Archive of SID

فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
شماره پیاپی ۱۰، جلد ۳، شماره ۳، تابستان ۸۹، صفحه ۱۱۵ تا صفحه ۱۲۱

استخراج و تعیین متابولیت‌های ثانویه برخی از گونه‌های گلسنگ‌های پوسته‌ای و برگی در حوزه استان خراسان رضوی با استفاده از تشکیل کریستال‌های ریز

اعظم سلطانی[۱]، **مهرو حاجی منیری**[۱]، طاهر نژادستاری[۲]

۱- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد. **m.h.moniri@mshdiau.ac.ir**
۲- دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.

تاریخ دریافت: ۸۹/٤/٤ تاریخ پذیرش: ۸۹/٦/١٦

چکیده

گلسنگ‌ها که ارگانیسم‌های همزیستی هستند و از یک جزء قارچی و یک یا چند شریک جلبکی تشکیل شده اند. آنالیزهای شیمیایی و میکروشیمیایی متابولیت های ثانویه گلسنگ‌ها درحمایت از نتایج تاگزونومیکی آن‌ها نقش مؤثری دارد به همین علت هدف از این پژوهش استخراج و تعیین متابولیت‌های ثانویه برخی گلسنگ‌های پوسته‌ای و برگی با استفاده از تشکیل کریستال‌های ریز است. طی بررسی تاگزونومیک گلسنگ های کلاته آلبالو (شمال بخش مرکزی کاشمر)، استان خراسان رضوی، علاوه بر بررسی‌های ریخت شناسی، آناتومیک و تست‌های شیمیایی رایج، روش میکرو کریستال نیز بر روی شش گونه با استفاده از دو واکنش‌گر GE و GAW انجام و ۱۳ ترکیب شیمیایی متعلق به شش گروه کلی از متابولیت های ثانویه گلسنگ ها استخراج و تعیین گردید.

کلید واژه: متابولیت ثانویه، گلسنگ، میکروکریستال، خراسان رضوی.

مقدمه

متابولیت‌های ثانویه (Secodary metabolites) گلسنگ‌ها (Lichens) که ترکیبات یا اسیدهای گلسنگی (Lichen acids) نامیده می شوند، به طور معمول بیش از ترکیبات شیمیایی سایر موجودات زنده در سیستماتیک کاربرد دارند زیرا، بسیاری از این ترکیبات اختصاصی بوده و حاصل سنتز در شرایط همزیست می‌باشند. این تولیدات برون سلولی نامحلول در آب که گاهی تا ۳۰٪ وزن خشک تال را تشکیل می‌دهند، بر روی دیواره سلولی هیف های قارچی متبلور شده آن گاه در سطح تال و یا در بافت به خصوصی محدود می گردند (۱۰، ۸). پیش از این متابولیت های ثانویه که به عنوان ترکیبات بی اهمیتی در حفظ حیات موجوداتی که آن ها را می سازند، در نظر گرفته می شدند ولی امروزه برخی اعمال زیست شناسی به حضور این ترکیبات نسبت داده می شود. از طرف دیگر متابولیت های ثانویه گلسنگ ها در صنایع دارو سازی کاربرد فراوانی دارند (۲۰، ۱۴، ۵، ۲). معمولاً ترکیب شیمیایی تال گلسنگ در سراسر طول زندگی یک گونه یکسان باقی می ماند (۷). این ترکیبات شامل رده‌های متفاوت آمینواسیدها (Aminoacids)، الکل‌های قندی (Sugar alcohols)، اسیدهای آلیفاتیک (Aliphatic acids)،

www.SID.ir

Archive of SID

لاکتون‌ها (Lactons)، ترکیبات آروماتیک تک حلقه‌ای (Uni-ring aromatic compounds)، کرومون‌ها (Chromones)، دی بنزوفوران‌ها (Dibenzofurans)، دپسیدها (Depsides)، ترپنوئیدها (Terpenoids)، استروئیدها (Steroids) و کاروتنوئیدها (Carotenoids) می باشند (۲۱، ۹، ۷، ۶، ۴، ۳، ۱). شناسایی ترکیبات گلسنگ‌ها نیازمند استخراج و مقایسه آن ها با نمونه های موثق است. تست‌های نقطه‌ای با معرف‌های رایجی که یکی از مراحل سه گانه شناسایی گلسنگ‌ها می‌باشد، تنها ترکیبات موجود گلسنگ را شناسایی می‌کند، در حالی که روش تشکیل کریستال های بسیار کوچک (Microcrystalzation) ساده ترین روش جهت جدا کردن ترکیبات خاص از گونه‌های مرتبط با یکدیگر محسوب می‌شود (۱۷).اساس روش میکروکریستال بر تشکیل مجدد ترکیبات گلسنگ به صورت بلور در یک حلال مناسب است. حساسیت این روش به قدر کافی بالاست تا آنجا که مقادیر ناچیز این گونه ترکیبات را نیز آشکار می‌کند (۱۱). هدف از این پژوهش استخراج و تعیین متابولیتهای ثانویه برخی گلسنگ‌های پوسته‌ای و برگی با استفاده از تشکیل کریستال‌های ریز است.

مواد و روش‌ها

گلسنگ‌های منطقه کلاته آلبالو واقع در شمال بخش مرکزی کاشمر، استان خراسان رضوی، در طی یک رساله کارشناسی ارشد در گروه زیست‌شناسی واحد مشهد مورد بررسی تاگزونومیک قرار گرفت (۱۲). شناسایی گونه‌ها بر اساس صفات ریخت شناسی، آناتومی و تست‌های نقطه‌ای تحت شرایط استاندارد و با تکیه بر کلیدهای شناسایی (۱۶، ۱۳)، فهرست گونه‌های ایران و مقایسه با نمونه‌های تیپ انجام شد (۱۹، ۱۸). کلیه نمونه‌های مورد بحث در کلکسیون شخصی مؤلف دوم موجود است. بر طبق این تحقیق با توجه به افزایش دو گزارش جدید *Rhizoplaca* peltata (Ramond) Leuckert & *Poelt* و *Lecidea tessellata* Flörke به فهرست گلسنگ‌های خراسان رضوی، قطعاتی از این دو گونه به همراه چهار تال شناخته‌شده گونه‌های *Rhizoplaca melanophthalma* (Ramond) Leuckert & Poelt, *Lecanora muralis* (Schreber.) Rebenh (Pers.) Müll. Arg., *Dimeleana oreina* (Ach.) Norman, *Glypholecia scarba*

جمع‌آوری شده از ناحیه فوق الذکر به منظور اطمینان بیشتر از روند شناسایی، مورد آنالیز میکروکریستال نیز قرار گرفت.

مراحل انجام تکنیک میکروکریستال به ترتیب عبارت است از:

۱- استخراج ترکیبات موجود در هر گونه با استفاده از حلال استون

۲- انتقال عصاره استونی به سطح گرم یک اسلاید میکروسکوپی

۳- تبلور مجدد عصاره استونی با کمک حلال‌های GAW و GE

پس از گذشت ۵ تا ۱۰ دقیقه اسلاید آماده را با درشت نمایی کم مشاهده می‌گردد. از آن جا که برخی ترکیبات جهت تبلور به زمان بیشتری احتیاج دارند، اسلاید پس از ۲۴ ساعت مجدداً بررسی می‌شود (۱۵).

ترکیب شیمیایی و طرز تهیه حلال‌های مذکور عبارتند از (۱۵):

GAw: گلیسرول: ۱، اتانول: ۱، آب مقطر: ۱

GE: گلیسرول: ۱، اسید استیک غلیظ: ۳

نتایج

در این بررسی، ۱۳ ترکیب شیمیایی متعلق به شش گروه از متابولیت‌های ثانویه با استفاده از روش میکروکریستال استخراج و تعیین گردید. اطلاعات زیر به ترتیب شامل نام گونه ای، نام مولف گونه، نام ترکیبات کریستالی، گروه‌های اصلی متابولیت‌های ثانویه، حلال مورد آزمون و فرمول شیمیایی هر ترکیب می‌باشد(۱۵، ۹).

www.SID.ir

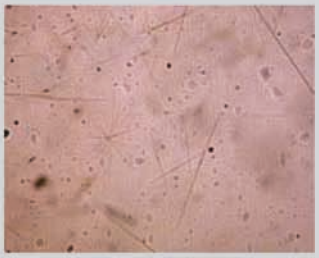
Archive of SID

I. **Dimelaena oreina** (Ach.) Norman .(شکل 1)

1. Fumarprotocetraric acid (Depsidon) (GE), $C_{22}H_{16}O_{12}$.
2. Gyrophoric acid (Tridepside) (GE), $C_{24}H_{20}O_{10}$.
3. Lecanoric acid (Didepside) (GE), $C_{16}H_{14}O_7$ (شکل1- الف).
4. Norstictic acid (Depsidon) (GAW), $C_{18}H_{12}O_9$.
5. Sphaerophorin (Depside) (GE), $C_{23}H_{28}O_7$.(شکل 1- ب)
6. Stictic acid (Depsidon) (GAW), $C_{19}H_{14}O_9$.
7. Usnic acid (Dibenzofurane) (GE), $C_{18}H_{16}O_7$.

شکل ۱- تال *Dimelaena oreina*

شکل ۱- ب. بلور Sphaerophorin در حلال GE



شکل ۱- الف. بلور Lecanoric acid در حلال GE

II. *Glypholecia scarba* (Pers.) Müll. Arg. (شکل 2)

1. Gyrophoric acid (Tridepside) (GE), $C_{24}H_{20}O_{10}$.(شکل 2- الف)

شکل ۲- الف. بلور Gyrophoric acid در حلال GE

شکل ۲- تال *Glypholecia scarba*

www.SID.ir

Archive of SID

III. ***Lecanora muralis*** (Schreber.) Rebenh .(شکل 3)

1. Leucotylin (GE), $C_{30}H_{52}O_3$.(شکل 3- الف)

2. Usnic acid (Dibenzofurane)(GE), $C_{18}H_{16}O_7$.

3. Zeorin (Triterpenoid)(GE), $C_{30}H_{52}O_2$.

شکل ۳- الف. بلور Leucotylin در حلال GE

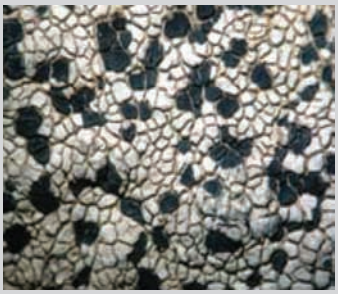
شکل ۳- تال *Lecanora muralis*

IV. ***Lecidea tessellata*** Flörke .(شکل 4)

1. Confluentic acid (Depside)(GE), $C_{28}H_{36}O_8$.(شکل 4- الف)

2. Norstictic acid (Depsidon)(GAW), $C_{18}H_{12}O_9$.(شکل 4- ب)

3. Stictic acid (Depsidon)(GAW), $C_{19}H_{14}O_9$.



شکل ٤- تال *Lecidea tessellata*

شکل ٤- الف. بلور Confluentic acid در حلال GE

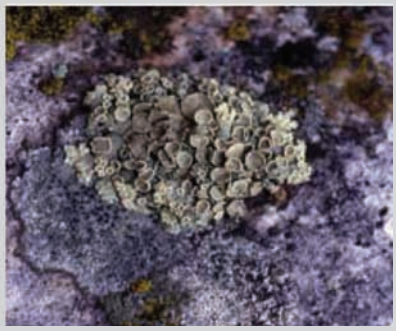
شکل ٤- ب. بلور Norstictic acid در حلال GAW

www.SID.ir

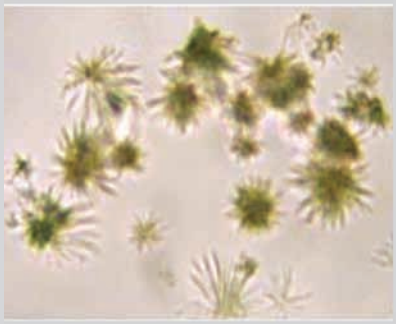
Archive of SID

V. ***Rhizoplaca melanophthalma*** (Ramond) Leuckert & Poelt

1. Lecanoric acid (Didepside)(GE), $C_{16}H_{14}O_7$.
2. Psoromic acid (Depsidon)(GAW), $C_{18}H_{14}O_8$. (شکل 5- الف)
3. Usnic acid (Dibenzofurane)(GE), $C_{18}H_{16}O_7$.



شکل ۵- تال *Rhizoplaca melanophthalma*



شکل ۵- الف. بلور Psoromic acid در حلال GAW

VI. ***Rhizoplaca peltata*** (Ramond) Leuckert & Poelt

1. Hypoprotocetraric acid (Depsidon)(GAW), $C_{18}H_{16}O_7$. (شکل 6- الف)
2. Lecanoric acid (Didepside) (GE), $C_{16}H_{14}O_7$.
3. Norstictic acid (Depsidon) (GAW), $C_{18}H_{12}O_9$.
4. Pannarin (Depsidone) (GE), $C_{18}H_{15}ClO_6$.
5. Usnic acid (Dibenzofurane) (GE), $C_{18}H_{16}O_7$. (شکل 6- ب)
6. Zeorin (Triterpenoid) (GE), $C_{30}H_{52}O_2$.

شکل ٦- تال *Rhizoplaca peltata*

شکل٦- الف. بلور Hypoprotocetraric acid در حلال GAW

شکل ٦- ب. بلور Usnic acid در حلال GE

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

این روش که نیازمند تجهیزات تخصصی نیست عموماً بر روی نمونه‌هایی انجام می‌شود که ترکیبات آن شناخته‌شده‌اند، لذا تفکیک و تشخیص بلورها بر اساس هونک و یوشیمورا (۱۹۹۶) و اورنج و همکاران (۱۹۹۲) میسر می‌شود. حضور بلورهای اصلی شناسایی شده با شرح شیمی هر گونه به ویژه گزارش‌های جدید استان منطبق بود (۱۶، ۹)، ضمن این‌که تشخیص دو ترکیب لکانوریک و گیروفوریک اسید در نمونه‌های مورد آزمایش حساسیت این روش را اثبات می‌کرد (۱۲). از طرف دیگر با کاهش زمان تشکیل بلور، تأثیر عوامل محیطی در نتایج کاهش می‌یابد (۹).

منابع

1. Asahina, Y. , Shibata, S. (1971).Chemistry of Lichen Substances, A. Asher, Co. Ltd. Vaals-Amsterdam.

2. Bergter, E. B. (1987). Chemical structure immunology and application of polysaccharides of Fungi and Lichens, studies in natural products chemistry. Structure Elucidation Part B, Ed: Rahman, A., 5; 275-340.

3. Culberson, C.F. (1969). Chemical and botanical Guide to Lichen Products, The University of North Carolina Press, Chapel Hill.

4.Culberson, C.F. , Elix, J.A. (1989). Lichen substances, Methods in Plant Biochemistry, Ed: Dey, P. M., Harborne, J. B., 1; 509-535.

5. Dembitsky, V. M., Rezanka, T., Bychek, I.A., Shustov ,M.V. (1992b). Phytochemistry, 31;841-43.

6. Elix, J.A., Venables, D.A. (1993). Mycotaxon, 47;275-281.

7. Fahselt, D. (1994). *Secondary biochemistry of lichens*. Symbiosis, 16; 117- 165.

8.Huneck, S., Schreiber, K., Steglich, W. (1973). Flechteninhaltsstoffe-XCVIII. Struktur des Aspicilins. *Tetrahedron* ,29; 3687-3693.

9. Huneck, S., Yoshimura, I. (1996). Identification of Lichen substances. Springer- Verlge. Berline Heidelberg. Printed in Germany. Pp 493.

10. Kirmizigül, S., Koz, Ö., Anil, H., İCLİ ,S. (2003). Isolation and structure elucidation of novel natural products from Turkish Lichen. Turk J Chem, 27; 493-500.

11. Lumsch, H. T. (1988). Taxonomic use of metabolic data in lichen forming fungi. In chemical Fungi Taxonomy, eds frisvard JC, Bridge PD and Arora DK. Macel Dekker, New York.

12. Moniri, M. H., Soltani, A., Kamyabi, S. (2009). Some lichens from Kashmar, NE Iran. Journal of Applied and Natural Science, 1(2);286-290.

13. Nash, T. H., Ryan, B. D.Gries. C. , Bungartz, F., (2002). Lichen Flora of The Greater Sonoran Desert Region. Vol I, Arizon Stata University, Tempe, Arizon, USA.

14. Nishikawa ,Y., Ohki ,K., Takahashi, K., Kurono,G., Kurono, F., Emori, M. (1974). Chem. Pharm. Bull., 22; 2692-2702.

15. Orange, A., W. James, P., J. White, F. (2001). Microchemical methods for the Identification of Lichens.102 pp, British Lichen Society, UK.

16. Purvis, W.o., coppins, B.j., Hawksworth, D.L., James, P.W., Moor, D.M. (1992). The Lichen Flora of Great Britain and Ireland, 710pp. The British Lichen Society.

17. Roiand, M., Nash, T. H.III. (1999). The *genus Heterodermia* in the Sonoran Desert area. The Bryologist, 102(1);1-14.

18. Seaward ,M. R. D., Sipman, H. J. M.,

www.SID.ir

Archive of SID

Schultz, M., Maassoumi, A. A., Hadj Moniry, M., Sohrabi ,M. (2004). A preliminary lichen checklist for Iran. Willednowia, 34;543-576.

19. Seaward, M. R. D., Sipman, H. J. M., Sohrabi, M. (2008). A revised checklist of lichenized. Lichencolouse and allied fungi Iran. Sauteria, 15; 459-420.

20. Vartia, K.O. (1950). Ann. Med. ex., tl. Biol. Fenn., 27; 46-54; Ebenda, 28; 7-19.

21. Zeybek, U., Lumbsch, H.T., Feige, F.B.,Elix, J.A. , John ,V. (1993). Crypt. Bot, 3;260-63.

www.SID.ir