizin content in different *Glycyrrhiza glabra* ecotypes grown in ½ MS culture medium containing NAA and IAA hormone treatments

Source of variation	d.f.	Number of lateral roots	Root length	Root diameter	Root fresh weight	Root dry weight	Glycyrrhizin content
Ecotype	2	0.77 ns	9.28 ns	0.04 ns	1057.96 ns	0.04 ns	0.40**
Hormone	6	1.36 ns	10.51**	0.17 ns	901.83 ns	6.13**	0.16**
Ecotype × Hormone	12	2.83*	11.54**	0.21*	2053.61**	7.22**	0.07**
Experimental error	42	1.33	2.92	0.095	550.44	1.18	0.015
C.V. (%)		16.34	25.36	26.01	22.45	5.23	12.29

n.s., *, and **: non-significant, significant at 5, and 1% probability levels, respectively.



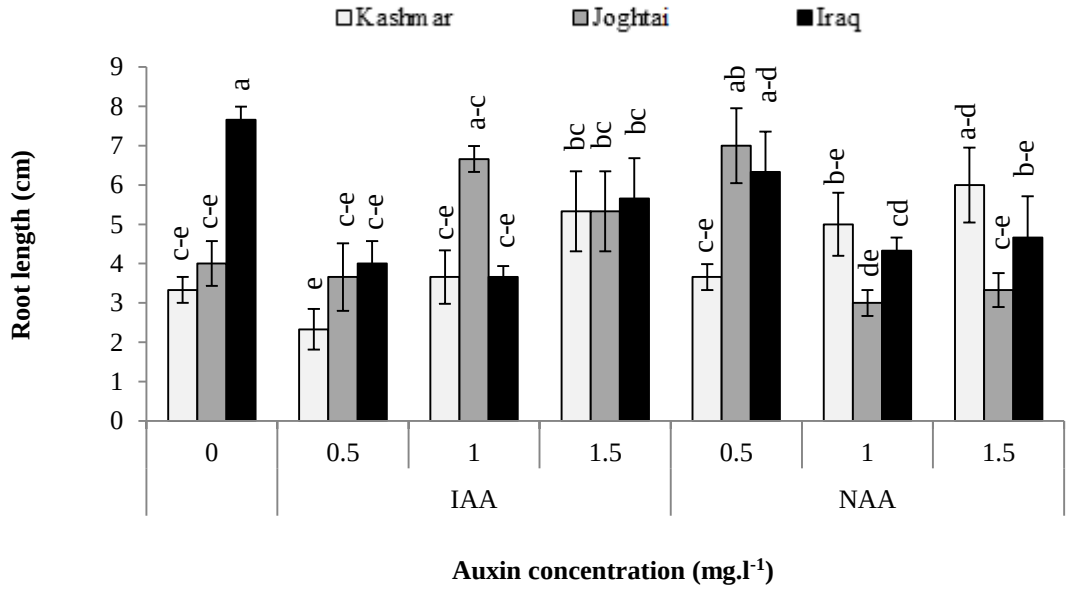
شکل ۷- مقایسه میانگین تعداد ریشه‌های جانبی تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین‌بیان در محیط کشت MS ½ غنی‌شده با سطوح مختلف هورمون‌های IAA و NAA

Figure 7. Means comparison of lateral roots number produced in different *Glycyrrhiza glabra* ecotypes in ½ MS medium supplemented with different levels of IAA and NAA hormones

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

طول ریشه

تجزیه واریانس صفت طول ریشه بیانگر معنی‌داری اثر ساده تیمار هورمون و اثر متقابل دو تیمار اکوتیپ و هورمون بر این صفت بود (جدول ۲). بر این اساس، نتایج مقایسه میانگین این صفت تحت تأثیر اثر متقابل اکوتیپ× هورمون نشان داد که اکوتیپ عراقی در شرایط عدم کاربرد هورمون توانست طویل‌ترین ریشه‌ها را به طول متوسط ۷/۶۶ سانتی‌متر تولید کند. به‌طوری که اعمال سطوح مختلف تیمارهای هورمونی، افزایش معنی‌داری را نسبت به این عدد در پی نداشت (شکل ۸). همچنین مشاهده شد که اکوتیپ‌های مختلف پاسخ متفاوتی به اعمال سطوح هورمونی مختلف در افزایش معنی‌دار این صفت نشان دادند (شکل ۹). برای نمونه، اعمال هورمون IAA با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت اکوتیپ کاشمر توانست (با افزایشی ۳ سانتی‌متری) طول ریشه‌های تولید شده را نسبت به اعمال غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از این هورمون به‌طور معنی‌داری افزایش دهد. البته روند افزایشی مشابه و غیر معنی‌داری در طویل شدن ریشه‌های تولید شده در این اکوتیپ با افزایش سطوح غلظتی هورمون NAA مشاهده گردید. در حالی که این روند در سایر اکوتیپ‌ها از الگوی متفاوت و گاهی معکوس برخوردار بود (شکل ۸).



شکل ۸- مقایسه میانگین طول ریشه‌های تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین‌بیان در محیط کشت MS ½ غنی‌شده با سطوح مختلف هورمون‌های IAA و NAA

Figure 8. Means comparison of root length produced in different *Glycyrrhiza glabra* ecotypes in ½ MS medium supplemented with different levels of IAA and NAA hormones

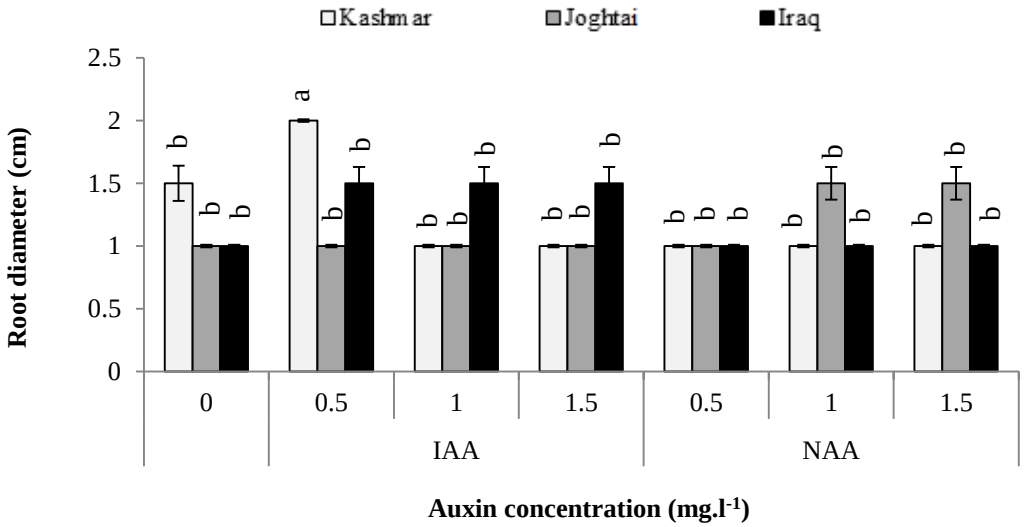
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

شکل ۹- پاسخ ریزنمونه ریشه اکوتیپ‌های مختلف شیرین بیان به کاربرد ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA در محیط کشت ½MS پس از ۲۱ روز؛ اکوتیپ‌های a: کاشمر، b: جغتای و c: عراقی

Figure 9. Root explants response of different *Glycyrrhiza glabra* ecotypes to 1.5 mg.l^{-1} IAA in ½ MS culture medium after 21 days; ecotypes a: Joghtai, b: Kashmar, and c: Iraq

قطر ریشه

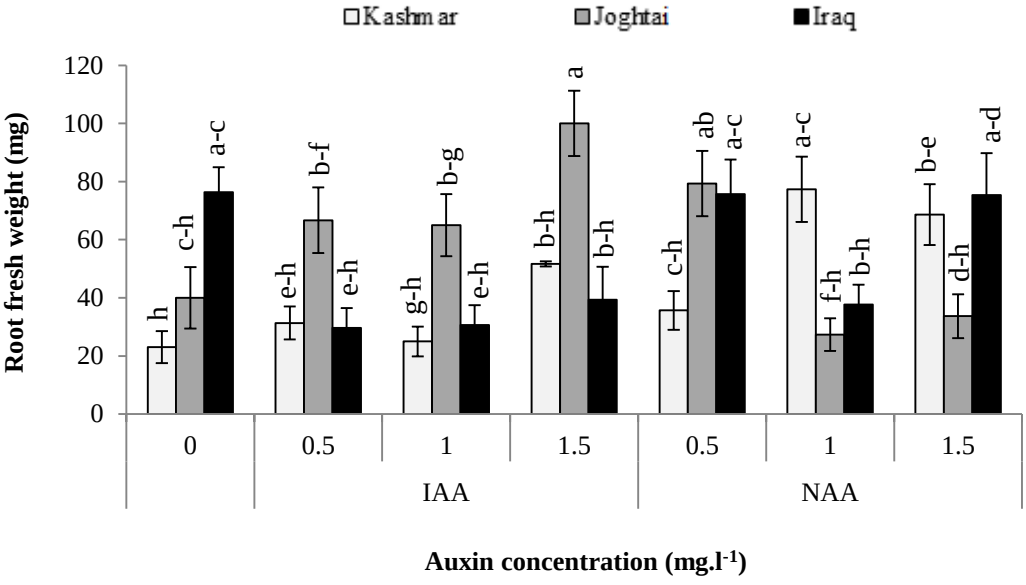
نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌های قطر ریشه نشان داد که در بین تیمارهای مورد بررسی، فقط اثر متقابل دوجانبه اکوتیپ و هورمون در سطح ۵٪ اختلافات معنی‌داری در این صفت ایجاد کرد (جدول ۲). مقایسه میانگین اثر متقابل اکوتیپ× هورمون بر این صفت نشان داد که اکوتیپ کاشمر رشد کرده در محیط MS نیمه جامد غنی شده با ۰/۵ میلی‌گرم هورمون IAA، با افزایش معنی‌دار ۳۳ درصدی نسبت به شرایط شاهد (عدم مصرف هورمون) توانست قطورترین ریشه را تولید کند. سایر اکوتیپ‌ها در سطوح هورمونی مختلف اختلاف معنی‌داری را از نظر این صفت نشان ندادند (شکل ۱۰).



شکل ۱۰- مقایسه میانگین قطر ریشه‌های تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین‌بیان در محیط کشت ½ MS غنی‌شده با سطوح مختلف هورمون‌های IAA و NAA

Figure 10. Means comparison of root diameter produced in different *Glycyrrhiza glabra* ecotypes in ½ MS medium supplemented with different levels of IAA and NAA hormones

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).



شکل ۱۱- مقایسه میانگین وزن‌تر ریشه‌های تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین‌بیان در محیط کشت ½ MS غنی شده با سطوح مختلف هورمون‌های IAA و NAA

Figure 11. Means comparison of root fresh weight produced in different *Glycyrrhiza glabra* ecotypes in ½ MS medium supplemented with *d*ifferent levels of IAA and NAA hormones

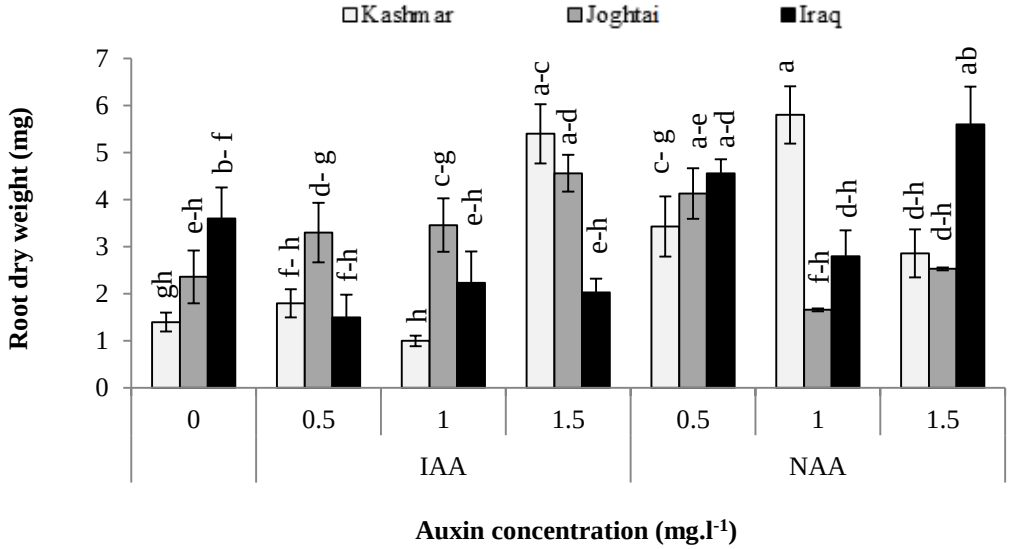
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

وزن تر ریشه

یافته‌های جدول تجزیه واریانس داده‌های وزن‌تر ریشه نیز بیانگر اثر متقابل معنی‌دار و دوجانبه اکوتیپ× هورمون بر تغییرات وزن تر ریشه در ترکیب‌های تیماری مختلف بود (جدول ۲). 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 کرده در شرایط عدم مصرف هورمون مشاهده شد (شکل ۱۱).

وزن خشک ریشه

وزن خشک ریشه به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر سطوح مختلف تیمار هورمونی و نیز برهم‌کنش دو تیمار اکوتیپ و هورمون قرار گرفت (جدول ۲). با توجه به معنی‌داری اثر متقابل دو جانبه اکوتیپ و هورمون و براساس مقایسات میانگین انجام شده، مشاهده شد که اکوتیپ‌های مختلف رشد کرده تحت سطوح مختلف هورمون‌های اکسینی اعمال شده، پاسخ متفاوتی را به تولید و تجمع ماده خشک در ریشه از خود نشان دادند (شکل ۱۲). همچنین مشاهده شد که اعمال غلظت‌های مختلف هورمون‌های اکسینی در برخی اکوتیپ‌ها به افزایش معنی‌دار تولید ماده خشک در ریشه منجر شده است. بر این اساس، کاربرد غلظت‌های ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم از هورمون‌های NAA و IAA توانستند علاوه بر افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد، بالاترین میزان ماده خشک (به‌ترتیب ۵/۸ و ۵/۴ میلی‌گرم) را در ریشه اکوتیپ کاشمر تولید کنند (شکل ۱۲). نتیجه مشابهی با کاربرد غلظت‌های ۱/۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون NAA در اکوتیپ عراقی نیز حاصل گردید. اکوتیپ جغتای نیز با دریافت بالاترین سطح هورمون IAA (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و پس از آن پایین‌ترین سطح هورمون NAA (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) توانست به‌ترتیب افزایش معنی‌دار ۹۳/۲ و ۷۵ درصدی را در تولید ماده خشک ریشه نسبت به شاهد ایجاد نماید (شکل ۱۱).



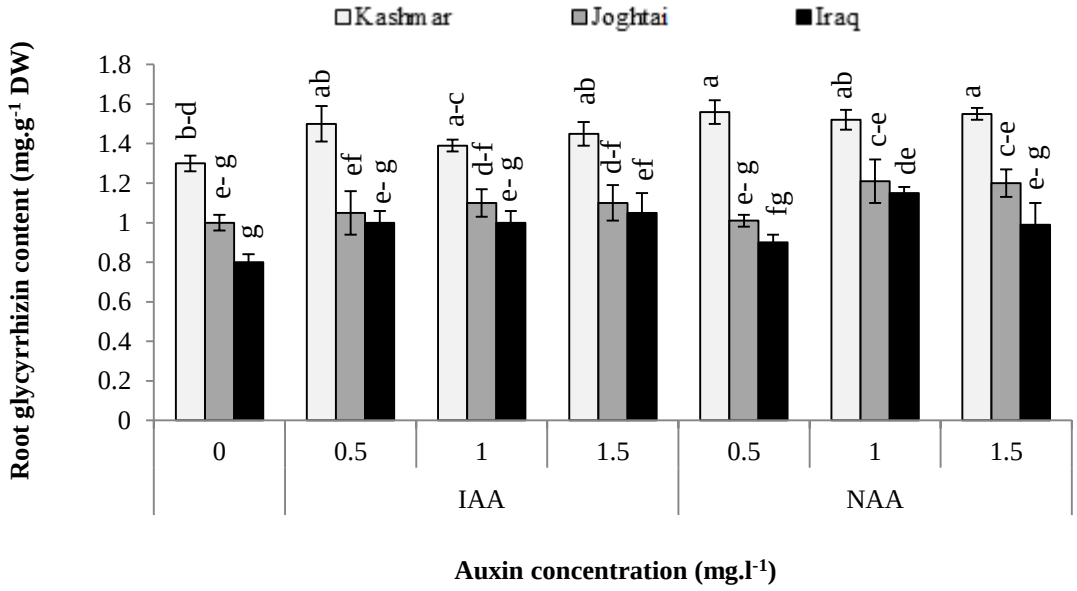
شکل ۱۲- مقایسه میانگین وزن خشک ریشه‌های تولید شده در اکوتیپ‌های مختلف شیرین‌بیان در محیط کشت ½ MS غنی شده با سطوح مختلف هورمون‌های IAA و NAA

Figure 12. Means comparison of root dry weight produced in different *Glycyrrhiza glabra* ecotypes in ½ MS medium supplemented with different levels of IAA and NAA hormones

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

محتوای گلیسیریزین

نتایج آنالیز HPLC بیانگر تولید گلیسیریزین در ریشه‌های رشد کرده در شرایط درون شیشه‌ای بود (شکل ۱۳). تمامی تیمارهای مورد بررسی اعم از اکوتیپ‌های مختلف، سطوح مختلف هورمون‌های اکسین و اثر متقابل آنها بر میزان تولید ماده مؤثره گلیسیریزین در ریشه‌ها به‌طور معنی‌داری تأثیرگذار بودند (جدول ۲). نتایج مقایسات میانگین اثر متقابل فاکتورها، به وضوح بیانگر برتری اکوتیپ کاشمر در کلیه سطوح تیمارهای هورمونی IAA و NAA بود (شکل ۱۳). با این حال، اعمال غلظت‌های ۰/۵ و ۱/۵ (به‌صورت مشترک) از هورمون NAA توانست با افزایش ۲۰ درصدی معنی‌دار تولید گلیسیریزین در ریشه این اکوتیپ نسبت به شاهد، از سایر سطوح هورمونی مورد بررسی موفق‌تر باشد. اکوتیپ کاشمر اگرچه با مقدار کمتر ولی در تیمار شاهد (عدم مصرف هورمون) نیز به‌عنوان برترین اکوتیپ در تولید این ماده مؤثره شناسایی شد (شکل ۱۰). همچنین اکوتیپ عراقی هر چند در پایین‌ترین رتبه از نظر تولید این ماده مؤثره در شرایط شاهد و کلیه سطوح هورمونی قرار داشت، با وجود این اعمال برخی تیمارهای هورمونی مانند تیمار NAA در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و نیز تیمارIAA در بالاترین سطح آن (غلظت ۱/۵ میلی‌گرم) توانست افزایش معنی‌دار تولید گلیسیریزین در ریشه‌های این اکوتیپ را نیز نسبت به شاهد در پی داشته باشد (شکل ۱۳).



شکل ۱۳- مقایسه میانگین میزان گلیسیریزین تولید شده در ریشه اکوتیپ‌های مختلف شیرین‌بیان در محیط کشت ½ MS غنی شده با سطوح مختلف هورمون‌های IAA و NAA

Figure 13. Means comparison of glycyrrhizin content produced in different *Glycyrrhiza glabra* ecotypes in ½ MS medium supplemented with different levels of IAA and NAA hormones

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

بحث

گیاهان دارویی منابع ارزشمندی از عصاره‌ها و متابولیت‌هایی هستند که سهم برجسته‌ای در درمان بیماری‌ها دارند. نزدیک به ۸۰٪ این گیاهان از جنگل‌ها و سایر منابع طبیعی برداشت می‌شوند که جمع‌آوری و بهره‌برداری بی‌وقفه آنها باعث نادر شدن بسیاری از این گیاهان و حتی منقرض

شدن برخی از گونه‌ها شده است (Chen *et al.*, 2016). پیشرفت‌های کنونی در بیوتکنولوژی گیاهی امکان کشت اندام‌های متمایز شده گیاهی (مانند ریشه، ساقه و ...) را با هدف حفظ تنوع زیستی و تأمین متابولیت‌های ثانویه ارزشمند آنها فراهم کرده است. با توجه به پایداری ژنتیکی و ظرفیت بهتر تولید متابولیت‌های ثانویه، کشت اندام، به‌ویژه زمانی که متابولیت‌ها در ناحیه اندام مورد نظر در گیاه (شاخساره یا ریشه) تولید می‌شوند، جایگزینی عملی برای کشت‌های سلولی متمایز نشده در برخی گونه‌های گیاهان دارویی مانند *Eagle marmelos* (Abirami & Kumar, 2013)، *Decalepis hamiltonii* (Thangavel *et al.*, 2014)، *Croton floribundus* (Da Silva, *et al.*, 2013) و *Morinda citrifolia*. (Baque *et al.*, 2012) است. با این حال در سطح تجاری، به دلیل سرعت تکثیر زیاد و توانایی بالای ایجاد بیوماس، تولید متابولیت‌های ثانویه مهم عمدتاً در کشت ریشه انجام می‌شود (Choi *et al.*, 2000؛ Baque *et al.*, 2012). در این پژوهش درصد جوانه‌زنی بذرها در سطوح مختلف پیش‌تیمار شیمیایی و نیز تفاوت‌های مورفولوژیکی و محتوای گلیسیریزین ریشه دو اکوتیپ ایرانی شیرین‌بیان به نام‌های کاشمر و جغتای و یک اکوتیپ خارجی از کشور عراق در پاسخ به غلظت‌های مختلف دو تیمار هورمونی اکسینی از انواع طبیعی (IAA) و سنتزی (NAA)، در شرایط کشت درون شیشه‌ای بررسی شد. در گام نخست، کاربرد پیش‌تیمارهای آب مقطر و اسید سولفوریک برای رفع خواب بذرها نشان داد که بیشترین درصد جوانه‌زنی در بذرهای شیرین‌بیان تیمار شده با اسید سولفوریک ۹۸٪ اتفاق افتاد. جوانه‌زنی بذر یکی از عوامل کلیدی تعیین کننده موفقیت یا شکست در استقرار گیاه است که پارامترهای آن (شامل شروع، درصد و سرعت) به‌شدت تحت تأثیر مجموعه‌ای از عوامل ژنتیکی و محیطی قرار دارد (Carruggio *et al.*, 2021). محیط از طریق خواب بذر، که یکی از سازوکارهای اصلی کنترل زمان جوانه‌زنی است، تأثیرگذار می‌باشد (Baskin & Baskin, 2014). خواب نوعی سازگاری با شرایط نامناسب است که اجازه می‌دهد جوانه‌زنی تا تأمین شرایط بهینه برای ظهور، رشد و بقای گیاهچه به‌تأخیر بیفتد. در گیاه شیرین‌بیان ۷۰٪ تا ۹۰٪ بذرها دچار خواب عمیق فیزیکی هستند، به‌طوری که پوسته ضخیم این بذرها با ممانعت از ورود آب و اکسیژن به درون بذر، آغاز واکنش‌های بیوشیمیایی جوانه‌زنی را به تعویق می‌اندازد. Ghadiri و Bagherani (۲۰۰۰) کاربرد پیش‌تیمار اسید سولفوریک ۷۰٪ به مدت ۲۵ دقیقه را برای رفع خواب و حصول جوانه‌زنی ۷۵ درصدی بذرهای شیرین‌بیان مؤثر دانستند. Shirazi و همکاران (۲۰۱۲) نیز دستیابی به حداکثر جوانه‌زنی بذرهای شیرین بیان را در شرایط اسکاریفیکاسیون شیمیایی با پیش‌تیمار غلظت‌های مختلف اسید سولفوریک گزارش کردند. علاوه بر این، محققان دیگر نیز مواردی از کاربرد سایر پیش‌تیمارها مانند آب گرم، نیترات پتاسیم و اسید جیبرلیک را در رفع خواب بذرهای شیرین‌بیان گزارش کردند (Pei-sheng *et al.*, 2008). با این حال، Carruggio و همکاران (۲۰۲۰) در بررسی جوانه‌زنی بذرهای اکوتیپ‌های دو گونه از خانواده Fabaceae علاوه بر پیش‌تیمار، به تأثیر سایر عوامل محیطی و ژنتیکی از جمله ابعاد بذر، بر سرعت شکست خواب فیزیکی و بروز تفاوت‌های معنی‌دار در درصد جوانه‌زنی بذرها اشاره نمودند. نتایج این پژوهش نیز ضمن تأکید بر نقش مثبت پیش‌تیمار اسید سولفوریک، حکایت از تأثیرگذاری شرایط اکولوژیکی محل جمع‌آوری بذرها و نیز اندازه بذر در میزان جوانه‌زنی بذرها بود. به‌طوری که بذرهای درشت جمع‌آوری شده از منطقه معتدل و پرآب مسیّب در کشور عراق از میزان جوانه‌زنی بیشتری نسبت به بذرهای ایرانی جمع‌آوری شده از مناطق خشک استان خراسان رضوی برخوردار بودند.

با عنایت به معنی‌دار شدن آثار متقابل هورمون و اکوتیپ در کلیه صفات مورد بررسی، افزایش یا کاهش خصوصیات مورفولوژیک و نیز محتوای گلیسیریزین ریشه در هر اکوتیپ، با توجه به شرایط مصرف (نوع و غلظت هورمون) یا عدم مصرف هورمون متفاوت بود. بر این اساس، اکوتیپ عراقی در شرایط عدم مصرف هورمون (شاهد) توانست در

کلیه صفات مورد بررسی بجز محتوای گلیسیریزین ریشه در گروه برتر آماری نسبت به سایر اکوتیپ‌ها قرار بگیرد. برتری ذاتی این اکوتیپ به لحاظ صفات مورفولوژیک بافت ریشه موجب شد، برتری این اکوتیپ در تمامی صفات مورد بررسی به‌استثنای صفت قطر ریشه، در شرایط کاربرد برخی سطوح هورمونی (به ویژه هورمون NAA) نسبت به شرایط عدم مصرف آن (شاهد) به لحاظ آماری معنی‌دار نباشد. در مقابل، نتایج حاصل بیانگر تأثیر مثبت اعمال تیمارهای هورمونی در بهبود صفات مورفولوژیک ریشه در هر دو اکوتیپ داخلی بود. به‌طوری که اکوتیپ کاشمر رشد کرده در محیط غنی شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA توانست قطورترین ریشه‌ها را تولید کند. این اکوتیپ همچنین توانست با دریافت سطوح نسبتاً بالای هر دو هورمون IAA و NAA ریشه‌هایی با وزن خشک بالا تولید کند. در حالی که در مجموع با افزایش غلظت هر دو هورمون، به‌ویژه NAA از طول ریشه‌های تولید شده در اکوتیپ‌ها تا حدودی کاسته و بر تعداد ریشه‌های تشکیل شده اضافه شد. Klerk و همکاران (۱۹۹۹) نیز گزارش کردند که کاربرد خارجی اکسین‌ها محرک شروع ریشه‌دهی بوده و تعداد ریشه‌های تولیدی را تقویت کرده، در عین حال با افزایش سطوح مصرف آنها از ازدیاد طول ریشه‌ها کاسته می‌شود. همچنین Thuy Tien و همکاران (۲۰۱۹) با ارزیابی توان ریشه‌زایی ریزنمونه‌های گیاهی مختلف در شرایط کاربرد اکسین‌های مختلف گزارش کردند که تعداد ریشه‌های تولید شده در هر ریزنمونه با انواع و غلظت‌های مختلف اکسین‌های اعمال شده در محیط کشت متفاوت بود. هورمون NAA برای شروع ریشه‌دهی از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و لپه‌ای مناسب بود، در حالی که IAA در غلظت‌های مختلف برای القای ریشه از ریزنمونه‌های ریشه مناسب بود. در اکوتیپ جغتای نیز ریشه‌هایی وزین (به لحاظ وزن خشک و وزن تر) با کاربرد سطوح بالای هورمون IAA ایجاد شد که این برتری در سطح پایین هورمون NAA نیز تا حدودی حفظ گردید.

چندین فرایند مولکولی پیچیده ناشی از عوامل فیزیولوژیکی درون‌زا و برون‌زا (مانند هورمون‌ها، زخم‌ها، فراهمی مواد غذایی و ...) در شکل‌گیری ریشه‌های فرعی نقش دارند (Sorin *et al.*, 2005). شروع و تمایز مراحل فیزیولوژیکی ریشه‌زایی را می‌توان با تغییرات سطح درون‌زای اکسین‌ها در ریزنمونه‌ها و افزودن اکسین‌های بیرونی در محیط کشت مناسب آغاز کرد (Klerk *et al.*, 1999). البته القای ریشه در شرایط کشت بافت توسط سطوح بالای اکسین و غلظت‌های پایین سیتوکینین تقویت می‌شود. با این حال، عوامل دیگری مانند ریزنمونه‌ها (نوع و سن فیزیولوژیک آنها)، مکمل‌های آلی، مواد معدنی، نور و منبع کربن نیز بر ریشه‌زایی مؤثرند (Praveen *et al.*, 2009). در پژوهش Thuy Tien و همکاران (۲۰۱۹)، پاسخ ریزنمونه‌های ریشه به همراه اکسین از سایر ریزنمونه‌های مورد بررسی بهتر بود و ریزنمونه‌های هیپوکوتیل نسبت به ریزنمونه‌های لپه در شکل‌گیری ریشه‌های ناخواسته مناسب‌تر بودند.

علاوه بر تولید و تکثیر بافت ریشه در شرایط آزمایشگاهی، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه نیز توسط الیستورهای زیستی و غیر زیستی مختلف تحت تأثیر قرار می‌گیرند. برای نمونه، Lee و همکاران (۲۰۱۱) در پی بهینه‌سازی القاء و تکثیر ریشه‌های فرعی از ریزنمونه‌های برگی کشت شده از گیاه آلوئه‌ورا، در شرایط کاربرد تیمارهای هورمونی NAA و BA، محیط کشت B5 را به‌عنوان مناسب‌ترین محیط برای تولید آلوئه-امودین (با مقدار ۰/۱۲ ± ۱۳۳/۰۸ میگروگرم بر گرم) در این گیاه معرفی کردند. همچنین Praveen و همکاران (۲۰۰۹) با کاربرد ۵/۳ میکرومولار از هورمون NAA به منظور تولید ریشه از ریزنمونه‌های برگی گیاه *Andrographis paniculata* در محیط کشت MS جامد، ضمن دستیابی به افزایش بیوماس ۷ برابری، بازدهی تولید آندروگرافولید را در این گیاه (پس از چهار هفته) ۳/۵ برابر گیاهان رشد کرده در شرایط طبیعی گزارش نمودند. افزودن یک میلی‌گرم در لیتر اسید سالیسیلیک به‌عنوان محرک و با هدف افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در محیط کشت MS ریشه‌های

Glycyrrhiza uralensis، مقادیر اسید گلیسیریزیک، اسید گلیسرتینیک و پلی‌ساکارید را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد (به‌ترتیب به میزان ۲/۵۸، ۱/۲۷ و ۲/۰۷ برابر) افزایش داد (Jing *et al.*, 2016). علاوه بر این، کاربرد ۲ میلی‌گرم در لیتر اسید سالیسیلیک، محتوای فلاونوئید کل را (با مقدار ۹/۴۰ میلی‌گرم در گرم) به میزان ۲/۶۸ برابر شاهد افزایش داد.

نتایج تولید متابولیت در این پژوهش نشان داد که با وجود برتری اکوتیپ عراقی در بیشتر صفات مورفولوژیک ریشه، این اکوتیپ نسبت به اکوتیپ‌های ایرانی از محتوای گلیسیریزین پایین‌تری برخوردار بود، در حالی که اکوتیپ کاشمر با دریافت سطوح هورمونی مختلف، توانست ضمن افزایش محتوای گلیسیریزین ریشه نسبت به شرایط شاهد، حائز رتبه برتر تولید این متابولیت در سایر ترکیب‌های تیماری باشد. در مجموع با در نظر گرفتن ماده خشک تولید شده و نیز میزان متابولیت سنجش شده، مشخص گردید که کاربرد سطوح بالا و متوسط (۱/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) هر یک از هورمون‌های IAA و NAA بالاترین بازدهی تولید گلیسیریزین را (به‌ترتیب به میزان ۸/۸۲ و ۷/۸۳ میکروگرم/گرم ماده خشک) در ریشه اکوتیپ کاشمر داشت.

به‌طور کلی در این تحقیق به وضوح روشن گردید که انتخاب نوع و غلظت محرک‌های هورمونی بر مورفولوژی و میزان تولید زیست توده ریشه در اکوتیپ‌های مختلف شیرین‌بیان تأثیرگذار است. همچنین اعمال تیمارهای هورمونی و گزینش اکوتیپ مناسب می‌تواند تولید ماده مؤثره گلیسیریزین را در ریشه‌های شیرین‌بیان رشد کرده در شرایط درون شیشه‌ای به‌طور معنی‌داری افزایش دهد. یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که اجرای پروژه‌های هدفمند و توجه به ژرم‌پلاسم بومی گیاهان دارویی، منابع امیدوارکننده‌ای برای تولید متابولیت‌های ارزشمند این گیاهان برای استفاده در صنایع غذایی و دارویی فراهم می‌کند که می‌تواند ضمن تأمین نیاز داخلی، جایگاه ایران را در زمینه تولید و صادرات محصولات دارویی با منشأ طبیعی، در بازارهای بین‌المللی ارتقاء بخشیده و بازده اقتصادی بالایی را در این حوزه به‌همراه داشته باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از مسئولان محترم دانشگاه صنعتی شاهرود و شرکت زیست فناور سپنتا ناروان به دلیل حمایت‌هایشان در اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

- Abirami, H. and Kumar, P.S., 2013. In vitro regeneration and extraction of secondary metabolites in *Aegle marmelos* L. Correan. Asian Journal of Plant Science Research, 3: 99-106.
- Ayabe, S., Takano, H., Fujita, T., Hirota, H. and Takahshi, T., 1990. Triterpenoid biosynthesis in tissue cultures of *Glycyrrhiza glabra* var. glandulifera. Plant Cell Reports, 9: 181-184.
- Bais, H.P., Govindaswamy, S. and Ravishankar, G.A., 2000. Enhancment of growth and coumarin priduction 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.
- Baque, M.A., Elgirban, A., Lee, E.J. and Paek, K.Y., 2012. Sucrose regulated enhanced induction of anthraquinone, phenolics, flavonoids biosynthesis and activities of antioxidant enzymes in adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* L. Acta Physiologiae Plantarum, 34: 405-415.
- Baskin, C.C. and Baskin, J.M., 2014. Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination, 2nd ed.; Elsevier Academic Press, London, UK, ISBN 9780124166776.
- Carruggio, F., Onofri, A., Impelluso, C., Giusso del Galdo, G., Scopece, G. and Cristaudo, A., 2020. Seed Dormancy Breaking and Germination in *Bituminaria basaltica* and *B. bituminosa* (Fabaceae). Plants, 9: 1110.
- Carruggio, F., Onofri, A., Catara, S., Impelluso, C., Castrogiovanni, Maria., Lo Cascio, P. and Cristaudo, A., 2021. Conditional seed dormancy helps *Silene hicesiae* Brullo and Signor. Overcome Stressful mediterranean summer conditions. Plants, 10: 2130.
- Celik, M.M. and Nizami, D., 2019. An experimental in-vitro study to evaluate the anti-helicobacter activity of Glycyrrhetinic acid. Revista Română de Medicină de Laborator, 27(1): 63.
- Chen, S.L., Yu, H., Luo, H.M., Wu, Q., Li, C.F. and Steinmetz, A., 2016. Conservation and sustainable

Adventitious root culture an alternative strategy for secondary metabolite production: A Review. Agronomy, 12: 1178.
- Klerk, D.G.J., Krieken, W.V.D. and Jong, J.C.D., 1999. Review: The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant, 35: 189-199.
- Lee, Y.S., Yang, T.J., Park, S.U., Baek, J.H., Wu, S.Q. and Lim, K.B., 2011. Induction and proliferation of adventitious roots from *Aloe vera* leaf tissues for in vitro production of aloe emodin. Plant Omics, 4(4): 190-194.
- 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 industry technologies, 9(1): 72-82.
- Namdeo, A.G., 2007. Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites. Pharmacognosy Reviews, 1: 69-79.
- Pei-sheng, M., Yu-hong, W., Xin-guo, W., Jia-jie, L. and Ying, H., 2008. Conditions and Stimulation for Germination in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. Seeds. Agricultural Sciences in China, 7(12): 1438-1444.
- Praveen, N., Manohar, S.H., Naik, P.M., Nayeem, A., Jeong, J.H. and Murthy, H.N., 2009. Production of androghrapholide from adventitiousroot cultures of *Andrographis paniculata*. Current Science, 96: 5-10.
- Ravishankar, G.A. and Ramachandra, R.S., 2000. Biotechnological production of phyto-pharmaceuticals. Journal of Biochmistry Molecular Biology and Biophysics, 4: 73-102.
- Russo, M., Serra, D., Suraci, F., Sanzo, R.D., Fuda, S. and Postorino, S., 2014. The potential of e-nose aroma profiling for identifying the geographical origin of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) roots. Food Chemistry, 165: 467-474.
- Shabani, L., Ehsanpour, A.A., Asghari, 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.
- Shaheen, A., Munawar, A., Naveed, A., Yaser, H., El-Hendawy, S. and Abd-El Gawad, A.M., 2020. Micropropagation of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) by using intermediate nodal explants. Chilean journal of agricultural research, 80(3): 326-333.
- Sharma, S. and Thokchom, R., 2014. A review on endangered medicinal plants of India and their conservation. Journal of Crop and Weed, 10(2): 205-218.
- Shirazi, Z., Piri, K., Asl, A.M. and Hasanloo, T., 2012. Glycyrrhizin and isoliquiritigenin production by use of medicinal plants: Problems, progress, and prospects. Chinese Medicine, 11: 37-46.
- Choi, S.M., Son, S.H., Yun, S.R., Kwon, O.W., Seon, J.H. and Paek, K.Y., 2000. Pilot-scale culture of adventitious roots of ginseng in a bioreactor system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 62: 187-193.
- Cintal, J., Morgenstern, B., Bauer, G., Chandra, P., Rabenau, H. and Doerr, H.W., 2003. Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. Lancet, 361: 2045-2046.
- Da Silva, B.O., Amaral, A.C.F., Ferreira, J.L.P., Santiago, L.J.M. and Louro, R.P., 2013. Micropropagation and in vitro production of secondary metabolites of Croton floribundus Spreng. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant, 49: 366-372.
- 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., 1999. Basic Botany: Anatomy and Morphology, Vol. 1. University of Tehran Press, 539p.
- Hurst, W.J., McKim, J.M. and Martin, R.A., 1983. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Glycyrrhizin in Licorice Products. Journal of Agricultural Food Chemistry, 31: 387-389.
- Hayashi, H. and Sudo, H., 2009. Economic importance of licorice. Plant Biotechnology, 26: 101-104.
- 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.
- Isbrucker, R. and 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. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 46: 167-192.
- Jeong, J.A., Wu, C.H., Murthy, H.N., Hahn, E.J. and Paek, K.Y., 2009. Application of an airlift bioreactor system for the production of adventitious root biomass and caffeic acid derivatives of *Echinacea purpurea*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 14: 91-98.
- Jing, L., Wang, J., Li, J., Liu, S.H. and Gao, W., 2016. Salicylic acid induces the change in the adventitious root of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.: bioactive compounds and antioxidant enzymes. Research on Chemical Intermediates, 42: 1503-1519.
- Khanam, M.N., Anis, M., Bin Javed, S., Mottaghipisheh, J. and Csupor, D., 2022.

Food and Biotechnology, ICCFB Vietnam, Malaysia, 15-17 October.
- Tripathi, L. and Tripathi, J.N., 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2: 243-253.
- Vispute, S. and Khopade, A., 2011. *Glycyrrhiza glabra* L. "Klitaka": A review. International Journal of Pharma and BioSciences, 2: 42-50.
- Wongwicha, W., Tanaka, H., Shoyama, Y., Tuvshintogtokh, I. and Putalun, W., 2008. Production of Glycyrrhizin in Callus Cultures of Licorice. Zeitschrift für Naturforschung, 63: 413-417.
- Wu, S.Q., Lian, M.L., Gao, R., Park, S.Y. and Piao, X.C., 2011. Bioreactor application on adventitious root culture of *Astragalus membranaceus*. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant, 47: 719-724.
- Wu, S.Q., Yu, X.K., Lian, M.L., Park, S.Y. and Piao, X.C., 2014. Several factors affecting hypericin production of *Hypericum perforatum* during adventitious root culture in airlift bioreactors. Acta Physiologiae Plantarum, 36: 975-981.

hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra*. Journal of Medicinal Plants Research, 6: 4640-4646.
- Sorin, C., Bussell, J.D. and Camus, I., 2005. Auxin and light control of adventitious rooting in Arabidopsis required ARGONAUTE1. Plant Cell, 17: 1343-1359.
- Srivastava, M., Singh, G., Sharma, S., Shukla, S. and Misra, P., 2019. Elicitation enhanced the yield of glycyrrhizin and antioxidant activities in hairy root cultures of *Glycyrrhiza glabra* L. Journal of Plant Growth Regulation, 38: 373-384.
- Sujatha, G. and Ranjitha Kumari, B.D., 2012. Establishment of fast growing in vitro root culture system in *Artemisia vulgaris*. Journal of Agricultural Science and Technology, 8: 1779-1790.
- Thangavel, K., Ravichandran, P., Ebbie, M.G. and Manimekalai, V., 2014. In vitro microrhizome production in *Decalepis hamiltonii*. African Journal of Biotechnology, 13: 1308-1313.
- Thuy Tien, T., Le, C.T., Nguyen, H. and Minh, V., 2019. The induction of *Beta vulgaris* L. adventitious roots in in vitro culture for betalains. 4th International Conference on Chemical Engineering,

Effects of auxin elicitors on root morphology and glycyrrhizin biosynthesis in *Glycyrrhiza glabra* L. ecotypes

A.A. Alizadeh Everi[1], M. Parsaeian[2*] and Z. Ghasimi Hagh[3]

1- Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran
2*- Corresponding author, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran, E-mail: mahparsa.cb@shahroodut.ac.ir
3- Department of Horticulture Science and Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran

Received: October 2022 Revised: January 2023 Accepted: February 2023

Abstract

Glycyrrhiza glabra L. is one of the valuable medicinal plants of the world, whose glycyrrhizin, the most important triterpenoid metabolite in its roots, is widely used in food and modern pharmaceutical industries. To overcome the seed germination problems, the risk of plant extinction due to the indiscriminate root harvesting, and the slow rate of natural biosynthesis of secondary metabolites, it is necessary to study on this plant root tissue culture and use elicitors to increase its glycyrrhizin biosynthesis. In the present study, the seed germination rate of two Iranian licorice ecotypes (Kashmar and Joghtai) and an Iraqi ecotype was investigated at different levels of sulfuric acid pretreatment. In addition, differences between the ecotypes in terms of morphology and root glycyrrhizin content were studied in response to IAA and NAA auxin elicitors with concentrations of 0, 0.5, 1, and 1.5 $mg.l^{-1}$ in ½ MS medium using root explants. The results showed that all three ecotypes obtained the highest seed germination in the 98% sulfuric acid pretreatment for 40 minutes. The Iraqi ecotype was placed in the statistically best group in terms of all traits except glycyrrhizin content under control and some hormone levels (esp. NAA) conditions. In the Iranian ecotypes, the auxin elicitors application significantly improved the root traits and glycyrrhizin content. Kashmar ecotype produced the thickest roots using 0.5 $mg.l^{-1}$ of IAA and the highest root dry weight (5.8 and 5.4 mg, respectively) using the medium and high concentrations of NAA and IAA. Joghtai ecotype also produced the heavy roots with 1.5 and 0.5 $mg.l^{-1}$ of IAA and NAA (100 and 79 mg, respectively). In general, the medium and high concentrations of IAA and NAA (1 and 1.5 $mg.l^{-1}$) caused the highest glycyrrhizin production (8.82 and 7.83 $\mu g.g^{-1}$ DW, respectively) in Kashmar ecotype roots. Therefore, selection of appropriate ecotype and auxin elicitors application can increase *in vitro* production of biomass and root glycyrrhizin content in *G. glabra.*

Keywords: Plant growth regulators, *Glycyrrhiza glabra* L., root culture, secondary metabolite.