بررسی میزان گلیسیریزیک اسید درکالوسها و ریشه‌های طبیعی چند جمعیت از گیاه شیرین بیان

فرانسواز برنارد، سیده حمیرا سلیمانی، محمدباقر رضایی، کامکار جایمند
دانشگاه شهید بهشتی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

چکیده

در پژوهش حاضر مقدار اسید گلیسیریزیک (GA) در ریشه‌های طبیعی و کالوس‌های چند جمعیت ازگیاه شیرین بیان[۱] با روش HPLC تعیین گردید. ریشه‌ها و بذرهای گیاه مذکور از مناطق آباده ، جوپار و ویسیان جمع آوری شدند. نتایج حاصل از بررسی تغییرات اسید گلیسیریزیک در ریشه‌ها نشان داد که مقدار این ترکیب در جمعیت‌های مختلف، از تفاوت معنی‌داری برخوردار نیست. همچنین به منظور بررسی تاثیر عواملی چون نوع واریته و خاستگاه قطعه جدا کشت بر تولید اسید گلیسیریزیک، با استفاده از قطعات جدا کشت ریشه‌ای حاصل از بذرها در محیط کشت MS دارای $0/5\ mg.l^{-1}$ (2,4-D و IAA) و $0/1\ mg.l^{-1}$ BAP کالوس ایجاد گردید. میزان رشد و مقدار اسید گلیسیریزیک در کالوسهای شش هفته‌ای محاسبه شد. نتایج نشان داد که میزان رشد و مقدار اسید گلیسیریزیک در جمعیت‌های مختلف به طور معنی‌داری تفاوت دارد. در کالوس‌های فارس واریته گلاندولیفرای شیرین‌بیان[۲] که از رشد بیشتری برخوردار است، کمترین میزان اسید وجود دارد و بیشترین مقدار آن در کالوس‌های فارس واریته گلابرای شیرین بیان[۳] مشاهده می‌شود.

مقدمه

گیاه شیرین بیان از تیرة بقولات[۴] و راستة بقولات[۵] است [۹]. این گیاه دو واریته به نامهای گلابرا[۶] و گلاندولیفرا[۷] و دارد که در واریته اول نیام فاقد کرک و در واریته دوم نیام کرکدار است[۱۰]. شیرین بیان در طب سنتی ،صنایع دارویی و صنایع غذایی کاربرد دارد. اهمیت وارزش ریشه این گیاه در تنوع مواد شیمیایی موجود در آن است [۱]. ترکیباتی چون فلاونوئیدها، کومارین‌ها، شالکونها و تری‌ترپنها از این گیاه استخراج شده است [۵]. در میان مواد موثر شیرین بیان، گلیسیریزین از اهمیت بیشتری برخوردار است. گلیسیریزین در بخشهای چوبی ریشه بصورت کریستال‌های نمک کلسیم، منیزیم و پتاسیم یافت می‌شود[٤]. این ماده پنجاه مرتبه از سوکرزشیرین‌تر است و در درمان التهاب، زخم، آلرژی [۸] و هپاتیت [۷] مورد استفاده قرار می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: گلیسیریزیک اسید،کالوس، Glycyrrhiza glabra

۱-GLycyrrhiza glabra L ۲ -G. glabra L.var. glandulifera ۳-G .glabra L.var. glabra
٤- Fabaceae ٥- Fabal ٦- var.glabra ۷ - var. glandulifera

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-03-29]

از آنجایی که این گیاه محدود به نواحی خاصی است و تکثیرکلاسیک آن با مشکلات زیادی همراه است به کشت invifro گیاه توجه ویژه‌ای می‌شود[١٤]. در مورد تولید اسیدگلیسریزیک در کشت بافت شیرین‌بیان نتایج متناقضی وجود دارد. «Wu و همکاران (١٩٧٤)، Hayashi و همکاران (١٩٩٠) وToivonen and Rosenqvist (١٩٩٥)» گزارش کرده‌اند که در کشت بافت این گیاه اسیدگلیسیریزیک سنتزنمی‌شود[٣]، [٦]،[١١] در حالی که «Mardamshin و همکاران (١٩٩٦) و Tailang و همکاران (١٩٩٧ و ١٩٩٨)» حضور این ترکیب را در کشت کالوس گیاه مذکور اعلام داشته‌اند[٢]،[١٢]،[١٣].

در مقاله حاضر میزان گلیسیریزیک اسید در ریشه‌های طبیعی و کالوس‌های حاصل از چند جمعیت از این گیاه بررسی شده است.

مواد و روشها

ریشه‌های طبیعی

الف- جمع آوری نمونه

استان لرستان جمع آوری شد. نمونه‌های کرمان و لرستان منحصراً واریته گلاندولیفرا و فارس شامل هر دو واریته گلاندولیفرا و گلابرا است. همراه ریشه‌های گیاه شیرین‌بیان از مناطق آباده در استان فارس، جوپار در استان کرمان و ویسیان درها مقداری از خاک مناطق نیز برداشت شد و مورد آنالیز قرار گرفت.ریشه‌هائی با قطر ١/٤ سانتی متر انتخاب شده و پس از شستشو و خشک شدن به وسیله آسیاب پودر شد و پودرها برای تعیین میزان اسید گلیسیریزیک اسید مورد استفاده قرار گرفتند.

ب- استخراج گلیسیریزیک اسید از نمونه‌ها

برای تعیین اسید گلیسیریزیک گرم از پودر ریشه‌ها، پس از توزین، با ١٥ میلی لیتر آب جوش و ١ میلی لیتر NH_4OH مخلوط شد و pH با H_3PO_4 روی ٧ تنظیم گردید. ٠/٥ میلی لیتر دیاستاز ١٠% مرک[١] به آن افزوده شد و به مدت ٣٠ دقیقه در بن ماری ٣٧ درجه سانتیگراد حرارت داده شد و سپس با متانول به حجم ٥٠ میلی لیتررسید و محتویات با کاغذ صافی واتمن ٤٢ صاف شد .

ج - تعیین میزان اسید گلیسیریزیک با HPLC

٢٠ میکرولیتر از محلول حاصل به دستگاه HPLC دارای فاز متحرک استیک اسید، متانول، آب با نسبت‌های٦:٦٠ :٣٤ و آشکارساز ٢٥٤ نانومتر تزریق گردید و به منظور تعیین میزان آن از استاندارد $mg.l^{-1}$ ٠/١ گلیسیریزیک اسید مرک استفاده شد [١٩]. میزان اسید در کالوس‌ها با مقایسه مساحت پیک استاندارد و از رابطه زیر محاسبه گردید:

١-Merck

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-03-29]

[مساحت پیک استاندارد / (مساحت پیک نمونه × غلظت GA استاندارد) = غلظت GA درنمونه]

کشت بافت

الف ـ تشکیل کالوس

بذرهای گیاه از مناطق آباده (شامل هر دو واریته)، جوپار و ویسیان (واریته گلاندولیفرا) همراه با ریشه‌ها جمع‌آوری شد چون پوستهٔ بذرها سخت است، به منظور غلبه بر مشکل جوانه زنی، به مدت ۳۰ دقیقه با سولفوریک اسید ۹۸% تیمار شد و جهت ضدعفونی ابتدا در الکل ۷۰% به مدت ۲ دقیقه و سپس درسدیم هیپوکلریت ۱% به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد و پس از شستشو با آب مقطر، به محیط MS [۱۶] انتقال یافتند و از ریشه‌های ده روزه حاصل از رویش بذرها به عنوان قطعه جدا کشت استفاده گردید.

قطعات ۱ سانتی‌متری جدا کشت در محیط MS دارای هورمونهای 2,4 –D، IAA و BAP به غلظت‌هائی به ترتیب ۰/۵، ۰/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر منتقل شدند. کشتها در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار در فیتوترون دارای دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره روشنایی ۱۶ ساعت قرار داده شد و هر سه هفته یکبار واکشت می‌شدند. کالوسهای شش هفته‌ای مورد آنالیز قرار گرفتند و وزن‌تر و خشک و اندیس رشد آنها محاسبه شد.

اندیس رشد از رابطه زیر محاسبه گردید:

[وزن خشک قطعه جدا کشت / (وزن خشک قطعه جدا کشت - وزن خشک کالوس) = اندیس رشد]

ب ـ تعیین میزان اسید کلیسیریزیک

کالوسها پس از شش هفته از محیط کشت خارج شد و به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۶۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت و پس از خشک شدن، به پودر تبدیل شد و با همان روش ذکر شده برای استخراج و اندازه‌گیری اسید در ریشه‌های طبیعی، مقدار این ترکیب در یک گرم از پودر کالوسها تعیین شد.

آنالیز آماری

آنالیز آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 6.0 در قالب طرح CRD با ۹۵% اطمینان صورت گرفت.

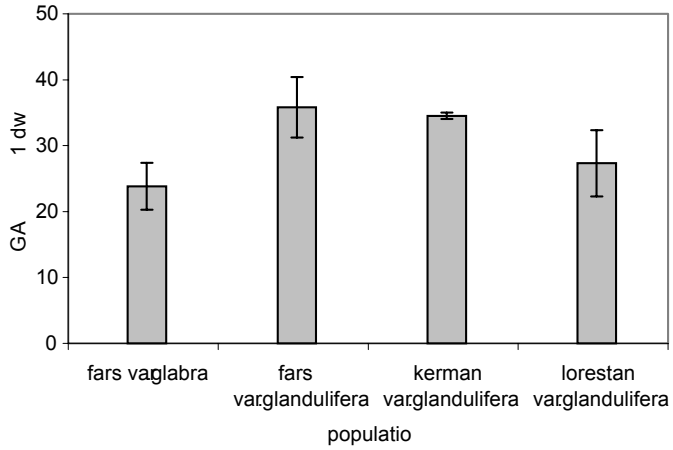
نتایج و بحث

ریشه‌های طبیعی مواد موثره موجود در گیاهان دارویی اگرچه با هدایت فرایندهای ژنتیکی ساخته می‌شود ولی ساخت آنها بطور بارزی تحت‌تاثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرد. نظور بررسی تاثیر عوامل محیطی بر سنتز GA در شیرین‌بیان، میزان این ترکیب در ریشه‌های چند جمعیت از این گیاه اندازه‌گیری شد.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-03-29]

نمودار ۱ مقدار این ترکیب را در جمعیت‌های متفاوت نشان می‌دهد. مطالعه آنالیز واریانس نشان‌می‌دهد که در سطح α=۰/۰۵، میزان GA در ریشه‌های متعلق به مناطق مختلف از تفاوت معنی‌داری برخوردار نیست (P>۰/۰۵) (جدول۱). توجه به نتایج حاصل میزانGA در ریشه‌های شیرین‌بیان ایران بطور متوسط میانگین ۳۰($mg.g^{-1}dw$) یا ۳% (w/w) است. خصات آب وهوا و نتایج آنالیز خاک این مناطق در جداول ۲ و ۳ ارائه شده است. «ick و همکاران» بیان می‌کنند که GA در ریشه‌های گیاه شیرین‌بیان تحت تأثیر عواملی چون واریته و سن گیاه، قطر ریشه و شرایط آب و هوایی حاکم متغیر است[۵]. در تحقیق حاضر مشاهده شد که علیرغم اختلافات موجود در شرایط محیطی، مقدار GA در این جمعیت‌ها از تفاوت معنی‌داری برخوردار نیست. با توجه به آنکه ژنوتیپ و عوامل محیطی هر دو در سنتز متابولیت‌های ثانوی اثر می‌گذارند، بنابراین احتمالاً ژنوتیپ این گیاهان باید متفاوت باشد که در پاسخ به عوامل محیطی مختلف، در نهایت نتیجه یکسان است. البته تایید این فرضیه نیازمند آزمایش‌هایی چون کشت گیاه در شرایط محیطی یکسان، تعیین کاریوتایپ و سنجش ایزوزیم‌ها می‌باشد.

نمودار ۱- مقدار اسید گلیسیریزیک ($mg.g^{-1}$ dw) در ریشه‌های طبیعی چند جمعیت از گیاهشیرین‌بیان



جدول ۱- مقدار اسید در ریشه‌های گیاه شیرین‌بیان متعلق به مناطق مورد بررسی

اسید گلیسیریزیک در ریشه‌های گیاه شیرین‌بیان متعلق به مناطق مورد بررسی(مقادیر میانگین سه تکرارمعیت ریشه‌های طبیعی	E ± میزان اسید گلیسیریزیک ($mg.gdw^{-1}$)
جمعیت فارس واریته گلابرا	۲۳/۸۳ ± ۳/۵۸
جمعیت فارس واریته گلاندولیفرا	۳۵/۸۳ ± ٤/۵۸
جمعیت کرمان واریته گلاندولیفرا	۳٤/۵۱ ± ۰/٤۹
جمعیت لرستان واریته گلاندولیفرا	۲۷/۳۳ ± ۵/۰٤

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-03-29]

جدول۲ـ مشخصات مناطق مورد بررسی

مناطق	طول جغرافیایی (درجه)	عرض جغرافیایی (درجه)	ارتفاع محل(متر)	متوسط حداقل دما (درجه سانتی گراد)	متوسط حداکثردما (درجه سانتی گراد)
آباده	۵۲/٤۰	۳۱/ ۱۱	۲۰۱۵	٦/۹	۲۳/۳
جوپار	۵۷/۵ـ۵۷/۱۰	۳۰ـ۳۰/۵	۱۸۰۰	۱	۳۲
ویسیان	٤۸/۲۲	۳۳/۲۹	۱۱۲۵	۸/۹	۲۵

جدول ۳ـ نتایج آنالیز خاک مناطق مورد بررسی

مناطق مورد بررسی	نوع بافت خاک	pH	رطوبت اشباع (%)	شوری عصاره اشباع ($ds.m^{-1}$)	پتاسیم قابل جذب (ppm)	فسفر قابل جذب (ppm)	آهک (%)	کربن آلی (%)	ازت (%)
آباده	لوم-شنی	۷/۱۵	٤۲/٤۳	۱/۲	۲۷/۰٦	۱/۸۱	۱۰/۳۸	۱/۲٦	۰/۰۰٦
جوپار	لوم-شنی	۷/۳۵	۲۷/۰۷	۱/۱۰	۲۱/۳٦	۰/۸	۰/۰٦	۰/۲۵	۰/۰۲۷
ویسیان	لوم رسی-رسی	۷/٤٤	۷۸/۹٦	۰/۳٦	٤۱/۳٦	۲/۰۹	۰/۰۷	۱/۷۲	۰/۰۲

کالوس‌ها

قطعه جداکشت، شرایط محیط و نوع محیط کشت از جمله عواملی هستند که در ایجاد کالوس تاثیر می‌گذارند. عوامل متعددی بر انتخاب نوع قطعه جداکشت مؤثراست. این عوامل عبارتند از: سن انتوژنی اندام یا بافت، کیفیت گیاه منبع، فصلی که قطعه از گیاه جدا شده است و اندازه قطعه جداکشت [۱۸].

در این تحقیق قطعات جداکشت ریشه‌ای متعلق به مناطق مختلف در یک نوع محیط کشت و تحت شرایط محیطی یکسان قرار گرفتند.

پس از حدود دو هفته توده‌های حاصل از تکثیر سلولها بر روی قطعات جدا کشت ظاهر گردید. پارامترهای رشد از قبیل وزن تر، وزن خشک و اندیس رشد محاسبه شد. نتایج در جدول ٤ ارائه شده است. از آزمون ANOVA در سطح $\alpha=۰/۰۵$ برای مقایسه پارامترهای مذکور استفاده گردید.

در وزن‌تر جمعیت‌ها اختلافات معنی‌داری مشاهده می‌شود ($P<۰/۰۵$). وزن خشک آنها نیز از تفاوتهای

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-03-29]

معنی‌داری‌برخوردار‌است($P<۰/۰۵$).در نمودار ۲ مشخص شده است که جمعیت فارس واریته گلاندولیفرا بیشترین وزن‌تر و وزن خشک را دارد و کمترین وزن‌تر و خشک متعلق به جمعیت لرستان است.

پارامتر اندیس رشد نیز میان جمعیتها از تفاوت معنی‌داری برخوردار‌است ($P<۰/۰۵$) و جمعیت فارس واریته گلاندولیفرا بیشترین اندیس رشد را دارد و کمترین مقدار متعلق به جمعیت لرستان است(نمودار۳). نتایج نشان می‌دهد که قطعات جداکشت از لحاظ تولید کالوس به محیط القاء پاسخهای متفاوتی می‌دهند، چنانکه جمعیت فارس واریته گلاندولیفرا بیشترین رشد را دارد و کمترین رشد در جمعیت لرستان مشاهده می‌شود.

امروزه مطالعات بسیاری در ارتباط با تولید متابولیتهای ثانوی در کشت سلول و بافت و تلاش برای افزایش آن صورت می‌گیرد [۱۵]. در مورد تولیدGA در کشت بافت شیرین‌بیان نتایج متناقضی وجود دارد. « Tailang و همکاران(۱۹۹۷)» با قراردادن قطعات‌جداکشت ریشه‌ای درمحیط‌کشت MS دارای $mg.l^{-1}$۰/۵(2,4-D و IAA) و $mg.l^{-1}$۰/۱ (BAP) موفق به تولید GA در کالوسها شدند و بنابراین در تحقیق حاضر نیز جهت القای کالوس از این نوع محیط کشت استفاده گردید و برای بررسی اثر قطعات جداکشت متفاوت در تولید GA، قطعات جداکشت حاصل از رویش بذرهای جمعیت‌های مختلف در این محیط کشت و تحت شرایط یکسان قرار داده شدند. مشاهده شد که‌میزان این ترکیب درکالوسهای حاصل میان (۱/۰۷-۰/۰۵ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) متغیر است. بیشترین مقدار در جمعیت فارس واریته گلابرا و کمترین مقدار در جمعیت فارس واریته گلاندولیفرا یافت می‌شود (جدول ۵).

آزمون ANOVA در سطح $\alpha=۰/۰۵$ بیان می‌دارد که اختلافات در مقدار GA در میان جمعیت‌های متفاوت کالوس‌ها معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$).

در میزان تولیدات یک سلول عوامل متعددی دخالت دارند. این عوامل عبارتند از: ژنوتیپ و سن سلول و میزان تمایز سلول و ترکیب محیط کشت.

King در سال ۱۹۸۰ بیان کرد که تعدادی از ویژگیهای مورفولوژیکی و احتمالا ویژگیهای متابولیکی خط سلولی به تنهایی توسط شرایط کشت تعیین نمی‌شود، بلکه بیشتر نتیجه‌ای از نوع گونه و طبیعت قطعه جداکشت است (۱۷).

در تحقیق حاضر نیز چون تمام عواملی که در ایجاد کالوس مؤثرند (سن و اندازه قطعه جدا کشت، شرایط محیط و نوع محیط کشت) یکسان‌اند، تنها عاملی که می‌تواند بر اختلاف رشد و میزان گلیسیریزیک اسید اثرگذار باشد کیفیت گیاهی است که از آن جداکشت تهیه شده است.

با وجود آنکه در قیاس با ریشه‌های طبیعی، مقدار GA در کالوس‌های این گیاه اندک است ولی به کشت بافت آن توجه خاصی می‌شود و با استفاده از تیمارهای هورمونی، موتاژن، elicitor وcocultivation سعی در

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-03-29]

افزایش آن شده است.

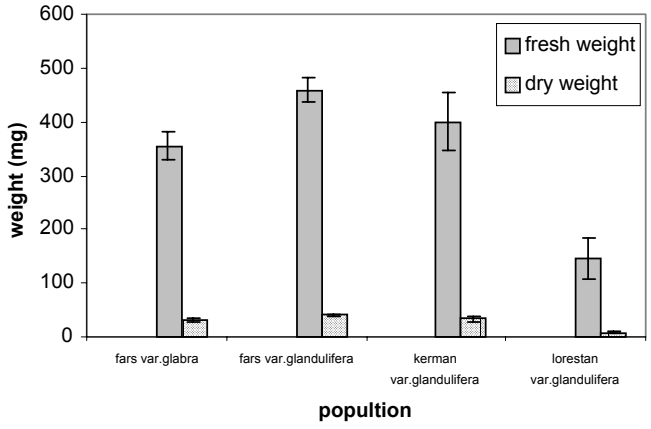
جدول ٤- نتایج آنالیز رشد در جمعیت‌های متفاوت در کالوس‌های گیاه G. glabra پس از شش هفته

جمعیت‌ها	SE ± وزن تر (mg)	SE ± وزن خشک (mg)	SE ± اندیس رشد
جمعیت فارس واریته گلابرا	٣٥٥/٢٩ ± ٢٥/٥	٣٠/٣٧ ± ٣/٢٧	٧١/٣١ ± ٧/٨٠
جمعیت‌فارس‌واریته‌گلاندولیفرا	٤٥٩/٢٢ ± ٢٢/٢٣	٤١/١٧ ± ١/٤٩	٩٧/٠٣ ± ٣/٥٥
جمعیت کرمان گلاندولیفرا	٤٠٠/٤ ± ٥٣/٨٢	٣٣/١٥ ± ٤/١١	٣٩/٤٢ ± ٥/٠٢
جمعیت لرستان واریته گلاندولیفرا	١٤٦/٣٥ ± ٣٨/١٨	٧/٩٥ ± ١/٨٩	٩/٤٤ ± ٢/٥

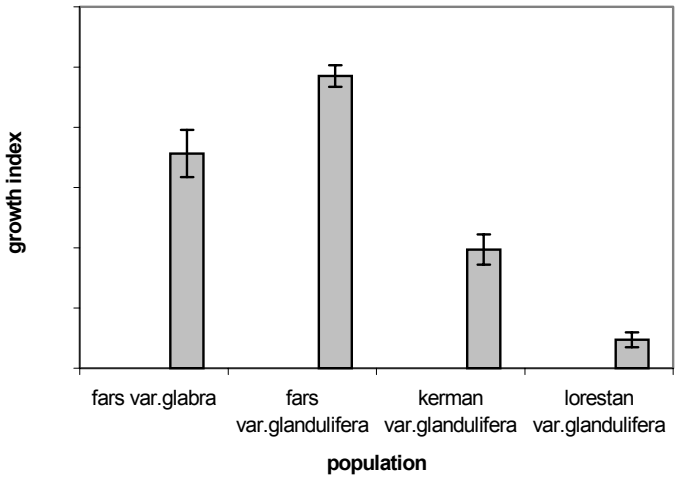
جدول ٥- میزان GA در جمعیت‌های متفاوت کالوسها

جمعیت کالوس‌ها	SE ± میزان GA ($mg.gdw^{-1}$)
جمعیت فارس واریته گلابرا	١/٠٧٥ ± ٠/١١
جمعیت‌فارس‌واریته‌گلاندولیفرا	٠/٠٥ ± ٠/٠٠٨
جمعیت کرمان گلاندولیفرا	٠/١١ ± ٠/٠٤
جمعیت‌لرستان‌واریته‌گلاندولیفرا	٠/٣٥ ± ٠/٠٧

نمودار ٢- تغییرات وزن‌تر و خشک در کالوس‌ها جمعیت‌های متفاوت پس از شش هفته



[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-03-29]



نمودار ۳- مقایسه اندیس رشد در کالوس‌ها جمعیت‌های متفاوت پس از شش هفته

تشکّر و قدردانی

در پایان از آقایان کنعانی، گلی‌پور و خانم مهندس احمدی که جمع آوری نمونه‌ها را برعهده داشتند سپاسگزاری می‌نمایم.

منابع

۱. کمالی سروستانی، حسین، مجموعه مقالات اقتصادی و اجتماعی شیرین‌بیان. سازمان برنامه و بودجه استان فارس ۱۳۷۰.

2. AG. Mardamshin, DF.IL'-gulova, SA. Shaikhutdiuova, Biotekhnologiya,Vol. 2 (1996) 62-64.

3. CH. Wu, EM. Zabawa. PM. Townsley, Canadian-institute of food science and technology journal, Vol.7 (1974) 105-109.

4. G.C. Marzi , G.M. Vampa, Acta Horticulture, Vol.33 (1993) 377-379.

5. G.R. Fenwick, J. Lutomski, C.Nieman Food chem. Vol.38 (1990) 119-143.

6. H. Hayashi, T. Sakai, T.Fukui, M.Tabata. Phytochem.Vol.29 (1990) 3127-29.

7. H. Takeda, K. Ohta, H. Niki, Tokai J Exp Clin Med, 16 (1991) 183

8. I. Kitagawa, J. Liang Zhou, M.Sakagami, Chem. Pharm. Bull., 36 (1988) 3710-13

9. Judd, Campbell, Kellogg,Plant systematics: Aphylogenetic Approach (1999).

10. K.H. Rechinger, Flora Iranica, v.157(1984), Academische Druck-u. verlaganstalt

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-03-29]

11. L. Toivonen, H. Rosenqvist, Plant cell, tissue and organ culture, Vol.41(1995) 249-258

12. M.K. Tailang, M.D. Kharya,V.K. Dixit, Indian. J. pharm. sci. Vol.59 (1997) 22-25

13. M.K. Tailang, M.D. Kharya, M. Tailang, J.of Med.and Arom.plant sciences, Vol.20 (1998) 36-41

14. M. Henry, A.M. Eddy, P. Desmarest, Biotech.in Agric.and forestry, Med. And Arom.Plants III. Ed.Y.P.S.Bajaj, Vol.15 (1991) 270-82.

15. M. Misawa, Plant tissue culture: An alternative for production of useful metabolites (1994) Bio International, Inc.

16.Murashige & Skoog Physiol. Plant, 15 (1962) 437

17. P.J. King, Int.Rev.Cytol.Suppl., vol.11A (1980) 25-53.

18. S.S. Purohit, Agricultural biotechnology (1999) Agrobotanica, India.

19. W.J. Hurst, J.M. Mckim, A.R. Martin, J.Agric.Food Chem. Vol.31 (1983) 387-389.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-03-29]