Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ٦، شماره ٣، پاییز ١٣٩٤، ٣٩٦-٣٨٩

تاثیر حضور پراکسید هیدروژن بر القای برخی متابولیت‌های ثانویه در کالوس گیاه پریوش (*Catharanthus roseus L.*)

راضیه کشاورز .M.Sc[1]، مجید مهدیه .Ph.D[2]، محمد حسین آبنوسی .Ph.D[2]، محمد رضا امیرجانی .Ph.D[2*]

١- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، اراک، ایران
٢- دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، اراک، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m-amirjani@araku.ac. ir

تاریخ دریافت: ١٣٩٣/١٢/٤ تاریخ پذیرش: ١٣٩٤/٢/٢٩

چکیده

هدف: در این تحقیق اثر تنش اکسیداتیو ناشی از حضور پراکسید هیدروژن بر القای برخی متابولیت‌های ثانویه و همچنین تغییر در محتوی پراکسید هیدروژن درون سلولی در کالوس گیاه پریوش بررسی شد.

مواد و روش‌ها: به‌منظور القا کالوس، برگ گیاه پریوش استریل شد و بر روی محیط کشت جامد MS قرار گرفت. کالوس‌ها با غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن (١، ٥ و ١٠ میکرومولار) به‌مدت ۶ روز تیمار شدند. محتوی آلکالوئید کل، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و همچنین توان آنتی‌اکسیدانتی بر اساس احیای آهن مورد سنجش قرار گرفت و داده‌ها با روش‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج: تنش اکسیداتیو ناشی از حضور پراکسید هیدروژن خارجی بر مقادیر درون سلولی پراکسید هیدروژن تاثیر معنی‌دار ($p<0/05$) داشته و محتوی پراکسید هیدروژن درون سلولی در کالوس‌های تیمار شده با پراکسید هیدروژن به‌مدت شش روز نسبت به کنترل افزایش معنی‌دار نشان داد. مقایسه میانگین آلکالوئید کل، محتوی فلاونوئید و فنل کل نشان داد که تیمار با پراکسید هیدروژن باعث میزان افزایش معنی‌دار ($p<0/05$) محتوی این ترکیبات نسبت به کنترل شده است. از طرفی تیمار با پراکسید هیدروژن موجب افزایش توان آنتی اکسیدانتی نسبت به کنترل شده است. افزایش توان آنتی‌اکسیدانتی احیا آهن وابسته به غلظت بود.

نتیجه گیری: پراکسید هیدروژن موجب افزایش مقادیر درون سلولی پراکسید هیدروژن شد. متابولیت‌های ثانویه‌ای مانند آلکالوئید کل و ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی نیز افزایش یافت. بنابراین ممکن است بتوان با اعمال این تنش میزان تولید برخی از آن‌ها را نیز افزایش داد.

واژگان کلیدی: پراکسید هیدروژن، پریوش، کالوس، آلکالوئیدها، فنل، فلاونوئید، آنتی اکسیدانت کل

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گیاهان دارویی از هزاران سال پیش به‌عنوان یکی از مهم‌ترین منابع دارویی کاربرد داشته‌اند (۱). پریوش (*Catharanthus roeus L.*)، گیاهی است دارویی و متعلق به خانواده Apocynaceae که به‌دلیل وجود ترکیبات دارویی و آلکالوئیدها مورد توجه قرار گرفته است (۲).

پراکسید هیدروژن با فرمول مولکولی H_2O_2 ، جرم مولکولی ۳۴/۰۱۴ گرم بر مول و دانسیته ۱/۱۳۵ گرم بر سانتی‌متر مکعب ترکیبی ساده، با پیوند یگانه (اکسیژن – اکسیژن) و مایعی روشن و کمی غلیظ‌تر از آب می‌باشد. پراکسید هیدروژن در سال ۱۸۱۸ توسط لویس جاکوس تنارد کشف شد و به‌عنوان یک محصول صنعتی توجه زیادی را جلب کرد (۳). منابع اصلی تولیدکننده پراکسید هیدروژن در سلول‌های گیاهی شامل واکنش‌های زنجیره انتقال الکترون درکلروپلاست ومیتوکندری، واکنش مهلر، آنزیم‌های پراکسیداز و NADPH اکسیداز می‌باشند (۴). در برخی از واکنش‌ها پراکسید هیدروژن به‌طور مستقیم و در برخی از طریق واکنش حد واسط مثل اکسیژن و سوپراکسید تولید می‌شود (۵). هنگامی‌که اکسیژن یک الکترون را دریافت می‌کند به رادیکال سوپراکسید تبدیل شده که بسیار ناپایدار است و به‌طور خود به‌خودی یا توسط آنزیم سوپراکسیددیسموتاز با پروتون واکنش داده و تبدیل به پراکسید هیدروژن می‌شود. پراکسید هیدروژن همچنین از طریق احیای سوپراکسید توسط احیا کننده‌هایی مانند آسکوربات، تیول، فرودوکسین و غیره تولید می‌شود (۶). بنابراین سطوح درون سلولی پراکسید هیدروژن ارتباط مستقیم با میزان تولید رادیکال سوپراکسید دارد.

با توجه به نقشی که پراکسید هیدروژن درپیام رسانی دارد لذا می‌تواند باعث افزایش فعالیت و یا القای بیان برخی ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی از جمله متابولیت‌های ثانویه شود (۷) که این سیستم‌های آنتی‌اکسیدانتی به‌عنوان یک سیستم دفاعی در مقابل انواع واکنش‌گرهای اکسیژن عمل کرده و به سلول کمک می‌کنند تا بهتر بتواند شرایط تنش را تحمل کند. از طرفی نیز می‌توان تحت تنش پراکسید هیدروژن تا حدودی تولید متابولیت‌های ثانویه را نیز افزایش داد که این خود نیاز به تحقیق بیشتر داشته و با توجه به این نکته که مطالعات کمی در مورد بررسی اثر پراکسید هیدروژن بر کشت سلولی گیاه پریوش انجام شده است، لذا در این تحقیق اثر تنش اکسیداتیو ناشی از حضور پراکسید هیدروژن بر کشت کالوس گیاه پریوش مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی و محیط کشت: از برگ گیاه پریوش به‌منظور القا کالوس استفاده شد. برگ‌های جوان از قسمت راسی گیاه جدا استریل شدند. قطعات برگ پس از شستشو با آب مقطر به‌مدت ۱۵ دقیقه درهیپوکلریت سدیم ۵ درصد (شرکت مرک آلمان) قرار داده شدند و سپس مجددا با آب مقطر اتوکلاو شده شستشو داده شدند. قطعات شستشو داه شده به‌مدت ۱۰ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد قرار داده شدند و مجددا با آب مقطر اتوکلاو شده شستشو شدند (۸). پس از آن، برگ را به قطعات حدود یک سانتی‌متر برش زده و بر روی محیط کشت جامد Murashige and Skoog, Sigma-Aldrich, UK) MS) حاوی ساکارز با غلظت ۳۰ گرم در لیتر به‌عنوان منبع کربن و آگار برای جامد کردن محیط کشت باغلظت ۸ گرم در لیترو ویتامین‌ها شامل، تیامین با غلظت۰/۱.میلی‌گرم در لیتر)، پیریدوکسین (با غلظت۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) نیکوتین (با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و عناصر ماکرو و میکرو و ترکیب هورمونی کینتین (با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و 2-4D (2,4-Dichloro- phenoxyacetic acid) (با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) بود، قرار داده شدند (کلیه مواد فوق‌الذکر از شرکت Sigma-Aldrich کشور انگلستان تهیه شدند). سپس شیشه‌های حاوی جداکشت‌ها به اتاق کشت با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند (۸) کالوس‌ها بعد از سه هفته واکشت و به محیط کشت جدید منتقل شدند و از کالوس‌های واکشت دوم برای تیمار دهی استفاده شد.

سنجش محتوی پراکسید هیدروژن درون سلولی: برای سنجش محتوی پراکسید هیدروژن ۰/۵ گرم از بافت کالوس در یخ با ۱ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۰/۱درصد سائیده شد و مخلوط هموژن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، با سرعت ۱۲۰۰۰g، به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۷۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به ۷۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (pH=۷) و۷۰۰ میکرولیتر یدید پتاسیم یک مولار اضافه و میزان جذب در طول موج ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محتوی پراکسید هیدروژن با کمک منحنی استاندارد (y=۰/۲۱۲x با R2= ۰/۹۹) که با مقادیر مشخص

www.SID.ir

Archive of SID

پراکسید هیدروژن رسم شده بود سنجیده شد و به‌صورت میکرومول بر گرم وزن تر کالوس گزارش گردید (۹).

اندازه‌گیری آلکالوئید کل: میزان آلکالوئید کل با استفاده از روش اسپکتروفتومتری (مدل T80+ ساخت شرکت PG instrument کشور انگلستان) و معرف دراژندروف برای شناسایی آلکالوئیدها محاسبه شد (۱۰). میزان ۳ گرم بافت تازه کالوس را با ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۹۶ درصد در حضور نیتروژن مایع سائیده و سپس نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت به انکوباتور شیکردار با دور ۰/۸g و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها در ۲۴۰۰۰g به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی به آون ۸۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱ تا ۲ ساعت انتقال داده تا حجم نهایی محلول به ۱ میلی‌لیتر تبخیر شود. به عصاره باقیمانده ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۰/۵ نرمال اضافه گردید. با استفاده از سود ۱۰ نرمال، pH محلول را به ۱۰ رسانده و ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم به آن اضافه و سپس محلول به دکانتور منتقل شد. در این مرحله دو فاز تشکیل شد: فاز اسیدی در بالا و فاز کلروفرمیک حاوی عصاره در پایین تشکیل شد. حجم محلول کلروفرمیک با اتانول ۹۶ درصد به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. به ۵ میلی‌لیتر از محلول فوق HCl رقیق اضافه تا pH آن بین ۲ تا ۲/۵ تنظیم شود. سپس به محلول حاصل ۱ میلی‌لیتر معرف دراژندورف اضافه و این ترکیب به‌مدت ۵ دقیقه در ۲۴۰۰۰ g سانتریوفوژ شد. محلول رویی را دور ریخته و رسوب باقیمانده با اتانول ۹۶ درصد شستشو شد. پس از دور ریختن محلول رویی به رسوب ۱ میلی‌لیتر دی‌سدیم سولفید۱ درصد اضافه و پس از تکان دادن محلول به‌مدت ۵ دقیقه در ۲۴۰۰۰g سانتریوفوژ شد. در این مرحله پس از حذف محلول روئی به رسوب قهوه‌ای تشکیل شده ۲ میلی‌لیتر دی سدیم سولفید ۱ درصد اضافه و مجددا به‌مدت ۵ دقیقه در ۲۴۰۰۰g سانتریوفوژ شد. پس از دور ریختن محلول رویی ۲ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ به رسوب اضافه و با آب مقطر دو بار تقطیر حجم محلول به ۵ میلی‌لیتر رسانیده شد. از محلول فوق ۱ میلی‌لیتر برداشته، به آن ۲/۵ میلی‌لیتر محلول تیوره ۳ درصد اضافه و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل T80+PG InstruentUV/Vis.Spectrometer) جذب نمونه‌های تیمار شده در طول موج ۴۳۵ نانومتر قرائت شد. دستگاه اسپکتروفتومتر با محلول تیوره ۳ درصد صفر شد. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف بیسموت (شرکت سیگما آمریکا) استفاده شد و غلظت آلکالوئید کل نمونه‌های تیمار شده بعد از رسم نمودار استاندارد توسط فرمول خطی ۰/۰۳۲۰- x y=۰/۰۲۹۱ با R2= ۰/۹۹ تعیین شد.

اندازه‌گیری فلاونوئید کل: میزان فلاونوئید با استفاده از روش Marinova و همکاران (۱۱) محاسبه شد. به تعداد نمونه‌ها لوله آزمایش آماده و به هر کدام از لوله‌ها ۱۲۴۵ میکرولیتر آب مقطر، ۷۵ میکرولیتر محلول سدیم نیترات ۵ درصد و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه شد. برای تهیه نمونه شاهد کلیه ترکیبات شرکت کننده به میزان‌های فوق الذکر بدون حضور عصاره در لوله آزمایش تحت نام کنترل ریخته شد. لوله‌ها به‌مدت ۶ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. سپس به هر لوله مقدار ۱۵۰ میکرولیتر محلول کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد اضافه و برای مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفتند. در مرحله آخر به هر لوله میزان ۵۰۰ میکرولیتر سود ۱ مولار اضافه و جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۰ نانومتر ثبت شد. از محلول فاقد عصاره جهت صفر کردن دستگاه استفاده شد. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف کاتچین (شرکت سیگما آمریکا) استفاده شد و غلظت فلاونوئید در نمونه‌های تیمار شده با استفاده از فرمول خطی ۰/۰۴۱+ y= ۰/۰۰۰۲x با R2= /۹۹ و بر حسب میلی‌گرم کاتچین در گرم وزن تر بافت بیان گردید.

اندازه‌گیری میزان فنل کل

تهیه عصاره فنلی: میزان ۰/۱ گرم از بافت کالوس با ۱ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد در حضور نیتروژن مایع سائیده شد. سپس به‌مدت ۵ دقیقه در ۱۷۰۰۰g سانتریفوژ گردید. از محلول شفاف رویی به‌عنوان عصاره در سنجش میزان فنل کل استفاده شد. میزان فنل کل با استفاده از روش Singleton و همکاران (۱۲) مطابق مندرجات زیر تعیین شد. به تعداد نمونه‌های تیماری لوله آزمایش برداشته و به هر کدام مقدار ۴۷۰ میکرولیتر آب مقطر، ۳۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۵۰۰ میکرولیتر سدیم کربنات ۱ درصد اضافه شد. برای تهیه نمونه شاهد کلیه ترکیبات شرکت کننده به میزان‌های فوق الذکر بدون حضور عصاره در لوله آزمایش تحت نام کنترل ریخته شد. لوله‌ها به‌مدت ۳ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفتند. سپس به هر کدام ۵۰۰ میکرولیتر فولین سیوکالتیو اضافه و نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. سپس جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر ثبت

www.SID.ir

Archive of SID

شد. به‌منظور صفر کردن دستگاه از نمونه کنترل استفاده شد. به‌منظور تهیه منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف گالیک اسید (شرکت سیگما آمریکا) استفاده شد و مقادیر فنل تام عصاره با استفاده از منحنی استاندارد (y= ۰/۰۲۱۳ x+ ۰/۰۰۱۶ با R2= ۰/۹۸۹) بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در گرم وزن تر بافت بیان گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانت کل به روش FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power): فعالیت آنتی‌اکسیدانتی کل با استفاده از روش Benzie and Strain (۱۳) تعیین شد. به تعداد نمونه‌ها لوله آزمایش تهیه و به هر کدام ۱۷۰۰ میکرولیتر محلولFRAP ، ۹۷۰ میکرولیتر آب مقطر و ۳۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه شد. برای تهیه نمونه شاهد کلیه ترکیبات شرکت کننده به میزان‌های فوق الذکر بدون حضور عصاره در لوله آزمایش تحت نام کنترل ریخته شد. لوله‌ها برای مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شدند. با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر ثبت شد.برای تهیه منحنی استاندارد از محلول سولفات آهن (FeSO4.7H2O) (شرکت Merck آلمان) استفاده شد. کلیه مراحل تهیه نمونه‌های استاندارد مانند مراحل فوق انجام شد با این تفاوت که به‌جای عصاره از غلظت‌های مختلف سولفات آهن استفاده شد. فعالیت آنتی اکسیدانتی نمونه‌های تیمار شده پس از رسم منحنی استاندارد با استفاده از فرمول خطی y=۰/۰۱۳۲ +۰/۰۲۷۷ با R2=۰/۹۹ و بر حسب میکرو مول آهن در میلی‌گرم وزن تر بافت (µM/mg FW) محاسبه شد.

آنالیزهای آماری: آزمایش‌های انجام شده برای هر تیمار در سه تکرار انجام شد. داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و تست Duncan آنالیز شدند. در هر اندازه‌گیری ارتباط بین گروه‌ها بررسی و وجود تفاوت معنی‌دار در سطح p<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

داده‌های حاصل از اندازه‌گیری محتوی پراکسید هیدروژن درون سلولی در کالوس‌های گیاه پریوش تیمار شده در مقایسه با کنترل نشان داد که اثر پراکسید هیدروژن بر مقادیر درون سلولی این ماده (H_2O_2) تاثیر معنی‌دار (p<۰/۰۵) داشته است (جدول۱). محتوی پراکسید هیدروژن درون سلولی در کالوس‌های تیمار شده با ۱، ۵ و ۱۰ میکرومولار نسبت به کنترل به‌ترتیب به‌میزان ۳۱/۴۳ ،۶۹/۱۳ و۴۴/۸۲ درصد افزایش داشته است. گرچه محتوی پراکسید هیدروژن درون سلولی، درگروه تیمار شده با غلظت۱۰ میکرومولار نسبت به گروه تیمار شده با غلظت ۵ میکرومولار، کاهش معنی‌داری را نشان داد (p<۰/۰۵).

جدول ۱: مقایسه میانگین پراکسید هیدروژن درون سلولی(µM g-1FW) کالوس گیاه پریوش، شش روز پس از تیمار با پراکسید هیدروژن (۱، ۵ و ۱۰ میکرومولار) با گروه کنترل. مقادیر به‌صورت means ±SD می‌باشد. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند (one way ANOVA, Duncan test, p<۰/۰۵)

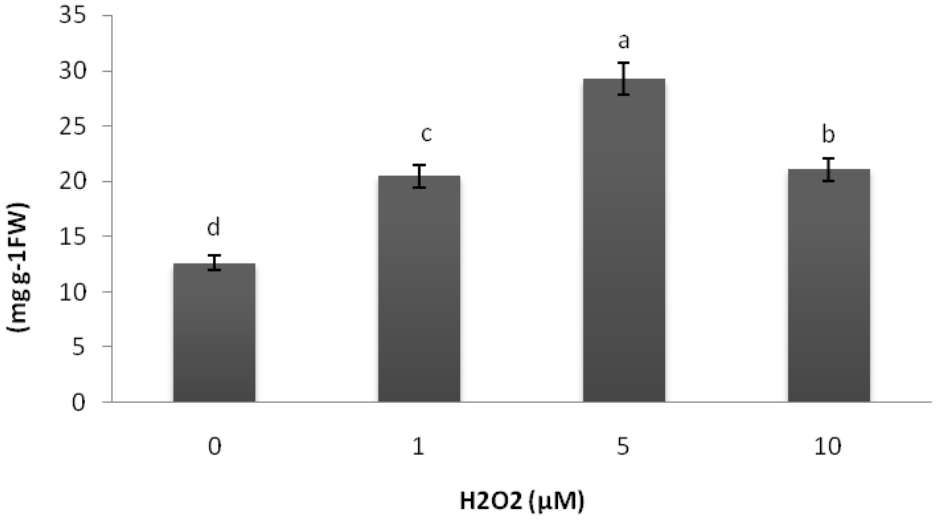
H_2O_2 (µM)	پراکسید هیدروژن درون سلولی (µM g-1FW)
۰	۱۰/۵۳ d ±۰/ ۴۸۲
۱	۱۳/۸۴c±۰/۰۹۱
۵	۱۷/۸۱a±۰/۳۷۱
۱۰	۱۵/۲۵b±۰/۷۸۱

مقایسه میانگین آلکالوئید کل نشان داد که تیمار با غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ میکرومولار باعث افزایش معنی‌دار (p<۰/۰۵) محتوی آلکالوئید کل نسبت به کنترل شده است و مقدار آلکالوئید کل، درگروه تیمار شده با غلظت ۱۰ میکرومولار نسبت به گروه تیمار شده با غلظت ۵ میکرومولار، کاهش معنی‌داری را نشان داد (p<۰/۰۰۱) و افزایش در محتوی آلکالوئید کل درگروه های تیمار شده با ۱، ۵ و۱۰ میکرومولار نسبت به کنترل به‌ترتیب به‌میزان ۶۲/۳۰ ، ۱۳۲/۳۸ و ۶۶/ ۹۸ درصد نسبت به کنترل می‌باشد (نمودار۱). علاوه بر این مقایسه میانگین محتوی فلاونوئید نشان داد که تیمار با غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ میکرومولار پراکسید هیدروژن موجب افزایش معنی‌دار محتوی فلاونوئید نسبت به کنترل شده است که در این سه غلظت محتوی فلاونوئید نسبت به کنترل به‌ترتیب به‌میزان ۱۳۸/۷۹ ،۱۵۲/۰۵ و۳۶۸/۴۹ درصد افزایش داشته است (نمودار۲). اثر

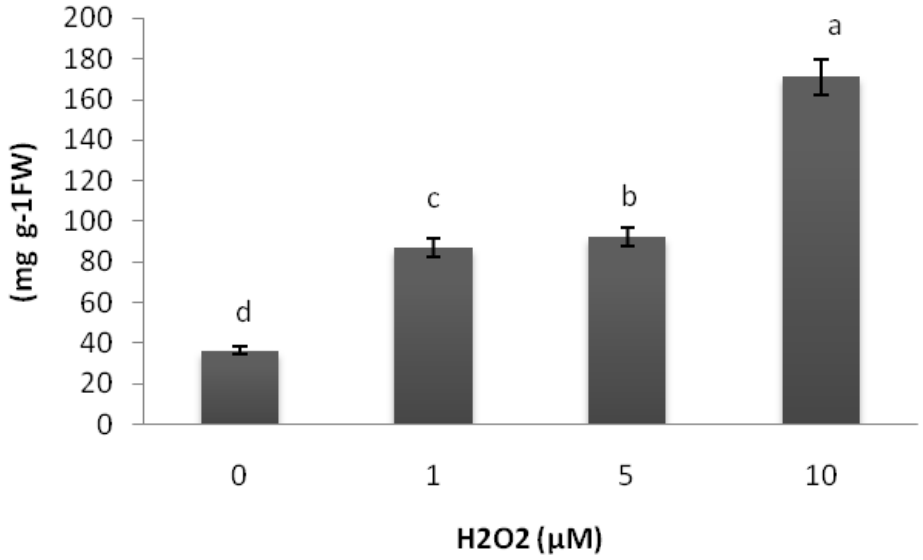
www.SID.ir

Archive of SID

پراکسید هیدروژن بر محتوی فنل کل نیز معنی‌دار ($p<0/05$) بود (جدول ۲). مقایسه میانگین محتوی فنل نشان داد تیمار با غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ میکرومولار باعث میزان افزایش معنی‌دار محتوی فنل نسبت به کنترل شده است و به‌ترتیب نسبت به کنترل به میزان ۱۰۲/۷۹، ۱۹۴/۴۰ و۱۲۵/۱۷ درصد افزایش می‌یابد. این در حالی است که محتوی فنل، درگروه تیمار شده با غلظت ۱۰ میکرومولار نسبت به گروه تیمار شده با غلظت ۵ میکرومولار، کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p<0.05$). از طرفی مقایسه میانگین توان آنتی‌اکسیدانتی نیز نشان داد که تیمار با غلظت ۱، ۵ و ۱۰ میکرومولار پراکسید هیدروژن موجب افزایش توان آنتی‌اکسیدانتی نسبت به کنترل شده است. داده‌های جدول مقایسه میانگین بیانگر این واقعیت است که افزایش توان آنتی اکسیدانتی احیای آهن وابسته به غلظت بود و در این سه گروه تیمار شده به‌ترتیب به‌میزان ۸۵/۴۴ ، ۲۵۵/۱۴ و ۳۶۰/۴۴ درصد نسبت به کنترل افزایش می‌یابد (جدول۲).



نمودار۱: مقایسه میانگین آلکالوئید (mg g-1FW) کالوس برگ گیاه پریوش شش روز پس از تیمار با پراکسید هیدروژن (۱، ۵ و ۱۰ میکرومولار) با گروه کنترل. مقادیر به‌صورت means ±SD می‌باشد. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند (one way ANOVA, Duncan test, P<0.05)



نمودار۲ : مقایسه میانگین فلاونوئید (mg g-1FW) کالوس برگ گیاه پریوش شش روز پس از تیمار با پراکسید هیدروژن (۱، ۵ و ۱۰ میکرومولار) با گروه کنترل. مقادیر به‌صورت means ±SD می‌باشد. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند (one way ANOVA, Duncan test, P<0.05)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: مقایسه میانگین محتوی فنل وآنتی اکسیدان کل کالوس برگ گیاه پریوش شش روز پس از تیمار با پراکسید هیدروژن (۱، ۵ و ۱۰ میکرومولار) با گروه کنترل. مقادیر به‌صورت means ±SD می‌باشد. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند(one way ANOVA, Duncan test, p<0.05)

H_2O_2 (µM)	فنل (mg g-1FW)	آنتی‌اکسیدانت‌کل (µM mg-1 FW)
۰	۱/۴۳^{d}±۰/۰۶۰	۰/۶۸۰^{d} ±۰/۰۱۸
۱	۲/۹۰ ^{c} ±۰/۰۴۲	۱/ ۲۶۱ ^{c} ±۰/۰۶۷
۵	۴/۲۱ ^{a} ±۰/۰۲۶	۲/۴۱۵^{b}±۰/۱۸۱
۱۰	۳/۲۲ ^{b} ±۰/۰۹۷	۳/۱۳۱^{a} ±۰/۳۹۱

بحث

تیمار با پراکسید هیدروژن می‌تواند کانال‌های کلسیمی را فعال کرده و غلظت کلسیم سیتوپلاسمی را افزایش دهد و از طرفی نیز کلسیم سیتوزولی به‌نوبه خود آنزیم NADPH اکسیداز غشایی پلاسمایی را فعال کرده که منجر به انفجار اکسیداتیو و تولید پراکسید هیدروژن می‌شود (۱۴). در تحقیق حاضر، اثر پراکسید هیدروژن بر مقادیر درون سلولی این ماده (H_2O_2) معنی‌دار (p<۰/۰۵) بود. نتایج تحقیق حاضر در راستای نتایج دیگران بوده است. Tang و همکاران (۱۵) در تحقیقات خود بر روی گیاه پریوش نشان دادند که ۱۰۰ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن باعث افزایش معنی‌دار (p<۰/۰۵) پراکسید هیدروژن درون‌سلولی نسبت به کنترل شده است. از طرفی Tian و همکاران (۱۶) در تحقیقات خود بر روی کالوس گیاه توت فرنگی تحت تیمار با ۵۰ میکرومولار پراکسید هیدروژن، به نتیجه مشابه‌ای دست یافتند. در صورتی‌که نتایج Yu و همکاران (۱۷) بر روی Vigna radiata (L.) نشان داد که پس از تیمار با ۲۰۰ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن محتوی درون سلولی این ماده کاهش می‌یابد. تفاوت‌ها در نتایج ممکن است بدلیل اختلاف در گونه گیاهی و متعاقبا اختلاف در پاسخ سلولی این گونه باشد.

از طرفی آلکالوئیدها نیز به‌عنوان یک دفاع شیمیایی در پاسخ به تنش افزایش می‌یابند، اما مکانیسم واقعی در این پاسخ سلولی هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است (۱۵). نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها در آزمایش حاضر نشان داد که اثر پراکسید هیدروژن بر محتوی آلکالوئید کل در کالوس‌های گیاه پریوش تیمار شده در مقایسه با کنترل معنی‌دار است (p<۰/۰۵) و با افزایش غلظت، محتوی آلکالوئید افزایش می‌یابد. نتایج حاضر در تایید نتایج Tang و همکاران (۱۵) بود، آن‌ها نیز در تحقیق خود بر روی گیاه پریوش نشان دادند که تیمار۱۰۰ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن باعث افزایش معنی‌دار (p<۰/۰۵) غلظت آلکالوئید وین بلاستین نسبت به کنترل شده است. از طرفی با توجه به اینکه اهمیت آلکالوئیدها در حفاظت سلول‌های گیاهی تحت تنش مشخص شده است (۱۸). لذا می‌توان گفت که افزایش یا کاهش میزان آلکالوئید کل در یک گیاه متناسب با نوع تنش بوده و تفاوت این نتایج ممکن است به‌دلیل اختلاف در گونه گیاهی باشد.

علاوه بر این پراکسید هیدروژن محتوی فلاونوئید در کالوس‌های گیاه پریوش تیمار شده در مقایسه با کنترل را به‌طور معنی‌دار (p<۰/۰۵) و وابسته به غلظت افزایش داد. Tumova و همکاران (۱۹) در تحقیق خود بر روی کشت کالوس Ononis arvensis گزارش کردند که تنش اکسیداتیو ناشی از حضور پراکسید هیدروژن (۰/۱ تا ۱ میلی‌مولار) باعث تولید فلاونوئید شده است. همچنین Hao و همکاران (۲۰) نیز در مطالعه خود بر روی کالوس Ginkgo biloba مشاهده کردند که UV-B از طریق افزایش فعالیت آنزیمNitric Oxide Synthase (NOS) منجر به تولید رادیکال آزاد NO شده که این رادیکال با افزایش فعالیت آنزیمPhenylalanine Ammonium Lyase (PAL) موجب افزایش تولید فلاونوئیدها گردیده است. از طرفی نیز ترکیبات فنلی به‌عنوان شاخص‌های تنش اکسیداتیو محسوب می‌شوند (۲۰)، لذا انباشتگی انواع ترکیبات فنلی در شرایط تنش می‌تواند به‌عنوان یک نشانه در جلوگیری از تخریب سلولی عمل کرده و در نهایت به افزایش تحمل در برابر تنش منجر شود (۲۰). ترکیبات فنلی دارای گروه هیدروکسیل هستند که دهنده هیدروژن می‌باشند و این ترکیبات فعالیت رادیکال‌های آزاد را مهار کرده و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی را فعال می‌کنند (۲۱). در این مطالعه پراکسید هیدروژن اثر معنی‌داری بر محتوی فنل در کالوس‌های گیاه پریوش تیمار شده در مقایسه با کنترل داشت و با افزایش غلظت پراکسید هیدروژن محتوی فنل کل نیز افزایش

www.SID.ir

Archive of SID

یافت. مطالعات انجام شده توسط **Fang** و همکاران (۲۲) بر روی کشت سلولی گیاه مریم گلی (Salvia miltiorrhiza) نشان داده است که غلظت ۱۰ میکرومولار پرکسید هیدروژن می‌تواند به‌عنوان یک القا کننده موثر تجمع متابولیت ثانویه پلی فنلیک (Depside) را در سوسپانسیون سلولی گیاه مریم گلی القا کند. بدین ترتیب افزایش میزان فلاونوئید و فنل کل در گیاه پریوش می‌تواند در راستای پاسخ به تنش حاصل از پراکسید هیدورژن درگیاه پریوش باشد.

مطالعات نشان می‌دهد که بالا بودن ترکیبات فنلی دلیل عمده بالا بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانتی نیز می‌باشد، زیرا بر اساس شواهد موجود ارتباط مثبتی بین میزان ترکیبات فنلی و قدرت آنتی‌اکسیدانتی گیاهان وجود دارد (۲۲). قدرت احیاکنندگی ترکیبات موجود در نمونه‌های حاضر با احیا آهن III به آهنII سنجیده شدند (۱۵). احیای آهن اغلب به‌عنوان شاخص فعالیت الکترون دهی که مکانیزم مهمی در عمل آنتی‌اکسیدانتی مواد فنلی می‌باشد به‌کار می‌رود (۲۲). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که توان آنتی‌اکسیدانتی بر اساس احیای آهن (FRAP) در کالوس‌های گیاه پریوش تیمار شده در مقایسه با کنترل به‌طور معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) و وابسته به غلظت افزایش یافت. از آنجا که، در تمام گیاهان بین آنتی‌اکسیدانت کل و ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی ارتباط مستقیمی وجود دارد (۲۳)، در این تحقیق نیز افزایش توان آنتی‌اکسیدانتی بر اساس احیای آهن، با افزایش ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی همراه بود. این نتایج در راستای نتایج Sharma -وRamawat (۲۳) می‌باشد که در تحقیقات خود بر روی گیاه (Salvadora persica Linn) گزارش کردند که تیمار با غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک طعام به‌طور معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) و وابسته به غلظت باعث افزایش توان آنتی‌اکسیدانتی نسبت به کنترل شده است.

نتیجه گیری

تیمار کالوس گیاهان مختلف با پراکسید هیدروژن می‌تواند باعث القای پاسخ‌های دفاعی شود (۱۷). بسیاری از مطالعات گزارش کرده‌اند که وقتی گیاه در معرض پراکسید هیدروژن قرار می‌گیرد غلظت آن در درون سلول افزایش می‌یابد (۱۵). چون تیمار با پراکسید هیدروژن می‌تواند کانال‌های کلسیمی را فعال کرده و غلظت کلسیم سیتوزلی را افزایش دهد، کلسیم سیتوزولی نیز به‌نوبه خود آنزیم NADPH اکسیداز غشایی پلاسمایی را فعال کرده و منجر به انفجار اکسیداسیونت و تولید پراکسید هیدروژن شود (۱۵). از طرفی پراکسید هیدروژن در درون سلول به‌عنوان یک پیامبر ثانویه عمل کرده لذا می‌تواند باعث افزایش فعالیت و یا القای بیان برخی ترکیبات آنتی‌اکسیدانت از جمله متابولیت‌های ثانویه شود (۲۴). این سیستم‌های آنتی‌اکسیدانتی به‌عنوان یک سیستم دفاعی در مقابل انواع واکنش‌گرهای اکسیژن عمل کرده و به سلول کمک می‌کنند تا بهتر بتواند شرایط تنش را تحمل کند. از طرفی نیز می‌توان تحت تنش پراکسید هیدروژن تا حدودی تولید متابولت‌های ثانویه را نیز افزایش داد. از آنجا که برخی متابولیت‌های ثانویه می‌توانند در درمان بیماری‌ها انسانی از قبیل سرطان، هپاتیت، فشار خون و غیره موثر باشند و وجود این ترکیبات در پریوش ممکن است بتوان با اعمال این تنش میزان تولید برخی از آن‌ها را نیز افزایش داد که این خود نیاز به تحقیق بیشتر داشته و با توجه به تحقیقات دارویی اخیر برای جایگزینی داروهای شیمیایی توسط گیاهان دارویی سنتی ایجاد پایه علمی برای شناسایی اثرات آن‌ها ، امری لازم است و از طرف این تیم تحقیقاتی پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از معاونت پژوهشی دانشکده‌ی علوم پایه دانشگاه اراک که امکانات لازم جهت انجام این تحقیق را در اختیار ما قرار دادند.

منابع

1. Zhao J, Verpoorte R. Manipulating indole alkaloid production by Catharanthus roseus cell cultures in bioreactors: from biochemical processing to metabolic engineering. Phytochem Rev. 2007; 6: 435–457.

2. Yokoyama M, Inomata S. Catharanthus roseus (periwinkle): in vitro culture and highlevel production of Arbutine by biotransformation. Biotech. Agri. Forest. 1998; 41: 67-80.

3. Bienert P, Schjoerring GJ, Jahn P. Membrane transport of hydrogen peroxide. Biochimica et Biophysica. 2006; 1758(8) :994–1003.

4. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci. 2002; 7(9): 405-410.

5. Desikan R, Hancock JT, Neill S J. 5 Oxidative stress signal in.Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2003; 4(5): 121-149.

www.SID.ir

Archive of SID

6. Sutherland M. W. The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. Physiol Mol Plant Pathol. 1991; 39(2): 79-93.

7. Lamb C, Dixon RA. The oxidative burst in plant disease resistance. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 1997; 48: 251-275.

8. Saifullah kh.Callus induction and cell suspension culture production of catharanthus roseus for biotransfermation studies of (-)- caryophyllene oxide, Pak. J. Bot. 2012; 43(1): 467-473.

9. Sergiev I, Alexieva V, Karanov E. Effect of spermine,atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci, 1997; 51: 121-124.

10. Sreevidya N, Mehrotra S. Spectrophotometric Method for Estimation of AlkaloidsPrecipitable with Dragendorff's Reagent in PlantMaterial. Journal of Aoac International. 2003; 86(6): 1-4.

11. Marinova D, Ribarova F. Atanassova Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. J. Univ. Chem. Technol. Metallurgy. 2005; 40(3): 255-260.

12. SingletonVL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysisoftotal phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu. Reagent..MethodsEnzymol. 1999; 299: 152–178.

13. Benzie I, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'Antioxidant Power': The FRAP assay. Anal. Biochem .1996; 239(1): 70-76.

14. Desikan R, Reynolds A, Hancock JT, Neill1 SJ. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have ifferential effects on defence gene expression in Arabidopsis suspension cultures. Biochem. J. 1998; 330: 115-120.

15. Tang ZL, Yang Y, Zu X. Variations of vinblastine accumulation and redox state affected by exogenous H2O2 in Catharanthus roseus (L.). Plant Growth Regul. 2009; 57: 15–20.

16. Tian M, Gu Q, Zhu M.The involvement of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the process of organogenesis of strawberry callus. plant science. 2003; 165: 701-707.

17. Yu CW, Murphy TM, Lin CH. Hydrogen peroxideinduced chilling tolerance in mung beans mediated through ABA-independent glutathione accumulation.. - Funct. Plant Biol. 2003; 30: 955-963.

18. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci. 2002; 7(9): 405-410.

19. Proceedings of the Fifth Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries,(5th CMAPSEEC), Brno, Czech Republic, 2-5 September, 2008.

20. Tumová L, Tuma J, Cheel J Dušek J. Oxidative stress and flavonoid production by Ononis arvensis L. culture in vitro. 2008; pp. 24.

21. Hao G, Du X, Zhao F, Shi R, et al. Role of nitric oxide in UV-B-induced activation of PAL and stimulation of flavonoid biosynthesis in Ginkgo biloba callus . Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 97(2): 175-185.

22. He L, Gao Z , Li R. Pretreatment of seed with H2 O2 enhances drought tolerance of wheat (Triticum aestivum L.) seedlings. African Journal of Biotechnology. 2009; 8(22): 6151-6157.

23. Fang Y, Zong-shen Z, Bin Y. Effects of Exogenous Hydrogen Peroxide on Suspension Cell Growth and Secondary Metabolites Accumulation of Salvia miltiorrhiza. Southwest China Journal of Agricultural Sciences.. Journal of Agricultural Sciences. 2011; S 567.53.

24. Sharma V, Ramawat KG. Salinity-induced modulation of growth and antioxidant activity in the callus cultures of miswak (Salvadora persica).Biotech. 2013; 3(1): 11–17.

25. Desikan NR, Hancock J. Hydrogen peroxide signaling. Curr. Opin. Plant Biol. 2002; 5: 388-395.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Autumn 2015; 6(3): 389-396

Original Article

Effect of Hydrogen Peroxide on Induction of Secondary Metabolites in Periwinkle (*Catharanthus roseus* L.) Callus

Keshavarz R, M.Sc.[1], Majid Mahdiyeh M, Ph.D.[2], Abnosi MH, Ph.D.[2], Amirjani MR, Ph.D.[2*]

1. M.Sc. Student, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, 38156-8-8349, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, 38156-8-8349, Iran

* Email corresponding author: m-amirjani@araku.ac.

Received: 23 Feb. 2015 Accepted: 19 May. 2015

Abstract

Aim: In the present study the effect of oxidative stress resulted from hydrogen peroxide on some secondary metabolites and changes on intra cellular hydrogen peroxide has been explored.

Material and methods: To induction of callus Periwinkle leaf was sterilized and put on MS medium. Calluses were treated by different concentrations (1, 5 and 10 μM) of hydrogen peroxide for 6 days. Total alkaloid, phenolic components and felavonoids as well as antioxidant potential on the basis of Iron reduction were determined. Data were analyzed using one way ANOVA.

Results: Addition of hydrogen peroxide resulted in significant ($P \leq 0.05$) increase of intra cellular hydrogen peroxide compared to the control. Total alkaloids, flavonoids and phenols content showed that hydrogen peroxide caused a significant increase ($P < 0.05$. Furthermore, hydrogen peroxide increased the antioxidant capacity. Better antioxidant capacity was Iron reduction dependent.

Conclusion: Hydrogen peroxide increased intra cellular levels of hydrogen peroxide. Secondary metabolites such as alkaloids and phenolic compounds and total flavonoid were boosted as well. Therefore tensions may be applied to increase them.

Keywords: Alkaloids, Antioxidant Callus, *Catharanthus roseus*, Flavonoids, Hydrogen peroxide, Phenols

www.SID.ir