

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

۳۱۵۲۲

# دانشگاه شهید بهشتی

دانشگاه شهید بهشتی

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

۱۳۷۹ / ۱۲ / ۲۰

پایان نامه:

جهت اخذ دانشنامه کارشناسی ارشد (M.Sc) علوم گیاهی  
(گرایش فیزیولوژی)

موضوع:

مطالعه جنین‌زایی سوماتیک گیاه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*) و آنالیز تنوع ترکیبات  
بیوشیمیایی و رشد در کالوس تحت اثر ترکیبات فنلی و اسید جیبرلیک.

استاد راهنما:

سرکار خانم دکتر فرانسواز برنارد

اساتید مشاور:

جناب آقای دکتر حسین شاکر

سرکار خانم مهندس مهناز نصیری

نگارش:

طیبه چراغی

۹۰۹۶

۳۱۵۲۲

الذي جعل لكم الارض مهداً وسلك لكم فيها سبلاً و

انزل من السماء ماء فاخرجنا به اشجاراً من نبات شتى.

همان خدایی که زمین را آسایشگاه شما قرار داد و در آن برای شما راهها کشید و از آسمان آب را نازل کرد تا با آن آب آسمانی انواع گیاهان مختلف را از زمین برویانیم.

سوره طه، آیه ۵۳

صور نجلسه دفاع از پایان نامه تحصیلی دوره کارشناسی ارشد

با تائید ات خداوند متعال و با استعانت از حضرت ولی عصر (عج) جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم طیبه چراغی رشته زیست شناسی گرایش فیزیولوژی گیاهی تحت عنوان: مطالعه جنین زایی سوماتیک گیاه شیرین بیان *Glycyrrhiza glabra* و آنالیز تنوع ترکیبات بیوشیمیایی و رشد در کالوس تحت اثر ترکیبات فنلی و اسید جیبرلیک که در تاریخ ۷/۲/۷۹ با حضور هیات محترم داوران در دانشگاه شهید بهشتی برگزار گردید به شرح زیر است /

قبول (با درجه: عالی) امتیاز: (۱۹,۵)  دفاع مجدد  مردود

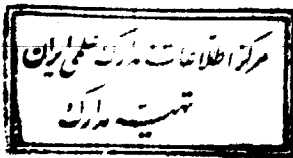
۱- عالی (۱۸-۲۰)

۲- بسیار خوب (۱۶-۱۷/۹۹)

۳- خوب (۱۴-۱۵/۹۹)

۴- قابل قبول (۱۲-۱۳/۹۹)

۵- غیر قابل قبول (کمتر از ۱۲)



عضو هیات داوران نام و نام خانوادگی رتبه علمی امضاء

- |                                 |                      |          |  |
|---------------------------------|----------------------|----------|--|
| ۱- استاد راهنما                 | دکتر فرانسواز برنارد | استادیار |  |
| ۲- استاد مشاور                  | دکتر حسین شاکر       | استادیار |  |
| ۳- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی | دکتر حسین ریاحی      | دانشیار  |  |
| ۴- استاد ممتحن                  | دکتر مه لقا قربانلی  | استاد    |  |
| ۵- استاد ممتحن                  | دکتر دینا عزیزیان    | دانشیار  |  |

محمد مهدی طهرانچی

معاون تحصیلات تکمیلی دانشکده علوم



## تقدیم به:

پدر گرامیم کوه صبر و استقامت.

مادر فداکارم دریای عشق و محبت.

دو موجود مقدسی که توانشان رفت تا من به توانایی رسم.

مویشان سپیدی گرفت تا من روسپید شوم.

باشد که اندک قطره‌ای از دریای زحماتشان جبران شود.

### باتشکر و سپاس از:

سرکار خانم دکتر فرانسواز برنارد و جناب آقای دکتر حسین شاکر که در طول این دوره زحمات بی شائبه و راهنمایی‌های ارزنده ایشان رهگشای راهم بوده‌است. سرکار خانم مهناز نصیری که در آزمایشگاه آنالیتیک شیمی همکاری نمودند. اساتید محترم گروه زیست‌شناسی: آقای دکتر شیدایی، آقای دکتر ریاحی، آقای دکتر سینا، آقای مهندس زهزاد، خانم دکتر عزیزیان، خانم دکتر افتخار، خانم دکتر مالک و خانم دکتر حداد کاوه.

سرکار خانم دکتر مهلقا قربانلی که قبول زحمت کرده و داوری پایان نامه را برعهده دارند. جناب آقای مهندس بهرامی وحدت و خانواده محترمشان که ضمن استفاده از راهنمایی‌های ارزنده ایشان، در طول دوره تحصیل همواره یاریگرم بودند. دوستانی که هر یک به نوعی در این راه زحمت کشیدند: خانمها: بیداری، ارچنگی، سرپوشان، راطبی، بیات، زندی، کویاز، خسروی، فراهانی، مجتهدی، ملکسی و آقایان: کاویانی، کنعانی، سنبلی، مهرگان، عاملی، آقائی و منفرد. و کلیه کارکنان گروه زیست‌شناسی و دانشکده علوم.

## فهرست مطالب

| صفحه                         | عنوان  |
|------------------------------|--|
| ۱                            | مقدمه.....   |
| ۳                            | بررسی سیستماتیک گیاه شیرین بیان <i>Glycyhiza glabra</i> .....    |
| ۳                            | ویژگی های تیره پروانه آسا.....                                   |
| ۴                            | مصارف اقتصادی و کاربردی تیره پروانه آسا.....                     |
| ۵                            | ویژگی های جنس شیرین بیان.....                                    |
| <b>فصل اول: بررسی منابع</b>  |  |
| ۷                            | ۱- بذر و جوانه زنی آن.....                                       |
| ۹                            | ۲- کشت در شیشه <i>in vitro</i> و تولید محصولات گیاهی.....        |
| ۹                            | ۱-۲- کشت <i>in vitro</i> .....                                   |
| ۱۱                           | ۱-۱-۲- بررسی کشت کالوس.....                                      |
| ۱۲                           | ۲-۱-۲- جنین زایی سوماتیک.....                                    |
| ۱۹                           | ۲-۱-۳- ریزاز یادی.....   |
| ۲۱                           | ۲-۲- تولید محصولات گیاهی.....                                    |
| <b>فصل دوم: مواد و روشها</b> |  |
| ۳۶                           | ۱- جوانه زنی بذر.....  |
| ۳۸                           | ۲- کشت بافت.....   |
| ۴۱                           | ۳- ریزاز یادی.....   |
| ۴۱                           | ۴- تیمار با پیش ماده های متابولیکی.....                          |
| ۴۲                           | ۵- اندازه گیری و آنالیزها.....                                   |
| ۴۴                           | ۶- بررسی آماری.....  |
| <b>فصل سوم: نتایج</b>        |  |
| ۴۵                           | ۱- جوانه زنی بذر گیاه شیرین بیان <i>Glycyrrhiza glabra</i> ..... |

- ۲- کشت *in vitro* گیاه شیرین بیان: ..... ۴۶
- ۲-۱- کشت *in vitro* به منظور تولید کالوس: ..... ۴۶
- ۲-۲- کشت *in vitro* به منظور جنین زایی سوماتیک ..... ۵۰
- ۲-۳- عمل ریزازیادی در گیاه شیرین بیان ..... ۶۲
- ۳- اثر تیمارهای شیمیایی مختلف بر رشد کالوس در کشت بافت گیاه شیرین بیان ..... ۶۶
- ۳-۱- اثر برخی ترکیبات آروماتیک بر میزان رشد کالوس ..... ۶۶
- ۳-۲- اثر اسید جیبرلیک بر میزان رشد کالوس ..... ۷۳
- ۴- اثر تیمارهای شیمیایی مختلف بر تجمع ترکیبات فنلی کل در کشت بافت شیرین بیان ..... ۷۵
- ۴-۱- اثر برخی ترکیبات آروماتیک بر تجمع ترکیبات فنلی کل ..... ۷۵
- ۴-۲- اثر اسید جیبرلیک بر تجمع ترکیبات فنلی کل ..... ۸۲
- ۵- اثر تیمارهای شیمیایی مختلف بر تجمع آنتوسیانین در کشت بافت شیرین بیان ..... ۸۴
- ۵-۱- اثر برخی ترکیبات آروماتیک بر تجمع آنتوسیانین ..... ۸۴
- ۵-۲- اثر اسید جیبرلیک بر تجمع آنتوسیانین ..... ۹۰
- ۶- اثر تیمارهای شیمیایی مختلف بر سنتز پروتئین در کشت بافت شیرین بیان ..... ۹۲
- ۶-۱- اثر برخی ترکیبات آروماتیک بر سنتز پروتئین ..... ۹۲
- ۶-۲- اثر اسید جیبرلیک بر سنتز پروتئین ..... ۹۹

#### فصل چهارم: بحث

- ۱- بررسی جوانه زنی بذر گیاه شیرین بیان *Glycyrrhiza glabra* ..... ۱۰۱
- ۲- بررسی کشت *in vitro* گیاه شیرین بیان *Glycyrrhiza glabra* ..... ۱۰۲
- ۲-۱- بررسی تولید کالوس در محیط *in vitro* ..... ۱۰۲
- ۲-۲- بررسی کشت کالوس به منظور تولید جنین رویشی ..... ۱۰۳
- ۲-۳- بررسی عمل ریزازیادی در گیاه شیرین بیان ..... ۱۰۵
- ۳- بررسی سنتز متابولیت‌های ثانویه در کالوس شیرین بیان ..... ۱۰۶



- ۱-۳-۱- بررسی تأثیر ترکیبات فنلی بر رشد، تجمع برخی متابولیت‌های ثانویه و سنتز پروتئین... ۱۰۸
- ۱-۳-۱-۱- بررسی اثر اسید سالیسیلیک..... ۱۰۸
- ۱-۳-۱-۲- بررسی اثر اسید کافئیک..... ۱۱۱
- ۱-۳-۱-۳- بررسی اثر کومارین..... ۱۱۱
- ۱-۳-۲- بررسی اثر اسید جیبرلیک بر رشد، تجمع برخی متابولیت‌های ثانویه و سنتز پروتئین. ۱۱۳

---

## **Abbreviations:**

**P.E.D.C** : Pre Embryo Determination Cell.

**I.E.D.C** : Induce Embryo Determination Cell.

**MS**: Murashige and Skoog.

**B<sub>5</sub>** : Gamborg's Medium.

**BAP** : 6-Benzyl Amino Purin.

**ABP** : Auxin Binding Protein.

**2,4.D** : Dichlorophenoxy Acetic Acid.

**B.S.A**: Bovin Serum Albumin.

**SA**: Salicylic Acid.

**CA** : Caffeic Acid (3,4 Dihydroxy cinnamic acid).

**Cum** : Coumarin.

**GA**: Gibberellic Acid.

**SAR** : Systemic Acquired Resistance.

**PR** : Pathogenesis - Related.

**PAL** : Phenylalanine Ammonia Lyase.

**4 CL** : 4- Coumarate CoALigas.

**C<sub>4</sub>H** : Cinnamate - 4- Hydroxylase.

**XMT** : Antho toxol( - 0 - methy) transferase.

**IAA** : Indol Acetic Acid.

**Kin** : Kinetin (6- Furfuryl amino purin)

**HIV** : Human Immonodeficiency Virus.

**EDTA** : Ethylene Diamin Tetra actic Acid.

## چکیده فارسی:

مطالعه جنین‌زایی سوماتیک گیاه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*) و آنالیز تنوع رشد و ترکیبات

بیوشیمیایی در کالوس تحت اثرات ترکیبات فنلی و اسید جیبرلیک.

کالوس شیرین بیان از لپه و هیپوکوتیل کشت شده روی محیط MS حاوی ویتامین‌های

گمبورگ تولید گردید. ریزا زیادی در شرایط هورمونی انجام شد.

جنین کروی از دمبرگ کشت شده روی محیط گمبورگ تولید شد. شوک اکسین (۲۵ میلی‌گرم

در لیتر به مدت ۵/۵ ساعت) تولید جنین کروی را در اولین مرحله از جنین‌زایی سوماتیک

تحریک نمود.

اضافه کردن تیمارهای اسید سالیسیلیک، اسید کافئیک کومارین و اسید جیبرلیک در غلظت‌های

مختلف (۵/۵، ۵، ۲۵ و ۱۰۰ میکرومولار) به بافت گیاه شیرین بیان اثرات قابل توجهی بر رشد

کالوس و تولید متابولیت‌های ثانویه و پروتئین‌ها داشت.

در برخی از تراکم‌های تیمارهای اسید سالیسیلیک، کومارین، اسید کافئیک افزایش ترکیبات

فنلی کل مشاهده گردید.

تیمار با اسید سالیسیلیک و اسید کافئیک در برخی از تراکم‌ها سطح آنتوسیانین را افزایش و

تیمار با کومارین تجمع آنتوسیانین را کاهش داد.

تیمار با اسید سالیسیلیک و اسید کافئیک (در تراکم‌های ۵ و ۱۰۰ میکرومولار) و اسید جیبرلیک

(در تراکم‌های ۲۵ و ۱۰۰ میکرومولار) رشد کالوس را افزایش و تیمار با کومارین (در تراکم‌های

۵ و ۵/۵ میکرومولار) باعث کاهش در رشد کالوس گردید.

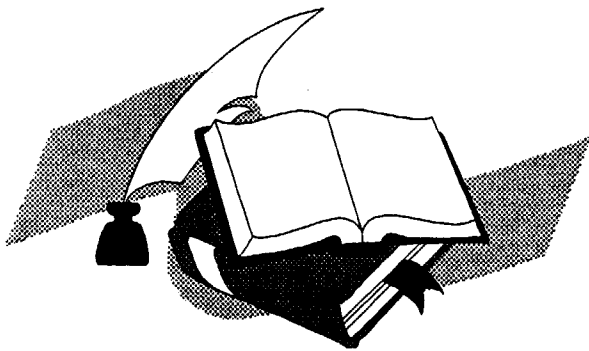
تمام تیمارها (اسید سالیسیلیک، اسید کافئیک، کومارین و اسید جیبرلیک) در تراکم‌های

مختلف سنتز پروتئین‌ها را افزایش دادند.

کلمات کلیدی: اسید سالیسیلیک، کومارین، اسید کافئیک، اسید جیبرلیک، ترکیبات فنلی کل،

رشد، آنتوسیانین، پروتئین، ریزا زیادی، جنین‌زایی سوماتیک، شیرین بیان.

۱۰۰۰



## مقدمه:

دیر زمانی است که انسان از مشتقات ژنتیکی گیاهان وحشی به عنوان غذا، سوخت، مواد ساختمانی و ترکیبات دارویی مصرف میکند. کم کم با اهلی کردن بیشتر گیاهان، وابستگی انسان به آنها بیشتر شده و این مسأله منجر به پیشرفت عملیات‌هایی مثل انتخاب، زادآوری و غیره گردید.

محصولات گیاهی مفید برای انسان گاهی متابولیت‌های اولیه و گاهی متابولیت‌های ثانویه هستند که اغلب متابولیت‌های ثانویه برای مصارف صنعتی، دارویی، طعم غذا، تهیه مواد رنگی و خوشبو کننده مصرف می‌شوند.

تولید این ترکیبات در گذشته منحصر به استخراج از گیاهان میشد که به علت تردید در ذخیره و ناپایداری مواد خام در بسیاری از موارد بوسیله سنتز شیمیایی جایگزین گردید. اما بسیاری از این ترکیبات دارای ساختمان پیچیده و ملگول‌هایی هستند که مشکل بدست می‌آیند و یا سنتز آنها غیر ممکن است. طوری که در حال حاضر حدود ۲۵٪ از نسخه‌های بیماران در امریکا از موادی که از گیاهان عالی بدست می‌آید، می‌باشد با توجه به موارد ذکر شده تهیه این گونه متابولیت‌ها توجه زیست شناسان را به خود جلب کرد.

امکان تولید متابولیت‌های ثانویه مفید در کشت سلول برای اولین بار در سال ۱۹۷۰ شناخته شد و تعدادی از محققان در مجامع صنعتی و علمی تلاش کردند تا پتانسیل تولید سلول گیاهی را برای بدست آوردن محصولات تجارتي افزایش دهند. اگر چه پس از پانزده سال تلاش، اکنون محصولات تولید شده در تجارت باز هم از نظر تعداد محدود هستند و نیاز به تحقیق و بررسی‌های بیشتری دارد.

عوامل متعددی باعث کندی توسعه کاربرد کشت سلول و بافت در صنایع تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شوند و به عنوان نمونه میتوان از پایین بودن سرعت رشد اکثر بافتهای کشت شده و میزان کم بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در آنها در مقایسه با گیاهان طبیعی، نام برد.

در این تحقیق هدف ما کشت بافت گیاه شیرین بیان *Glycyrrhiza glabra* ، تنظیم رشد *in vitro* و بررسی تنوعات برخی از متابولیت‌های ثانویه از قبیل ترکیبات فنلی کل (Total phenolic) و آنتوسیانین تحت شرایط مختلف محیطی می‌باشد.

### بررسی سیستماتیکی گیاه شیرین بیان *Glycyrrhiza glabra*:

گیاه شیرین بیان از شاخه اسپریماتوفیت، زیرشاخه نهاندانگان، رده دولپه‌ایها، زیررده جداگلبرگهای کالسی فلور، راسته رزال در تیره *Papilionaceae* یا پروانه آسا قرار دارد.



عکس شماه ۱: گیاه شیرین بیان در منطقه‌ای از شهرستان آباده.

### ویژگی‌های تیره پروانه آسا (*papilionaceae*):

گیاهان این تیره اغلب علفهای یکساله یا پایا، چند ساله و یا درختچه‌های کوچک و یا درختانی بلند هستند که معمولاً در مناطق معتدل و سرد پراکنده شده‌اند. برگها متناوب و مرکب شانه‌ای و گوشوارک‌دار هستند.