Archive of SID

محتوی سولفارافان در اندام‌های مختلف گیاه *Lepidium draba* در اکوتیپ‌های مختلف استان کرمان

Sulforaphane Content in Different Organs of *Lepidium draba* from Different Ecotype of Kerman Province

مریم امینی‌زاده[۱]، علی ریاحی‌مدوار[۲*] و مهدی محمدی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۵/۰۸

چکیده

ازمک (*Lepidium draba*)، یک علف هرز چندساله از خانواده براسیکاسه است که حاوی مقدار قابل‌توجهی گلوکورافانین از گروه گلوکوزینولات‌ها می‌باشد. این متابولیت تحت هیدرولیز آنزیمی میروزیناز، نوعی ایزوتیوسیانات به‌نام سولفارافان تولید می‌نماید که خواص ضدسرطانی متعددی دارد. مشخص شده است که عوامل محیطی مختلف از قبیل دما و ارتفاع بر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه تأثیر دارند. در این مطالعه، محتوی سولفارافان در بخش‌های مختلف گیاه بالغ *L. draba* (شامل ریشه، برگ، گل و میوه) جمع‌آوری شده از اکوتیپ‌های مختلف استان کرمان (ماهان، بافت و جیرفت (ساردوئیه)) با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا اندازه‌گیری شد. نتایج نشان‌دهنده میزان بالای این ایزوتیوسیانات در میوه این گیاه می‌باشد که در مرتبه‌های بعدی، گل، برگ و ریشه‌های قرار دارند. همچنین محتوی سولفارافان در تمامی اندام‌ها، در گیاهان جمع‌آوری شده از شهر ماهان در مقایسه با دو شهر دیگر بیشتر بود. با توجه به ارتفاع کمتر و درجه حرارت بالاتر شهر ماهان نسبت به دو شهر دیگر استنباط می‌شود که این عوامل تأثیر بسزایی در بیوسنتز این ماده مؤثره دارند.

واژه‌های کلیدی: ایزوتیوسیانات، HPLC، گلوکوزینولات، میروزیناز

۱. کارشناس ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان

۲. استادیار گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان

۳. کارشناس ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان

*: نویسنده مسوول Email: ariahi@icst.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گیاهان دارویی منابع طبیعی ارزشمندی هستند که امروزه مورد توجه کشورهای پیشرفته جهان قرار گرفته و به‌عنوان مواد اولیه جهت تبدیل به داروهای بی‌خطر برای انسان محسوب می‌شوند. ایران به‌دلیل تنوع بالای شرایط زیستگاهی، یکی از غنی‌ترین منابع گیاهان دارویی جهان به‌شمار می‌رود. فلات وسیع ایران، به‌عنوان یک واحد خاص جغرافیایی در روی کره‌ی زمین به حساب می‌آید، که گونه‌های گیاهی متنوعی در آن انتشار دارند، به‌طوری‌که جوامع گیاهی منتشر شده در آن، هر یک دارای ترکیب معینی از گونه‌های مختلف می‌باشند *هوراوو و داسیلوا* (Hoareau and Dasilva, 1999).

متابولیت‌های ثانویه، گروه متنوعی از مولکول‌هایی هستند که در سازگاری گیاهان در مقابل شرایط محیطی درگیرند و به‌عنوان ترکیبات فرعی و انتهایی متابولیسم‌های اولیه در نظر گرفته می‌شوند. این ترکیبات در فرآیندهای متابولیسمی وارد نمی‌شوند *تیواری* و همکاران (Tiwari *et al.*, 2012). از آنجاکه متابولیت‌های ثانویه تحت تاثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند، میزان آن‌ها در مناطق جغرافیایی مختلف، با یکدیگر متفاوت خواهد بود *لی* و همکاران (Lee *et al.*, 2010). *لیندرو* (Lindroth, 2012) و *زیدورن* (Zidorn, 2005) بیان کردند که عوامل محیطی شامل نور، درجه حرارت و ارتفاع محل تأثیر زیادی بر کمیت و کیفیت مواد مؤثره‌ی گیاهان می‌گذارد.

تمام اعضا خانواده براسیکاسه (Brassicaceae) منابع استثنائی و غنی از گروهی از متابولیت‌های ثانویه بی‌نظیر و منحصربه‌فرد بنام گلوکوزینولات هستند. ترکیب شیمیایی این متابولیت‌ها متشکل از یک مولکول قند، یک زنجیره جانبی و یک بخش آلدوکسیم سولفونات است. تا سال ۲۰۰۴ بیش از ۱۲۰ نوع گلوکوزینولات گزارش شده است. تفاوت اصلی گلوکوزینولات‌ها در زنجیره جانبی آن‌ها است که از اسیدهای آمینه مختلف شامل اسیدهای آمینه‌آلیفاتیک، آروماتیک و ایندولی سنتز می‌شوند *میتن* (Mithen, 2001). *مویس* و همکاران (Mewis *et al.*, 2005) گزارش دادند که گلوکوزینولات‌ها اهمیت دفاعی برای گیاهان دارند و در زمان حمله توسط پاتوژن‌ها یا گیاه خواران در معرض آنزیم میروزیناز (β-thioglucoside glucohydrolase, EC 3.2.3.1) قرار می‌گیرند و هیدرولیز می‌شوند. هیدرولیز این ترکیبات تولید نیتریل‌ها و تیوسیانات‌ها و ایزوتیوسیانات‌ها می‌نماید که از میان آن‌ها ایزوتیوسیانات‌ها اهمیت دارویی زیادی دارند. یکی از مهم‌ترین ایزوتیوسیانات‌ها، سولفارافان (1-isothiocyanato-4-methylsulfinylbutane) می‌باشد که از اثر آنزیم میروزیناز بر گلوکوزینولات گلوکورافانین تولید می‌شود.

سولفارافان به‌عنوان یک عامل شگفت‌انگیز شیمی درمانی به خاطر داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی، محدود ساختن تومورها، فعالیت ضد هیستون داستیلازی *میزاک* و همکاران (Myzak *et al.*, 2006)، ضد باکتری هلیکوباکتر پیلوری *فهی* و همکاران (Fahey *et al.*, 2002) و القای آپوپتوز *لنزی* و همکاران (Lenzi *et al.*, 2014) در سال‌های اخیر زیاد مورد توجه قرار گرفته است. *چوانگ* (Chuang, 2013) گزارش کرده است که سولفارافان با القای آپوپتوز و متوقف کردن چرخه سلولی به‌عنوان یک عامل ضدتوموری عمل می‌کند.

گلوکورافانین به وفور در گیاه بروکلی (*Brassica oleracea*) و ازمک (*Lepidium draba* L) یافت می‌شود *فهی* و همکاران (Fahey *et al.*, 2001). در مقایسه با سایر گیاهان خانواده براسیکاسه که حاوی گلوکوزینولات‌های متعدد می‌باشند، گیاه ازمک به‌طور عمده حاوی دو گلوکوزینولات، گلوکوسینالبین و گلوکورافانین است *پوول* و همکاران (Powell *et al.*, 2005). همین ویژگی، تخلیص گلوکورافانین (پیش‌ساز سولفارافان) از این گیاه را راحتر می‌نماید *فهی* و همکاران.

آنالیز عصاره این گیاه توسط *داکسنبیشلر* و همکاران (Daxenbichler *et al.*, 1991) حضور حداقل ۵ محصول متفاوت ناشی از تجزیه گلوکوزینولات‌ها شامل اروسین، سولفارافان، اریسولین، الیل‌ایزوتیوسیانات و سینالبین را تأیید کرد. *فهی* و همکاران با بررسی تنوع شیمیایی گلوکوزینولات‌ها در *L. draba*، گلوکوسینالبین و نمک گلوکوزینولاتی L-پرولینیوم ۴-(متیل سولفینیل) بوتیل گلوکوزینولات از گل‌های سفید این گیاه جداسازی کردند. تاکنون گزارشی مبنی بر تأثیر عوامل محیطی بر محتوی گلوکوزینولاتی و یا مشتقات آن‌ها در گیاه *L. draba* صورت نگرفته است.

مطالعات گذشته *گو* و همکاران (Gu *et al.*, 2012) و *کو* (Koo, 2012) نشان داده است که شرایط آب‌وهوایی تأثیر مهمی بر محتوی گلوکوزینولات‌ها دارد. تأثیر دما و شرایط فصلی بر محتوی گلوکوزینولات‌های گیاه بروکلی توسط *رزا و رودریگز* (Rosa and Rodrigues, 2001) مشخص گردید. علاوه‌بر آن ثابت شده که ارتفاع نیز یک عامل تأثیرگذار بر محتوی متابولیت‌های ثانویه است. *زیدرون* گزارش کرده است که هر چقدر ارتفاع محل رویش گیاهان خانواده کاسنیان افزایش می‌یابد محتوی فلاونوئیدی و اسیدهای فنلی بیشتر می‌شود. از طرف دیگر، مطالعات انجام شده توسط *کائور* و همکاران (Kaur *et al.*, 2012) نشان داد که محتوی ترپنی

www.SID.ir

Archive of SID

برگ‌های گیاه *Ginkgo biloba* جمع‌آوری شده از ارتفاع‌های بین ۱۰۰۰-۲۰۰۰ متر از سطح دریا نسبت به ارتفاع‌های پایین‌تر و بالاتر بیشتری می‌باشد.

نقش ارتفاع در میزان متابولیت‌های ثانویه مانند نقش عرض‌های جغرافیایی می‌تواند مبهم و چندگانه باشد؛ اما دو تئوری مهم در این رابطه وجود دارد: ۱- در آب و هوای سردتر، تعداد و تنوع گیاه‌خواران از سمت مناطق با ارتفاع کم به سمت مناطق با ارتفاع بالا کاهش می‌یابد درنتیجه، تنش کمتری توسط گیاه‌خواران به گیاه وارد می‌شود، بنابراین میزان و تنوع ترکیبات فعال گیاهی، در مناطق سردتر نسبت به مناطق گرم‌تر کمتر است. ۲- آب و هوا و اشعه خورشید و دما از عوامل ایجاد تنش در گیاهان می‌باشند. با توجه به این نظریه، کاهش ترکیبات فعال گیاهی در دماهای پایین یا در حضور اشعه زیاد UV-B در ارتفاعات بالاتر رخ می‌دهد *زیدرون* (Zidorn, 2010). در نتیجه با توجه به نقش متابولیت‌های ثانویه در گیاه، میزان و تنوع هریک از آن‌ها در شرایط جغرافیایی مختلف می‌تواند متفاوت باشد.

برخی مطالعات مانند مطالعات *گو* و همکاران و *رزا* (Rosa *et al.*, 1997) به تأثیر اندام گیاه و مرحله رشدی آن بر محتوی گلوکوزرینولات‌ها و حضور گلوکوزینولات‌های خاص اشاره دارند. بررسی محتوی گلوکورافانین توسط *ترنی* و همکاران (Trenerry *et al.*, 2006) در بذر و گل گیاه بروکلی نشان داد که میزان این گلوکوزینولات در گل بروکلی نسبت به بذر آن بسیار بیشتر است.

با توجه به تنوع اقلیمی و پراکنش وسیع گیاه *L. draba* در استان کرمان، محتوی سولفارافان در اندام‌های مختلف این گیاه در سه اکوتیپ بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه گیاهی

در ابتدا، گیاهان کامل *L. draba* در روزهای آخر بهار سال ۱۳۹۱ از سه اکوتیپ مختلف استان کرمان با شرایط اقلیمی متفاوت جمع‌آوری گردید. گیاهان تحت شرایط کنترل شده به آزمایشگاه منتقل شدند و توسط یک گیاه شناس در دانشگاه باهنر کرمان، یکسان بودن گونه‌های گیاهی مورد تأیید قرار گرفت. سپس اندام‌های مختلف شامل گل، برگ، ریشه و میوه جدا شدند.

اندازه‌گیری میزان سولفارافان

جهت بررسی میزان تولید سولفارافان، عصاره‌گیری از هر کدام از اندام‌ها با استفاده از روش *لیانگ* و همکاران (Liang *et al.*, 2006) با کمی تغییرات انجام شد. به این منظور، یک گرم از هر کدام از بافت‌ها درون هاون به‌طور کامل ساییده شد. پس از اضافه کردن یک میلی‌لیتر آب با pH برابر ۵/۸ (pH با HCl رقیق شده تنظیم شد)، مخلوط حاصل به‌مدت دو ساعت در دمای ۲±۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس پنج میلی‌لیتر استونیتریل به آن اضافه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. محلول رویی برداشته شد و قبل از تزریق به ستون کروماتوگرافی HPLC (1100 Series شرکت Agilent) از فیلتر ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد. بعد از آماده نمودن ستون کروماتوگرافی C_{18} (۰/۴۶ × ۲۵ سانتی‌متر) ابتدا استاندارد سولفارافان (Sigma-Aldrich) به دستگاه تزریق شد تا پیک استاندارد و زمان نگه‌داری نمونه در ستون مشخص گردد، سپس نمونه‌ها در دمای آزمایشگاه به ستون تزریق شدند. یک حلال دو فازی شامل شامل استونیتریل و آب به‌ترتیب به نسبت ۰/۴ و ۰/۶ مورد استفاده قرار گرفت. برای شناسایی این ترکیب از طول موج ۲۵۴ نانومتر استفاده شد.

آنالیز آماری

آزمایشات با ۳ تکرار، مستقل و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. میانگین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (v.21) توسط آزمون دانکن با در نظر گرفتن سطح اطمینان ۵٪ مورد تجزیه واریانس یک عاملی قرار گرفت.

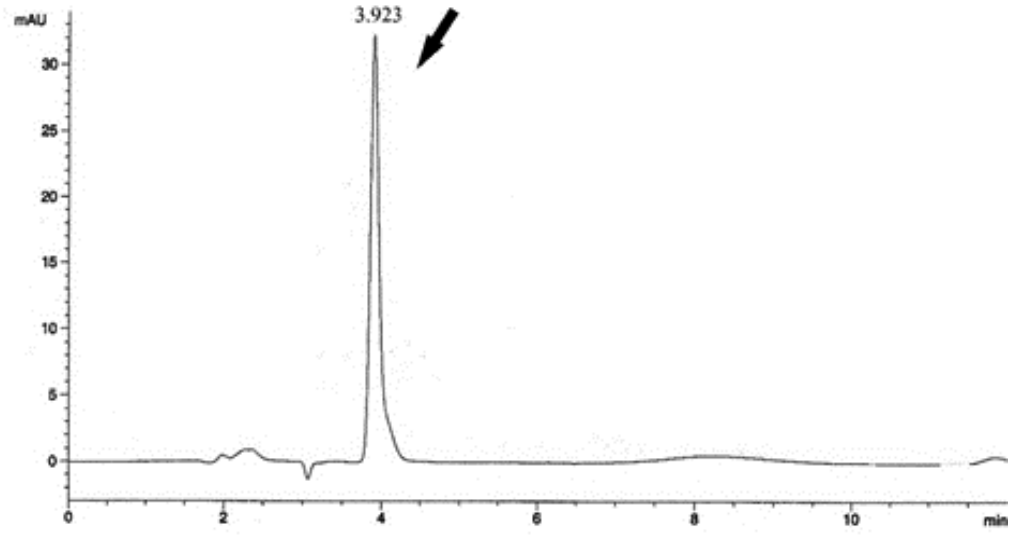
نتایج

زمان نگهداری نمونه در ستون

جهت تعیین زمان نگهداری نمونه درستون کروماتوگرافی، از نمونه استاندارد سولفارافان استفاده گردید. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می شود زمان نگهداری نمونه در ستون حدود چهار دقیقه پس از تزریق می‌باشد. پیکی مشابه برای هر یک از نمونه‌ها در این زمان بر روی کروماتوگرام HPLC مشاهده گردید (نتایج نشان داده نشده است).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: کروماتوگرام HPLCمربوط به نمونه استاندارد سولفارافان. زمان نگهداری نمونه در ستون بر روی شکل با علامت فلش نشان داده شده است که حدود چهار دقیقه پس از تزریق می‌باشد

Fig.1: HPLC chromatogram of sulforaphane standard. Retention time of sample was shown with arrow in the figure that was around 4 minutes after injection

محتوی سولفارافان در اندام‌های مختلف گیاه *L. draba*

همان‌طور که در شکل ۲ قابل مشاهده است، تفاوت معنی‌داری بین محتوی سولفارافان در اندام‌های مختلف وجود دارد. در حالی‌که بیشترین محتوی این ایزوتیوسیانات در میوه گیاه قابل مشاهده است، اندام‌های گل و برگ در مرتبه بعدی قرار دارند و کمترین مقدار آن در ریشه یافت می‌شود. این الگو برای گیاهان جمع‌آوری شده از اکوتیپ‌های مختلف مشابه می‌باشد. از مقایسه تولید سولفارافان در گیاهان ازمک جمع‌آوری شده از شهرهای مختلف چنین استنباط می‌شود که بیشترین مقدار این ماده مؤثره در گیاهان جمع‌آوری شده از سطح شهر ماهان می‌باشد که در تمامی اندام‌ها نسبت به اندام‌های متناظر در نمونه شهرهای دیگر بیشتر می‌باشد. در حالی‌که تفاوت چشمگیری بین محتوی سولفارافان در اندام‌های مختلف گیاهان جمع‌آوری شده از اطراف شهرستان‌های بافت و جیرفت مشاهده نمی‌شود.

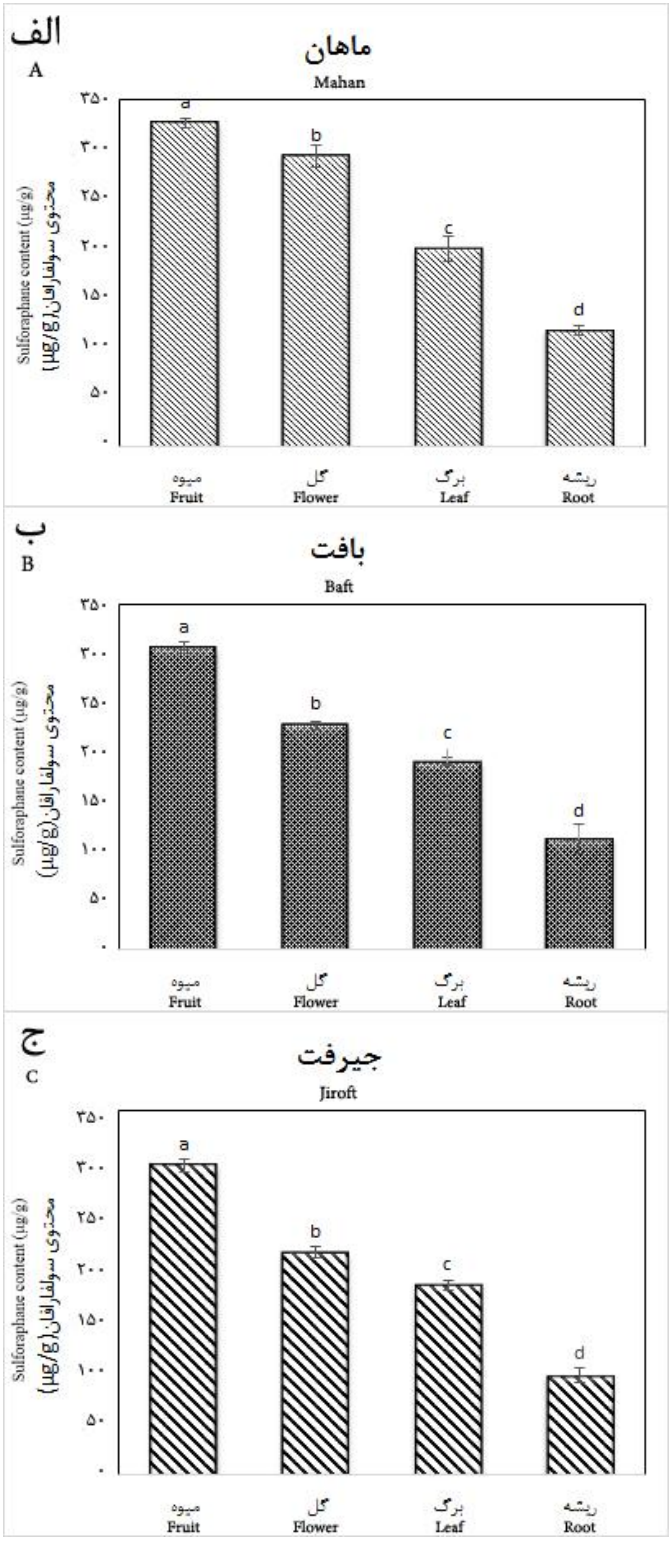
بحث و نتیجه‌گیری

گلوکوزینولات‌ها از جمله متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که در گیاهان خانواده براسیکاسه به فراوانی یافت می‌شوند. مطالعات مختلف نشان داده است که محتوی و پروفایل گلوکوزینولات‌ها در بافت‌های گیاهان به فاکتورهای مختلفی از جمله: فاکتورهای اندوژنوز شامل ژنوتیپ و گونه گیاهی، مرحله رشد گیاه و سن، اندام گیاه و فاکتورهای اگزوژنوز از قبیل فاکتورهای کشاورزی مثل تغذیه خصوصاً کوددهی با سولفور و نیتروژن بستگی دارد *فالک* و همکاران (Falk *et al.*, 2007). علاوه‌بر این، *تکستور و گرشنزون* (Textor and Gershenzon, 2009) گزارش دادند که آسیب‌ها و استرس‌های وارده به گیاه مانند حمله آفات و محرک‌ها و شرایط جغرافیایی بر مقدار گلوکوزینولات‌ها اثرگذار است. در مقاله مروری گو نتایج متعددی آورده شده است که نشان می دهد چند فاکتور شیمیایی و فیزیکی مانند pH، دما و تهویه خاک بر تولید ترکیبات شیمیایی گیاهی تأثیر می‌گذارد.

در این مطالعه، محتوی سولفارافان در اندام‌های مختلف گیاه *L. draba* جمع‌آوری شده از اکوتیپ‌های مختلف استان کرمان با اقلیم‌های متفاوت شامل ماهان (۱۸۵۰ متر ارتفاع از سطح دریا)، بافت (۲۲۸۰ متر ارتفاع از سطح دریا) و جیرفت (ساردوئیه) (۲۶۲۰ متر ارتفاع از سطح دریا) *بختیاری* (Bakhtiari, 2010) بررسی گردید.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲: مجتوی سولفارافان در اندام‌های مختلف گیاه *L. draba* جمع‌آوری شده از اطراف شهر (الف) ماهان، (ب) بافت، (ج) جیرفت.
حروف کوچک بالای هر ستون نشان دهنده معنی داری در سطح ۵٪ می‌باشد

Fig. 2: Sulforaphane content in different organs of *L. draba* plant collected from surrounding of Mahan (A), Baft (B) and Jiroft (C). Bars with different letters are significantly different at $p \leq 0.05$

گیاه *L. draba* به‌دلیل داشتن مقادیر قابل‌توجهی از گلوکوزینولات گلوکورافانین یک منبع مهم و ارزشمند برای تهیه و تولید سولفارافان می‌باشد *فهی* و همکاران. نتایج نشان داد که مقدار سولفارافان در اندام‌های هوایی نسبت به اندام‌های زمینی بیشتر می‌باشد. علاوه‌بر آن مشخص گردید که مقدار این ترکیب در اندام‌های زایشی نسبت به اندام‌های رویشی قابل‌توجه می‌باشد و بیشترین مقدار آن در میوه گیاه مشاهده شد. این یافته‌ها با نتایج منتشر شده توسط *افشاری‌پور* و همکاران (2005) که بر روی

www.SID.ir

Archive of SID

ترکیبات مؤثره گیاه ازمک جمع‌آوری شده از شهر اصفهان انجام شده است تا حدودی مغایرت دارد. آن‌ها نشان دادند که سولفارافان اصلی‌ترین ترکیب میوه و ریشه این گیاه است.

ثابت شده است که عواملی همچون دما و فشار بر محتوی گلوکوزینولات‌ها و فعالیت آنزیم میروزیناز که کلیدی‌ترین آنزیم مسیر بیوسنتز سولفارافان است، تأثیر می‌گذارد. برای مثال در مطالعه *ایلن* و همکاران (Eylen *et al.*, 2008)نشان داده شده است که فشار متعادل و درجه حرارت بالا (کمتر از ۴۵ درجه) می‌تواند باعث افزایش فعالیت میروزیناز و همچنین افزایش محتوی گلوکوزینولات‌ها در گیاه بروکلی شود. جالب توجه اینکه، نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد در گیاهان جمع‌آوری شده از شهر ماهان که نسبت به دو شهر دیگر از متوسط درجه حرارت بالاتری برخوردار است محتوی سولفارافان نیز بیشتر می‌باشد. مطالعات قبلی توسط *رزا* و *رودریگز* (Rosa and Rodrigues, 1998) و *رزا* و همکاران (Rosa *et al.*, 1996) بر روی گیاه کامل برخی اعضای براسیکاسه نیز نشان داده است که دماهای مطلوب برای رشد گیاه با میزان بالاتری از گلوکوزینولات‌ها همخوانی دارد (دشت ساردوئیه، بلندترین دشت ایران با ارتفاع ۲۶۲۰ متر از سطح دریا، یکی از سردترین نقاط استان کرمان است که کاهش میزان سولفاران در این منطقه با توجه به شرایط اقلیمی خاص آن کاملاً توجیه‌پذیر می‌باشد. نتایج به‌دست آمده با نتایج گزارش شده توسط *پریرا* و همکاران (Pereira *et al.*, 2002) مبنی بر افزایش میزان گلوکوزینولات‌ها در گیاه بروکلی رشد یافته در دمای ۳۱ درجه سانتی‌گراد نسبت به دماهای ۲۲ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد منطبق است.

در مجموع نتیجه‌گیری می‌شود، مناطقی با درجه حرارت بالاتر و ارتفاع کمتر بر محتوی گلوکوزینولات‌های این گیاه تأثیر بیشتری دارند. با توجه به اینکه در این بررسی تنها به تأثیر شرایط اقلیمی بر میزان سولفارافان پرداخته شده است مطالعات بیشتری لازم است تا اثر سایر فاکتورها و در تقابل با یکدیگر بر میزان این ترکیب باارزش گیاهی سنجیده و مورد ارزیابی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان انجام شده است؛ بنابراین مجری و همکاران مراتب سپاس و قدردانی خود را از آن دانشگاه محترم اعلام می‌دارند.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۵-۱۴ متن انگلیسی مراجعه شود.

www.SID.ir