

بررسی میزان گلیسیریزیک اسید در کالوسها 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 از گیاه شیرین بیان^۱ با روش HPLC تعیین گردید. ریشه‌ها و بذرها ی گیاه مذکور از مناطق آباءه، 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 تأثیر 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 ۵/۰ mg.l⁻¹ (IAA و 2,4-D) و ۱/۰ 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 و واریته گلاندولیفرا ی شیرین بیان^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 تیره بقولات^۴ و راسته بقولات^۵ است [۹]. این گیاه دو واریته به نامهای گلابرای^۶ و گلاندولیفرا^۷ 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 ارزش ریشه این گیاه در تنوع مواد شیمیایی موجود در آن است [۱۱]. 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 [۴]. این ماده پنجاه مرتبه از سوکرز شیرین‌تر است و در درمان التهاب، زخم، آلرژی [۸] و هیپاتیت [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*

^۴- Fabaceae

^۵- Fabal

^۶- var. *glabra*

^۷- var. *glandulifera*

از آنجایی که این گیاه محدود به نواحی خاصی است و تکثیر کلاسیک آن با مشکلات زیادی همراه است به کشت invitro گیاه توجه ویژه‌ای می‌شود [۱۴]. در مورد تولید اسید گلیسیریزیک در کشت بافت شیرین بیان نتایج متناقضی وجود دارد. «Wu و همکاران (۱۹۷۴)، Hayashi و همکاران (۱۹۹۰) و Toivonen and Rosenqvist (۱۹۹۵)» گزارش کرده‌اند که در کشت بافت این گیاه اسید گلیسیریزیک سنتز نمی‌شود [۳]، [۶]، [۱۱] در حالی که «Mardamshin و همکاران (۱۹۹۶) و Tailang و همکاران (۱۹۹۷ و ۱۹۹۸)» حضور این ترکیب را در کشت کالوس گیاه مذکور اعلام داشته‌اند [۲]، [۱۲]، [۱۳].

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 شیرین بیان از مناطق آباده در استان فارس، جویبار در استان کرمان و ویسیان درها مقداری از خاک مناطق نیز برداشت شد و مورد آنالیز قرار گرفت. ریشه‌هایی با قطر ۱/۴ 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 ۱۵ میلی لیتر آب جوش و ۱ میلی لیتر NH_4OH مخلوط شد و pH با H_3PO_4 روی ۷ تنظیم گردید. ۰/۵ میلی لیتر دیاستاز ۱۰٪ مرک^۱ به آن افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد حرارت داده شد و سپس با متانول به حجم ۵۰ میلی لیتر رسید و محتویات با کاغذ صافی واتمن ۴۲ صاف شد.

ج- تعیین میزان اسید گلیسیریزیک با HPLC

۲۰ میکرولیتر از محلول حاصل به دستگاه HPLC دارای فاز متحرک استیک اسید، متانول، آب با نسبت‌های ۶۰:۳۴ و آشکارساز ۲۵۴ نانومتر تزریق گردید و به منظور تعیین میزان آن از استاندارد 1 mg.l^{-1} ۰/۱ گلیسیریزیک اسید مرک استفاده شد [۱۹]. میزان اسید در کالوس‌ها با مقایسه مساحت پیک استاندارد و از رابطه زیر محاسبه گردید:

^۱-Merck

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

کشت بافت

الف - تشکیل کالوس

بذرهای گیاه از مناطق آباده (شامل هر دو واریته)، جوپار و ویسیان (واریته گلاندولیفرا) همراه با ریشه‌ها جمع‌آوری شد چون پوسته 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 در سدیم 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 IAA، 2,4-D و BAP به غلظت‌هایی به ترتیب ۰/۵، ۰/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر منتقل شدند. کشتها در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در فیتوترون دارای دمای 25 ± 1 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 وزن تر 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 - 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

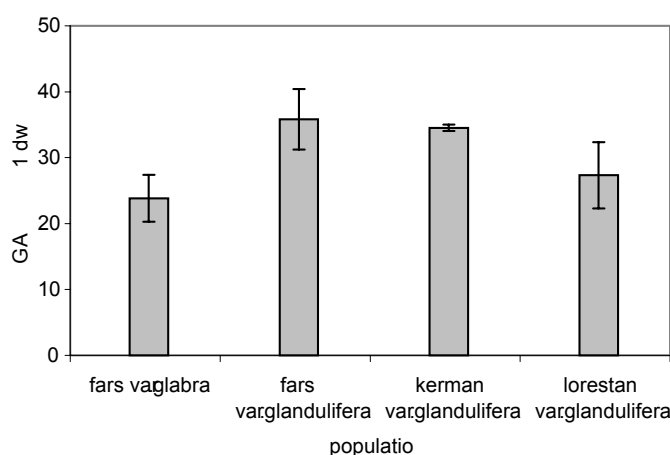
آنالیز آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 6.0 در قالب طرح CRD با ۹۵٪ اطمینان صورت گرفت.

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. نظیر بررسی تاثیر عوامل محیطی بر سنتز GA در شیرین‌بیان، میزان این ترکیب در ریشه‌های چند جمعیت از این گیاه اندازه‌گیری شد.

نمودار ۱ مقدار این ترکیب را در جمعیت‌های متفاوت نشان می‌دهد. مطالعه آنالیز واریانس نشان می‌دهد که در سطح $\alpha=0/05$ ، میزان GA در ریشه‌های متعلق به مناطق مختلف از تفاوت معنی‌داری برخوردار نیست ($P>0/05$) (جدول ۱). توجه به نتایج حاصل میزان GA در ریشه‌های شیرین‌بیان ایران بطور متوسط میانگین $(mg.g^{-1}dw)$ ۳۰ یا ۳% (w/w) است. خصات آب و هوا 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 کاربوتایپ و سنجش ایزوزیم‌ها می‌باشد.

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



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 تکرار معیت ریشه‌های طبیعی)	$\pm E$ میزان اسید گلیسیریزیک ($mg.gdw^{-1}$)
جمعیت فارس واریته گلابرا	$23/83 \pm 3/08$
جمعیت فارس واریته گلاندولیفرا	$35/83 \pm 4/08$
جمعیت کرمان واریته گلاندولیفرا	$34/01 \pm 0/49$
جمعیت لرستان واریته گلاندولیفرا	$27/33 \pm 0/04$

جدول ۲- مشخصات مناطق مورد بررسی

مناطق	طول جغرافیایی (درجه)	عرض جغرافیایی (درجه)	ارتفاع (متر)	متوسط حداقل دما (درجه سانتی گراد)	متوسط حداکثر دما (درجه سانتی گراد)
آبادیه	۵۲/۴۰	۳۱/۱۱	۲۰۱۵	۶/۹	۲۳/۳
جوپار	۵۷/۵-۵۷/۱۰	۳۰-۳۰/۵	۱۸۰۰	۱	۳۲
ویسیان	۴۸/۲۲	۳۳/۲۹	۱۱۲۵	۸/۹	۲۵

جدول ۳- 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 (%)
آبادیه	لوم- شنی	۷/۱۵	۴۲/۴۳	۱/۲	۲۷/۰۶	۱/۸۱	۱۰/۳۸	۱/۲۶	۰/۰۰۶
جوپار	لوم- شنی	۷/۳۵	۲۷/۰۷	۱/۱۰	۲۱/۳۶	۰/۸	۰/۰۶	۰/۲۵	۰/۰۲۷
ویسیان	لوم رسی- رسی	۷/۴۴	۷۸/۹۶	۰/۳۶	۴۱/۳۶	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 مؤثر است. این عوامل عبارتند از: سن انووژنی 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 ۴ ارائه شده است. از آزمون ANOVA در سطح $\alpha=0/05$ برای مقایسه پارامترهای مذکور استفاده گردید. در وزن‌تر جمعیت‌ها اختلافات معنی‌داری مشاهده می‌شود ($P<0/05$). وزن خشک آنها نیز از تفاوت‌های

معنی‌داری برخوردار است ($P < 0/05$) 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 برخوردار است ($P < 0/05$) و جمعیت فارس واریته گلاندولیفرا بیشترین اندیس رشد را دارد و کمترین مقدار متعلق به جمعیت لرستان است (نمودار ۳). نتایج نشان می‌دهد که قطعات جداگشت 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 تولید GA در کشت بافت شیرین بیان نتایج متناقضی وجود دارد. «Tailang و همکاران (۱۹۹۷)» با قراردادن قطعات جداگشت ریشه‌ای در محیط کشت MS دارای $0/5 \text{ mg.l}^{-1}$ (IAA و 2,4-D) و $0/1 \text{ mg.l}^{-1}$ (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 جداگشت متفاوت در تولید GA، قطعات جداگشت حاصل از رویش بذرهای جمعیت‌های مختلف در این محیط کشت و تحت شرایط یکسان قرار داده شدند. مشاهده شد که میزان این ترکیب در کالوسهای 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 $\alpha = 0/05$ بیان می‌دارد که اختلافات در مقدار GA در میان جمعیت‌های متفاوت کالوس‌ها معنی‌دار است ($p < 0/05$).

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 احتمالاً ویژگیهای متابولیکی خط سلولی به تنهایی توسط شرایط کشت تعیین نمی‌شود، بلکه بیشتر نتیجه‌ای از نوع گونه و طبیعت قطعه جداگشت است (۱۷).

در تحقیق حاضر نیز چون تمام عواملی که در ایجاد کالوس مؤثرند (سن و اندازه قطعه جداگشت، 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 جداگشت 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 و cocultivation سعی در

افزایش آن شده است.

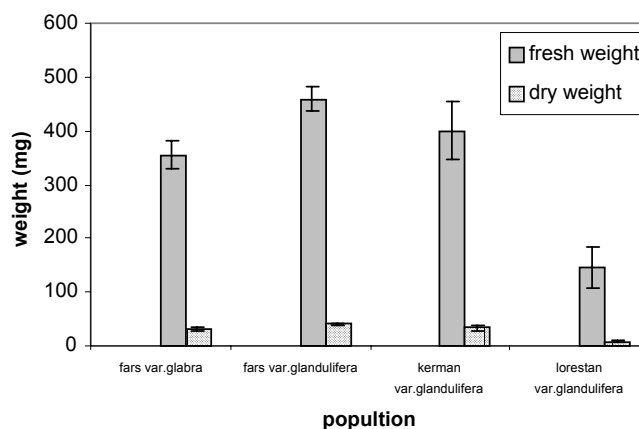
جدول ۴- نتایج آنالیز رشد در جمعیت‌های متفاوت در کالوس‌های گیاه *G. glabra* پس از شش هفته

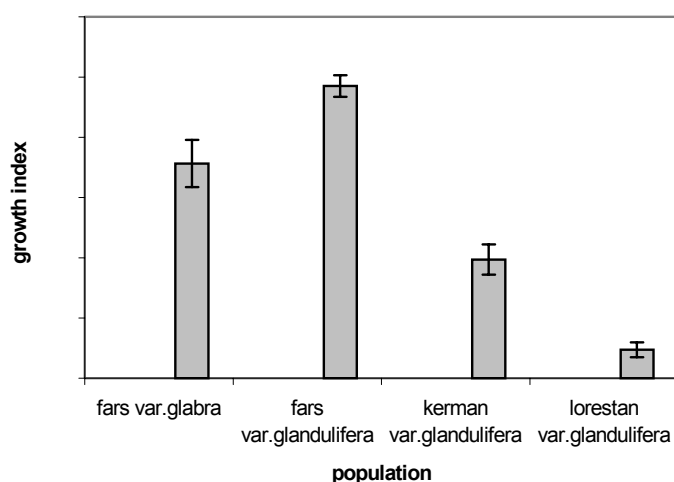
جمعیت‌ها	SE $\pm$ وزن تر (mg)	SE $\pm$ وزن خشک (mg)	SE $\pm$ اندیس رشد
جمعیت فارس واریته گلابرا	۳۵۵/۲۹ $\pm$ ۲۵/۵	۳۰/۳۷ $\pm$ ۳/۲۷	۷۱/۳۱ $\pm$ ۷/۸۰
جمعیت فارس واریته گاندولیفرا	۴۵۹/۲۲ $\pm$ ۲۲/۲۳	۴۱/۱۷ $\pm$ ۱/۴۹	۹۷/۰۳ $\pm$ ۳/۵۵
جمعیت کرمان گاندولیفرا	۴۰۰/۴ $\pm$ ۵۳/۸۲	۳۳/۱۵ $\pm$ ۴/۱۱	۳۹/۴۲ $\pm$ ۵/۰۲
جمعیت لرستان واریته گاندولیفرا	۱۴۶/۳۵ $\pm$ ۳۸/۱۸	۷/۹۵ $\pm$ ۱/۸۹	۹/۴۴ $\pm$ ۲/۵

جدول ۵- میزان GA در جمعیت‌های متفاوت کالوسها

جمعیت کالوس‌ها	SE $\pm$ میزان GA (mg.gdw^{-1})
جمعیت فارس واریته گلابرا	۱/۰۷۵ $\pm$ ۰/۱۱
جمعیت فارس واریته گاندولیفرا	۰/۰۵ $\pm$ ۰/۰۰۸
جمعیت کرمان گاندولیفرا	۰/۱۱ $\pm$ ۰/۰۴
جمعیت لرستان واریته گاندولیفرا	۰/۳۵ $\pm$ ۰/۰۷

نمودار ۲- تغییرات وزن تر و خشک در کالوس‌ها جمعیت‌های متفاوت پس از شش هفته





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

تشکر و قدردانی

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

منابع

۱. کمالی سروسستانی، 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

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.