بسم الله الرحمن الرحيم

١١٠٧٦٩

۸۷/۱/۱۰۷۲۷۳
۸۷/۱۲/۲۱

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه ی دکتری رشته زیست شناسی - فیزیولوژی گیاهی

بررسي اثرات سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر تولید گلیسیریزین و بیان دو ژن SQS و bAS در کشت ریشه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.)

استاد راهنما

دکتر علی اکبر احسان پور

استاد مشاور

دکتر غلامرضا اصغری

پژوهشگر

لیلا شبانی

مهرماه ۱۳۸۷

۱۳۸۷ /۱۲/۲۱

۱۱۰۷۶۹

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات
و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان
نامه متعلق به دانشگاه اصفهان است.

شیوه نگارش پایان نامه
رعایت شده است
تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه دکتری رشته زیست شناسی -- فیزیولوژی گیاهی خانم لیلا شبانی

تحت عنوان

بررسی اثرات سالیسیلیک اسید و متیل ژاسمونات بر تولید گلیسیریزین و بیان دو ژن SQS و bAS در کشت ریشه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.)

در تاریخ توسط هیات داوران زیر بررسی و با درجه به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای پایان نامه	دکتر علی اکبر احسان پور	با مرتبه علمی دانشیار	امضاء
۲- استاد مشاور پایان نامه	دکتر غلامرضا اصغری	با مرتبه علمی دانشیار	امضاء
۳- استاد داور داخل گروه	دکتر سید مجید قادریان	با مرتبه علمی دانشیار	امضاء
	دکتر منصور شریعتی	با مرتبه علمی دانشیار	امضاء
۴- استاد داور خارج گروه	دکتر فائزه قناتی	با مرتبه علمی دانشیار	امضاء
	دکتر فریبا امینی	با مرتبه علمی استادیار	امضاء

امضای مدیر گروه: دکتر سید مجید قادریان

چکیده

تحریک سلول های گیاهی با مواد شیمیایی موسوم به الیسیتور ها (الیسیتیشن) راهکاری موثر برای افزایش تولید متابولیت های ثانویه مانند ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و فیتوآلکسین ها محسوب می شود. تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی ناشی از الیسیتیشن سلول های گیاهی که عموما با مطالعه رشد گیاه، پروتئین ها، ترکیبات فنلی، آنزیم های آنتی اکسیدانت و تغییراتی که در سطوح بیان ژن های درگیر در مسیرهای بیوسنتزی مربوطه ارزیابی می شوند، همواره مورد توجه محققین قرار داشته و این اطلاعات می تواند به تجزیه و تحلیل نقش الیسیتورها در تولید متابولیت های ثانویه و درک مکانیسم های آنها کمک کند. گیاه شیرین بیان از خانواده لگوم ها، منبعی غنی از ترکیبات ثانویه مفید گیاهی همچون ساپونین تری ترپن ها و ترکیبات فنولیک می باشد. با وجود اهمیت زیاد این ترکیبات گیاهی، اطلاعات اندکی درمورد بیوسنتز آنها وجود دارد. در این تحقیق، به منظور بررسی اثرات متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر تولید گلیسیریزین و بیان ژن های دخیل در بیوسنتز آن (اسکوالن سنتاز و بتا آمیرین سنتاز) در گیاه شیرین بیان در شرایط این ویترو، تغییرات رشد و بعضی از شاخص های بیوشیمیایی مانند فعالیت های آنزیم های آنتی اکسیدانت و الگوی پروتئینی و همچنین تغییرات میزان متابولیت های ثانویه و بیان ژن های مسیر بیوسنتز آنها بررسی گردید. تیمار با متیل جاسمونات تولید گلیسیریزین را در ریشه ها با ممانعت رشد آنها در مدت ۲۴ ساعت در غلظت های ۰/۱، ۱ و ۲ میلی مولار متیل جاسمونات نسبت به کنترل افزایش داده بود در حالی که سالیسیلیک اسید بدون هیچ تاثیر منفی بر رشد باعث افزایش گلیسیریزین در مدت ۲۴ ساعت در غلظت های ۰/۱ و ۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید در ریشه ها شد. همچنین الیسیتیشن با این دو ترکیب تغییراتی در میزان فعالیت آنزیم های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پروتئین های محلول، ترکیبات فنولیک کل، فلاونوئید های کل و آنزیم فنیل آلانین آمونیو لیاز ایجاد نمود. افزایش فعالیت آنزیم های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در تیمار با متیل جاسمونات در اندام هوایی گیاهچه ها، ۲۴ ساعت پس از تیمار با غلظت ۲ میلی مولار و در ریشه ها در غلظت ۱و ۲ میلی مولار در ۴۸ ساعت پس از تیمار مشاهده گردید. میزان فعالیت آنزیم های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در اندام هوایی در تیمار با غلظت های ۱ و ۲ میلی مولار سالیسیلیک اسید پس از ۲۴ ساعت افزایش یافت. همچنین فعالیت این آنزیم ها در ریشه پس از ۲۴ ساعت الیسیتیشن با سالیسیلیک اسید افزایش نشان داد، با گذشت ۴۸ ساعت فعالیت کاتالاز در تمام غلظت های سالیسیلیک اسید و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در غلظت های ۱ و ۲ میلی مولار این ترکیب کاهش نشان داد. تیمار با متیل جاسمونات یا سالیسیلیک اسید موجب اندکی افزایش در محتوای پروتئین محلول در برگ ها می شود. محتوای پروتئین کل اندام هوایی ۲۴ ساعت پس از تیمار با غلظت های ۱ و ۲ میلی مولار متیل جاسمونات و سالیسلیک اسید افزایش نشان می دهد. همچنین محتوای پروتئین ریشه ها در گیاهچه های تیمار شده با غلظت های ۱ و ۲ میلی مولار متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید ۲۴ ساعت بعد از تیمار افزایش نشان داد، در حالی که با گذشت زمان محتوای پروتئین در غلظت ۲ میلی مولار هر دو الیسیتور کاهش یافت. نتایج حاصل از آنالیز کیفی پروتئین ها نیز نشان داد که پس از گذشت ۲۴ ساعت تیمار گیاهچه ها با متیل جاسمونات تراکم باندهای پروتئینی با وزن مولکولی ۴۵ و ۹۰ کیلو دالتون هم در اندام هوایی و هم در ریشه ها افزایش می یابد. در ریشه گیاهچه های تیمار شده با سالیسیلیک اسید نیز افزایش تراکم باندهای ۴۵، ۵۵ و ۹۰ کیلو دالتونی مشاهده شد. در این تحقیق تجمع مشابه ای در تولید گلیسیریزین، ترکیبات فنولیک کل و فلاونوئیدها بعد از ۲۴ ساعت الیسیتیشن با متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید مشاهده شد. همچنین فعالیت آنزیم کلیدی مسیر فنیل پروپانوئید، فنیل آلانین آمونیو لیاز به طور موقتی ۲۴ ساعت پس از الیسیتیشن با هر دو الیسیتور افزایش نشان داد که در توافق با افزایش معنی دار مقدار ترکیبات فنولیک کل و فلاونوئید ها پس از ۲۴ ساعت الیسیتیشن می باشد. نتایج حاصل از

Real time PCR نیز نشان داد که مقادیر رونوشت آنزیم اسکوالن سنتاز پس از ۲۴ ساعت تیمار با تمام غلظت های متیل جاسمونات و غلظت های۰/۱ و ۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید افزایش نشان می دهد. به طور مشابه بیان ژن بتا آمیرین سنتاز نیز در ۲۴ ساعت تیمار با غلظت های ۰/۱، ۱ و ۲ میلی مولار متیل جاسمونات و غلظت های ۰/۱ و ۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید افزایش موقتی نشان می دهد. نهایتا، نتایج بخش real time PCR نشان داد که تغییرات معنی داری که در میزان بیوسنتز گلیسیریزین بوجود آمده، از تغییرات اندکی در بیان رونوشت ژن های کد کننده آنزیم های کلیدی مسیر بیوسنتز ساپونین ها (bAS, SQS) بدست آمده است، لذا افزایش بیان این ژن های کلیدی نوید بخش تولید گلیسیریزین بیشتر خواهد بود. غلظت های ۰/۱، ۱ و ۲ میلی مولار متیل جاسمونات و غلظت های ۰/۱ و ۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید افزایش موقتی نشان می دهد. نهایتا، نتایج بخش real time PCR نشان داد که تغییرات معنی داری که در میزان بیوسنتز گلیسیریزین بوجود آمده، از تغییرات اندکی در بیان رونوشت ژن های کد کننده آنزیم های کلیدی مسیر بیوسنتز ساپونین ها (bAS, SQS) بدست آمده است، لذا افزایش بیان این ژن های کلیدی نوید بخش تولید گلیسیریزین بیشتر خواهد بود.

کلید واژه: شیرین بیان، گلیسیریزین، متیل ژاسمونات، سالیسیلیک اسید، اسکوآلن سنتاز، بتاآمیرین سنتاز.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه ۱

۱-۱: خصوصیات گیاه شناسی شیرین بیان ۱

۱-۱-۱: تاکسونومی و ریخت شناسی ۱

۱-۱-۲: پراکنش شیرین بیان ۲

۱-۱-۳: وضعیت گیاه شیرین بیان در ایران ۳

۱-۱-۴: اهمیت گیاه شیرین بیان ۴

۱-۲: فیتوشیمی گیاه شیرین بیان ۴

۱-۲-۱: متابولیت های گیاهان ۴

۱-۲-۲: گیاهان به عنوان منبع متابولیت های ثانویه با ارزش ۵

۱-۲-۳: ترکیبات شیمیایی شیرین بیان و اثرات درمانی آن ۶

۱-۲-۳-۱: فلاونوئیدها ۶

۱-۲-۳-۲: کومارین ها ۷

۱-۲-۳-۳: روغن های فرار ۷

۱-۲-۳-۴: تری ترپنوئیدها ۸

۱-۲-۳-۵: سایر ترکیبات ۸

۱-۲-۴ خواص دارویی شیرین بیان ۸

۱-۲-۵: ترپنوئید ها ۱۰

۱-۲-۵-۱: گلیسیریزین ۱۲

۱-۳: متابولیسم ثانویه گیاهان و پاسخ دفاعی ۱۳

۱-۳-۱: مفهوم الیسیتور ۱۳

۱-۳-۲: طبقه بندی الیسیتورها ۱۳

۱-۳-۳: فاکتورهای موثر بر الیسیتیشن ۱۴

۱-۳-۴: اختصاصی بودن الیسیتور ۱۴

۱-۳-۵: غلظت الیسیتور و فواصل تیمار ۱۵

۱-۳-۶: شرایط کشت: مرحله رشد، ترکیب محیط، نور ۱۶

۱-۳-۷: اثرات الیسیتیشن بر انتقال و ذخیره متابولیت های ثانویه ۱۶

۱-۴: متیل جاسمونات ۱۷

۱-۵: سالیسیلیک اسید ۲۰

۱-۶: مکانیسم مولکولی عمل الیسیتورها بر متابولیسم ثانویه: انتقال سیگنال ۲۲

۱-۶-۱: رسپتورهای الیسیتور گیاه ۲۲

۱-۷: کشت درشیشه گیاه شیرین بیان ۲۲

۱-۷-۱: افزایش متابولیت های ثانویه گیاه شیرین بیان در کشت در شیشه ۲۳

۱-۸: اهمیت و اهداف این تحقیق ۲۴

عنوان | صفحه

فصل دوم: مطالعه پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه شیرین بیان تحت تنش الیسیتیشن..... ۲۶

۲-۱: مطالعه شاخص رشد گیاهان تحت تنش الیسیتیشن ۲۶
۲-۲: مطالعه آنزیم های آنتی اکسیدانت ۲۸
۲-۲-۲: اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت ۲۹
۲-۲-۳: اثر متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت ۳۳
۲-۳: مطالعه پروتئین ها ۳۵
۲-۴: اهداف ۳۷
۲-۵: مواد و روش ها ۳۷
۲-۵-۱: مطالعه رشد تحت تنش الیسیتیشن ۳۷
۲-۵-۱-۱: ماده گیاهی ۳۷
۲-۵-۱-۲: کشت بذر و رشد گیاه ۳۸
۲-۵-۱-۳: تیمار گیاهچه ها با متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید ۳۸
۲-۵-۱-۴: اندازه گیری وزن خشک گیاه ۳۹
۲-۵-۲: مطالعه فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت ۳۹
۲-۵-۲-۲: استخراج عصاره آنزیمی ۳۹
۲-۵-۲-۳: اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز ۴۰
۲-۵-۲-۴: اندازه گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ۴۰
۲-۵-۳: مطالعه کمی و کیفی پروتئین ها ۴۱
۲-۵-۳-۱: مواد گیاهی ۴۱
۲-۵-۳-۲: استخراج پروتئین ۴۱
۲-۵-۳-۳: تعیین غلظت پروتئین ها ۴۱
۲-۵-۳-۴: الکتروفورز پروتئین ها ۴۲
۲-۵-۴: آنالیزهای آماری در این فصل ۴۴
۲-۶: نتایج ۴۴
۲-۶-۱: درصد جوانه زنی بذرها ۴۴
۲-۶-۲: انتخاب بهترین جمعیت ۴۵
۲-۶-۳: تاثیر متیل جاسمونات بر رشد اندام هوایی و ریشه ها ۴۶
۲-۶-۴: تاثیر سالیسیلیک اسید بر رشد اندام هوایی و ریشه ها ۴۸
۲-۶-۵: تاثیر متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم کاتالاز ۴۹
۲-۶-۶: اثر متیل جاسمونات بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز ۵۰
۲-۶-۷: اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت کاتالاز ۵۲
۲-۶-۸: اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز ۵۴
۲-۶-۹: اثر سالیسیلیک اسید بر ممانعت آنزیم های آنتی اکسیدانت ۵۶
۲-۶-۱۰: مطالعه کمی پروتئین ها ۵۷

عنوان | صفحه

۲-۶-۱۰-۱: اثر متیل جاسمونات بر میزان پروتئین محلول کل ۵۷
۲-۶-۱۰-۲: اثر سالیسیلیک اسید بر میزان پروتئین محلول کل ۵۹
۲-۶-۱۰-۳: مطالعه کیفی پروتئین ها ۶۱
۲-۶-۱۰-۴: تاثیر متیل جاسمونات بر تغییر الگوی پروتئین ها ۶۱
۲-۶-۱۰-۵: تاثیر سالیسیلیک اسید بر کیفیت پروتئین ها ۶۴
۲-۷: بحث ۶۵
۲-۷-۱: اثر متیل جاسمونات بر رشد ۶۵
۲-۷-۲: اثر سالیسیلیک اسید بر رشد ۶۷
۲-۷-۳: اثر متیل جاسمونات بر فعالیت های آنزیم های آنتی اکسیدانت ۶۹
۲-۷-۴: اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت های آنزیم های آنتی اکسیدانت ۷۰
۲-۷-۵: ممانعت فعالیت آنزیم های تجزیه کننده H_2O_2 توسط سالیسیلیک اسید ۷۱
۲-۷-۶: اثر متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر کمیت و کیفیت پروتئین ها ۷۳

فصل سوم: اثر متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر برخی متابولیت های ثانویه در شیرین بیان ۷۶

۳-۱: تولید گلیسیریزین ۷۶
۳-۱-۱: مقدمه ۷۶
۳-۱-۲: اهمیت تولید گلیسیریزین در شیرین بیان ۷۷
۳-۲: بررسی ترکیبات فنولیک ۷۹
۳-۳: اهداف ۸۲
۳-۴: آنالیز های آماری در این فصل ۸۳
۳-۵: مواد و روش ها ۸۳
۳-۵-۱: مواد گیاهی ۸۳
۳-۵-۲: استخراج گلیسیریزین ۸۴
۳-۵-۲-۱: عصاره گیری نمونه ها ۸۴
۳-۵-۲-۲: تهیه محلول استاندارد ۸۴
۳-۵-۲-۳: تعیین کیفی گلیسیریزین با کروماتوگرافی لایه نازک (Thin Layer Chromatography) ۸۴
۳-۵-۲-۴: خالص سازی گلیسیریزین با کروماتوگرافی لایه نازک ۸۵
۳-۵-۲-۵: تعیین میزان گلیسیریزین با روش HPLC ۸۵
۳-۵-۳: ترکیبات فنولیک کل ۸۶
۳-۵-۳-۱: تهیه محلول استاندارد ۸۶
۳-۵-۴: فلاونوئید ۸۶
۳-۵-۴-۱: تهیه محلول استاندارد ۸۷
۳-۵-۵: اندازه گیری فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیو لیاز ۸۷
۳-۵-۵-۱: محلول عصاره گیری ۸۷

عنوان | صفحه

۳-۵-۵-۲: روش استخراج ۸۷
۳-۵-۵-۳: فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیو لیاز ۸۸
۳-۶: نتایج ۸۸
۳-۶-۱: تعیین کیفی و خالص سازی گلیسیریزین با روش TLC ۸۸
۳-۶-۲: منحنی استاندارد گلیسیریزین ۹۰
۳-۶-۳: بررسی میزان گلیسیریزین در گیاهچه های شیرین بیان ۹۰
۳-۶-۳-۱: تاثیر متیل جاسمونات بر میزان گلیسیریزین در ریشه های شیرین بیان ۹۰
۳-۶-۳-۲: اثر سالیسیلیک اسید بر میزان گلیسیریزین در ریشه های شیرین بیان ۹۲
۳-۶-۴: اثر متیل جاسمونات بر میزان ترکیبات فنولیک کل ۹۳
۳-۶-۵: اثر متیل جاسمونات بر میزان فلاونوئیدها ۹۴
۳-۶-۶: اثر متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیو لیاز ۹۵
۳-۶-۷: تاثیر سالیسیلیک اسید بر میزان ترکیبات فنولیک کل ۹۶
۳-۶-۸: اثر سالیسیلیک اسید بر میزان فلاونوئیدها ۹۷
۳-۶-۹: اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیو لیاز ۹۸
۳-۷: بحث ۹۹
۳-۷-۱: اثر متیل جاسمونات بر تولید گلیسیریزین ۹۹
۳-۷-۲: اثر سالیسیلیک اسید بر تولید گلیسیریزین ۱۰۱
۳-۷-۳: اثر متیل جاسمونات بر میزان ترکیبات فنولیک کل ۱۰۴
۳-۷-۴: اثر سالیسیلیک اسید بر تجمع ترکیبات فنولیک کل ۱۰۴
۳-۷-۵: اثر متیل جاسمونات بر میزان فلاونوئید کل ۱۰۵
۳-۷-۶: اثر سالیسیلیک اسید بر میزان فلاونوئید کل ۱۰۶
۳-۷-۷: اثر متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیو لیاز ۱۰۶
۳-۷-۸: اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیو لیاز ۱۰۷

فصل چهارم: مطالعه ملکولی بیان ژن ها (پروفایل رونویسی دو ژن SQS و BAS) ۱۰۹

۴-۱: مقدمه (تری ترپنوئیدها) ۱۰۹
۴-۲: مسیر بیوسنتزی تری ترپن ها ۱۱۰
۴-۳: کشت بافت و الیسیتیشن ۱۱۲
۴-۴: اهداف ۱۱۵
۴-۵: آنالیز های آماری در این فصل ۱۱۶
۴-۶: مواد و روش ها ۱۱۶
۴-۶-۱: مواد گیاهی ۱۱۶
۴-۶-۲: استخراج RNA ۱۱۶
۴-۶-۳: بررسی کمیت و کیفیت RNA ۱۱۷

عنوان | صفحه

۴-۶-۳-۱: بررسی کمی (اسپکتروفتومتری Spectrophometry) ۱۱۷
۴-۶-۳-۲: تعیین کیفیت RNA ۱۱۷
۴-۶-۴: واکنش Reverse transcription (سنتز cDNA) ۱۱۸
۴-۶-۵: Real-time PCR ۱۱۹
۴-۶-۵-۱: طراحی پرایمر برای SQS, bAS ۱۱۹
۴-۶-۵-۲: رسم منحنی استاندارد ۱۲۰
۴-۶-۵-۳: واکنش زنجیره ای پلیمراز Real-Time (Real-time PCR reaction) ۱۲۰
۴-۶-۵-۶: آنالیز منحنی استاندارد Relative standard curves and melting curve analysis ۱۲۲
۴-۷: نتایج ۱۲۳
۴-۷-۱: استخراج RNA ۱۲۳
۴-۷-۲: اختصاصی بودن و میزان کارایی (Efficiency) پرایمرها ۱۲۴
۴-۷-۳: واکنش Real-Time PCR ۱۲۷
۴-۷-۳-۱: اندازه گیری بیان ژن bAS ۱۲۸
۴-۷-۳-۲: اندازه گیری بیان ژن SQS ۱۳۱
۴-۸: بحث ۱۳۶
الف- تاثیر متیل جاسمونات بر بیان ژن SQS ۱۳۷
ب- تاثیر متیل جاسمونات بر بیان ژن bAS ۱۳۸
ج- تاثیر سالیسیلیک اسید بر بیان ژن SQS ۱۳۹
د- تاثیر سالیسیلیک اسید بر بیان ژن bAS ۱۴۰

فصل پنجم: نتیجه گیری کلی ۱۴۱

۵-۱: تاثیر متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر رشد ۱۴۱
۵-۲: تاثیر متیل جاسمونات بر تجمع گلیسیریزین ۱۴۲
۵-۳: تاثیر سالیسیلیک اسید بر تجمع گلیسیریزین ۱۴۳
۵-۴: الگوی رشد و تولید گلیسیریزین ۱۴۳
۵-۵: ارتباط میان ترکیبات فنولیک، فلاونوئید ها و گلیسیریزین ۱۴۴
۵-۶: رشد و آنتی اکسیدانت ۱۴۵
۵-۷: ارتباط ترکیبات فنولیک و آنتی اکسیدانت ها ۱۴۵
۵-۸: پروتئین ۱۴۶
۵-۹: بیان ژن های اسکوالن سنتاز و بتاآمیرین ۱۴۷
پیشنهادات ۱۴۹

پیوست ها ۱۵۰

۶-۱: ترکیب محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) ۱۵۰

عنوان | صفحه

۶-۲: دستورالعمل های مربوط به فصل دوم بخش اندازه گیری کمی پروتئین ۱۵۱
۶-۳: دستور العمل های تهیه محلول های مورد نیاز الکتروفورز پروتئین ها ۱۵۳
۶-۴: کروماتوگرام های مربوط به گلیسیریزین ۱۵۷
۶-۵: دستور العمل های تهیه ژل الکتروفورز RNA و DNA ۱۷۲
۶-۵-۱: ژل الکتروفورز RNA ۱۷۲
۱-۵-۶-۱: محلول های مورد استفاده برای عمل الکتروفورز ۱۷۲
۶-۵-۲: ژل الکتروفورز DNA ۱۷۳
منابع و ماخذ ۱۷۴

فهرست شکل ها

عنوان صفحه

شکل (۱-۱)- تصویر گیاه شیرین بیان. ۳
شکل (۱-۲)- مسیر ایزوپرونوئید در گیاهان. خطوط پیوسته، خطوطی که به صورت نقطه نقطه و خطوطی که با خط تیره رسم شده اند، به ترتیب نشان دهنده مراحل آنزیمی منفرد و چندگانه و انتقال می باشند. ۱۲
شکل (۱-۳)- ساختار مولکولی گلیسیریزین. ۱۲
شکل (۱-۴): سنتز جاسمونات ها در پاسخ به پیام رسان های نموی و محیطی. ۱۸
شکل (۱-۵) - مسیر بیوسنتزی جاسمونات. ۱۹
شکل (۱-۶)- ساختار سالیسیلیک اسید (برگرفته شده از Hayat and Ahmad, 2006). ۲۱
شکل (۱-۷) - مسیر پیشنهادی برای بیوسنتز سالیسیلیک اسید در گیاهان (برگرفته شده از Hayat and Ahmad, 2006) ۲۱
شکل (۲-۴): مدل شماتیک عمل سالیسیلیک اسید بر القاء مقاومت تنش غیر زیستی. ۳۳
شکل (۲-۱)- رشد ریشه های چهار جمعیت شیرین بیان. ۴۶
شکل (۲-۲)- اثر غلظت های مختلف متیل جاسمونات بر رشد. ۴۷
شکل (۲-۳)- اثر غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید بر رشد. ۴۹
شکل (۲-۴)- اثر غلظت های مختلف متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه های گیاه شیرین بیان در زمان های مختلف. ۵۰
شکل (۲-۵)- اثر غلظت های مختلف متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم کاتالاز در اندام هوایی گیاه شیرین بیان در زمان های مختلف. ۵۰
شکل (۲-۶)- اثر غلظت های مختلف متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ریشه های شیرین بیان در زمان های مختلف. ۵۱
شکل (۲-۷)- اثر غلظت های مختلف متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در اندام هوایی شیرین بیان در زمان های مختلف. ۵۲
شکل (۲-۸)- اثر غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه های شیرین بیان در زمان های مختلف. ۵۳
شکل (۲-۹)- اثر غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم کاتالاز در اندام هوایی شیرین بیان در زمان های مختلف. ۵۴
شکل (۲-۱۰)- اثر غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ریشه های شیرین بیان در زمان های مختلف. ۵۵
شکل (۲-۱۱)- اثر غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در اندام هوایی شیرین بیان در زمان های مختلف. ۵۶
شکل (۲- ۱۴)- اثر غلظت های مختلف متیل جاسمونات بر میزان پروتئین کل در ریشه های شیرین بیان در زمان های مختلف. ۵۸
شکل (۲-۱۵)- اثر غلظت های مختلف متیل جاسمونات بر میزان پروتئین کل در اندام هوایی شیرین بیان در زمان های مختلف. ۵۹

عنوان صفحه

شکل (۲-۱۶)- اثر غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید بر میزان پروتئین کل در ریشه های شیرین بیان در زمان های مختلف ۶۰
شکل (۲-۱۷)- اثر غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید بر میزان پروتئین کل در اندام هوایی شیرین بیان در زمان های مختلف ۶۱
شکل (۲-۱۸)- الگوی الکتروفورزی پروتئین های اندام هوایی شیرین بیان تیمار شده با ۱ و ۲ میلی مولار متیل جاسمونات پس از ۲۴ ساعت در شرایط این ویترو ۶۲
شکل (۲-۱۹)- الگوی الکتروفورزی پروتئین های ریشه شیرین بیان تیمار شده با ۱ و ۲ میلی مولار متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید پس از ۲۴ ساعت در شرایط این ویترو ۶۳
شکل (۲-۲۰)- الگوی الکتروفورزی پروتئین های ریشه ها شیرین بیان تیمار شده با ۲ میلی مولار متیل جاسمونات پس از ۴۸ ساعت در شرایط این ویترو ۶۳
شکل (۲-۲۱)- الگوی الکتروفورزی پروتئین های اندام هوایی شیرین بیان تیمار شده با ۱ و ۲ میلی مولار سالیسیلیک اسید پس از ۲۴ ساعت در شرایط این ویترو ۶۴
شکل (۲-۲۲)- الگوی الکتروفورزی پروتئین های ریشه ها شیرین بیان تیمار شده با ۱ و ۲ میلی مولار سالیسیلیک اسید پس از ۴۸ ساعت در شرایط این ویترو ۶۵
شکل (۳-۱) - کروماتوگرافی لایه نازک نمونه استاندارد و عصاره ریشه شیرین بیان ۸۹
شکل (۳-۲)- مراحل خالص سازی گلیسیریزین در نمونه های استاندارد و عصاره ریشه شیرین بیان در شرایط کشت بافت ۹۰
شکل (۳-۳) - منحنی استاندارد گلیسیریزین ۹۰
شکل (۳-۴)- مقادیر گلیسیریزین را در مدت ۴۸ ساعت تیمار با غلظت های مختلف متیل جاسمونات در ریشه های شیرین بیان نشان می دهد ۹۲
شکل (۳-۵)- مقادیر گلیسیریزین را در مدت ۴۸ ساعت تیمار با غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید در ریشه های شیرین بیان نشان می دهد ۹۳
شکل (۳-۶)- مقادیر ترکیبات فنولیک کل را در مدت ۴۸ ساعت تیمار با غلظت های مختلف متیل جاسمونات در ریشه های شیرین بیان نشان می دهد ۹۴
شکل (۳-۷)- مقادیر ترکیبات فلاونوئید کل را در مدت ۴۸ ساعت تیمار با غلظت های مختلف متیل جاسمونات در ریشه های شیرین بیان نشان می دهد ۹۵
شکل (۳-۸)- مقادیر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیو لیاز را در مدت ۴۸ ساعت تیمار با غلظت های مختلف متیل جاسمونات در ریشه های شیرین بیان نشان می دهد ۹۶
شکل (۳-۹)- مقادیر ترکیبات فنولیک کل را در مدت ۴۸ ساعت تیمار با غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید در ریشه های شیرین بیان نشان می دهد ۹۷
شکل (۳-۱۰)- مقادیر ترکیبات فلاونوئید کل را در مدت ۴۸ ساعت تیمار با غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید در ریشه های شیرین بیان نشان می دهد ۹۸
شکل (۳-۱۱)- مقادیر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیو لیاز را در مدت ۴۸ ساعت تیمار با غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید در ریشه های شیرین بیان نشان می دهد ۹۹

عنوان صفحه

شکل (۴-۱)- مسیرهای بیوسنتتیک تری ترپنوئیدها و ساپونین ها در شیرین بیان Glycyrrhiza glabra..... ۱۱۲
شکل (۴-۲)- الکتروفورز ژل آگارز نمونه های RNA استخراج شده از ریشه های شیرین بیان..... ۱۲۴
شکل (۴-۳)- محصول تکثیر cDNA مربوط به ژن های SQS و bAS و همچنین DNA ژنومی توسط پرایمر های اختصاصی طراحی شده، واکنش RT-PCR..... ۱۲۵
شکل (۴-۴) - منحنی استاندارد از سری های رقت cDNA سنتز شده با پرایمر 18S rRNA. راندمان اختصاصی بودن پرایمرها در این واکنش بر اساس معادله (۴-۲) محاسبه شده است..... ۱۲۶
شکل (۴-۵) - منحنی استاندارد از سری های رقت cDNA سنتز شده با پرایمر bAS . راندمان اختصاصی بودن این پرایمر در این واکنش بر اساس معادله (۴-۲) محاسبه شده است..... ۱۲۶
شکل (۴-۶) - منحنی استاندارد از سری های رقت cDNA سنتز شده با پرایمر SQS . راندمان اختصاصی بودن این پرایمر در این واکنش بر اساس معادله (۴-۲) محاسبه شده است..... ۱۲۷
شکل (۴-۷)- نتایج real time RT-PCR ژن bAS در تیمار با غلظت های مختلف متیل جاسمونات..... ۱۲۹
شکل (۴-۸)- نتایج real time RT-PCR ژن bAS در ریشه های تیمار شده با غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید..... ۱۳۰
شکل (۴-۹)- مقادیر نسبی بیان ژن bAS را در مدت ۴۸ ساعت تیمار با غلظت های مختلف متیل جاسمونات نشان می دهد..... ۱۳۱
شکل (۴-۱۰)- مقادیر نسبی بیان ژن bAS را در مدت ۴۸ ساعت تیمار با غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید در ریشه های شیرین بیان نشان می دهد..... ۱۳۱
شکل (۴-۱۱)- نتایج real time RT-PCR ژن SQS در ریشه های تیمار شده با غلظت های مختلف متیل جاسمونات..... ۱۳۳
شکل (۴-۱۲)- نتایج real time RT-PCR ژن SQS در ریشه های تیمار شده با غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید..... ۱۳۴
شکل (۴-۱۳)- مقادیر نسبی بیان ژن SQS را در مدت ۴۸ ساعت تیمار با غلظت های مختلف متیل جاسمونات در ریشه های شیرین بیان نشان می دهد..... ۱۳۵
شکل (۴-۱۴)- مقادیر نسبی بیان ژن SQS را در مدت ۴۸ ساعت تیمار با غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید در ریشه های شیرین بیان نشان می دهد..... ۱۳۶
شکل (۶-۱): منحنی استاندارد بدست آمده جهت تعیین غلظت پروتئین ها..... ۱۵۳
شکل (۶-۲)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در تیمار ۰/۰۱ سالیسیلیک اسید در مدت زمان ۸ ساعت نشان داده شده است..... ۱۵۸
شکل (۶-۳)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در تیمار ۰/۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید در مدت زمان ۸ ساعت نشان داده شده است..... ۱۵۸
شکل (۶-۴)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در تیمار ۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید در مدت زمان ۸ ساعت نشان داده شده است..... ۱۵۹
شکل (۶-۵)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در تیمار ۲ میلی مولار سالیسیلیک اسید در مدت زمان ۸ ساعت نشان داده شده است..... ۱۵۹

عنوان صفحه

شکل (۶-۶)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در تیمار ۰/۰۱ سالیسیلیک اسید در مدت زمان ۲۴ ساعت نشان داده شده است. ۱۶۰
شکل (۶-۷) - کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در تیمار ۰/۱ سالیسیلیک اسید در مدت زمان ۲۴ ساعت نشان داده شده است. ۱۶۰
شکل (۶-۸)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در تیمار ۱ سالیسیلیک اسید در مدت زمان ۲۴ ساعت نشان داده شده است. ۱۶۱
شکل (۶-۹)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC اسید در تیمار ۲ میلی مولار سالیسیلیک اسید در مدت زمان ۲۴ ساعت نشان داده شده است. ۱۶۱
شکل (۶-۱۰)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در تیمار ۰/۰۱ سالیسیلیک اسید در مدت زمان ۴۸ ساعت نشان داده است. ۱۶۲
شکل (۶-۱۱)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در تیمار ۰/۱ سالیسیلیک اسید در مدت زمان ۴۸ ساعت نشان داده شده است. ۱۶۲
شکل (۶-۱۲)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در تیمار ۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید مدت زمان ۴۸ ساعت نشان داده شده است. ۱۶۳
شکل (۶- ۱۳)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در تیمار ۲ میلی مولار سالیسیلیک اسید در مدت زمان ۴۸ ساعت نشان داده شده است. ۱۶۳
شکل(۶- ۱۴)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در تیمار ۰/۰۱ میلی مولار متیل جاسمونات در مدت زمان ۸ ساعت نشان داده شده است. ۱۶۴
شکل (۶- ۱۵)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در تیمار ۰/۱ میلی مولار متیل جاسمونات در مدت زمان ۸ ساعت نشان داده شده است. ۱۶۴
شکل (۶-۱۶)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در تیمار ۱ میلی مولار متیل جاسمونات در مدت زمان ۸ ساعت نشان داده شده است. ۱۶۵
شکل (۶-۱۷)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در تیمار ۲ میلی مولار متیل جاسمونات در مدت زمان ۸ ساعت نشان داده شده است. ۱۶۵
شکل (۶-۱۸)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در تیمار ۰/۰۱ میلی مولار متیل جاسمونات در مدت زمان ۲۴ ساعت نشان داده شده است. ۱۶۶
شکل (۶-۱۹)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در تیمار ۰/۱ میلی مولار متیل جاسمونات در مدت زمان ۲۴ ساعت نشان داده شده است. ۱۶۶
شکل (۶-۲۰)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در تیمار ۱ میلی مولار متیل جاسمونات در مدت زمان ۲۴ ساعت نشان داده شده است. ۱۶۷
شکل (۶-۲۱)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در تیمار ۲ میلی مولار متیل جاسمونات در مدت زمان ۲۴ ساعت نشان داده شده است. ۱۶۷
شکل (۶-۲۲)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در تیمار ۰/۰۱ میلی مولار متیل جاسمونات در مدت زمان ۴۸ ساعت نشان داده شده است. ۱۶۸

عنوان | صفحه

شکل (۶-۲۳)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در تیمار ۰/۱ میلی مولار متیل جاسمونات در مدت زمان ۴۸ ساعت نشان داده شده است. ۱۶۸
شکل (۶-۲۴)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در تیمار ۱ میلی مولار متیل جاسمونات در مدت زمان ۴۸ ساعت نشان داده شده است. ۱۶۹
شکل (۶-۲۵)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در تیمار ۲ میلی مولار متیل جاسمونات در مدت زمان ۴۸ ساعت نشان داده شده است. ۱۶۹
شکل (۶-۲۶)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در گیاهچه های شاهد در مدت زمان ۸ ساعت نشان داده شده است. ۱۷۰
شکل (۶-۲۷)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در گیاهچه های شاهد در مدت زمان ۲۴ ساعت نشان داده شده است. ۱۷۰
شکل (۶-۲۸)- کروماتوگرم گلیسیریزین حاصل از HPLC در گیاهچه های شاهد در مدت زمان ۴۸ ساعت نشان داده شده است. ۱۷۱
شکل (۶-۲۹)- کروماتوگرام استاندارد گلیسیریزین حاصل از HPLC نشان داده شده است. ۱۷۱
شکل (۶-۳۰)- کروماتوگرام استاندارد داخلی (پارابن) و گلیسیریزین حاصل از HPLC نشان داده شده است. ۱۷۲

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

جدول (۱-۱)- متابولیت های ثانویه مفید تولید شده توسط کشت های سلول گیاه بر گرفته (Vanisree et al., 2004)..... ۶

جدول (۱-۲)- ترکیبات مختلف فلاونوئیدی در گیاه شیرین بیان (Hatano and Yoshida, 1998)..... ۷

جدول (۱-۳)- طبقه بندی الیسیتورها بر اساس منشاء و ساختار مولکولی..... ۱۴

جدول (۲-۱)- مواد مورد نیاز برای عصاره گیری آنزیمی..... ۴۰

جدول (۲-۲)- مواد مورد نیاز برای محلول واکنش..... ۴۱

جدول (۲-۳)- مراحل رنگ آمیزی ژل SDS-PAGE با نیترات نقره..... ۴۳

جدول (۴-۲)- توالی های پرایمر برایReal-Time PCR ژن های بتا آمیرین سنتاز، اسکوالن سنتاز و 18S rRNA..... ۱۲۰

جدول (۴-۳)- مواد مورد نیاز جهت واکنش Real- Time PCR..... ۱۲۱

جدول (۶-۱)- ترکیب محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962)..... ۱۵۰

جدول (۶-۲)- مواد مورد نیاز برای تهیه استوک برادفورد (۳۰۰ میلی لیتر)..... ۱۵۱

جدول (۶-۳)- مواد مورد نیاز برای تهیه بافر برادفورد (۵۰۰ میلی لیتر)..... ۱۵۱

جدول (۶-۴)- طرز تهیه غلظت های استاندارد پروتئین BSA..... ۱۵۲

جدول (۶-۵)- مواد لازم جهت تهیه محلول آکریل آمید (۳۰٪ آکریل آمید، ۰/۸٪ بیس آکریل آمید، ۲۰۰ میلی لیتر)..... ۱۵۳

جدول (۶-۶)- مواد لازم جهت تهیه بافر ژل جداکننده ۴X (تریس ۱/۵ مولار، pH= ۸/۸ ، ۲۰۰ میلی لیتر)..... ۱۵۳

جدول (۶-۸)- مواد لازم جهت تهیه ۱۰٪ سدیم دودسیل سولفات (SDS)..... ۱۵۴

جدول (۶-۹)- مواد لازم جهت تهیه ۱۰٪ آمونیوم پر سولفات..... ۱۵۴

جدول (۶-۱۰)- مواد لازم جهت تهیه محلول برمو فنل بلو..... ۱۵۴

جدول (۶-۱۱)- مواد لازم جهت تهیه بافرتانک..... ۱۵۵

جدول (۶-۱۲)- مواد لازم جهت تهیه محلول ژل جدا کننده (۱۳/۵ میلی لیتر)..... ۱۵۶

جدول (۶-۱۳)- مواد لازم جهت تهیه محلول ژل متراکم کننده (۸/۵ میلی لیتر)..... ۱۵۷

جدول (۶-۱۴)- مواد لازم جهت تهیه بافر TBE 5X..... ۱۷۳

فصل اول

مقدمه

۱-۱: خصوصیات گیاه شناسی شیرین بیان

۱-۱-۱: تاکسونومی و ریخت شناسی

نام علمی گیاه شیرین بیان *Glycyrrhiza glabra* L. است. شیرین بیان گیاه علفی چند ساله، متعلق به زیر خانواده Papilionoideae از خانواده لگومینوز می باشد. ارتفاع این گیاه به ۱۵۰ سانتی متر می رسد و مهمترین بخش آن نواحی زیر زمینی می باشد. گیاهان این جنس که در ایران به نام شیرین بنان نیز نامیده می شوند، معمولا پایا با برگ های تک شانه ای هستند. گل ها به رنگ مایل به آبی، یا آبی مایل به بنفش هستند و در گل آذین های محوری کپه ای مجتمع می شوند. کاسه گل دولبه، درفش باریک، بال ها و ناو نوک تیز، خامه بدون کرک، خمیده، در انتها برگشته و دارای کلاله ای سر مانند است. نیام چرمی، خطی و فشرده، یا تسبیح مانند، ناشکوفا و یا به وسیله دو کفه باز می شود (قهرمان، ۱۳۷۲). جنس شیرین بیان حاوی ۳۰ گونه بومی نواحی معتدله گرم یا نیمه گرمسیری حوزه مدیترانه می باشد که از مهمترین این گونه ها می توان به *G. glabra*، *G. inflata* و *G. uralensis* که تولید کننده گلیسیریزین و گونه های *G. echinata*، *G. pallidiflora*، *G. macedonica* که تولید کننده Masdonosoide هستند اشاره کرد (Hayashi et al., 2000b). از بین آنها گونه *G. glabra* در نقاط مختلفی از کشور ایران رویش داشته و از دیرباز به عنوان یک گیاه دارویی در طب سنتی مورد توجه قرار گرفته است.

گیاهان متعلق به گونه *G. glabra* علفی به ارتفاع ۵۰ تا ۱۰۰ سانتی متر هستند که طول آن ها گاهی تا ۲ متر هم می رسد. دارای ساقه ساده و یا منشعب، در قاعده بدون کرک و تا اندازه ای کرک دار بوده و در تمام طول، واجد غدد براق

بدون پایه است. گوشوارک های آن قهوه ای و غشایی به ابعاد تقریبا ۲ میلی متر، درفشی و زودافت است. برگ ها مرکب شانه ای فرد، به طول ۱۰ تا ۲۵ سانتی متر، دمبرگ به طول ۱/۵ تا ۳ سانتی متر و حداقل در بخش پایینی کرک دار، برگچه ها به تعداد ٤ تا ۸ جفت، سرنیزه ای، لوزی تخم مرغی یا کشیده به ابعاد (۵۵-) ٤۰-۲۰ × (۲۵-) ۱۸- ۵ میلی متر با نوک گرد و یا گاهی کشیده، در سطح زمین به طور منفصل پوشیده از غدد نقطه ای است.

گل آذین خوشه، کشیده و تنک، یا گاهی کوتاه و فشرده. گل ها دارای دمگلی بسیار کوتاه، دم گل آذین به طول ۳- ۱/۵ سانتی متر. کاسه گل به طول ٦-٤ میلی متر، لوله ای، بدون کرک یا تقریبا کرکدار، دندانه های کاسه گل سرنیزه ای، دو دندانه بالایی پهن تر و اندکی کوتاه تر، قطعات کاسه در پایین به یکدیگر جوش خورده است. جام به رنگ صورتی- آبی یا ارغوانی، درفش لوزی سرنیزه ای به ابعاد ۱۲- ۹ × ۵-۳ میلی متر و در انتها نوک تیز یا نوکدار و در پایین باریک و کشیده و یا ناخنک دار است. بال ها به طول ۱۰-۷ میلی متر با پهنکی داسی شکل، پهن و نوک تیز، ناو به طول ۸- ٦ میلی متر، پهنک آن باریک کشیده، اندکی نوک دار، نیم خطی کشیده، فشرده و پهن به ضخامت ۵ میلی متر و عرض آن تا ۳۰ میلی متر است. دانه ۷- ۱ عددی، واجد منقاری کوتاه، بدون کرک یا غده دار و کم و بیش در فاصله بین بذرها فشرده شده است (Towsend, 1974).

گونه *Glycyrrhiza glabra* دارای سه واریته می باشد (Hatano and Yoshida, 1998):

۱- *G. glabra* var. *typical* (=شیرین بیان اسپانیایی) که در ناحیه مدیترانه ای شامل کشورهای پرتقال، ایتالیا، یونان، ترکیه و برخی کشورهای همسایه (به جز ایران) یافت می شود.

۲- *G. glabra* var. *glandulifera* (=شیرین بیان روسی). در این واریته ریزوم ها از بین رفته اند. این واریته در مجارستان، ایران و اسپانیا یافت می شود.

۳- *G. glabra* var. *violacea* که به اشتباه شیرین بیان ایرانی نامیده شده است. این واریته در ایران یافت نمی شود ولی در عراق وجود دارد.

۱-۱-۲: پراکنش شیرین بیان

شیرین بیان در اکثر مناطق جهان به خصوص بین دو عرض جغرافیایی۳۰ و ۴۵ درجه در نیمکره شمالی زمین می روید. این گیاه در ایران نیز پراکنش بسیار وسیعی داشته و در استان هایی چون خراسان، آذربایجان شرقی و غربی، زنجان، گلستان، کردستان، فارس، اصفهان و تهران پراکنش بیشتری دارد (Rechinger, 1984).