Third National Conference on Life Sciences
ZAMIN KAV RESEARCH CENTER- 2016
۳۰ آذر ۱۳۹۵
سومین کنفرانس ملی
علوم زیستی ایران

تغییر محتوای سولفورافان گیاهچه‌های ازمک *Lepidium draba* (L.) در پاسخ به جاسمونات

فاطمه رضایی*[۱]، مهرداد لاهوتی[۲]، محمود ملکی[۳]، علی گنجعلی[۲]

۱ و *- نویسنده مسوول: دانشجوی دوره دکترای فیزیولوژی گیاهی. دانشگاه فردوسی مشهد .
Fa_re959@um.ac.ir

۲- اساتید گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان

چکیده

سولفورافان یک ایزوتیوسیانات طبیعی است که از هیدرولیز گلوکورافانین توسط میروزیناز تولید می‌شود. گیاه ازمک (*Lepidium draba*) یک علف هرز از خانواده براسیکا است که حاوی مقدار قابل توجهی گلوکورافانین می‌باشد. در این مطالعه، محتوای سولفورافان گیاهچه‌های ۵ روزه ازمک تحت تیمار با غلظت مختلف جاسمونات به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد آنالیز قرار گرفت. بر اساس نتایج، محتوای سولفورافان در گیاهچه‌های تیمار شده بمدت ۴۸ ساعت با غلظت ۵۰ میکرومولار جاسمونات به صورت جزئی افزایش و در غلظت‌های بالاتر این تیمار به صورت جزئی نسبت به نمونه شاهد کاهش نشان داد که در سطح ۵٪ با نمونه شاهد معنی‌دار نبودند. با افزایش زمان تیمار به ۷۲ ساعت، محتوای سولفورافان در تمامی غلظت‌های این الیسیتور بطور معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت. درمجموع، چنین استنباط می‌شود که در شرایط آزمایش با افزایش زمان تیمار و همچنین غلظت الیسیتور، جاسمونات اثر منفی بر تولید سولفورافان در گیاهچه‌های ازمک دارد.

واژگان کلیدی: ازمک، جاسمونات، سولفورافان، محرک زیستی

Alteration of Sulforaphane content in *Lepidium draba* (L.)

Abstract
Sulforaphane (SFN) is a native isothiocyanate, produced from glucoraphanin through myrosinase hydrolysis. Lepidium draba (L.) is a weed plant of the Brassicaceae family contains high level of glucoraphanin. In the present study, SFN content was analyzed in L. draba seedlings under treatment with different concentration of Jasmonate (JA) after 48 and 72 hours. According to the results, increasing of SFN content in presence of 50 µM JA and decreasing of its content at higher concentration was not significant at the level of 5% in compared to control after 48 h treatment. The SFN content decreased at this treatment at higher JA concentration that also was not significant at the level of 5% in comparison with the control. The SFN content drastically decreased in treated seedlings with all JA concentrations as the treatment time increased up to 72 h. Overall, it deduced that in the experimental conditions, by increasing elicitation time as well as elicitor concentrations, Jasmonat has negative effect on SFN content in L. draba seedlings.

Keywords: Elicitor; Jasmonate; Lepidium draba (L.); Sulforaphane.

۱- مقدمه

استفاده از متابولیت‌های ثانویه موجود در گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌ها بیش از دوهزار سال قدمت دارد و همچنان در حال افزایش است (Elbarbry and Elrody, 2011). در حقیقت گیاهان دارویی به دلیل توأم بودن ماهیت طبیعی و وجود ترکیبات همولوگ دارویی در آن‌ها، با بدن سازگاری بهتری دارند و معمولاً فاقد عوارض ناخواسته داروهای شیمیایی هستند، بخصوص در موارد مصرف طولانی و در بیماری‌های مزمن بسیار مناسب‌ترند (Mulabagal and Tsay, 2004). بعنوان مثال تحقیقات اخیر نشان داد که اغلب اعضای تیره شب بو که معمولا شامل سبزیجات رایج (بروکلی، کلم، بروسل، گل کلم، شلغم و ...) هستند، سبب جلوگیری یا به تاخیر انداختن بسیاری از بیماری‌های التهابی از جمله سرطان‌ها می‌شوند. در حقیقت حضور چشمگیر گلوکوزینولات ها – از جمله مهمترین متابولیت‌های ثانویه طبیعی - در این تیره بعنوان یک عامل بالقوه ضد سرطان مطرح بوده و توجه زیادی را به خود جلب نموده است (Fahey et al., 1997). گلوکوزینولات‌ها یا تیوگلوکوزیدها ترکیبات ثانویه دارویی حاوی گوگرد و نیتروژن هستند که از گلوکز و آمینواسید تشکیل شده‌اند و در تیره شب بو به فراوانی یافت می‌شوند (Shaine Tyson et al., 2005; Mithen, 2006).

ازمک (*Lepidium draba* (L.)) از جمله گیاهان دارویی متعلق به این خانواده است که دارای گلوکوزینولات مهم گلوکورافانین می‌باشد (Powell et al., 2005). از بین ترکیبات حاصل از هیدرولیز گلوکوزینولات‌ها بواسطه آنزیم میروزیناز، ایزوتیوسیانات‌ها بسیار فعال بوده و اهمیت درمانی بسیار بالایی دارند. از هیدرولیز گلوکورافانین نیز ایزوتیوسیانات سولفورافان حاصل می‌شود که بعنوان یک ترکیب ضد سرطانی قدرتمند علیه بسیاری از سرطان‌ها عمل می‌کند. گیاهان از گلوکوزینولات‌ها و مشتقات آن‌ها به عنوان سیستم دفاعی طبیعی در برابر حشرات، علف‌خواران و پاتوژن‌های قارچی و باکتریایی استفاده می‌کنند (Samuni-Blank et al., 2012). قابلیت سم‌زدایی و عملکرد آنتی‌اکسیدانی دو ویژگی مهم گلوکوزینولات‌ها محسوب می‌شوند (Fahey et al., 2001). در حقیقت می‌توان گفت گلوکوزینولات‌ها به این دلیل که پیش‌ساز ایزوتیوسیانات‌ها هستند، هم برای گیاه و هم برای سایر موجودات حائز اهمیت می‌باشند (Ishida et al., 2014).

از میان دوازده ترکیب حاصل از هیدرولیز گلوکوزینولات‌های گیاه ازمک، سولفورافان اصلی‌ترین ایزوتیوسیانات موجود (با فراوانی ۶۹٪/۲) محسوب می‌گردد (Radonic et al., 2011). بنابراین این گیاه منبع بسیار مناسبی برای افزایش محتوای سولفورافان بواسطه تیمار با الیسیتورها مد نظر قرار گرفته است. یکی از راه‌های موجود برای تسهیل استخراج ترکیبات دارویی، وادار کردن گیاه به افزایش سنتز ماده شیمیایی مؤثر و مدنظر است. از جمله مهمترین و پرکاربردترین الیسیتورهای زیستی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی هستند که بدلیل سازگاری با محیط‌زیست در مقایسه با محرک‌های غیرزیستی همچون فلزات سنگین و ... همواره مورد توجه بوده‌اند. جاسمونات یا جاسمونیک اسید (JA) و مشتقات آن از جمله این تنظیم کننده‌ها هستند که در مسیرهای سیگنالینگ شرکت نموده و بسیاری از پاسخ‌های دفاعی مستقیم یا غیرمستقیم را در گیاهان تنظیم می‌کند (Ku et al., 2013). در مطالعات مختلف القا تولید گلوکوزینولات‌ها توسط تنش‌ها یا الیسیتورهای زیستی مانند پاتوژن‌ها (Doughty et al., 1995) به اثبات رسیده است. مطالعات نشان می‌دهند که استفاده از هورمون‌های گیاهی می‌تواند باعث تنظیم متابولیسم گلوکوزینولات‌ها نیز شود (Yan and Chen, 2007). بعنوان مثال برادر و همکاران در مطالعه خود به تاثیر مثبت متیل جاسمونات، یعنی استر متیلی جاسمونیک اسید، بر افزایش محتوای گلوکوزینولات‌ها در کلزا اشاره کردند (Brader et al., 2001). در موارد متعدد تاثیر مثبت جاسمونات بر افزایش محتوای گلوکوزینولات‌های اروماتیک یا ایندولی به اثبات رسیده است (Berger, 2007; Baenas et al., 2014). در این مطالعه، محتوای سولفورافان گیاهچه-های ازمک تحت تیمار با غلظت مختلف جاسمونات در زمان‌های مختلف مورد آنالیز قرار گرفت.

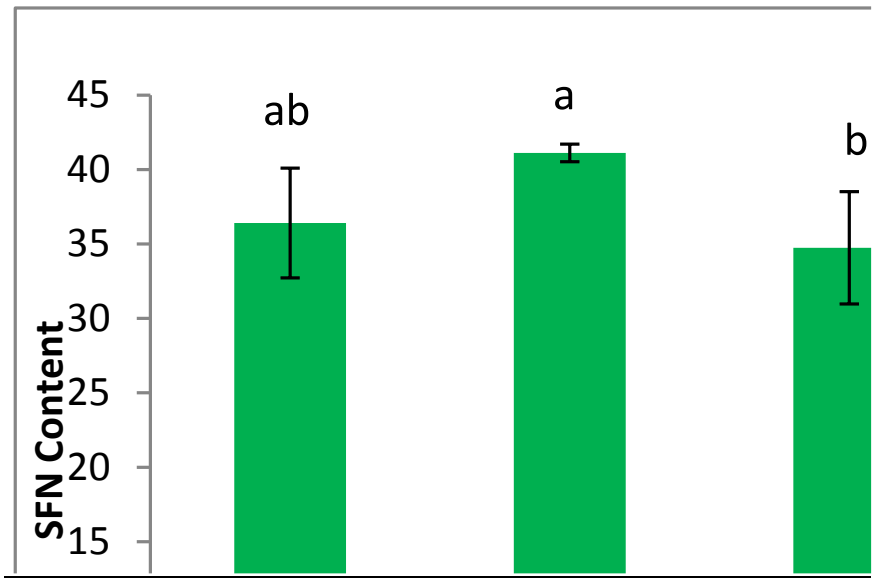
مواد و روش ها

بذرهای ازمک با محلول هیپوکلریت سدیم، اتانول ۷۰ درصد و آب مقطر استریل ضد عفونی گردید. بذرها بمنظور جوانه زنی در محیط حاوی آگار کشت شدند و به مدت ۳ روز داخل ژرمیناتور با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۶۵-۶۰ درصد در شرایط تاریکی مطلق قرار گرفتند. سپس گیاهچه‌ها به بمدت ۴۸ ساعت بمنظور سازگاری به ظروف کشت حاوی محلول غذایی هوگلند (Hoagland and Arnon, 1950) (در دمای ۲±۲۵-) منتقل شدند. گیاهچه‌های پنج روزه ازمک بمدت ۴۸ و ۷۲ ساعت در معرض غلظت‌های مختلف جاسمونات (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار) قرار گرفتند. لازم به ذکر است که برای انحلال جاسمونات (JA) از اتانول استفاده شد. اندازه‌گیری محتوای سولفورافان با اعمال کمی تغییرات به روش لیانگ و همکاران و با استفاده از دستگاه HPLC انجام شد. بعد از آماده نمودن ستون C18(25 × 0.46 cm) ، ابتدا استاندارد سولفورافان به دستگاه تزریق شد تا پیک استاندارد و زمان نگه داری نمونه در ستون مشخص گردد.

آزمایشات با ۳ تکرار مستقل و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. میانگین داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS-Release 16.0.0 توسط آزمون دانکن با در نظر گرفتن سطح اطمینان ۵٪ مورد تجزیه واریانس یک عاملی قرار گرفت.

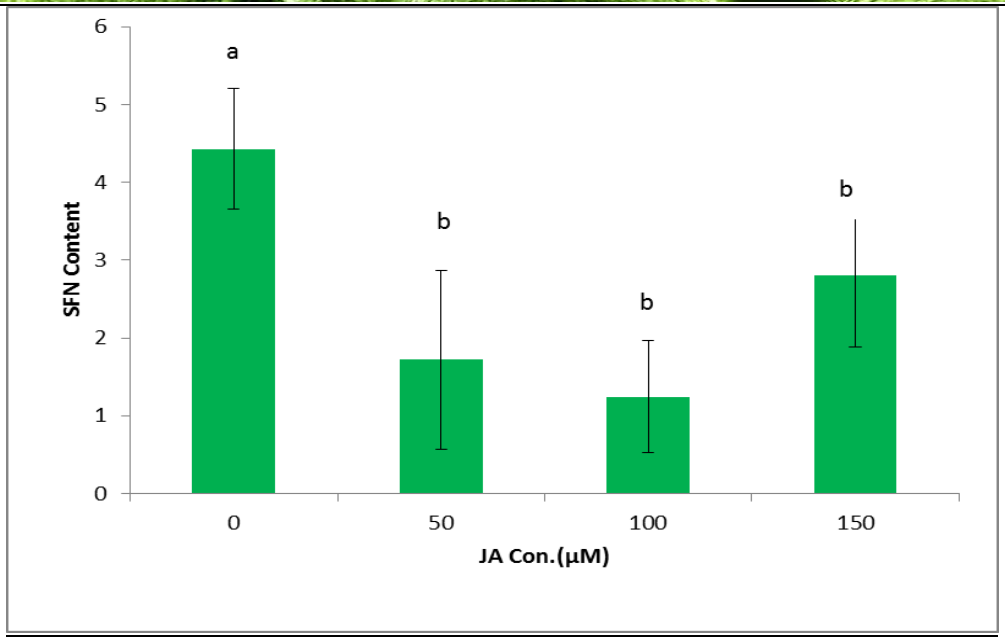
نتایج

محتوای سولفورفان در گیاهچه‌های پنج روزه تیمار شده با غلظت ۵۰ میکرومولار جاسمونات با گذشت ۴۸ ساعت در مقایسه با نمونه شاهد افزایش معنی داری پیدا نکرد؛ در حالیکه تفاوت معنی‌داری بین همین تیمار و غلظت‌های بالاتر جاسمونات (۱۰۰ و ۱۵۰ میکرو مولار) مشاهده نشد. در عین حال محتوای سولفورافان در غلظت های ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار در مقایسه با یکدیگر و نیز شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۱).



شکل ۱. محتوای سولفورافان گیاهچه‌های ازمک تیمار شده با غلظت های مختلف جاسمونات بمدت ۴۸ ساعت.

پس از گذشت سه روز (۷۲ ساعت) از اعمال تیمار جاسمونات، محتوای سولفورافان در هر سه غلظت مورد استفاده در مقایسه با نمونه شاهد بصورت معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۲).



شکل ۲. محتوای سولفورافان گیاهچه‌های ازمک تیمار شده با غلظت‌های مختلف جاسمونات بمدت ۷۲ ساعت.

بحث

از نتایج حاصله چنین استنباط می‌شود که در شرایط آزمایش، در گیاهچه‌های تحت تیمار قرار گرفته تولید سولفورافان تغییر مثبت معنی‌داری نسبت به شاهد نداشته بلکه در مقابل با افزایش زمان و غلظت الیسیتور محتوان آن کاهش یافته است که در زمان ۷۲ ساعت تیمار محسوس‌تر می‌باشد. مطالعات انجام شده توسط Van Dam و همکاران نشان داد که اعمال جاسمونات در گیاه *Brassica nigra* سبب افزایش محتوای گلوکوزینولات‌های کل و نیز گلوکوزینولات‌های آلیفاتیک و آروماتیک شده است (Van Dam et al., 2003) . همچنین غلظت ۲۵ میکرولیتر متیل جاسمونات باعث القا ۵۱٪ ایندول گلوکوزینولات‌ها در جوانه-های بروکلی شد (Pérez-Balibrea et al., 2011). این نتایج با نتایج حاصله در این مطالعه مغایرت دارد. لازم به ذکر است که بر حسب مراحل نموی، بخش‌های مختلف گیاه و نیز نوع گلوکوزینولات مورد نظر، تیمار با هورمون‌ها پاسخ‌های متفاوتی ایجاد خواهد داشت (Pauwels et al., 2009).

نتیجه گیری

با توجه به مطالعه انجام شده پیش از این که نشان می‌داد اعمال غلظت ۵۰ میکرومولار جاسمونات در مدت زمان ۲۴ ساعت در افزایش محتوای سولفورافان موثر است، میتوان گفت تاثیر افزایش مدت زمان و نیز غلظت این تیمار زیستی بر محتوای سولفورافان مثبت نیست و این هورمون السیتور بالقوه‌ای برای افزایش محتوای متابولیت دارویی سولفورافان در گیاه ازمک تحت این شرایط محسوب نمی شود.

منابع و مراجع

[1] Baenas N., García-Viguera C., and Moreno D. A. (2014) Biotic Elicitors Effectively Increase the Glucosinolates Content in Brassicaceae Sprouts. J. Agric. Food Chem. 62: 1881-1889.
[2] Bari R., and Jones J. D. G. (2009) Role of plant hormones in plant defence response. Plant Molecular Biology. 69: 473–488.
[3] Berger, B. (2007) The role of HIG1/MYB51 in the regulation of indolic glucosinolates biosynthesis. Inaugural Dissertation. University of Köln, Germany.
[4] Brader G., Tas E. and Palva E.T. (2001) Jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in Arabidopsis by culture filtrates of the nonspecific pathogen Erwinia carotovora. Plant Physiol. 126: 849–860.
[5] Dombrecht B, Xue GP, Sprague SJ, Kirkegaard JA, Ross JJ,Reid JB, Fitt GP, Sewelam N, Schenk PM, Manners JM. (2007) MYC2 differentially modulates diverse jasmonate dependent functionsin Arabidopsis. The Plant Cell 19: 2225–2245.
[6] Doughty K. J., Kiddle G. A., Pye B. J., Wallsgrove R. M., and Pickett J. A. (1995) Selective induction of glucosinolates in oilseed rape leaves by methyl jasmonate, Phytochemistry 38: 347-350.
[7] Elbarbry F, and Elrody N. (2011) Potential health benefits of sulforaphane: A review of the experimental, clinical and epidemiological evidences and underlying mechanisms. J. Med. Plant. Res.

[8] Fahey J. W., Zalcmann A.T., Talalay P. (2001) The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants, Journal Phytochemistry 56: 5–51.
[9] Fahey, J. W., Zhang, Y., & Talalay, P. (1997) Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers or enzymes that protect against chemical carcinogens. Proceedings of the National Academy Science, 94, 10367–10372.
[10] Ishida M., Hara M., Fukino N., Kakizaki T., and Morimitsu Y. (2014) Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. Breeding Science 64: 48–59
[11] Pauwels L., Inze´ D., and Goossens A. (2009) Jasmonate-inducible gene: what does it mean? Trends in Plant Science 14 (2).
[12] Mithen R. (2006) Sulphur-Containing Compounds., Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet., Edited by Alan Crozier, Michael N. Clifford, Hiroshi Ashihara.
[13] Mulabagal, V. and Tsay H.-S. (2004). Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. Int J Appl Sci Eng 2(1): 29-48.
[14] Pérez-Balibrea S., Moreno D A., García-Viguera C. (2011) Improving the phytochemical composition of broccoli sprouts by elicitation, Food Chemistry 129: 35–44.
[15] Powell E.E., Hill G.A., Juurlink B.H. J., Carrier D.J. (2005) Glucoraphanin extraction from Cardaria draba: Part 1. Optimization of batch extraction. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 80: 985–991.
[16] Radonić A., Blažević I., Mastelić J., Zekić M., Skočibušić M., Maravić A. (2011) Phytochemical analysis and antimicrobial activity of *Cardaria draba* (L.) Desv. Volatiles. Chemistry & biodiversity. 8: 1170–1181.
[17] Samuni-Blank M., Gerchman Y., Karasov W. H., Izhaki I., Trabelcy B., and Dearing M. D., Lotan A. (2012) Intraspecific Directed Deterrence by the Mustard Oil Bomb in a Desert Plant. Current Biology 22: 1218-1220.
[18] Shaine Tyson K., Brown J., Morra M. J. (2005) Glucosinolate-Containing Seed Meal as a Soil Amendment to Control Plant Pests.
[19] Van Dam, N. M., L. Witjes, and A. Svatos. (2003) Interaction of between aboveground and belowground induction of glucosinolates in two wild Brassica species. New Phytol. 161:801–810.
[20] Yan X, Chen S. (2007) Regulation of plant glucosinolate metabolism. Planta. 226: 1343–1352.