مقاله پژوهشی

مجله دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، جلد سوّم، شماره (۱) بهار، تابستان ۱۳۷۲

بررسی حضور گلوکزیدهای گوگرددار در کشت سلولی گیاهان براسیکاناپوس و سیناپیس آلبا

دکتر سلیمان افشاریپور *
دانشکده داروسازی و علوم داروئی - دانشگاه علوم‌پزشکی اصفهان

خلاصه

در این پژوهش، هیپوکتیل نشاهای پنج روزه براسیکاناپوس و سیناپیس آلبا در شرایط اسپتیک برروی محیط های کشت جامدموراشیگ واسکوگ اصلاح شده (۱) که حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مناسب (یک سیتوکینین و یک اوکسین) با غلظت‌های مختلف بوده کشت گردید. به برخی از محیطهای کشت جامد، علاوه بر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از سولفات پتاسیم (به‌مقدار ۳ میلی اکی‌والان در لیتر) جهت بالا بردن مقدار سولفات استفاده گردید. در محیط کشت دیگر از L - بتا - فنیل آلانین (به‌مقدار ۳۰ میلی اکی‌والان در لیتر) استفاده بعمل آمد تا شاید به‌عنوان پیشتاز تولید گلوکزید گوگرددار (گلوکزاینولات) وارد عمل شود. مقداری از کالوس حاصل به محیط های کشت مایع حاوی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی انتقال داده شد تا بدین‌ترتیب سلولها در کشت سوسپانسیونی رشد کنند. کالوس رشد کرده در ۲۰ هفتگی و سلولهای رشد کرده در سوسپانسیون در ۶ هفتگی جمع‌آوری، خشک و سپس از بابت حضور گلوکزیدهای گوگرددار بروش کروماتوگرافی گازی آنالیز شدند. نتایج حاصل از این پژوهش عدم حضور گلوکزیدهای مزبور را در سلولها و کالوسها به‌اثبات رساند.

مقدمه

امروزه صنعت داروئی به دلایل متعددی بدنبال پیدا کردن راههای کشت گونه‌های ویژه‌ای از سلولهای گیاهی تحت شرایطی مشابه شرایط تولید آنتی بیوتیکها بوده تا بتواند نهایتاً مواد داروئی را تهیه کند. بدین‌ترتیب، تولید داروها با این روش همیشه امکان‌پذیر و کیفیت استاندارد آنها قابل تضمین خواهد بود. در حقیقت بیش از سی سال پیش بود که پیشرفتهای مدرن در کشت سلول‌های گیاهان عالی بصورت کالوس یا بصورت کشت مایع سوسپانسیونی انجام گرفت. کشت سلولهای تکی که در شرایط کنترل شده در محیط کشت مایع رشد کرده و یا کشت کالوس حاوی توده‌های سلولی تفکیک نشده و غیر متمایز گشته که روی یک محیط نیمه جامد رشد می‌کند را می‌توان از بافتهای پارانشیمی نهال یا جوانه، ریشه و یا قسمت‌های دیگر گیاه تهیه نمود. نگهداری اینگونه کشتها با قرار دادن مواد مغذی (شامل تنظیم‌کننده‌های رشد) و محیط استریل کنترل شده بستگی دارد. این سلولها اگرچه از یکدیگر متمایز نگردیده اما هنوز دارای تمامی اطلاعات ژنتیکی (منجمله اطلاعات ژنتیکی لازم برای تولید متابولیت‌های ثانویه) موجود در گیاه طبیعی می‌باشند. هنگامیکه این سلولها تحریک و به فعالیت واداشته شوند، اصولاً باید متابولیت‌های ثانویه را تولید کنند. پژوهشگران در این زمینه از کشت سلولی علاقمندی زیادی را نشان داده و بدنبال این ایده می‌باشند که سلولهای گیاهی ویژه‌ای را در واحد تجارتی برای تولید متابولیت‌های ثانویه کشت نمایند. البته در اغلب موارد، کشتهای سلولی تولید مقادیر کمی از متابولیت‌ها را می‌نمایند و در حقیت یکی از مشکلات اساسی که از بکار بردن این تکنیک در سطح تجارتی جلوگیری می‌نماید همین مسئله تولید مقادیر کم ترکیبات داروئی توسط کشتها در مقایسه با گیاه معمولی می‌باشد. پژوهشگران با انجام مطالعات زیادی در باره محیط های کشت و انتخاب نژادهای تولید کننده دارو بمقادیر زیاد و کشت نمودن آنها تا بحال توانسته‌اند در برخی موارد این داروها را

به نسبت ۵ تا ۱۰ برابر بیشتر از تولید گیاه معمولی مربوطه توسط کشت سلولی تهیه نمایند. در این زمینه می‌توان نتایج بسیار خوبی از تولید گلیکوزیدهای قلبی، آنتراکینونها، برخی استروئیدها و آلکالوئیدهای مختلف بدست آمده است را ذکر نمود (۲).

هدف از این تحقیق بررسی تولید گلوکزیدهای گوگرددار (گلوکزاینولاتها) در کشت سلولی دوگونه از گیاهان تیره شب‌بو بنامهای براسیکاناپوس و سیناپیس آلبا بوده است. البته نوع گلوکزیدهای دو گیاه مزبور در یک تحقیق دیگر قبلاً مشخص و گزارش شده است (۳).

بخش تجربی :

نمونه‌های گیاهی : در این تحقیق اندازه‌گیری گلوکزیدها در دانه‌ها و گیاهان روئیده از آنها و نیز سلولهای حاصل از کشت بافت گیاهی انجام پذیرفت.

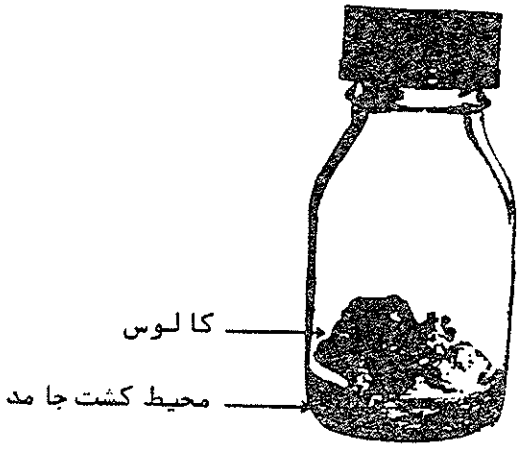
دانه‌های دو گیاه از مؤسسات تجارتی خریداری شدند. به‌علت اینکه شناسائی دقیق آنها امکان‌پذیر نبود، آنها را کشت داده و گیاهان روئیده توسط متخصصین گیاه‌شناسی مورد بررسی و شناسائی قرار گرفتند.

گیاهان را پس از کشت دادن و شناسائی درو کرده و در هوای آزاد جهت خشک شدن قرار داده شدند.

کشتهای سلولی با استفاده از هیپوکتیل نشاهای پنج روزه گیاهان بروش زیر تهیه گردیدند:

سطح خارجی دانه‌های گیاهان براسیکاناپوس و سیناپیس آلبا با قراردادن دانه‌ها در پراکسید هیدرژن (۳۰ درصد وزن در حجم) حاوی توین ۸۰ بمدت دو دقیقه استریل گردید. دانه‌های مزبور سپس در پتری دیشهای شیشه‌ای استریل شده قرار داده شدند. هرپتری دیش حاوی دو عدد کاغذ صافی واتمن شماره ۱ و مقدار ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود. عمل انکوباسیون ابتدا در تاریکی و در حرارت ۲±۲۷ درجه سانتیگراد بمدت ۵ تا ۸ روز و سپس بطور متناوب در نور بمدت ۱۲ ساعت و در تاریکی بمدت ۱۲ ساعت در همان درجه حرارت انجام گرفت. هیپوکتیل نشاهای پنج روزه در شرایط اسپتیک بروری محیطهای کشت جامد اصلاح شده موراشیگ و اسکوگ که حاوی اسیداسکوربیک بمقدار ۵ قسمت در میلیون، تنظیم کننده رشد گیاهی کینتین بمقدار ۰/۱ یا ۰/۵ قسمت در میلیون و تنظیم کننده رشد گیاهی ۲،۴ - دی کلرفنوکسی استیک اسید (D - ۴ و ۲) یا تنظیم کننده رشد گیاهی آلفا - نفتالین استیک اسید (a-NAA) بمقدار ۰/۲ تا ۱ قسمت در میلیون بودند قرار داده شد. برخی از محیط های کشت، علاوه برمواد فوق‌الذکر، حاوی سولفات پتاسم بمقدار ۳ میلی اکی‌والان در لیتر و برخی از محیط های کشت دیگر حاوی L - بتا فنیل آلانین بمقدار ۳۰ میلی اکی‌والان در لیتر بودند. کالوس در حرارت ۲±۲۷ درجه سانتیگراد و در شرایط نور (۱۲ ساعت) و تاریکی (۱۲) ساعت رشد کرد (شکل ۱). مقداری از کالوس حاصل به محیط های کشت مایع اصلاح شده موراشیگ واسکوگ که حاوی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی فوق‌الذکر بودند انتقال داده شد تا بدین‌ترتیب سلولها در کشت سوسپانسیونی رشد کنند.

روش آنالیز : آنالیز گلوزیدهای گوگردار را مروزه معمولاً از راه تشخیص ترکیبات فرار حاصل از هیدرولیز آنها انجام می‌پذیرد. هیدرولیز این گلوکزیدها در حضور سیستم آنزیمی میروزیناز که در بافت گیاهی حاوی گلوکزیدها حضور دارد انجام می‌پذیرد.



شکل ۱ :کالوس رشد کرده در محیط کشت جامد

در این تحقیق، ترکیبات فرار حاصل از هیدرولیز گلوکزیدها که قبلاً با بکار بردن روش کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی مورد شناسائی قرارگرفته بودند، با استفاده از گاز کروماتوگرافی تعیین مقدار گردیدند. برای انجام این امر، ابتدا

مقدار ۳۰ میلی‌گرم از ماده گیاهی پودر شده با ۷ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط گردید و بمدت ۱۷ ساعت در حمام ۳۵ درجه سانتیگراد جهت انجام هیدرولیز قرار داده شد. سپس حلال دی کلرومتان اضافه گردید و مخلوط بمدت ۳۰ دقیقه با دستگاه تکاندهنده دوارتکان داده شد. برای جدا سازی کامل لایه حلال آلی از سانتریفوژ استفاده گردید. لایه دی‌کلرومتان تا حاصل شدن حجم معینی تغلیظ گردید، به آن مقدار معینی دودکان نرمال به‌عنوان یک استاندارد داخلی اضافه و سپس جهت بررسی حضور ترکیبات حاصل از هیدرولیز گلوکزیدهای گوگردی با استفاده از کروماتوگرافی گازی آنالیز شد. دستگاه کروماتوگرافی گازی مورد استفاده از نوع کارلو - اربا بوده، و تجزیه اجزاء حاصل با استفاده از ردیاب گرم شده FID صورت گرفت. ستون بکار برده شده بطول ۲۵ متر و با قطر داخلی ۰/۳۲ میلی متر و حاوی صمغ متیل سیلیکون به‌عنوان فاز ثابت بوده است. میزان گاز هیدروژن (به‌عنوان گازحامل) ۲ میلی‌لیتر در دقیقه بود. دمای مورد استفاده ابتدا ۵ درجه سانتی‌گراد بود که پس از آن با افزایش ۵ درجه سانتیگراد در هر دقیقه به‌حدود ۲۸۰ درجه سانتیگراد رسانده شد. دمای محفظه تزریق و محفظه ردیابی به ترتیب ۲۸۰ و ۲۹۰ درجه سانتیگراد و حجم مایع مورد تزریق ۱ تا ۲ میکرولیتر بود. پیکها و مساحت آنها توسط ثبات شیمادزو کروماتوپک C-R2A ثبت گردید.

نتایج و بحث :

مقادیر ترکیبات فرار حاصل از هیدرولیز گلوکوزیدهای گوگرددار در دانه‌ها و گیاهان خشک شده براسیکاناپوس و سیناپیس آلبا در جدول شماره ۱ ارائه شده است. جدولهای شماره ۲ و شماره ۳ نام و مقدار تنظیم کننده‌های رشد گیاهی سیتوکینین و اوکسین مورد استفاده در محیطهای کشت موراشیگ واسکوگ که در آنها هیپوکتیل گیاهان براسیکاناپوس و سیناپیس آلبا یا کالوس آنها کشت گردیده و نیز نوع بافت بدست آمده ارائه گردیده است. همانطور که ملاحظه می‌شود، به برخی از محیط های کشت سولفات پتاسیم و به برخی دیگر L - بتا فنیل آلانین اضافه شده است. هنگامیکه کالوسها و سلولهای تکثیر یافته در کشتهای سوسپانسیونی آنالیز شدند، برخلاف دانه و گیاهان خشک شده فاقد گلوکزیدهای گوگرددار بودند (باستثنای یکی از انواع کشتهای کالوس مربوط به گیاه براسیکانوپوس که حاوی مقادیر جزئی بوده است). استفاده از سولفات پتاسیم بمقدار ۳ میلی اکی‌والان در لیتر در برخی از محیط های کشت بمنظور بالا بردن مقدار سولفات (باندازه بیش از ۵۰ درصد مقدار نرمال) بوده است، اما هیچگونه تغییری در جهت تولید گلوکزیدها مشاهده نگردید. این تکنیک قبلاً جهت بالا بردن مقدار تولید گلوکزیدهای گوگردی در گیاهان کشت شده براسیکاژونسه‌آ در محیط شنی موفقیت‌آمیز بوده است (۴).

رابطه بین اسیدهای آمینه وگلوکزیدهای گوگرددار از راه تبدیل آسان تریپتوفان نشاندار شده به ترتیب ۳ - ایندولیل متیل گلوکزاینولات در گیاه براسیکااوله را سه‌آونیز تبدیل L - بتافنیل آلانین به بنزیل گلوکز اینولات در گیاه تروپیولوم ماژوس به اثبات رسیده است (۵). اما در این مطالعه با اضافه کردن L - بتافنیل آلانین به محیط کشت سوسپانسیونی سیناپیس آلبا به‌عنوان پیشتاز آماده، تغییر در جهت تولید گلوکزید مشاهده نگردید.

از این تحقیق و نیز تحقیقات مشابهی که برروی کشت بافت گیاهان دیگر تیره شب‌بو انجام پذیرفته است چنین می‌توان استنباط کرد که شاید فاکتورها یا شرایط لازم برای سنتز یا ذخیره شدن و انباشته شدن این گلوکزیدها ناکافی یا کاملاً فراهم نشده است. ضمناً احتمال آن می‌رود که برخی تمایزهای مرفولوژیکی یا بیوشیمیائی ممکن است برای تولید مقادیر قابل توجهی از گلوکزیدهای گوگرددار مورد لزوم باشد، زیرا حضور تیوگلوکزیدها و میروزیناز در سطح های مختلف سیتومرفولوژیکی قبلاً به‌اثبات رسید است (۶).

جدول شماره ۱ : مقادیر ترکیبات حاصل از هیدرولیز گلوکوزیدهای گوگرددار (گلوکز اینولانها) در دانه‌ها و گیاهان براسیکاناپوس و سیناپیس آلبا

شماره ترتیبی	زمان نگهداری (دقیقه)	نام ترکیب حاصل از هیدرولیز	مقدار ترکیب (میکروگرم / گرم) دانه	گیاه خشک شده
۱ - براسیکاناپوس				
۱	۶/۸	۳ - بوتنیل ایزوتیوسیانات	۲۱۰/۸۲	۱۳/۳۸
۲	۱۱/۵	ایزوهگزیل ایزوتیوسیانات	مقدار جزئی	۹/۲۴
۳	۱۳/۸	۳ - فنیل پروپیونیتریل	۱/۰۳	۲/۸۰
۴	۱۴/۵	ایزوهپتیل ایزوتیوسیانات	مقدار جزئی	۰/۸۴
۵	۲۰/۳	۲ - فنیل اتیل ایزوتیوسیانات	۲۰/۰۸	۶۴/۸۴
۲ - سیناپیس آلبا				
۱	۱۶/۲	بنزیل ایزوتیوسیانات	۱/۸۳	۱/۸۷

جدول شماره ۲ : نام و مقدار تنظیم کننده‌های رشد و نیز مقدار سولفات پتاسیم اضافه شده به محیط های کشت موراشیگ و اسکوگ ارائه شده است. در این محیط های کشت، هیپوکتیلهای گیاه براسیکاناپوس کشت گردیده است. انواع بافتهای حاصل در این کشتها نیز ذکر گردیده است.

شماره ترتیبی نوع کشت	نام و مقدار ترکیبات تنظیم کننده رشد گیاهی مورد استفاده در محیط های کشت جامد	نوع بافت حاصل
۱	کینتین (۰/۱ قسمت در میلیون)+ آلفانفتالین استیک اسید (۰/۵ قسمت در میلیون).	گیاهچه
۲	کینتین (۰/۱ قسمت در میلیون)+ آلفانفتالین استیک اسید (۰/۵ قسمت در میلیون)+ سولفات پتاسیم (۳میلی اکی والان / لیتر).	گیاهچه
۳	کینتین (۰/۱ قسمت در میلیون) + آلفانفتالین استیک اسید (۱ قسمت در میلیون).	گیاهچه
۴	کینتین (۰/۱ قسمت در میلیون) + آلفا نفتالین استیک اسید (۱ قسمت در میلیون) + سولفات پتاسیم (۳ میلی اکی والان / لیتر).	گیاهچه
۵	کینتین (۰/۵ قسمت در میلیون)+ آلفا نفتالین استیک اسید (۱ قسمت در میلیون).	گیاهچه
۶	کینتین (۰/۵ قسمت در میلیون)+ آلفا نفتالین استیک اسید (۱ قسمت در میلیون)+ سولفات پتاسیم (۳ میلی‌اکی والان/ لیتر).	گیاهچه
۷	کینتین (۰/۵ قسمت در میلیون)+ آلفانفتالین استیک اسید (۳ قسمت در میلیون).	گیاهچه
۸	کینتین (۰/۵ قسمت در میلیون)+ آلفا نفتالین استیک اسید (۳ قسمت در میلیون)+ سولفات پتاسیم (۳ میلی اکی والان/ لیتر).	گیاهچه
۹	کینتین (۰/۵ قسمت در میلیون)+ آلفانفتالین استیک اسید (۵ قسمت در میلیون).	کالوس
۱۰	کینتین (۰/۵ قسمت در میلیون) + آلفا نفتالین استیک اسید (۵ قسمت در میلیون) + سولفات پتاسیم (۳ میلی اکی والان / لیتر).	کالوس
۱۱	کینتین (۰/۵ قسمت در میلیون) +۲،۴- دی کلرفنوکسی استیک اسید(۱ قسمت در میلیون).	کالوس*
۱۲	کینتین (۰/۵ قسمت در میلیون) +۲،۴- دی کلرفنوکسی استیک اسید (۱ قسمت در میلیون)+ سولفات پتاسیم (۳ میلی اکی والان).	کالوس

* در این بافت مقادیر جزئی از ۲ - فنیل اتیل ایزوتیوسیانات تشخیص داده شد.

جدول شماره ۳: نام و مقدار تنظیم کننده‌های رشد و نیز مقدار سولفات پتاسیم و L - بتا فنیل آلانین اضافه شده به محیط های کشت موراشیگ واسکوگ . در این محیط های کشت هیپوکتیلها یا کالوس گیاه سیناپیس آلبا کشت گردیده است. انواع بافتهای حاصل در این کشتها نیز ذکر شده است.

شماره ترتیبی نوع کشت	نام و مقدار ترکیبات تنظیم کننده رشد گیاهی مورد استفاده	نوع محیط	نوع‌بافت حاصل
۱	کینتین (۰/۵ قسمت در میلیون) +۴،۲- دی کلرفنوکسی استیک اسید (۱ قسمت در میلیون).	جامد	کالوس
۲	کینتین (۰/۵ قسمت در میلیون) +۴،۲- دی کلرفنوکسی استیک اسید (۱ قسمت در میلیون) + سولفات پتاسیم (۳ میلی اکی والان / لیتر).	جامد	کالوس
۳	کینتین (۰/۵ قسمت در میلیون) +۴،۲- دی کلرفنوکسی استیک اسید (۱ قسمت در میلیون)	جامد	کالوس
	سپس کالوس بدست آمده به محیط کشت حاوی :		
	کینتین (۰/۵ قسمت در میلیون) +۴،۲- دی کلرفنوکسی استیک اسید (۱ قسمت در میلیون).	مایع	سلول
۴	کینتین (۰/۵ قسمت در میلیون) +۴،۲- دی کلرفنوکسی اسیتک اسید (۱ قسمت در میلیون).	جامد	کالوس
	سپس کالوس بدست آمده به محیط کشت حاوی :		
	کینتین (۵ / ۰ قسمت در میلیون) +۴،۲- دی کلرفنوکسی استیک اسید ۱ قسمت در میلیون) + L - بتا - فنیل آلانین (۳۰ میلی اکی و الان/ لیتر).	مایع	سلول
۵	کینتین (۰/۵ قسمت در میلیون) +۴،۲- دی کلرفنوکسی استیک اسید (۱ قسمت در میلیون) + سولفات پتاسیم (۳ میلی اکی والان / لیتر)	جامد	کالوس
	سپس کالوس بدست آمده به محیط کشت حاوی :		
	کینتین (۰/۵ قسمت در میلیون) +۴،۲- دی کلرفنوکسی استیک اسید (۱ قسمت در میلیون)+ سولفات پتاسیم (۳ میلی اکی والان / لیتر).	مایع	سلول

منابع و ماخذ

1) Murashige, T . ; Skoog, F. Physiol . Plantarum, 1962, 15, 443
2) Trease, G.E.; Evans, W.C. Pharmacognosy, 12th edition, Bailliere Tindall : London, 1983; pp 74-82.
3) Afsharypuor, S.; Lockwood, G.B. Iran. J. chem. & Chem. Eng. , 1990, 13, 12-18.
4) Freeman, G.G.; Mossadeghi, N. J. Sci. Food Agric., 23, 1335- 1345.
5) Afsharypuor, S. ph. D. Thesis, University of Manchester, 1986, PP 230 - 231.
6) Matile, P. Biochem. Physiol. Pflanz., 1980, 175, 722-731.

Title: Determintation of sulfor containing glucosides in *Brassica napus* L. and *Sinapis alba* L. tissue cultures

Author: Suleiman Afsharypuor

Address: *Faculty of pharmacy and pharmaceutical Sciences, Isfahan univ. of Medical Sciences, Isfahan, IrAn.*

Abstract

In this study, hypocotyls of 5 day old seedlings of *Brassica napus* L. and *Sinapis alba* L. were explanted onto Murashige and Skoog's revised Tobaco Medium(1)containing different concentrations of suitable plant growth regulators (a cytokinin and an auxin). In addition to the plant growth regulators, potassium sulfate(in a concentration of 3 m. eq./liter) was added to some solid and liquid media in an attempt to raise available sulfate levels. to other medium, L - B- Phenylalanine was added (in a concentration of 30 m. eq./liter) to act possibly as a precursor for the biosynthesis of sulfor containing glucoside (glucosinolate). Suspension cell cultures were initiated from callus and grown in the same medium without agar. Calli which were harvested at 20 weeks and cells at 6 weeks after subculture, were dried and examined by capillary GC for the presences of sulfor containing glucosides. The obtained results indicated the absence of such glucosides in the cells and calli.