Archive of SID

نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۷، شماره ۱، صفحه ۱۳۱-۱۲۰ (۱۳۹۸)
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2019.122980.1312
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0891.1398.27.131.53.1.1576.115

بررسی اثر غلظت آنتی‌اکسیدان‌های مختلف بر کاهش قهوه‌ای شدن کالوس و تولید ذی‌توده آن در دو گونه از شیرین‌بیان *Glycyrrhiza glabra* و *G. uralensis*

مریم اله دو[۱]، منصور امیدی*[۲]، محمدرضا بی‌همتا[۳]، علیرضا عباسی[۴] و براتعلی فاخری[۵]

۱- دانشجوی دکترای اصلاح نباتات-ژنتیک مولکولی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

*۲- نویسنده و مسئول مکاتبات، استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، پست الکترونیک: momidi@ut.ac.ir

۳- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

۴- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

۵- استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه زابل، زابل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۶/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۰۷

چکیده

ریشه‌ها و استولن‌های شیرین‌بیان یکی از مهمترین داروهای خام را در دنیا تشکیل می‌دهند و محتوای مقادیر زیادی از ماده مؤثر گلیسیریزین، که یک نوع تریترپنوئید ساپونین است، می‌باشند. کشت بافت و تولید کالوس در شیرین‌بیان پیش‌نیاز مطالعات بررسی متابولیت‌های ثانویه و ترانسفورماسیون سلولی در این گیاه می‌باشد. به‌منظور تأثیر آنتی‌اکسیدان‌ها در کاهش قهوه‌ای شدن و رشد کالوس در دو گونه از شیرین‌بیان *Glycyrrhiza glabra* و *G. uralensis* از اسید اسکوربیک و PVP (پلی‌ونیل پیرولیدین) در چهار سطح مختلف استفاده شد. همچنین به‌منظور تأثیر این آنتی‌اکسیدان‌ها در شاخص رشد کالوس، اقدام به کشت سوسپانسیون سلولی در هر دو گونه گردید. برای تولید کالوس از هیپوکوتیل گیاهچه‌های دو هفته‌ای و هورمون‌های NAA (نفتالین استیک اسید) به غلظت نیم میلی‌گرم در لیتر و BA (بنزیل آمین) به غلظت دو میلی‌گرم در لیتر به همراه تیمارهای آنتی‌اکسیدان‌های اسید اسکوربیک و PVP در غلظت‌های مختلف در قالب دو آزمایش فاکتوریل جداگانه بر پایه طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. نتایج نشان داد در واکشت‌های متوالی میزان ۱۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر PVP در هر دو گونه، کمترین باززایی، نکروزه و بیشترین میزان کالوس را دارا بود. درحالی‌که در کشت سوسپانسیون سلولی با افزایش غلظت PVP شاخص رشد کالوس کاهش یافته و تیمار PVP با غلظت ۱۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر در هر دو گونه کمترین شاخص رشد کالوس را داشت، که می‌تواند به دلیل جذب هورمون‌ها (NAA و BA) توسط هورمون PVP و کاهش غلظت هورمون در محیط باشد. تیمار اسید اسکوربیک به‌ترتیب با غلظت‌های ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در هر دو گونه بیشترین شاخص رشد کالوس را داشت و برای کشت سوسپانسیون سلولی توصیه گردید.

واژه‌های کلیدی: شیرین‌بیان، اسید اسکوربیک، PVP، کالوس، سوسپانسیون سلولی

مقدمه

شیرین‌بیان یک گیاه چند ساله، با طول تقریبی ۶۰ سانتیمتر و به‌صورت وحشی در کشورهای آسیای غربی و ویتنام رشد می‌کند (Amagaya *et al.*, 1984). گونه *Glycyrrhiza glabra* در ایران به صورت خودرو و علف هرز در مزارع گندم و نخود در دیم‌زارهای استان‌های

www.SID.ir

Archive of SID

کرمانشاه، ایلام، فارس، اصفهان و اراک پراکنش یافته است (Ghahraman,1999). این گیاه محتوای نشاسته، لیگنین یک رزین قهوه‌ای به نام آسپاراژین و یک ماده موثره مشخص به نام گلیسیریزین می‌باشد (Christie *et al*.,2001).

ریشه‌ها و استولن‌های گونه‌های شیرین‌بیان *Glycyrrhiza glabra*، *G. uralensis* و *G. inflata* یکی از مهمترین داروهای خام را در دنیا تشکیل می‌دهند و محتوای مقادیر زیادی از ماده مؤثر گلیسیریزین (۲ تا ۸٪ از ماده خشک) که یک نوع تریترپنوئید ساپونین است، می‌باشند. گلیسیریزین طیف وسیعی از فعالیت‌های دارویی مانند ضدالتهاب، محافظ کبد، زخم معده، ضد حساسیت و ضد ویروس را در برابر ویروس‌های مختلف RNA یا DNAدار مانند ویروس نقص ایمنی‌اکتسابی (HIV) انسان و سندرم حاد تنفسی شامل می‌شود. شیرین‌بیان در سراسر دنیا به‌عنوان یک ماده دارویی در دسترس می‌باشد (Seki *et al*.,2011).

با توجه به ارزش دارویی بالای شیرین‌بیان، افزایش تقاضای بازار برای این گیاه و نیز محدودیت منابع شیرین‌بیان در دنیا، کشت بافت آن راهکار مناسبی برای تولید متابولیت های ثانویه و افزایش تولید ماده مؤثره گلیسیریزین می‌باشد. مطالعات انجام شده حکایت از موفقیت کشت درون شیشه‌ای این گیاه شامل کشت کالوس، سوسپانسیون و ریشه‌های موئی دارد. القای کالوس و تولید گلیسیریزین در شیرین‌بیان گونه *G. inflata* به‌طور موفقیت‌آمیزی انجام شده است (Wongwicha *et al*.,2008).

کالوس‌زایی در بیشتر گیاهان دارویی تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد مانند سیاهدانه (Hosseinpanahi *et al*.,2016)، مرزنجوش بخارایی (Hosseini & Bighamat, 2016) و زیره‌سیاه (Khosravinia et al.,2011) به‌طور موفقیت‌آمیزی انجام شده است، اما کشت بسیاری از گیاهان چوبی و تعدادی از گیاهان علفی، در شرایط درون شیشه‌ای، تولید بافت قهوه‌ای و فنل می‌کند (Cördük & Aki, 2011). قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها و مرگ احتمالی بافت گیاهی در طول مرحله اول کشت بافت گیاهی یک مشکل همیشگی است. قهوه‌ای شدن از طریق فعالیت پلی فنل اکسیداز (PPO) و پراکسیداز بوسیله تحریک واکنش دفاعی ناشی از زخم شدن رخ می‌دهد. موقعی که سلول‌ها در طول برش ریزنمونه ها زخمی می‌شوند، واکنش قهوه‌ای شدن شروع می‌گردد. البته وجود یک همبستگی مثبت بین فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز و سطح ترکیبات فنلی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در گونه‌های مختلف درختان گزارش شده است (Singh & Sharma, 2002). مواد افزودنی مختلف که از تولید ترکیبات فنلی جلوگیری یا مواد فنلی بازدارنده را از محیط کشت حذف کنند، می‌توانند در کنترل فنل و قهوه‌ای شدن مؤثر باشند. موادی از قبیل آنتی‌اکسیدان‌ها، مواد تشکیل دهنده کلات‌ها یا جذب کننده‌های سطحی، ترکیبات فنلی را از محیط کشت حذف می‌کنند (Thomas, 2008).

هنگامی که بافت‌های شیرین‌بیان در محیط کشت MS(موراشینگ و اسکوگ) حاوی هورمون‌های القای کالوس کشت می‌گردد، تولید کالوس‌های قهوه‌ای نموده که در طی واکشت‌های پی‌درپی رشد این کالوس‌های قهوه‌ای کم شده و در نهایت از بین می‌رود. یک راهکار برای غلبه بر این مشکل، استفاده از واکشت زودهنگام است. گزارش‌های متعددی برای غلبه بر قهوه‌ای شدن گیاهان دارویی و درختان مانند استفاده از جاذب‌ها مثل ذغال فعال و آنتی‌اکسیدان‌ها مانند اسید اسکوربیک و اسید سیتریک و هیدروکربن‌ها مانند گلوکز، فروکتوز و ساکارز وجود دارد (Jain *et al*.,2008 و Khosroushahi *et al*.,2011). هدف از این تحقیق، بررسی کاهش قهوه‌ای شدن و افزایش رشد کالوس از طریق آنتی‌اکسیدان‌های اسید اسکوربیک و PVP در غلظت‌های مختلف و نیز ارزیابی تأثیر آنتی‌اکسیدان‌ها بر رشد کالوس در کشت سوسپانسیون می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه، آماده سازی و کشت بذر

بذرهای گونه *G.glabra* از شهرستان سمیرم استان اصفهان تهیه و بذر گونه *G. uralensis* از شرکت *Xinqiao Liu* (Shanghai Fairy Valley) در چین خریداری شد.

www.SID.ir

Archive of SID

بذرها را ابتدا در آب استریل حاوی یک قطره مایع ظرفشویی شستشو و بعد بذرهای گونه *G. glabra* به مدت ۱۵ دقیقه و گونه *G. uralensis* به مدت ۳۰ دقیقه در اسید سولفوریک غلیظ قرار گرفته و سه مرتبه به مدت یک دقیقه با آب استریل شستشو داده شد. بذرها پس از خراش‌دهی در زیر هود استریل کشت با وایتکس ۳۰٪ به مدت ۱۵ دقیقه شستشو و بعد در محیط کشت یک دوم MS به‌منظور تولید ساقه کشت گردید.

کشت بافت

محیط کشت MS به‌عنوان محیط کشت پایه محتوای ۳٪ ساکارز برای همه گیاهچه‌ها استفاده شد. pH محیط کشت قبل از اضافه کردن آگار ۰/۸ درصد، بر روی ۵/۸ تنظیم و در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه اتوکلاو گردید. ریشه، برگ و هیپوکوتیل برای تولید کالوس مورد ارزیابی قرار گرفته و با توجه به موفقیت هیپوکوتیل در تولید کالوس، برای تولید کالوس از هیپوکوتیل استفاده گردید. هیپوکوتیل گیاهچه‌های دو هفته‌ای کشت شده در محیط کشت یک دوم MS، به قطعات نیم سانتیمتری تقسیم و به پتری‌دیش‌های استریل حاوی محیط کشت MS و تنظیم‌کننده‌های رشد شامل: ۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BA و نیم میلی‌گرم بر لیتر هورمون NAA قرار گرفت (Parsaeimehr *et al*.,2009). در هر پتری دیش حدود ۲۰ تا ۲۵ قطعه از هیپوکوتیل قرار گرفت.

تیمار با آنتی‌اکسیدان

به‌منظور تیمار گونه‌های شیرین‌بیان با آنتی‌اکسیدان‌ها، دو آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی نامتعادل با ۳ تا ۵ تکرار انجام شد.

الف-آزمایش اول: شامل فاکتور گونه با دو سطح (گونه *G. uralensis* و گونه *G. glabra*) و فاکتور آنتی‌اکسیدان اسیداسکوربیک، با چهار سطح (۸۰،۱۰۰، ۱۲۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) (Jain *et al*.,2008) و

ب- آزمایش دوم: شامل فاکتور گونه با دو سطح و آنتی‌اکسیدان PVP با چهار سطح (۳۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰ و ۱۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بود. تیمار کنترل برای هر دو گونه (تیمار فاقد آنتی‌اکسیدان) در نظر گرفته شد. برای استریل کردن اسید اسکوربیک از فیلترهای ۰/۲۲ میکرون استفاده گردید و زمانی‌که دمای محیط کشت به حدود ۵۰ تا ۶۰ درجه سانتی گراد رسید، اسید اسکوربیک به محیط کشت اضافه گردید. بعد از انتقال گیاهچه‌ها به محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد و آنتی‌اکسیدان‌ها، پتری‌دیش‌ها در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. چهار هفته بعد از کشت، کالوس‌ها جمع‌آوری و در محیط کشت‌های جدید حاوی غلظت‌های مختلف آنتی‌اکسیدان قرارگرفتند و بعد هر ۲۱ روز واکشت انجام شد.

بررسی صفات

در کشت اول صفات تعداد روز تا کالوس‌دهی (زمانی که بیش از پنجاه درصد گیاهچه‌ها به کالوس‌دهی رسیده بودند)، درصد گیاه باززا، درصد نکروزه و درصد کالوس سالم اندازه‌گیری و در واکشت‌های بعدی درصد نکروزه و کالوس سالم محاسبه گردید.

سوسپانسون سلولی

به‌منظور تأثیر آنتی‌اکسیدان‌ها بر روی رشد کالوس، دو آزمایش فاکتوریل جداگانه در قالب طرح پایه کاملا تصادفی نامتعادل با سه تا هفت تکرار انجام شد. در هر دو آزمایش، فاکتور اول گونه و فاکتور دوم آنتی‌اکسیدان با غلظت‌های مختلف (مانند آزمایش‌های قبل) بود. بدین‌منظور برای هر آزمایش حدود ۰/۵ گرم کالوس از گونه‌های مختلف به ارلن‌های حاوی محیط کشت MS مایع و غلظت‌های مختلف از آنتی‌اکسیدان‌ها انتقال و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، اتاق تاریک و شیکر با ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفت. بعد از ۲۱ روز صفت وزن تر کالوس سنجش و با استفاده از فرمول زیر شاخص رشد کالوس محاسبه گردید.(Zahedzadeh *et al*., 2014)

www.SID.ir

Archive of SID

$$G_i = \left(\frac{W_2 - W_1}{W_1}\right) \times 100$$

در این فرمول:

G_i، شاخص رشد کالوس (تفاوت وزن ثانویه و اولیه کالوس تقسیم بر وزن ثانویه ضربدر ۱۰۰)

W_1، وزن اولیه کالوس و W_2، وزن ثانویه کالوس می‌باشد.

آنالیز داده‌ها

تجزیه واریانس کلیه صفات بر اساس آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی نامتعادل با ۳ تا ۵ تکرار برای هر آنتی‌اکسیدان بطور جداگانه و نیز کشت سوسپانسیون با ۳ تا ۷ تکرار انجام شد. قبل از تجزیه واریانس داده‌ها در نرم‌افزار Minitab18 از نظر نرمال بودن مورد بررسی قرار گرفت، بدین صورت که ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از روش کولموگراف اسمیرناف بررسی و پس از تأیید نرمال بودن داده‌ها، خطاها نیز از نظر نرمال بودن بررسی شدند. سپس تجزیه واریانس کلیه صفات و آزمون مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد با نرم‌افزار SAS9.4 انجام شد (SAS 2010). نمودار مقایسه میانگین صفات با نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۷ رسم شد.

نتایج

صفات مورد بررسی در کشت کالوس

الف- اسید اسکوربیک

تجزیه واریانس صفات مورد بررسی برای تیمار اسید اسکوربیک نشان داد که اثر گونه در تمام صفات بجز روز تا کالوس‌دهی، درصد گیاه باززا و میانگین کالوس معنی‌دار و اثر اسید اسکوربیک در تمام صفات بسیار معنی‌دار ولی اثر متقابل گونه در اسید اسکوربیک فقط برای درصد گیاه باززا در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۱).

نتایج مقایسه میانگین برای اثر گونه نشان داد که برای صفات درصد کالوس سالم در واکشت اول، واکشت دوم و واکشت سوم، گونه *G. glabra* در گروه a و گونه *G.uralensis* در گروه b قرار گرفته و برای صفت درصد نکروزه گونه *G. uralensis* در گروه a و گونه *G. glabra* در گروه b قرار گرفت. برای فاکتور اسید اسکوربیک، صفت روز تا کالوس‌دهی در تیمار کنترل در گروه a و برای سطح چهارم از این فاکتور (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در گروه D قرار گرفت (شکل ۲-الف).

برای صفات درصد گیاه باززا و درصد نکروزه نیز تیمار شاهد در گروه a و سطح سوم و چهارم اسید اسکوربیک (۱۲۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در گروه c قرار گرفتند (شکل ۲- ب و د). ازاین‌رو بر اساس این نتایج می‌توان گفت با افزایش غلظت اسید اسکوربیک زمان کالوس‌دهی، درصد گیاه باززا و درصد نکروزه کاهش می‌یابد.

برای صفت درصد کالوس سالم در واکشت اول سطح سوم و سطح چهارم (۱۲۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) این آنتی‌اکسیدان در گروه a و کنترل در گروه d و برای صفت درصد کالوس در واکشت دوم سطح سوم در گروه a و کنترل در گروه d و برای صفت درصد کالوس سالم در واکشت سوم سطح دوم (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در گروه a و تیمار شاهد در گروه d قرار گرفت.

در صفت میانگین کالوس سطح دوم (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و پس از آن سطح اول (۸۰ میلی‌گرم در لیتر) به‌ترتیب در گروه a و ab و کنترل در گروه c قرار گرفت (شکل ۲- ج).

اثر متقابل گونه در اسید اسکوربیک فقط در صفت درصد گیاه باززا معنی‌دار شده (جدول ۱) و نتایج مقایسه میانگین نشان داد که اثر متقابل گونه *G. glabra* در کنترل اسید اسکوربیک در گروه a و پس از آن اثر متقابل گونه *G.uralensis* در کنترل در گروه b و اثر متقابل گونه *G. glabra* با سطح چهارم اسید اسکوربیک (۲۰۰ میلیگرم در لیتر) در گروه d قرار گرفت.

ب- پلی ونیل پیرولیدین (PVP)

تجزیه واریانس صفات مورد بررسی برای تیمار PVP نشان داد که اثر گونه در صفات درصد گیاه باززا، درصد کالوس سالم در واکشت اول، واکشت دوم و واکشت سوم در سطح یک درصد معنی‌دار و اثر PVP در تمام صفات و اثر

www.SID.ir

Archive of SID

متقابل گونه در PVP در صفات درصد نکروزه، درصد کالوس سالم در واکشت اول، واکشت دوم و واکشت سوم بسیار معنی‌دار شد (جدول ۲).

مقایسه میانگین صفات برای فاکتور PVP، نشان داد که در صفت روز تا کالوس‌دهی تیمار کنترل با بیشترین میانگین در گروه a و سطح چهارم این فاکتور (غلظت ۱۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) با کمترین میانگین در گروه c قرار گرفت (شکل ۳، الف). برای صفت درصد گیاه باززا نیز کنترل در گروه a و PVP با غلظت ۱۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر در گروه c قرار گرفتند (شکل ۳، ب). با توجه به این نتایج، می‌توان گفت با افزایش غلظت PVP، مدت زمان به کالوس رفتن، درصد گیاه باززا و نیز درصد نکروزه در هر دو گونه کاهش می‌یابد. در صفت درصد نکروزه، اثر متقابل فاکتور در PVP در سطح یک درصد معنی‌دار شده و گونه *G. glabra* در PVP با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر با بیشترین میانگین در گروه a و گونه *G. uralensis* در PVP و گونه *G. glabra* در PVP با غلظت ۱۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، با کمترین میانگین در گروه e قرار گرفتند (شکل۴، الف). در صفت درصد کالوس سالم در واکشت اول، دوم و سوم، تیمار PVP با غلظت ۱۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر با بیشترین میانگین در گروه a (شکل۱، A و B) و پس از آن غلظت‌های ۷۰۰، ۵۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌ترتیب در گروه‌های b، bc و c و تیمار کنترل با کمترین میانگین در گروه d قرار گرفتند. بر اساس این نتایج می‌توان گفت با افزایش غلظت PVP درصد کالوس سالم در واکشت‌های متوالی افزایش می‌یابد. در صفت میانگین کالوس نیز تیمار PVP با غلظت ۱۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر با بیشترین میانگین کالوس در گروه a و تیمار کنترل با کمترین میانگین در گروه d قرار گرفت (شکل ۳ ، د).

در مقایسه دو آنتی‌اکسیدان بکاررفته با سطوح مختلف (اسید اسکوربیک و PVP) می‌توان گفت با افزایش غلظت هر دو آنتی‌اکسیدان، میزان روز تا کالوس‌دهی، درصد گیاه باززا و درصد نکروزه کاهش و میزان کالوس سالم در واکشت‌های مختلف افزایش می‌یابد ولی در صفت میانگین کالوس، غلظت ۱۰۰ و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر اسیداسکوربیک و غلظت ۱۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر PVP در هر دو گونه مؤثر بوده و سبب افزایش میزان کالوس‌دهی شده بود (شکل ۲،ج و شکل ۳، د).

ج- سوسپانسیون سلولی

تجزیه واریانس صفت شاخص رشد در کشت سوسپانسیون سلولی تیمار شده با اسید اسکوربیک برای فاکتور اسید اسکوربیک در سطح یک درصد معنی‌دار و برای فاکتور گونه و اثر متقابل گونه در اسید اسکوربیک غیر معنی‌دار بود (جدول ۳). مقایسه میانگین صفات نشان داد که اسید اسکوربیک با غلظت۸۰ میلی‌گرم در لیتر دارای بیشترین شاخص رشد بوده، در گروه a و بعد سطح دوم این آنتی‌اکسیدان (اسید اسکوربیک با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در گروه b و تیمار شاهد (تیمار فاقد آنتی‌اکسیدان) با کمترین شاخص رشد در گروه d قرار گرفت (شکل ۲ و).

تجزیه واریانس صفت شاخص رشد در کشت سوسپانسیون سلولی تیمار شده با پلی ونیل پیرولیدین برای فاکتور گونه، آنتی‌اکسیدان PVP و اثر متقابل گونه در PVP در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). مقایسه میانگین صفت شاخص رشد برای فاکتور گونه حکایت از اختلاف معنی‌دار بین دو گونه داشت، به‌طوری‌که گونه *G.uralensis* در گروه a و گونه *G.glabra* در گروه b قرار گرفت. مقایسه میانگین این صفت برای فاکتور PVP نشان داد که سطح اول این فاکتور (۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) با بیشترین شاخص رشد در گروه a، سطح دوم و سوم آن (به‌ترتیب ۵۰۰ و ۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در گروه b، سطح چهارم (۱۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در گروه bc و شاهد (تیمار فاقد PVP) در گروه c قرار گرفت (شکل ۳، ه). با توجه به این نتایج می‌توان گفت با افزایش غلظت PVP، شاخص رشد کالوس کاهش یافته و تیمارهای با غلظت کمتر نتایج بهتری را ارائه دادند. مقایسه میانگین اثر متقابل گونه در PVP نیز نشان داد که گونه *G.uralensis* در سطح اول

www.SID.ir

Archive of SID

این فاکتور دارای بیشترین میانگین بوده و در گروه a قرار گرفته، در حالی که گونه *G.uralensis* در سطح چهارم PVP (۱۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و گونه *G. glabra* در سطح سوم فاکتور PVP (غلظت ۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر) با شاهد دارای کمترین میانگین بوده و در گروه D قرار گرفتند (شکل ۴، الف و ب).

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در تیمار با اسید اسکوربیک

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		روز تا کالوس‌دهی	درصد گیاه باززا	درصد نکروزه	درصد کالوس سالم V1	درصد کالوس سالم V2	درصد کالوس سالم V3	میانگین کالوس
گونه	۱	۰/۶۴۷ n.s	۱۴/۶۷ n.s	۱۲۶۹ **	۱۱۱۵/۹ *	۵۸۰۱ **	۱۱۸۳/۸۳ *	۰/۰۰۴ n.s
اسید اسکوربیک	۴	۳۲/۶۸ **	۷۷/۹۹ **	۶۲۶ **	۱۲۱۸/۵ **	۲۳۹۸ **	۲۰۹۰/۵۶ **	۰/۰۰۹ **
گونه×اسیداسکوربیک	۴	۰/۶۸۱ n.s	۲۸/۷۷ **	۱۹ n.s	۳۶/۴۸ n.s	۳۰۵ n.s	۱۰۳/۲۹ n.s	۰/۰۰۱۳ n.s
خطا	۲۹	۰/۳۴	۶/۱۹	۷۱/۷۶	۹۷/۱۴	۱۵۱/۵۵	۱۹۰/۲۱	۰/۰۰۲۹
ضریب تغییرات		۵/۳۱	۳۲/۶۸	۲۷/۴۹	۱۵/۵۲	۲۶/۴۳	۲۹/۴۷	۳۲/۹۸

ns، * و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در تیمار با پلی ونیل پیرولیدین (PVP)

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		روز تا کالوس‌دهی	درصد گیاه باززا	درصد نکروزه	درصد کالوس سالم V1	درصد کالوس سالم V2	درصد کالوس سالم V3	میانگین کالوس
گونه	۱	۱/۲۷ n.s	۶۱/۹۲ **	۱۷۸ n.s	۸۰۳/۵۷ **	۵۶۳۸/۷ **	۳۷۴۰ **	۰/۰۱۴ n.s
پلی ونیل پیرولیدین	۴	۷۲/۶ **	۱۱۷/۳۳ **	۱۴۰۴ **	۲۱۶۰/۰۱ **	۴۱۳/۹۹ **	۵۹۸۹ **	۰/۱۰۹ **
گونه×پلی‌ونیل‌پیرولیدین	۴	۰/۱۶ n.s	۱۳/۴۸ n.s	۵۶۰ **	۶۵۹/۷۴ **	۳۱۴/۵۹ **	۵۸۹/۷ **	۰/۰۰۱ n.s
خطا	۳۱	۰/۳۷۹	۷/۲۵	۶۱/۸۷	۹۴/۹۸	۷۲/۴۷	۸۸/۵۹	۰/۰۰۵۳
ضریب تغییرات		۶/۷۶	۳۴/۱۲	۲۶/۴۷	۱۴/۸۵	۱۵	۱۸/۸۳	۳۹/۵

ns، * و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

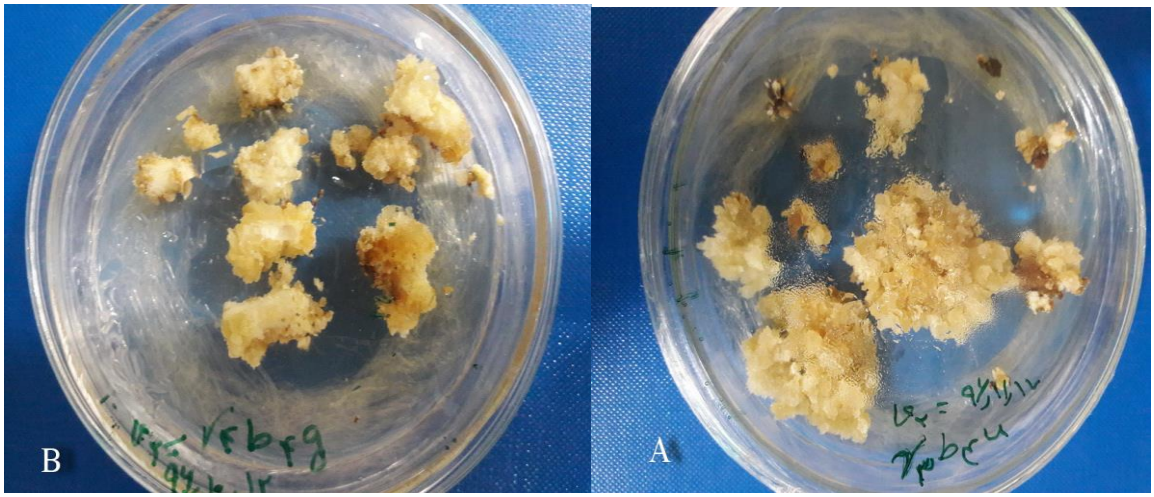
جدول ۳- جدول تجزیه واریانس شاخص رشد کالوس در کشت سوسپانسیون سلولی تیمار با اسید اسکوربیک و پلی ونیل پیرولیدین

منابع تغییرات اسید اسکوربیک	درجه آزادی	میانگین مربعات شاخص رشد کالوس	منابع تغییرات پلی ونیل پیرولیدین	درجه آزادی	میانگین مربعات شاخص رشد کالوس
گونه	۱	۳۱۳ ns	گونه	۱	۳۳۳٤ **
اسید اسکوربیک	٤	۱٤٥۱۲۱ **	PVP	٤	۲٥۳٤ **
گونه× اسید اسکوربیک	٤	۸٦٤ ns	گونه× PVP	٤	۱۲۳۰ **
خطا	۲۸	۲٦٤۱	خطا	٤٥	۱٤۷/٥
ضریب تغییرات	–	۳۹/۰۸	ضریب تغییرات		٥۹/۰۹

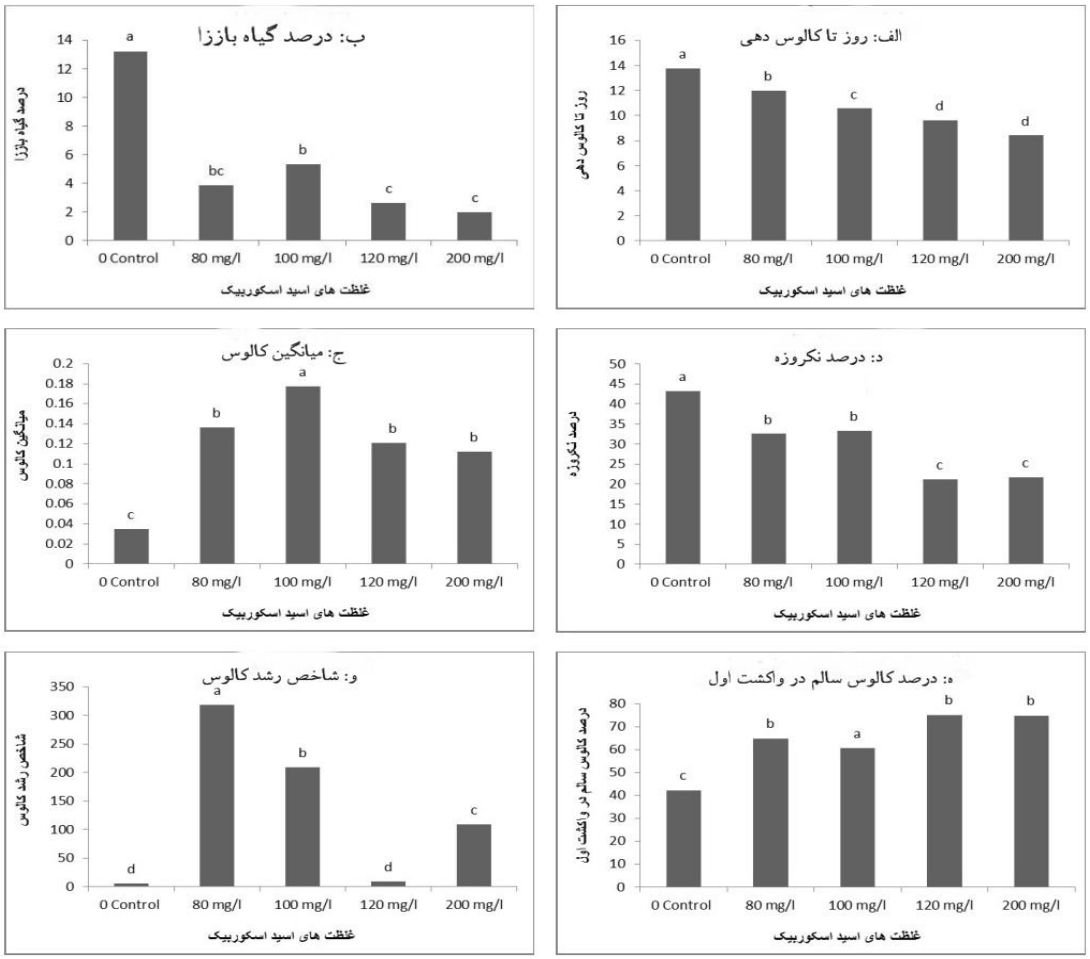
ns، * و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

www.SID.ir

Archive of SID



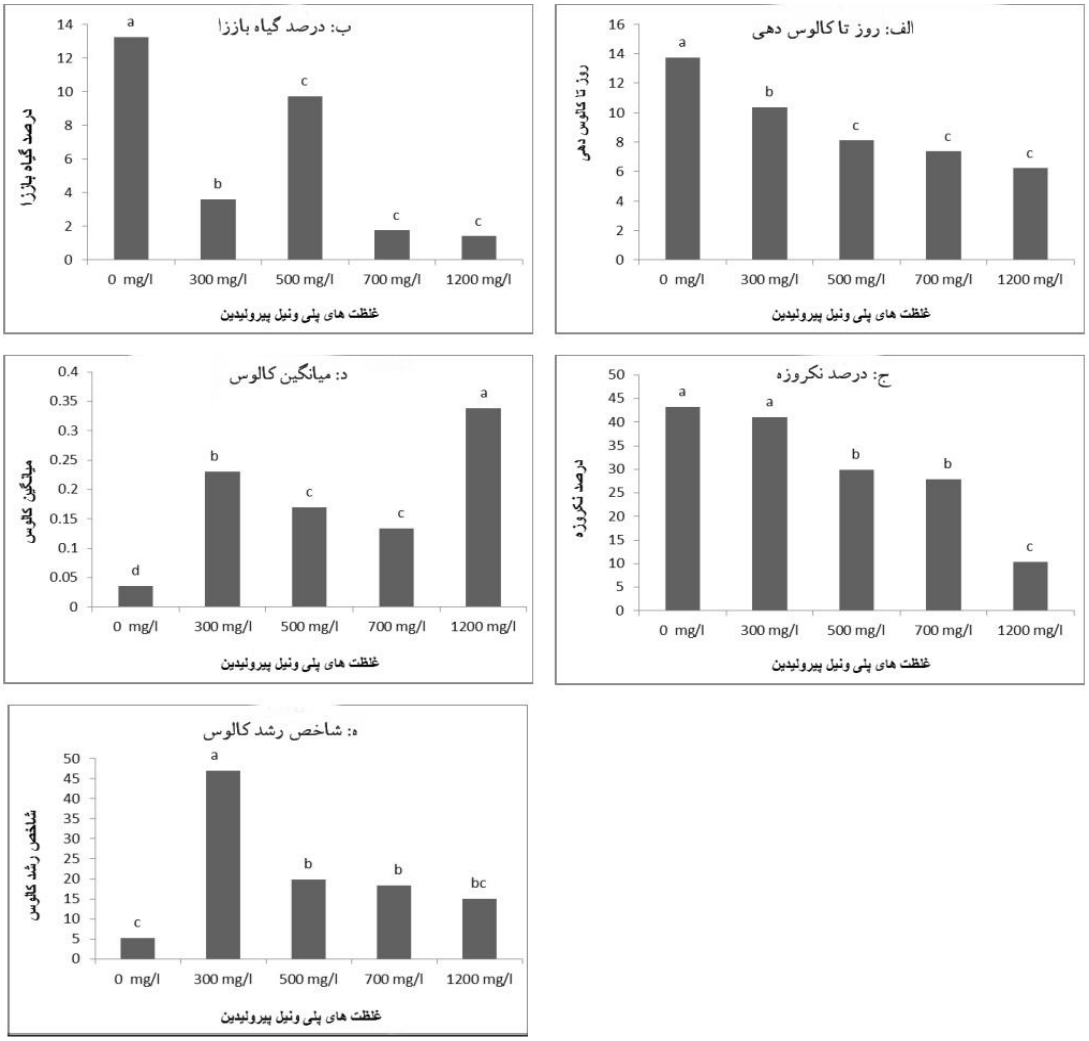
شکل ۱- کالوس حاصل از واکشت دوم در تیمار **PVP** با غلظت ۱۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر در گونه‌های **A**: ***G.uralensis*** و **B**: ***G.glabra***



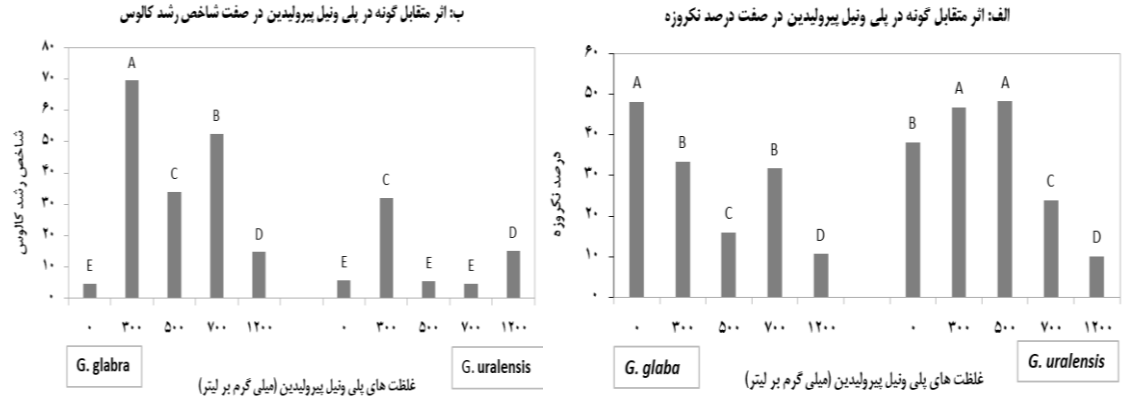
شکل ۲- مقایسه میانگین صفات مورد بررسی در کشت بافت تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسید اسکوربیک: الف. روز تا کالوس‌دهی، ب. درصد گیاه باززا، ج. میانگین کالوس، د. درصد نکروزه، ه. درصد کالوس سالم در واکشت اول، و. شاخص رشد کالوس در کشت سوسپانسیون سلولی

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- مقایسه میانگین صفات مورد بررسی در کشت بافت تیمار شده با غلظت‌های مختلف **PVP**: الف. روز تا کالوس‌دهی، ب. درصد گیاه باززا، ج. درصد نکروزه، د. میانگین کالوس، ه. شاخص رشد کالوس در کشت سوسپانسیون سلولی



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل گونه در **PVP** صفات مورد بررسی در کشت سوسپانسیون سلولی: الف. درصد نکروزه، ب. شاخص رشد کالوس

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

قهوه‌ای شدن یک مشکل عمده بوده که در مطالعات کشت بافت گیاهان دارویی بر محتوای ترکیبات فنلی تأثیر گذاشته و باعث واکنش‌های اکسیداسیون به سمت قهوه‌ای شدن می‌شود. مشکلات عمده در کشت کالوس به علت تغییرات در فعالیت‌های آنزیم‌های فنولاز و پراکسیداز می‌باشد. افزایش فنلاز و کاهش فعالیت پراکسیداز به دلیل اکسیداسیون بیشتر اکسیژن ترکیبات فنلی و عدم دسترسی به سوبسترا برای فعالیت پراکسیداز، فاکتورهای اصلی درگیر در قهوه‌ای شدن بافت کالوس هستند (Jain *et al.*,2008). اساسا" PVP یک ماده غیرمحلول است که معمولا برای حذف مواد فنلی استفاده می‌شود. پیوندهای هیدروژنی PVP پلی فنل را جذب کرده و مقدار آنها را کاهش می‌دهد (Layer ,2003). در این مطالعه از غلظت‌های ۳۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰ و ۱۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر PVP به محیط کشت محتوای دو میلی‌گرم در لیتر BA (بنزیل آمین) و نیم میلی‌گرم در لیتر NAA (نفتالین استیک اسید) استفاده شد و در غلظت ۱۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشترین مقدار کالوس در واکشت سوم در هر دو گونه مشاهده گردید که می‌تواند توجیهی برای وجود ترکیبات بالای مواد فنلی در این دو گونه گیاهی باشد. Ogita (2005) با اضافه کردن ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر PVP توانست بر قهوه‌ای شدن کالوس در محیط کشت غلبه کرده و ارتقای رشد جنین‌های سوماتیکی را در بامبو مشاهده کند، در حالی‌که Pick Kiong و همکاران (2008) با به‌کار بردن یک گرم در لیتر (برابر ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) توانستند از قهوه‌ای و نکروزه شدن کالوس در گیاه *Cycas revoluta* جلوگیری کنند. در کشت سوسپانسیون سلولی نتیجه بعکس بود. به‌طوری‌که با اضافه کردن PVP به محیط کشت به‌ویژه غلظت‌های بالای آن، شاخص رشد کالوس به کمترین مقدار رسید، در حالی‌که اسید اسکوربیک در غلظت‌های ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر دارای بالاترین شاخص رشد کالوس بود (شکل ۲، و، شکل ۳، ه). اضافه کردن PVP به محیط کشت به‌منظور جذب ترکیبات فنلی، نیاز به افزایش غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد را در کشت افزایش می‌دهد، زیرا PVP تنظیم‌کننده‌های رشد موجود در محیط کشت را جذب نموده و سبب کاهش آن می شود (Pick Kiong *et al.*, 2008). در کشت جامد با افزایش غلظت PVP میزان رشد کالوس افزایش و درصد نکروزه و باززایی کاهش یافت. شاید علت تناقض نتایج در کشت جامد و کشت سوسپانسیون سلولی به دلیل این است که در کشت جامد سطح تماس تنظیم‌کننده‌های رشد با PVP کمتر و در نتیجه میزان جذب تنظیم‌کننده‌های رشد توسط PVP کمتر بوده، در حالی‌که در کشت سوسپانسیون سلولی به دلیل اینکه نمونه‌ها در محیط مایع و در شیکر قرار دارند، دارای بالاترین سطح تماس بوده و میزان جذب تنظیم‌کننده‌های رشد توسط PVP به حداکثر مقدار رسیده و در نتیجه رشد کالوس کاهش می‌یابد. تنوع‌پذیری و نفوذپذیری غشا، زمانی‌که سلول‌ها به محیط کشت مایع منتقل می‌شوند، تغییر می‌کند. البته تنش‌های اسمزی و هیدرودینامیکی ناشی از کشت مایع به‌عنوان یکی از علل عمده قهوه‌ای شدن آنزیمی شناخته شده است (Yali *et al.*,2016).

عوامل ضد قهوه‌ای شدن می‌توانند به عوامل کاهش‌دهنده، عوامل کلاته‌کننده، عوامل پیچیده و ممانعت کننده‌های آنزیمی تقسیم‌بندی شوند (Ding *et al.*, 2002). در یک پژوهش از مهارکننده‌های آنزیمی مانند اسید سیتریک، سیستئین و اسید اسکوربیک برای کنترل قهوه‌ای شدن در کشت سوسپانسیون سلولی شیرین‌بیان گونه *G. glabra* استفاده شده و نتیجه گرفتند که اسیدسیتریک هیچ تأثیری در کنترل قهوه‌ای شدن نداشته، درحالی‌که اسید اسکوربیک و سیستئین (با غلظت ۰/۱ میلی مولار) بیشترین ذی‌توده سلولی را بعد از ۲۱ روز داشتند (Yali *et al.*, 2016). نتایج مذکور، با نتایج این تحقیق در کشت سوسپانسیون سلولی و غلظت ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسیداسکوربیک مطابقت داشت. اسیداسکوربیک یک مهارکننده قوی برای جلوگیری از فعالیت آنزیم پراکسیداز بوده و غیرفعال‌سازی آنزیمی کاملی را حتی در غلظت پایین دارا بوده و نیز دارای بیشترین فراوانی ماده شیمیایی استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

شده در کنترل قهوه‌ای شدن می‌باشد (Lopez *et al*.,2010). بنابراین نتایج این تحقیق و Yali و همکاران (2016) نشان می‌دهد که اسید اسکوربیک در غلظت‌های ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر یا ۰/۱ میلی‌مولار در لیتر به‌عنوان بهترین مهار کننده فعالیت آنزیم PPO و افزایش دهنده ذی‌توده سلولی در کشت سوسپانسیون سلولی در شیرین‌بیان گونه *glabra* و *uralensis* می‌باشد. ازاین‌رو اگر هدف افزایش تولید کالوس و کاهش نکروزه و باززایی باشد، توصیه می‌گردد ابتدا در محیط کشت جامد محتوای هزار و دویست میلی‌گرم در لیتر PVP اقدام به تولید کالوس نموده (به شرط واکشت ۲۱ روزه)، آنگاه در صورت نیاز به سوسپانسیون سلولی، این کالوس‌ها در محیط کشت مایع محتوای اسید اسکوربیک ۸۰ یا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کشت گردد.

منابع مورد استفاده

- Amagaya, S., Sugishita, E., Ogihara, Y., Ogawa, S., Okada, K., Aizawa, T., 1984. Comparative studies of the stereoisomers of glycirrhithic acid on anti-inflamatory activities. Journal Pharmacobio-Dynamics و 7 (12): 923-928.
- Christie, S., Walker, A.F., Lewith Flavonoids, G.T., 2001. A new direction for the treatment of fluid retention. Phytother Research, 15: 467-475.
- Cördük, N., Aki, C., 2011. Inhibition of browning problem during micropropagation of Sideritis trojana, an endemic medicinal herb of Turkey. Romanian Biotechnology Letter, 16: 6760–6765.
- Ding, C., Chachin, K., Ueda, Y., 2002. Inhibition of loquat enzymatic browning by sulfhydryl compounds. Food Chemistry, 76:213-218.
- Ghahraman A (1999) Basic Botany: Anatomy and Morphology, Vol. 1. University of Tehran Press. pp: 539.
- Hosseinpanahi, S., Majdi, M., Mirzaghaderi, Gh., (2016). Effects of growth regulators on in vitro callogenesis and regeneration of black cumin (*Nigella sativa*). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 24 (2): 232-242 (In Persian).
- Hosseini,B., Bighamat, A., (2016). Effects of different concentrations of growth regulators and explants type on callus induction, embryogenesis and shoot regeneration of *Origanum vulgare ssp*. Gracile. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 24 (2): 265-276 (In Persian).
- Jain, S., Kharya, M.D., Nayak, S., Barik, R., 2008. Effect of antioxidants on callus browning of *Glycyrrhiza glabra*. Journal of Natural Remedies, 8(1): 44 - 47.
- Khosroushahi, A., Naderi-Manesh, H., Toft Simonsen, H., 2011. Effect of Antioxidants and Carbohydrates in Callus Cultures of *Taxus brevifolia*: Evaluation of Browning, Callus Growth, Total Phenolics and Paclitaxel Production. BioImpacts, 1(1): 37-45.
- Khosravinia, S., Ziaratnia, S.M., Bagheri, A., Marathi, S.H., 2013. Optimization of suitable culture medium and hormone combinations for callus induction and cell suspension culture establishment of *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 21 (2): 163-173(In Persian).
- Layer, O., 2003. Mechanism in plant development. Oxford, UK: Blackwell Science.
- Lopez, J., Uribe, E., Vega-Galvez, A., 2010. Effect of air temperature on drying kinetics, vitamin C, antioxidant activity, total phenolic content, non-enzymatic browning and firmness of blueberries variety O' Neil. Food Bioprocess Technology, 3:772-777.
- Ogita, S., 2005. Callus and cell suspension culture of bamboo plant *Phyllostachys nigra*. Plant Biotechnology, 22(2): 119-125.
- Parsaeimehr, A., Mousavi, B., 2009. Producing Friable Callus for suspension Culture in *Glycyrrhiza glabra*. Advances in Environmental Biology, 3(2): 125-128.
- Pick Kiong, A.N., Shu Thing, Y., Azlan Gansau, J., Sobri, H., 2008. Induction and multiplication of callus from endosperm of *Cycas revolute*. African Journal of Biotechnology, 7 (23): 4279-4284.
- SAS, Institute., 2010. SAS Users Guide; SAS/STAT, Version 9. 4. SAS Inst. Inc. Cary (NC, USA).
- Seki, H., Sawai, S., Ohyama, K., Mizutani, M., Ohnishi, T., 2011. Triterpene Functional Genomics in Licorice for Identification of CYP72A154 Involved in the Biosynthesis of Glycyrrhizin. The Plant Cell, 23: 4112–4123.
- Sharma, R., Singh, S., 2002. Etiolation reduces phenolic content and polyphenol oxidase activity at the pre-culture stage and in vitro exudation of phenols from mango explants. Tropical Agriculture, 79: 94-99.
- Thomas, TD., 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnology Advances, 26(6): 618-631.
- Wongwicha, W., Tanaka, H., Shoyama, Y.,

www.SID.ir

Archive of SID

Tuvshintogtokhd, I., Putalun, W., 2008. Production of Glycyrrhizin in Callus Cultures of Licorice. Zeitschrift Fur Naturforsch, 63c: 413-417.

– Yali, L., Tingting, M., Yuxi, W., Zhang, X., 2016. Study on enzymatic browning in suspension cultures of licorice cells. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 30(2): 277-283.

– Zahedzadeh F., Mahna, N., Kakavan, F., Zaare-Nahandi, F., Panahandeh Yengejeh, J., (2014). Effect of concentration and source of carbohydrate on in vitro production of anthocyanin in apple. Journal of Biotechnology, 5(4): 37-47.

www.SID.ir

Archive of SID

Study of the effect of different antioxidants in reducing the browning of callus and its biomass production in two species of licorice

M. Allahdou[1], M. Omidi[2*], M.R. Bihamta[3], A.R. Abbasi[4], B.A. Fakheri[5]

1-, Ph.D. student, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, University of Tehran. Karaj, I.R. Iran.
2*- Corresponding author, Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, University of Tehran. Karaj, Iran. Corresponding author: momidi@ut.ac.ir
3- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, University of Tehran. Karaj, Iran.
4- Assoc. Prof, Department of Agricultural Biotechnology, University of Tehran. Karaj, I.R. Iran.
5-Professor. Department of Plant Breeding and Biotechnology, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, I.R. Iran.

Received: 27.08.2018 Accepted: 27.04.2019

Abstract

The roots and stolons of *Glycyrrhiza* species constitute one of the most important crude drugs in the world and contain a large amount of glycyrrhizin, an oleanane-type triterpenoid saponin. Tissue culture and callus production in licorice species are prerequisites for studies on secondary metabolites and cell transformation. In order to effect of antioxidant to reduce the browning and growth of callus, was used Ascorbic Acid and PVP in different levels. Also in order to influence these antioxidants in the callus growth index, were cultured both species as cell suspension. Callus was produced from hypocotyl related to two weeks' seedlings. Callus was induced from NAA (0.5 mg/L) and BA hormones (2 mg/L) as well as ascorbic acid and PVP treatments at different concentrations as two separated factorial experiments based on CRD design. The results showed that in consecutive sub culture 1200 mg/L of PVP had the least generation, necrosis and the most callus production in both species. Whereas, in cell suspension, with increasing PVP concentration, was decreased callus growth index and 1200 mg/L PVP has shown the lowest callus growth index in both species. It can be said that PVP absorb NAA and BA hormones in cell suspension and therefore it was reduced concentration of hormones in medium. Ascorbic acid treatment with 80 and 100 mg/L had the highest callus growth index in both species respectively and it is recommended for cell suspension culture in licorice.

Key words: licorice, ascorbic acid, PVP, callus, cell suspension

www.SID.ir