بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد(.M. Sc)

در رشته اصلاح نباتات

تولید کالوس و باززایی در گیاه شیرین‌بیان
(*Glycyrrhiza glabra* L.)

تحقیق و نگارش:

مریم حسینی

استاد راهنما:

دکتر بهرام ملکی زنجانی

استاتید مشاور:

دکتر بابک عندلیبی

مهندس رقیه عظیم‌خانی

اسفند ۹۱

تقدیم به خدایی که

آفرید انسان را، علم را، عشق را

و به کسانی که عشقشان را در وجودم دمید

پدر بزرگوارم، مادر مهربانم و همسر عزیزم

تقدیر و تشکر

مفتخرم که پژوهش حاضر را با راهنمایی استاد ارجمندم جناب آقای دکتر ملکی به انجام رساندم و از اینکه مرا از دانش و راهنمایی‌های خودشان بهره‌مند ساختند کمال سپاس وتشکر را دارم.

از تلاشها و راهنماییهای ارزنده اساتید مشاورم جناب آقای دکتر عندلیبی و سرکار خانم مهندس عظیم‌خانی بینهایت سپاسگزارم.

از داوران محترم جناب آقای دکتر امیری و سرکار خانم باقری و از جناب آقای دکتر توکلی نماینده تحصیلات تکمیلی سپاسگزارم.

از تمامی همکلاسی‌ها و دوستان عزیزم صمیمانه قدردانی و تشکر می‌نمایم.

چکیده

شیرین‌بیان با نام علمی *(Glycyrrhiza glabra* L.*)* از گیاهان دارویی علفی چند ساله و از خانواده‌ی لگومینوزه است. علی‌رغم نیاز روزافزون برای تکثیر انبوه، اطلاعات کمی در مورد روش‌های ازدیاد آن وجود دارد. عواملی چون خواب بذر از مهم‌ترین محدودیت‌های استفاده از بذر بوده و همچنین تکثیر از طریق بخش‌های رویشی(ریشه و ریزوم) بسیار کند می‌باشد. از این‌رو کشت بافت روشی مؤثر و مناسب برای تکثیر این گیاه می‌باشد. این تحقیق به منظور یافتن روشی مناسب برای ریزازدیادی، تولید کالوس و باززایی از کالوس‌های تولید شده در گیاه شیرین‌بیان انجام شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. که در آن تأثیر هورمون BA با سه سطح (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر)، هورمون NAA با سه سطح (۰، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و ریزنمونه‌های (ریشه، هیپوکوتیل، کوتیلدون، ساقه و برگ) در دو ژنوتیپ گیاهی اِژیه و ورزنه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که ژنوتیپ اژیه در مقایسه با جمعیت ورزنه برای ریزازدیادی در شرایط In vitro مناسب می‌باشد و در تمامی شرایط ریزنمونه‌ی ساقه، ریزنمونه‌ی مناسبی جهت ریزازدیادی این گیاه می‌باشد. در این آزمایش افزودن هورمون BA به محیط کشت MS با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش تعداد شاخه-های جانبی شد. اما بین ارتفاع گیاه در غلظت‌های مختلف هورمون NAA (۰، ۰/۱ و ۰/۵) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین در محیط کشت MS حاوی هورمون NAA با غلظت‌های (۰ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) بیشترین میزان ریشه‌زایی مشاهده شد. برای ارزیابی باززایی غیرمستقیم این ژنوتیپ‌ها، ترکیبات مختلف هورمون‌های BA و NAA و نیز BA و2,4-D در آزمایش‌های جداگانه مورد مطالعه قرار گرفتند. نشان داد که ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و ساقه بیشترین درصد تولید کالوس داشتند که در محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون NAA یا 2,4-D به دست آمد. بیشترین باززایی غیرمستقیم نیز مربوط به ریزنمونه ساقه بود که در محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون NAA یا 2,4-D به دست آمد. در نهایت گیاهان باززا شده برای ایجاد شاخه‌های جانبی به محیط کشت MS دارای ۰/۵ یا ۱ میلی‌گرم هورمون BA منتقل شدند. گیاهان باززا شده برای ریشه‌زایی به محیط MS دارای ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون NAA منتقل شدند.

کلمات کلیدی: شیرین‌بیان، ریزازدیادی، In vitro و باززایی غیرمستقیم.

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه

مقدمه ۲

اهداف پژوهش ۵

فصل دوم: کلیات و بررسی منابع

۲ -۱- گیاه شناسی شیرین‌بیان ۷

۲-۲- رویشگاه و مناطق انتشار شیرین‌بیان ۸

۲-٤- اهمیّت دارویی شیرین‌بیان ۱۰

۲-۵- دلایل تکثیر و باززایی این گیاه در شرایط آزمایشگاهی ۱۱

۲-٦- کشت بافت گیاه ۱۱

۲-۷- فاکتورهای موثر بر رشد و نمو گیاه در محیط درون‌شیشه‌ای (این‌ویترو) ۱۲

۲-۸- انواع کشت بافت ۱۳

۲-۸-۱- کشت گیاه کامل ۱۳

۲-۸-۲- کشت اندام گیاهی ۱۳

۲-۸-۳- کشت کالوس ۱۳

۲-۸-٤- کشت پروتوپلاست ۱۳

۲-۸-۵- کشت سلول ۱٤

۲-۸-٦- کشت جنین ۱٤

۲-۹- محیط کشت ۱٤
۲-۱۰- ترکیبات محیط کشت ۱۵
۲-۱۰-۱- آب ۱۵
۲-۱۰-۲- آگار ۱۵
۲-۱۰-۳- منبع هیدرات کربن ۱٦
۲-۱۰-٤- ویتامین‌ها ۱٦
۲-۱۰-۵- اسیدهای آمینه ۱٦
۲-۱۰-٦- زغال فعال ۱۷
۲-۱۰-۷- pH محیط ۱۷
۲-۱۱- انواع هورمون‌های گیاهی ۱۷
۲-۱۱-۱- اکسین ۱۸
۲-۱۱-۲- جیبرلین ۱۸
۲-۱۱-۳- سیتوکینین ۱۸
۲-۱۱-٤- اتیلن ۱۹
۲-۱۲- چشم انداز کشت بافت گیاهی ۱۹
۲-۱۳- مزایای کشت بافت ۲۰
۲-۱۳-۱- تکثیر سریع گیاهان ۲۰
۲-۱۳-۲- وسیله‌ای برای حذف ویروس‌های گیاهی ۲۰

۲-۱۲-۳- حفظ یکنواختی ژنتیکی ۲۱

۲-۱۳-٤-گزینش گیاه..... ۲۱

۲-۱۳-۵- محیط کنترل شده ۲۱

۲-۱۳-٦- تولید گیاهان هیبرید ۲۱

۲-۱۳-۷- تولید گیاهان هاپلویید ۲۱

۲-۱۳-۸- تولید دایم گیاه در طول سال ۲۲

۲-۱۳-۹- حفظ ذخایر ژنتیکی..... ۲۲

۲-۱٤- ریزازدیادی ۲۲

۲-۱۵- ایجاد کالوس از ریزنمونه ۲۳

۲-۱٦- تولید متابولیت‌های ثانویه..... ۲٤

۲-۱۷- حذف پوسته‌ی سخت(اسکاریفیکاسیون) بذور شیرین‌بیان ۲٤

۲-۱۸- باززایی درون شیشه‌ای..... ۲۵

۲-۱۸-۱- باززایی مستقیم ۲۵

۲-۱۸-۲- باززایی غیرمستقیم ۲۸

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- مواد گیاهی مورد استفاده..... ۳۲

۳-۲- تهیه محیط کشت پایه موراشیک و اسکوگ (MS) جهت اجرای آزمایش ۳۳

۳-۲-۱- استوک A (عناصر پرمصرف) ۳۳

۳-۲-۲- استوک B (عناصر کم مصرف) ۳٤
۳-۲-۳- استوک C (ویتامین‌ها) ۳٤
۳-۲-٤- استوک D (آهن) ۳۵
۳-۳ -تهیه هورمون‌ها ۳۵
۳-٤- شرایط کشت..... ۳٦
۳-۵- دستگاه اتاقک رشد ۳٦
۳-٦- ضدعفونی وسایل مورد نیاز در کشت بافت..... ۳٦
۳-۷- اسکاریفیکاسیون بذرها ۳۷
۳-۸ - ضدعفونی بذر ۳۷
۳-۹- کاشت بذور ۳۷
۳-۱۰- مواد شیمیایی به‌کار رفته در باززایی مستقیم ۳۸
۳-۱۲- ریزازدیادی در گیاه شیرین‌بیان ۳۸
۳ -۱۲- ۱-تعیین بهترین ریزنمونه برای ریزازدیادی شیرین‌بیان ۳۸
۳-۱۲-۲- بررسی امکان ریزازدیادی در گیاه شیرین‌بیان ۳۹
۳-۱۲-۳- مرحله سازگاری به شرایط بیرونی..... ٤۰
۳-۱۳- القای کالوس در گیاه شیرین‌بیان ٤۰
۳-۱۳-۱- تعیین بهترین ریزنمونه جهت القای کالوس در گیاه شیرین‌بیان ٤۱
۳-۱٤- باززایی از کالوس ٤۱

۳-۱۵- نوع طرح ٤۳

۳-۱٦- نرم‌افزار مورد استفاده ٤۳

فصل چهارم: نتایج و بحث

٤-۱- ریزازدیادی ٤٥

٤-۱- ۱- حذف پوسته‌ی سخت بذور گیاه شیرین‌بیان با اسید سولفوریک ٤٥

٤-۱-۲- تعیین بهترین ریزنمونه برای ریزازدیادی شیرین‌بیان ٤۷

٤-۱-۲-۱- اثر ریزنمونه‌ها ٤۷

٤-۱-۳- بررسی امکان ریزازدیادی در دو ژنوتیپ (اژیه و ورزنه) گیاه شیرین‌بیان ٤۸

٤-۱-۳-۱- تعداد شاخه‌های جانبی ٤۹

٤-۱-۳-۱-۱- اثر ژنوتیپ ٤۹

٤-۱-۳-۱-۲- تأثیر سطوح مختلف هورمون BA بر تعداد شاخه‌های جانبی ٥۰

٤-۱-۳-۲- ارتفاع گیاه ٥۱

٤-۱-۳-۲-۱- ترکیبات تیماری ژنوتیپ و هورمون BA ٥۱

٤-۱-۳-۲-۲- ترکیبات تیماری ژنوتیپ و هورمون NAA ٥۲

٤-۱-۳-۲-۳- ترکیبات تیماری هورمونهای BA و NAA ٥۲

٤-۱-۳-۳- طول ریشه ٥٤

٤-۱-۳-۳-۱-اثر ژنوتیپ در صفت طول ریشه در گیاه شیرین‌بیان ٥٤

٤ -۱-۳-۳-۲- ترکیبات تیماری هورمون BA و هورمون NAA ٥٤

٤-١-٤- انتقال گیاهان تکثیر شده به محیط بیرون ٥٦

٤-٢- القای کالوس ٥٧

٤-٢-١- تعیین بهترین ریزنمونه برای القای کالوس در گیاه شیرین‌بیان ٥٧

٤-٢-٢- بررسی امکان القای کالوس با استفاده از هورمون‌های BA و NAA دردو ژنوتیپ گیاه شیرین‌بیان..... ٥٨

٤-٢-٢-١- درصد کالوس‌زایی در ترکیب هورمونی BA-NAA..... ٦٠

٤-٢-٢-١-١- اثر هورمون BA در درصد کالوس‌زایی (ترکیب هورمونی BA-NAA) ٦٠

٤-٢-٢-١- ٢- اثر هورمون NAA در صفت درصد کالوسزایی (ترکیب هورمونی BA-NAA) ٦٠

٤-٢-٢- ٢- حجم کالوس در ترکیب هورمونی BA-NAA..... ٦١

٤-٢-٢-١-١- اثر هورمون NAA در صفت حجم کالوس (ترکیب هورمونی BA-NAA) ٦١

٤-٢-٢-٣- رنگ کالوس در ترکیب هورمونی BA-NAA..... ٦٢

٤-٢-٢-٣-١- اثر هورمون BA در صفت رنگ کالوس (ترکیب هورمونی BA-NAA) ٦٢

٤-٢-٢-٣-٢- اثر هورمون NAA در رنگ کالوس (ترکیب هورمونی BA-NAA)..... ٦٣

٤-٢- ٣- بررسی امکان القای کالوس با استفاده از هورمون‌های BA و 2,4-D در گیاه شیرین‌بیان ٦٥

٤-٢-٣-١- درصد کالوس زایی در ترکیب BA-2,4-D..... ٦٦

٤-٢-٣-١-١- اثر هورمون BA درصد کالوس‌زایی در ترکیب BA-2,4-D ٦٦

٤-٢-٣-١-٢- اثر هورمون 2,4-D در صفت درصد کالوس‌زایی (ترکیب BA-2,4-D)..... ٦٦

٤-٢-٣-٢- حجم کالوس (ترکیب BA-2,4-D)..... ٦٧

٤-٢-٣-٢-١- اثر هورمون BA در صفت حجم کالوس (ترکیب BA-2,4-D) ٦٧

٤-٤-٣-٢-٢- اثر هورمون 2,4-D در صفت حجم کالوس (ترکیب BA-2,4-D) ٦٨

٤-٢-٣-٣- رنگ کالوس در ترکیب BA-2,4-D ٦٩

٤-٢-٣-٣-١- اثر هورمون BA در صفت رنگ کالوس (ترکیب BA-2,4-D) ٦٩

٤-٢-٣-٣-٢- اثر هورمون 2,4-D در صفت رنگ کالوس (ترکیب BA-2,4-D) ٧٠

٤-٣- باززایی ٧٢

٤-٣-١- درصد باززایی در ترکیب هورمونی BA-NAA ٧٢

٤-٣-١-١- ترکیبات تیماری ریزنمونه و هورمون BA ٧٢

٤-٣-١-٢- اثر هورمون NAA ٧٣

٤-٣-٢-درصد باززایی در ترکیب BA-2,4-D ٧٤

٤-٣-٢-١-ترکیبات تیماری ریزنمونه‌ها و هورمون BA ٧٤

٤-٣-٢-٢- ترکیبات تیماری ریزنمونه و هورمون 2,4-D ٧٥

نتیجه گیری کلی

نتیجه گیری کلی ٨٠

پیشنهادها

پیشنهادها ٨٠

فهرست اشکال

شکل۲-۱- شمایی از گیاه شیرین‌بیان.....۸

شکل ۲-۲- ساختار شیمیایی گلیسریزین.....۱۰

شکل ٤-۱- مقایسه جوانه‌زنی بذور شیرین‌بیان اسکاریفیکاسیون شده (با اسید و آب گرم) و بذور اسکاریفیکاسیون نشده..... ٤٦

شکل ٤-۲- بذور جوانه زده ژنوتیپ ورزنه.....٤٦

شکل ٤-٤- گیاه رشد کرده بر روی محیط MS ساده بعد از یک ماه.....٤٧

شکل ٤-٦- تعیین بهترین غلظت هورمون BA برای صفت تعداد شاخه های جانبی در ریزازدیادی شیرین بیان.....۵۰

شکل٤-۸- ترکیبات تیماری ژنوتیپ‌ها و سطوح هورمون NAA برای صفت ارتفاع گیاه در ریزازدیادی گیاه شیرین‌بیان.....۵۲

شکل ٤-۱۰- گیاه باززا شده از نظر ارتفاع گیاه در محیط کشت MS.....۵۳

شکل٤-۱۲- تعیین بهترین ژنوتیپ برای صفت طول ریشه در ریزازدیادی شیرین‌بیان.....٥٤

نمودار٤-۱۳- ترکیبات تیماری هورمون‌های BA و NAA برای صفت طول ریشه در ریزازدیادی گیاه شیرین‌بیان.....۵۵

شکل ٤-١٤- گیاه کامل باززا شده در شرایط کشت درون شیشه‌ای.....۵۵

شکل٤-١٦- اثر سطوح هورمون BA برای صفت درصد کالوس‌زایی گیاه شیرین‌بیان در ترکیب هورمونی BA-NAA.....٦۰

شکل٤-۱۷- اثر سطوح هورمون NAA برای صفت درصد کالوس‌زایی گیاه شیرین‌بیان در ترکیب هورمونی BA-NAA.....٦۱

شکل٤-۱۸- اثر سطوح هورمون NAA برای صفت حجم کالوس گیاه شیرین بیان در ترکیب هورمونی BA-NAA.....٦۲

شکل٤-۱۹- اثر سطوح هورمون BA برای صفت رنگ کالوس‌ها گیاه شیرین‌بیان در ترکیب هورمونی BA-NAA.....٦۳

شکل٤-۲۰- اثر سطوح هورمون NAA برای صفت رنگ کالوس‌ها گیاه شیرین‌بیان در ترکیب هورمونی BA-NAA.....٦۳

شکل ٤-۲۱- گیاه باززا شده از کالوس در ترکیب هورمونی BA و NAA هر دو با غلظت ۱ میلی‌گرم برلیتر ٦٤

شکل ٤-۲۲- انتقال گیاه باززا شده از کالوس به شیشه دارای هورمون BA با غلظت ۱ میلی گرم بر لیتر.....٦٤

نمودار٤-٢٣- اثر سطوح هورمون BA برای صفت کالوس‌زایی در ترکیب BA-2,4-D گیاه شیرین‌بیان..... ٦٦

شکل٤-٢٤- اثر سطوح هورمون 2,4-D برای صفت کالوس‌زایی در گیاه شیرین‌بیان با ترکیب BA-2,4-D.....٦٧

شکل٤-٢٥- اثر سطوح هورمون BA برای صفت حجم کالوس در گیاه شیرین‌بیان با ترکیب BA-2,4-D..... ٦٨

شکل٤-٢٦- اثر سطوح هورمون 2,4-D برای صفت حجم کالوس در گیاه شیرین‌بیان با ترکیب BA-2,4-D..... ٦٨

شکل٤-٢٧- اثر سطوح هورمون BA برای صفت رنگ کالوس در گیاه شیرین‌بیان با ترکیب BA-2,4-D..... ٦٩

شکل٤-٢٨- اثر سطوح هورمون 2,4-D برای صفت رنگ کالوس در گیاه شیرین‌بیان.....٧٠

شکل ٤-٢٩- کالوس‌هایی با حجم بزرگ‌تر و رنگ روشن در ترکیب هورمونی BA، ١ میلی‌گرم بر لیتر و هورمون 2,4-D میلی‌گرم بر لیتر.....٧١

شکل٤-٣٠- ترکیبات تیماری ریزنمونه و سطوح هورمون BA برای صفت باززایی در گیاه شیرین‌بیان.....٧٣

شکل٤-٣١- اثر سطوح هورمون NAA برای صفت درصد باززایی کالوس گیاه شیرین‌بیان در ترکیب هورمونی BA-NAA.....٧٤

شکل٤-٣٣- ترکیبات تیماری ریزنمونه‌ها و سطوح هورمون 2,4-D برای باززایی کالوس‌ها با ترکیب BA-2,4-D..... ٧٥

شکل ٤-٣٤- باززایی از کالوس (ریزنمونه ساقه) در ترکیب هورمونی BA با غلظت ٢ و 2,4-D با غلظت ٠/٥ میلی‌گرم بر لیتر.....٧٦

شکل ٤-٣٥-گیاه باززا شده از کالوس در ترکیب هورمونی BA-2,4-D.....٧٦

شکل ٤-٣٦-انتقال گیاه باززا شده از کالوس به محیط گلدان.....٧٦

فهرست جداول

٣-١- عناصر پر مصرف مورد نیاز در تهیه استوک ماکرو محیط کشت MS..... ٣٣

۳-۲- عناصر کم مصرف مورد نیاز در تهیه استوک میکرو محیط کشت MS ۳٤

۳-۳- جدول ویتامین‌های به کار رفته در محیط کشت.MS..... ۳٤

۳-٤- مواد به کار رفته برای تهیه استوک آهن محیط کشتMS ۳۵

۳-۵- حلال جهت تهیه استوک هورمون‌های به کار رفته..... ۳۵

۳-٦- هورمون‌ها و سطوح هورمونی استفاده شده برای باززایی مستقیم..... ۳۸

۳-۷- سطوح هورمونی به کار رفته در تولید کالوس و باززایی در شیرین‌بیان..... ٤۲

٤-۱- تجزیه واریانس مربوط به ریزازدیادی در گیاه شیرین‌بیان..... ٤۹

٤-۲- تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده در القای کالوس گیاه شیرین‌بیان در ترکیب هورمونی .BA-NAA ۵۹

٤-۳- تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده در القای کالوس گیاه شیرین‌بیان در ترکیب هورمونی BA-2,4-D ٦۵

فصل اول

مقدّمه

مقدمه

هزاران سال است که گیاهان دارویی از مهم‌ترین منبع درمانی محسوب می‌شوند حتی امروزه، سازمان بهداشت جهانی اعلام نموده که بیش از ۸۰ درصد از مردم دنیا هنوز در طب سنتی از گیاهان دارویی برای درمان استفاده می‌نمایند (Srivastava, 2000). گیاهان همچنین منبع بسیاری از درمان‌های جدید نیز می‌باشند. تقریباً یک‌چهارم داروهای تولید شده حاوی عصاره‌های گیاهی یا ترکیباتی هستند که از مواد گیاهی به دست آمده‌اند یا براساس ترکیبات گیاهی مدل‌سازی شده‌اند (Tripathi and Tripathi, 2003; Yaniv, 2005). کشور ایران به اندازه‌ی چهار برابر قاره اروپا دارای شرایط اقلیمی برای تولید گیاهان دارویی است. با توجه به تنوع آب‌وهوایی، کشت انواع گیاهان دارویی و معطر در آداب و رسوم ایرانیان سابقه طولانی دارد. رویکرد جدید علم به سمت تولید گیاهان دارویی و مواد طبیعی به جای استفاده از مواد شیمیایی مصنوعی، اهمیّت کشت و فرآوری این گیاهان را روشن می‌سازد و بازگشت به سمت طب سنتی و استفاده از گیاهان دارویی سبب شده در مراکز تحقیقات به روش‌های تولید و بهبود روش‌های استخراج متابولیت‌های ثانویه بیشتر توجه شود. متابولیت‌های ثانویه اغلب برای گیاه بدون فایده هستند، ولی برعکس اثرات درمانی آنها قابل توجه است. عوارض نامطلوب داروهای شیمیایی به پیشرفت علم گیاهان دارویی سرعت بیشتری بخشیده است. کلیه موادی که در گیاهان دارویی یافت می‌شوند هر کدام به نوبه خود و همه در مجموع به هنگام مصرف اثر درمانی دارند. غالباً وجود ماده‌ای اثر درمانی ماده دیگر را تقویت می‌کند. این مواد بر روی هم می‌توانند اثر تشدیدکننده یا اثر کنترل‌کننده و تنظیم‌کننده داشته باشند. در کل، اثر مجموعه این مواد به هنگام مصرف گیاهان دارویی در مقایسه با داروهای شیمیایی، فاقد اثرات جانبی بر روی انسان است (معقول، ۱۳۷۷).

شیرین‌بیان یکی از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی می‌باشد. ریشه این گیاه در سرتاسر دنیا کاربرد وسیعی در پزشکی، صنایع غذایی، دخانیات و صنایع دیگر دارد. گیاه شیرین‌بیان محتوی ساپونین‌های تری ترپنویید(۲۰-٤ درصد) است که مهم‌ترین آن گلیسریزین [1](اسید گلیسریزیک) است که از ریشه‌ها و ریزوم‌ها بدست می-آید که این ماده ۵۰ برابر شیرین‌تر از شکر است. در صنایع غذایی از عصاره‌ی این گیاه برای شیرین کردن و معطر کردن استفاده می‌شود. شیرین‌بیان و مشتقات آن به طور گسترده در صنایع دارویی استفاده می‌شود که دارای خواص ضد سرطانی، ضد باکتریایی و ضد ویروسی می‌باشد (Zalkov *et al*.,1994; Fiore, 2008). عصاره‌ی این گیاه درمان کننده زخم معده و اثنی‌عشر است و در درمان سرطان معده تأثیر مطلوب دارد. همچنین برای روماتیسم و ورم مفاصل استفاده می‌شود (Olukoga and Donaldson 1980; Duke 1981).

تکثیر این گیاه از طریق بخش‌های رویشی (ریشه‌ها و ریزوم‌ها) و بذر می‌باشد. تکثیر از طریق بذر به دلیل وجود پوسته‌ی سخت بسیار پایین می‌باشد. تکثیر از طریق بخش‌های رویشی بسیار کند می‌باشد چون سال‌ها طول می‌کشد تا دوباره ریشه‌ها و ریزوم‌ها رشد کرده و قابل استفاده شوند. از طرفی با توجه به انقراض این گیاه، از یک جهت به دلیل برداشت بی‌رویه این گیاه از طبیعت و از جهت دیگر به دلیل مبارزه با این گیاه به عنوان علف هرز، و با توجه به اینکه رشد این گیاه محدود به مناطق خاصی می‌باشد و همچنین ریشه‌ها و استولون‌ها برداشت شده از گیاهانی که از طبیعت برداشت می‌شوند کیفیت و کمیت کافی برای استفاده در صنایع داروسازی را ندارند. بنابراین با توجه به محدودیت‌های خاص، روش کشت بافت روشی مناسب و مؤثر برای تکثیر این گیاه می‌باشد (Kojoma et al., 2010). هدف از اصلاح گیاهان دارویی، افزایش کمیّت

[1]-Glycyrrhizin

و کیفیت آن دسته از مواد مؤثره در این گیاهان است که در صنایع دارویی از اهمیت خاصی برخوردار هستند. در این راستا استفاده از تکنیک‌های وابسته به کشت بافت[1] و بیوتکنولوژی به منظور ارتقای صفات کمّی و کیفی و کاهش زمان اصلاح نباتات از اهمیت خاصی برخوردار است. کشت بافت‌های گیاهی در آزمایشگاه، ابزار مناسبی برای رسیدن به هدف‌های ناممکنی است که در شرایط خارج آزمایشگاه وجود ندارد (میردریکوند، ۱۳۸۱). به کشت سلول، بافت، اندام و یا گیاه کامل بر روی محیط کشت غذایی در شرایط کاملاً استریل آزمایشگاهی کشت بافت گیاهی اطلاق می‌گردد. اگر یک بافت تمایز یافته جدا شود و در شرایط آزمایشگاهی تولید یک توده سلولی تمایز نیافته به نام کالوس نماید، این پدیده را کشت کالوس می‌نامند. کالوس برای تولید جنین‌های سوماتیکی و تکثیر انبوه گیاه و نیز برای کشت سلول‌های گیاهی به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار می‌گیرد همچنین از کالوس برای مطالعات سلولی، ایجاد تنوع و انتقال ژن استفاده می‌شود. به توسعه ساختارهای اندام مانند مثل ریشه‌ها، شاخه‌ها، جوانه‌های گل، جنین‌های سوماتیکی و غیره از کالوس، باززایی[2] اطلاق می‌شود. اندام‌زایی[3] نیز برای تعریف این رویدادها به‌کار می‌رود.

در شرایط کشت بافت تعیین محیط کشت مناسب یکی از مسایل مهم می‌باشد که عموماً از محیط کشت موراشیک و اسکوگ[4] برای اکثر گونه‌ها استفاده می‌شود. در فصول بعدی به جزییات آن بیشتر

[1] -Tissue culture
[2] -Regeneration
[3] -Organogenesis
[4] - Murashige and Skoog (MS)

پرداخته می‌شود. دو گروه مهم هورمون‌ها شامل اکسین‌ها[1] و سیتوکنین‌ها[2] نقش اساسی را در مراحل مختلف کشت بافت بر عهده دارند. شرایط درون انکوباسیون محیط کشت از قبیل نور، دما و رطوبت نسبی از پارامترهای مهم در کشت محسوب می‌گردند (باقری، ۱۳۸۲). ریزازدیادی یا تکثیر و تولید انبوه گیاهان از طریق فنون مختلف کشت بافت گیاهی، یکی از مهم‌ترین و موفقیت‌آمیزترین تکنیک‌ها محسوب می‌شود (حسندخت، ۱۳۸۵).

اهداف پژوهش

هدف از انجام این پژوهش دست یافتن به روشی مناسب جهت ریزازدیادی گیاه شیرین‌بیان و بهبود روش‌های کشت بافت این گیاه از طریق تولید کالوس و باززایی کالوس‌های تولید شده می‌باشد. همچنین تأثیر عواملی از قبیل محیط کشت مناسب و ریزنمونه مناسب در تکثیر این گیاه از طریق کشت درون‌شیشه‌ای مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

[1] -Auxin
[2] -Cytokinin