نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 28، شماره 3، پاییز 1393، ص. 398-388
شاپا: 4730 - 2008

Journal of Horticultural Science
Vol. 28, No. 3, Fall 2014, P. 388-398
ISSN: 2008 - 4730

تأثیر اسید سالیسیلیک و تنش شوری بر جوانه‌زنی بذر و آنتی‌اکسیدان‌های فراسودمند در جوانه‌های کلم براکلی

آزاده اسفندیاری[1]- مصباح بابالار[2*]- جواد هاشمی[3]- یونس مستوفی[4]

تاریخ دریافت: 1391/10/25
تاریخ پذیرش: 1392/11/15

چکیده

سولفورافان ماده‌ای بسیار قوی در کنترل سرطان می‌باشد. این ماده در کلم براکلی تولید می‌شود و به نظر می‌رسد تنش شوری از طریق فعال کردن مقاومت اکتسابی سیستمیک باعث بیش‌تر شدن تولید سولفورافان گردد. با هدف به‌دست آوردن غلظت مناسب شوری برای تولید حداکثر سولفورافان، به‌همراه کنترل درصد جوانه‌زنی، تیمار با NaCl در 5 سطح0، 50، 100، 150، 200 میلی‌مولار به‌همراه اسیدسالیسیلیک (0 ، ۱۰۰،۲۰۰ میکرومولار) مورد آزمایش قرار گرفت. برای بررسی تأثیر تیمارها بر حداکثر درصد جوانه‌زنی، سرعت افزایش و زمان لگ، مدل لجستیک استفاده شد و سولفورافان و ویتامین ث با استفاده از HPLC اندازه‌گیری شدند. اسید سالیسیلیک مقاومت به شوری را افزایش داد. ترکیب اسید سالیسیلیک و کلرید سدیم غلظت سولفورافان و ویتامین‌ث را افزایش داد. تیمار100 میکرومولار اسید سالیسیلیک به‌همراه 100 میلی‌مولار کلرید سدیم بالاترین غلظت سولفورافان و ویتامین ث، به‌همراه بهترین فاکتورهای رشدی را ایجاد نمود.

واژه‌های کلیدی: هیدرکسی بنزوئیک اسید، کلرید سدیم، فاکتورهای جوانه‌زنی، سولفورافان، ویتامین ث

مقدمه

کلم براکلی (*Brassica oleraseae* var. Italica) به عنوان یک منبع غذایی سلامتی بخش[5] قوی، حاوی انواع آنتی‌اکسیدان‌ها مانند ویتامین‌ها و گلوکوزینولات‌ها[6] می‌باشد (10، 24 و 39). گلوکوزینولات‌ها که ترکیبات سولفوره ثانویه منحصر به خانواده کلم‌ها می‌باشند، در تحقیقات کلینیکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند و در جوانه‌های[7] کلم براکلی نسبت به گلچه‌ها به میزان بیش‌تری تولید می‌شوند (3، 4، 7، 18، 32) به‌علت وجود آنتی‌اکسیدان‌های فراوان، جوانه‌ها و گلچه‌های کلم براکلی در لیست مواد خوراکی فراسودمند[8] قرار می گیرد. خوراکی‌های فراسودمند، استانداردهای مورد نیاز سلامتی انسان را بیش‌تر از خوراکی‌های معمولی فراهم می‌کنند و با تأثیری که بر سیستم های فعال بدن انسان می گذارند، از بروز و پیشرفت بیماری‌های خطرناکی مانند سرطان و بیماری‌های قلبی عروقی جلوگیری می‌کنند (1 و 25). مهم‌ترین گلوکوزینولات شناخته‌شده در کلم براکلی، گلوکورافانین می‌باشد. بر اثر تخریب بافت (چیده شدن، جویده شدن، یخ زدن و ...) گلوکورافانین رها شده و فوراً به سولفورافان (ایزوتیوسیانات) تبدیل می‌شود. اثر بازدارندگی سولفورافان بر رشد سلول‌های زیان‌آور در انواع سرطان از طریق کاهش یا جلوگیری از آسیب رسیدن به DNA و از طریق تنظیم رشد و مرگ سلول‌ها به اثبات رسیده است. افزایش تولید گلوکورافانین در گیاه و در نتیجه آن، افزایش محتوای این مواد در گرم ماده تازه هدفی است که تحقیقات زیادی در مورد آن در حال انجام است (17، 19، 21، 31، 33 و 39). از جمله سازوکارهای موفق به کار گرفته شده برای افزایش گلوکورافانین، استفاده از تنش شوری می‌باشد (39). این تنش باعث القای سنتز گلوکوزینولات‌ها در سیستم دفاعی گیاه می‌گردد. این شوری می‌تواند به‌صورت تیمار در بستر کشت بذر و یا مهم‌تر از آن کشت بذر در مناطقی با خاک یا آب شور باشد. یوان و همکاران (39) اثر سطوح مختلف شوری را بر گلوکوزینولات‌ها و مواد فنولی در جوانه‌های تربچه بررسی کردند و افزایش شوری را به‌عنوان

1، 2 و 4- دانشجوی دکتری و استادان گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
3- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه مرکزی کشور
(*- نویسنده مسئول: (Email: mbabalar@ut.ac.ir

5- Health-promoting compound
6- Glucosinolates
7- Sprout
8- Functional foods

القاگر سنتز گلوکوزینولات‌ها و عامل مؤثری در افزایش کیفیت غذایی گیاه معرفی نمودند، اما درصد جوانه‌زنی بذرها کاهش پیدا کرد. در واقع تأثیر شوری در فیزیولوژی گیاه بسیار پیچیده است و حتی اگر با هدف و در راستای افزایش ارزش غذایی به کار برده شود، تأثیر مخرب همیشگی خود یعنی کاهش جوانه‌زنی و کاهش رشد را در پی خواهد داشت. این اثر تخریبی از طریق کاهش پتانسیل اسمزی خاک و در نتیجه آن تنش خشکی در پی شوری ایجاد می گردد؛ هم‌چنین تعادل جذب عناصر در این حالت تغییر می‌کند و بیش‌بود سدیم و کلر و کمبود سایر عناصر باعث مسمومیت گیاه می‌گردد. در نتیجه درون سلول‌ها آب کافی برای تورژسانس وجود ندارد و تقسیم سلولی و بزرگ‌شدن سلول‌ها دچار مشکل می‌شود (12 و 35). در این شرایط و برای مقابله با صدمات اکسیداتیو تنش شوری، گیاه سیستم‌های مختلف تولید مواد آنتی‌اکسیدان را فعال می‌کند (31). از جمله موادی که در این حالت فعال می‌شود اسیدسالیسیلیک[1] است (34 و 38). اسید سالیسیلیک یا هیدروکسی بنزوئیک اسید یک ترکیب فنولی و فایتوهورمون است. این ماده در رشد و نمو گیاه، فتوسنتز، تنفس، جذب یون‌ها و حرکت آن‌ها درون گیاه اثر دارد (13). هم‌چنین این مولکول در مسیر علائم‌دهی که منتهی به فعال‌شدن سیستم دفاعی سیستمیک[2] می‌شود، بسیار مهم است (20 و 36) به‌همین دلیل اسید سالیسیلیک می‌تواند باعث مقاومت گیاه در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده از جمله شوری گردد. باتوجه به این‌که تحقیقات انجام شده اکثراً در مورد گلوکورافانین بوده و تبدیل آن به ماده سولفورافان کم‌تر مورد توجه قرار گرفته، این تحقیق با هدف بررسی جوانه‌زنی و رشد بذرهای براکلی در سطوح بالای شوری همراه با اسید سالیسیلیک و هم‌چنین تأثیر این تیمارها در تولید آنتی‌اکسیدان‌های سولفورافان و ویتامین ث انجام گرفته‌است.

مواد و روش‌ها

کشت بذر: بذرهای کلم براکلی (*B. oleracea.* cv. liberty var. Italica) در هیپوکلرید سدیم 20 درصد خیس گردید و بعد از رسیدن به pH طبیعی، یک شب در آب خالص و دیونیزه شده قرار داده شدند (11). سپس هر 60 عدد در پتری دیش‌های جداگانه قرار گرفتند. تیمارهای مورد بررسی شامل شوری و اسید سالیسیلیک بود که در 3 تکرار انجام گرفت. تیمار شوری با کلرید سدیم (Merck) در 5 سطح 0، 4/53، 9/125، 13/68، 18/25 دسی‌زیمنس بر متر (0، 50، 100، 150، 200 میلی‌مولار) اعمال گردید و در ترکیب با اسید سالیسیلیک (Riedel-deHean, sigma aldrich) 0، 100و200 میکرومولار استفاده شد. بذرها در شرایط کنترل شده شامل 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی با دمای 25 درجه روزانه و 20 درجه شبانه قرار داده شدند (28). شمارش بذرهای دارای کوتیلدون به صورت تجمعی سه بار در روز انجام شد. زمان برداشت جوانه‌ها طول 2 سانتی‌متر در نظر گرفته شد که به فاکتورهای کیفی آن مثل شکل، اندازه و بلوغ (ساقه باریک، سفید، مستقیم و برگ‌ها قلبی‌شکل ، قطر ساقه تقریباً 1میلی‌متر و طول کم‌تر از 50 میلی‌متر) بر می‌گردد. زمان رسیدن به طول 2 سانتی‌متر فاکتور دیگری بود که در تیمارها مورد بررسی قرار گرفت.

اندازه‌گیری سولفورافان: برای اندازه‌گیری سولفورافان، 100 میلی‌گرم نمونه فریزدرایر شده (ChRist, Germany) با 4 میلی‌لیتر آب اسیدی با pH= 3/5 (تنظیم شده با اسید کلریدریک) 2/5 ساعت در بن‌ماری (Polyscience, USA) 45 درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس 20 میلی‌لیتر دی‌کلرومتان به نمونه‌ها اضافه شده و 15 میلی‌لیتر از کارتریج سیلیسی (Finisterre, UK) عبور داده شد. سولفورافان خالص به‌دست آمده برای تزریق به دستگاه HPLC (Syknm, Germany) در استونیتریل حل شد. برای اندازه‌گیری سولفورافان از گارد و ستون C_{18} (Alltheck, 4.0mm×250mm, 0.5µm) استفاده شد. سرعت جریان محلول درون ستون0/6 میلی‌لیتر بر دقیقه و فاز متحرک ترکیب استونیتریل (Lichrosolv, Merck,Germany) و آب خالص (Millipore,Direct-Q,France) در نظر گرفته شد. پیک سولفورافان در طول موج 202 nm بعد از 15 دقیقه مشاهده شد. سپس سطح زیر موج محاسبه شده و با استفاده از منحنی استاندارد به‌دست آمده از استاندارد سولفورافان (Sigma Aldrich) غلظت‌ها محاسبه گردید (6).

اندازه‌گیری ویتامین ث: برای ارزیابی میزان ویتامین ث از روش کروز و همکاران (8) و پرز و همکاران (29) استفاده شد. در این روش مجموع اسید اسکوربیک و دی هیدرو اسکوربیک اسید (پس از تبدیل به DFQ[3]) محاسبه می‌گردد. ستون مورد استفاده C18 (Eurospher, Eurospher, 250 × 4mm) در نظر گرفته شد. فاز متحرک شامل 13/61 گرم پتاسیم دهیدروژناز (Merk) و 3/64g ستریماید[4](Fluka)، اضافه شده به متانول و آب بود. سرعت عبور محلول $0/9\ min^{-1}$ و طول موج مورد استفاده برای DFQ، 348 nm و برای اسید اسکوربیک 261nm در نظر گرفته شد. از مجموع سطح زیر دو پیک DFQ و AA[5] میزان کل اسید اسکوربیک با استفاده از منحنی‌های استاندارد به‌دست آمد (8، 29).

تجزیه آماری: برای توضیح جوانه‌زنی بذرها، از مدل رگرسیون لجستیک استفاده شد. در این مدل پارامترهای درصد جوانه‌زنی و

1- Salicylic acid
2- Systemic acquired resistance (SAR)

3- (1,2-dihydroxyethyl)fure(3,4-b)quinoxaline-1-one
4- Cetrimide (Alkyltrimethylammonium bromide)
5- Ascorbic acid

سرعت جوانه‌زنی، تحت تیمارهای انجام شده تخمین‌زده می‌شود؛ که سرعت شامل دو فاکتور مقدار افزایش و زمان لگ[1] می‌شود. مدل به‌صورت زیر نمایش داده می‌شود.

$$y= M[1+ \exp [K (t -L)]]^{-1}$$

در مدل y درصد جوانه‌زنی تجمعی در زمان t است. M حداکثر درصد جوانه زنی، K سرعت افزایش و L زمان لگ یا زمان رسیدن به 50 درصد فاکتور M می‌باشد. حاصل مدل، نمودارهای غیر خطی می‌باشد که برای رژیم‌های نمکی مختلف در هر تیمار اسید سالیسیلیک به‌دست آمد. برازش داده‌ها با استفاده از مدل غیر خطی و روش حداقل مربعات در نرم ا فزار SAS انجام شد (23). غلظت سولفورافان و ویتامین ث بر حسب میکروگرم بر گرم ماده خشک به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در نرم افزار SAS محاسبه گردید.

نتایج و بحث

جوانه‌زنی: جدول (1) مقادیر به‌دست آمده برای حداکثر درصد جوانه‌زنی (M)، سرعت جوانه‌زنی (K) و زمان رسیدن به 50 درصد فاکتور M (L) و معنی‌داری آن‌ها در سطح $p\leq0/05$ را نشان می‌دهد، هر تیمار درون جدول (1) در سطح 95 درصد دارای یک بازه می‌باشد که اگر با بازه به‌دست آمده از تیمار دیگری دارای همپوشانی باشد، این دو تیمار تفاوت معنی‌دار ندارند. این موضوع در شکل 1 نیز نشان داده شده است.

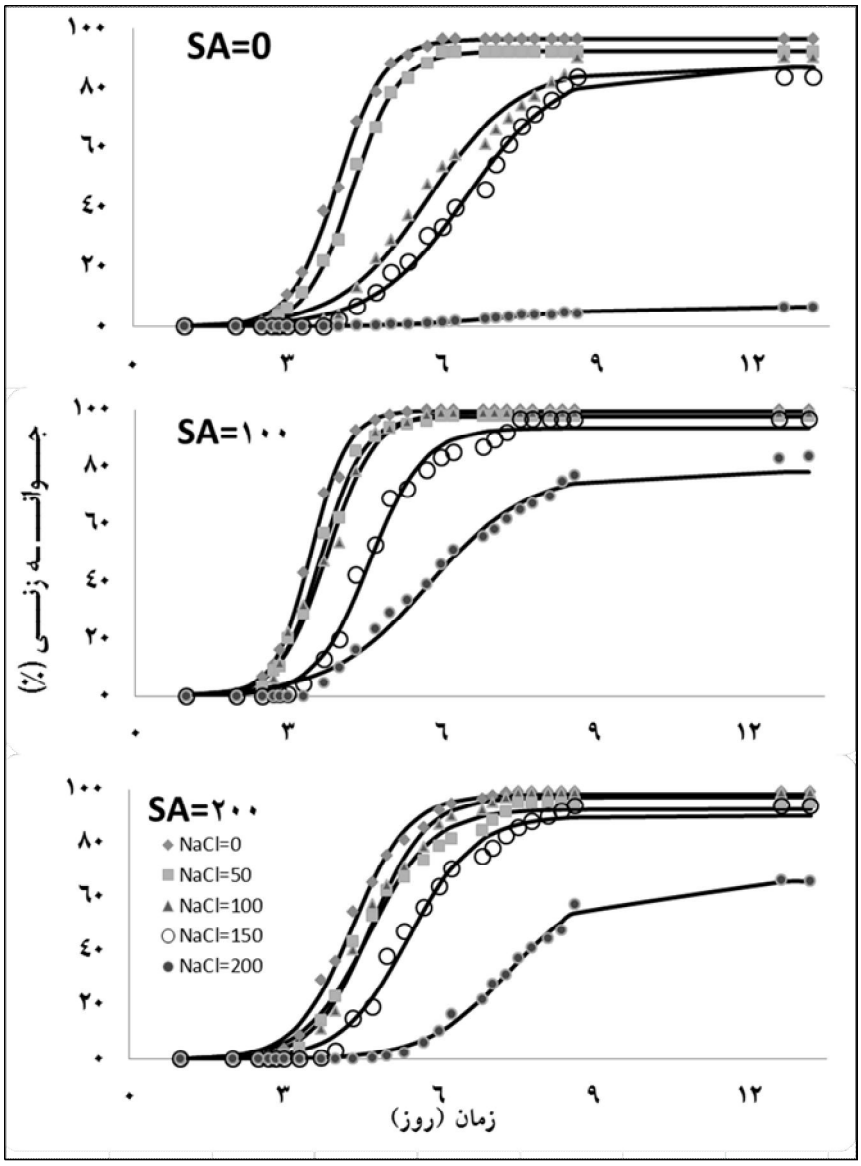
در توضیح اثر متقابل تیمار کلرید سدیم و اسید سالیسیلیک باتوجه به جدول 1 و هم‌پوشانی بازه‌ها، می‌توان مشاهده نمود که در اسید سالیسیلیک صفر میکرومولار (بدون استفاده از اسیدسالیسیلیک)، حداکثر جوانه‌زنی، در سطوح مختلف نمک کاهش معنی‌دار داشته است (شکل 1 و شکل 1). در عدم حضور نمک میزان جوانه‌زنی طبیعی بذر 96/987درصد می‌باشد، با افزایش میزان نمک، جوانه‌زنی به 92/792، 88/5، 86/376، و 6/238 رسید. در واقع با افزایش نمک از صفر به 50 میلی‌مولار اولین تغییر معنی‌دار ایجاد شده، تیمارهای 100 و 150 میلی‌مولار اگرچه نسبت به صفر میلی‌مولار کاهش معنی‌دار دارند ولی به هم‌دیگر بسیار نزدیک هستند. در کلریدسدیم 200 میلی‌مولار درصد جوانه‌زنی به‌شدت کاسته شده و از تیمارهای دیگر فاصله بسیار گرفته‌است (شکل 1). به‌همین ترتیب سرعت جوانه‌زنی (K) در تیمار 50 میلی‌مولار بسیار به صفر میلی‌مولار کلرید سدیم نزدیک است . تیمارهای 100 و 150 میلی‌مولار تفاوت معنی‌دار ندارند و نسبت به 0 و 50 میلی‌مولار کاهش معنی‌دار نشان می‌دهند و تیمار اسید سالیسیلیک صفر و کلریدسدیم200 میلی‌مولار به‌طور معنی‌دار از تیمارهای اسیدسالیسیلیک صفر و کلریدسدیم0، 50، 100، 150، سرعت کم‌تری دارد و به‌نظر می‌رسد در این سطح از نمک آستانه تحمل بذر به کلی از بین رفته است. فاکتور (L) نیز دارای تفاوت معنی‌دار در بین 5 تیمار ذکر شده می‌باشد که نشان می‌دهد افزایش نمک در محیط رشد باعث کم‌ترشدن درصد جوانه‌زنی و طولانی‌شدن زمان جوانه‌زنی می‌گردد.

دسته دوم تیمارها شامل 5 سطح تیمار نمکی ذکر شده می‌باشد که با اسید سالیسیلیک 100 میکرومولار استفاده شده‌بودند. طبق جدول 1 و شکل 1، تیمارهای 0، 50 و 100 میلی‌مولار نمک و 100 میکرومولار اسید سالیسیلیک از لحاظ حداکثر جوانه‌زنی تفاوت معنی‌دار ندارند. اما در میزان 200 میکرومولار نمک میزان درصد جوانه‌زنی 80/499 می‌باشد و هم‌چنان کاهش معنی‌داری نسبت به تیماری دیگر وجود دارد، اما نکته مهم و قابل توجه افزایش حداکثر جوانه‌زنی در همراهی 100 میکرومولار اسید سالیسیلیک با تیمارهای مختلف نمکی نسبت به تیمارهای فاقد اسید سالیسیلیک می‌باشد. مثلاً در تیمار 200 میکرومولار نمک، جوانه‌زنی از 6/238 درصد در سالیسیلیک صفر به 80/499 درصد در سالیسیلیک 100 میکرو مولار ارتقا پیدا کرد. این افزایش معنی‌دار برای همه تیمارهای نمکی به غیر از کلرید سدیم صفر صدق می‌کند. همین روند در مورد سرعت جوانه‌زنی و زمان رسیدن به 50 درصد حداکثر جوانه‌زنی وجود دارد و در همراهی اسید سالیسیلیک 100میکرو مولار، جوانه‌زنی در سطح بالاتر و در زمان کوتاه‌تری اتفاق افتاد. دسته سوم تیمارها شامل 5 سطح کلریدسدیم به‌همراه 200 میکرومولار اسید سالیسیلیک می‌باشند. طبق جدول 1و شکل 1، حداکثر جوانه‌زنی در تیمارهای 50 و 100 میلی‌مولار نمک همراه با 200 میکرومولار اسید سالیسیلیک درحالی‌که با هم تفاوت معنی‌دار ندارند، نسبت به صفر میلی‌مولار نمک کاهش معنی‌دار داشته‌اند، هم‌چنین تیمارهای 150 و 200 میلی مولار نمک روند کاهشی معنی‌داری را نشان می‌دهند. در کل، همراهی 200 میکرومولار اسید سالیسیلیک با تیمارهای نمکی نسبت به 100 میکرومولار اسید سالیسیلیک باعث کاهش معنی‌دار حداکثر جوانه‌زنی شد. وجود 200 میکرومولار اسید سالیسیلیک در بستر کشت نسبت به عدم وجود اسید سالیسیلیک باعث افزایش معنی‌دار جوانه‌زنی در اکثر تیمارهای نمکی به‌خصوص تیمار 200 میلی‌مولار نمک شده است، اما این تیمار نسبت به 100 میکرومولار اسید سالیسیلیک در تیمارهای نمکی مختلف کاهش معنی‌داری را در جوانه‌زنی نشان داد. بنابراین طبق برازش انجام شده بهترین تیمار اسیدسالیسیلیک به همراه سطوح مختلف نمک به کار برده شده در این آزمایش، 100 میکرومولار می‌باشد به‌طوری‌که با افزایش تنش شوری در محیط جوانه‌زنی، این تیمار باعث حفظ جوانه‌زنی شد. زمان رسیدن به 50 درصد حداکثر جوانه‌زنی در تیمار100 میکرومولار اسید سالیسیلیک بین 3/4 تا 5/8 روز با افزایش تنش تغییر کرد؛ این درحالی است که در تیمارهای دیگر بین 4 تا 7 روز تغییر نموده‌است.

1- Lag time

جدول ۱- مقادیر تخمین زده شده برای پارامترهای مدل لجستیک برازش شده بر داده‌های جوانه‌زنی تحت تاثیر تیمارهای مختلف شوری به همراه غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک و معنی‌داری آنها در سطح ۵٪. (M) حداکثر درصد جوانه‌زنی، (K) سرعت جوانه‌زنی و (L) زمان رسیدن به ۵۰٪ فاکتور M

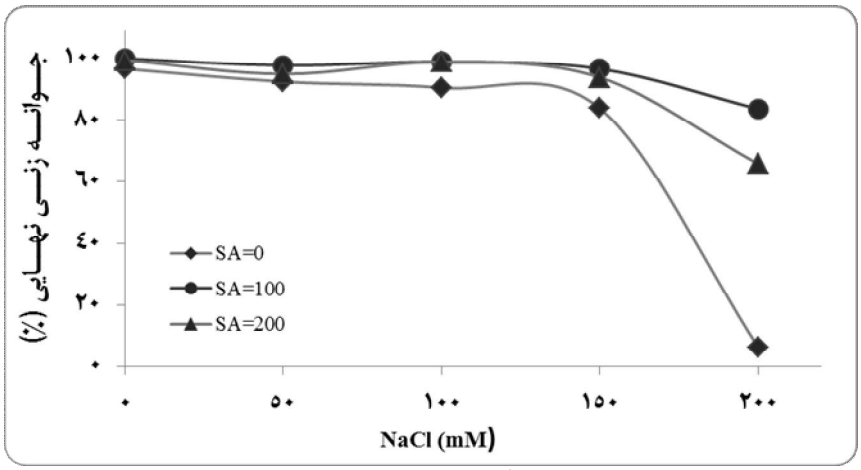
NaCl (میلی‌مولار)	پارامتر	میکرومولار SA=۰				میکرومولار SA=۱۰۰				میکرومولار SA=۲۰۰			
		تخمین	خطای استاندارد	محدوده اطمینان ۹۵ درصد	R2	تخمین	خطای استاندارد	محدوده اطمینان ۹۵ درصد	R2	تخمین	خطای استاندارد	محدوده اطمینان ۹۵ درصد	R2
۰	M	۹۶/۹۸	۰/۸۳	۹۵/۳۵		۹۹/۹۱	۰/۷۶	۹۸/۴۲		۹۸/۲۹	۰/۹۱	۹۶/۵۱	
	K	۲/۲۲	۰/۱۳	۱/۹۷	۰/۹۹	۲/۷۳	۰/۱۵	۲/۴۳	۰/۹۹	۱/۸۲	۰/۰۹	۱/۶۳	۰/۹۹
	L	۳/۹۶	۰/۰۳	۳/۸۹		۳/۴۳	۰/۰۳	۳/۳۸		۴/۳۰	۰/۰۳	۴/۲۴	
۵۰	M	۹۲/۸۰	۰/۸۶	۹۱/۱۰		۹۷/۶۲	۰/۷۹	۹۶/۰۷		۹۳/۰۲	۱/۰۱	۹۱/۰۵	
	K	۲/۲۳	۰/۱۴	۱/۹۶	۰/۹۹	۲/۴۱	۰/۱۳	۲/۱۴	۰/۹۹	۱/۵۸	۰/۰۹	۱/۴۱	۰/۹۹
	L	۴/۲۴	۰/۰۳	۴/۱۷		۳/۶۳	۰/۰۳	۳/۵۷		۴/۶۳	۰/۰۴	۴/۵۵	
۱۰۰	M	۸۸/۵۰	۱/۶۰	۸۵/۳۵		۹۹/۰۷	۰/۸۱	۹۷/۴۷		۹۷/۲۷	۰/۹۶	۹۵/۳۹	
	K	۱/۱۱	۰/۰۶	۰/۹۹	۰/۹۸	۲/۱۴	۰/۱۱	۱/۹۲	۰/۹۹	۱/۸۲	۰/۱۰	۱/۶۳	۰/۹۹
	L	۵/۷۷	۰/۰۶	۵/۶۴		۳/۷۴	۰/۰۳	۳/۶۸		۴/۶۵	۰/۰۴	۴/۵۹	
۱۵۰	M	۸۶/۳۷	۱/۸۴	۸۲/۷۷		۹۴/۱۸	۰/۹۵	۹۲/۳۳		۹۱/۰۹	۱/۲۳	۸۸/۶۷	
	K	۱/۱۲	۰/۰۶	۱/۰۰	۰/۹۹	۱/۸۴	۰/۱۰	۱/۶۴	۰/۹۹	۱/۵۰	۰/۰۹	۱/۳۳	۰/۹۹
	L	۶/۴۲	۰/۰۷	۶/۲۸		۴/۵۸	۰/۰۴	۴/۵۱		۵/۴۲	۰/۰۸	۵/۳۳	
۲۰۰	M	۶/۲۴	۲/۱۰	۲/۱۱		۸۰/۴۹	۱/۷۳	۷۷/۱۰		۶۷/۱۹	۲/۰۶	۶۳/۱۵	
	K	۰/۹۱	۰/۶۸	-۰/۴۲	۰/۹۹	۰/۹۷	۰/۰۶	۰/۸۶	۰/۹۹	۱/۲۰	۰/۰۹	۱/۰۲	۰/۹۹
	L	۷/۰۲	۱/۱۴	۸/۷۸		۵/۸۲	۰/۰۳	۵/۶۶		۷/۳۹	۰/۰۸	۷/۲۳	



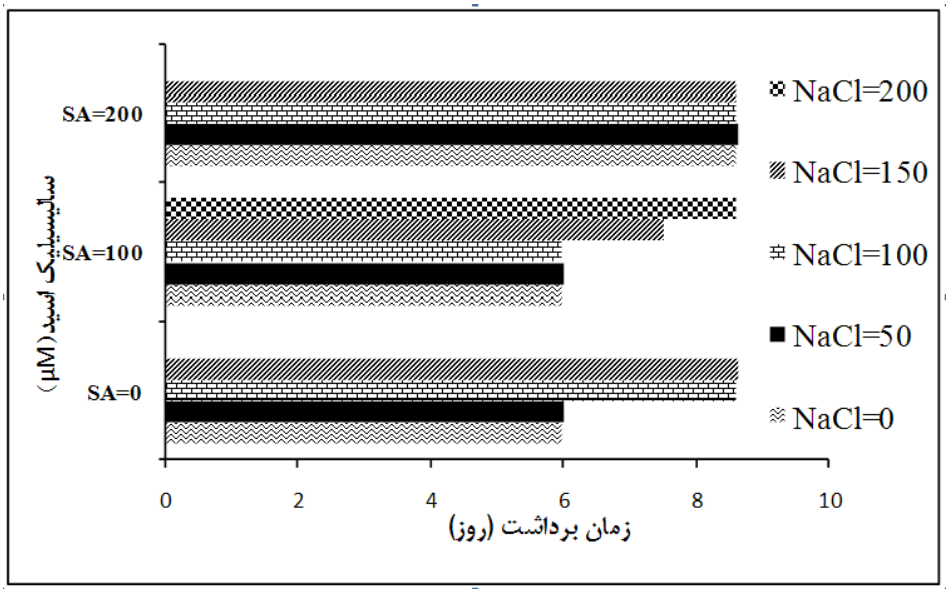
شکل 1- اثر متقابل سطوح مختلف کلریدسدیم با اسیدسالیسیلیک در جوانه زنی

هم‌چنین بیش‌ترین شاخص سرعت جوانه‌زنی در تیمارهای مختلف نمکی مربوط به تیمار 100میکرومولار اسید سالیسیلیک می‌باشد (جدول1).

شکل 2 جوانه‌زنی نهایی بذرها را در هر سطح تنش شوری تحت تأثیر سطوح مختلف اسیدسالیسیلیک نشان می‌دهد و مشخص می‌کند کاربرد اسیدسالیسیلیک باعث کاهش تأثیر تنش شوری می‌شود؛ اما زیادبودن غلظت اسیدسالیسیلیک ممکن است تنش ضعیفی را در گیاه ایجاد کند که همراه با سطوح بالای نمک (150 میلی‌مولار و بیش‌تر) از حداکثر جوانه‌زنی بذرهای براکلی می‌کاهد. سطح 100میکرومولار اسیدسالیسیلیک بهترین تأثیر را در سطوح نمکی این تحقیق داشته است شکل 3 زمان برداشت را طبق فاکتورهای کیفی نشان می‌دهد. بدون استفاده از اسیدسالیسیلیک (SA=0) و بدون تنش شوری (NaCl=0)، بذرها 6 روز پس از برداشت طولی معادل 2 سانتی‌متر داشتند و به کیفیت برداشت رسیدند. همین زمان در کلریدسدیم 50 میلی‌مولار بدون استفاده از اسیدسالیسیلیک وجود دارد، اما در سطوح بالاتر نمک این زمان به حدود 9 روز رسیده‌است. با افزودن اسیدسالیسیلیک 100 میکرومولار به بستر کشت حداقل زمان برداشت (6 روز) در تیمارهای 0، 50 و 100 میلی‌مولار نمک وجود دارد، اما در تیمار 100 میلی‌مولار نمک زمان طولانی‌تر شده و به حدود 8 روز می‌رسد و تیمار 200 میکرومولار نمک که تنها در حضور اسیدسالیسیلیک 100 میکرومولار رشد داشته، پس از 9 روز به کیفیت برداشت رسیده است. تیمار 200 میکرومولار اسید سالیسیلیک به‌طورکلی باعث طولانی‌ترشدن زمان برداشت شده و تیمارهایی که رشد داشتند پس از 9 روز برداشت شدند.



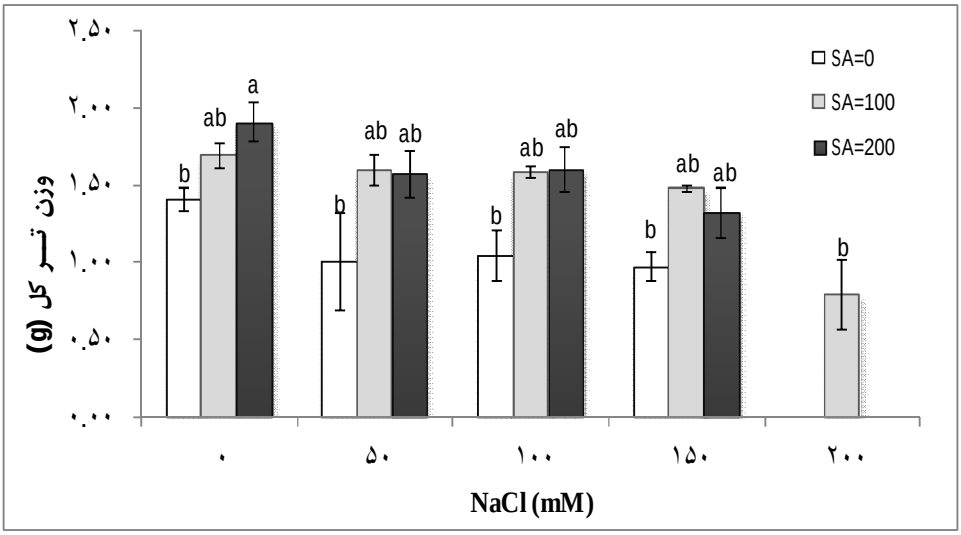
شکل 2- حداکثر جوانه زنی بذرها تحت تأثیر تیمارهای شوری (NaCl) و اسید سالیسیلیک (SA)



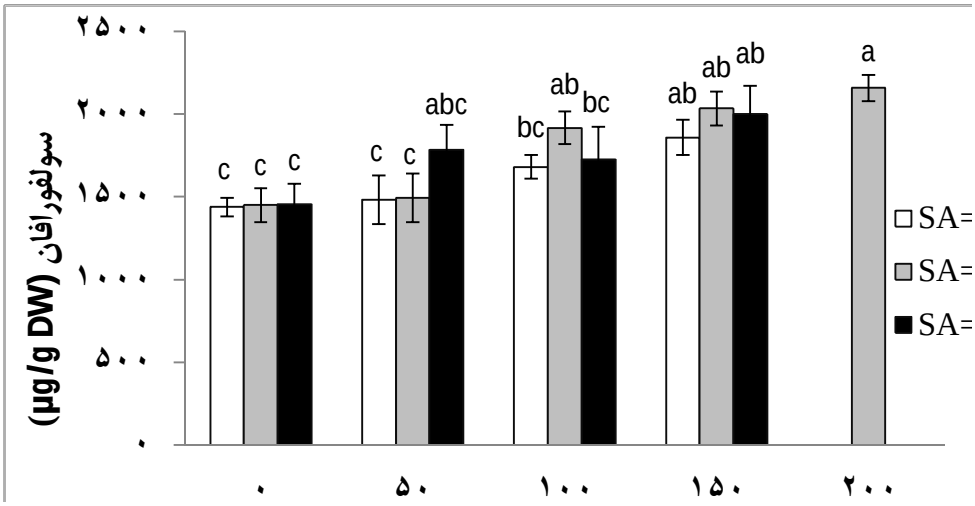
شکل 3- زمان برداشت تحت تأثیر اثر متقابل تیمارهای شوری(NaCl) و اسید سالیسیلیک (SA)

هم‌چنین در 100 میکرومولار اسید سالیسیلیک وزن تر جوانه‌ها (وزن تر کل به تعداد جوانه‌ها) تحت تیمارهای مختلف نمکی حفظ می‌شود و بالاتر از غلظت 150 میلی‌مولار نمک که جوانه‌ها رشدی ندارند، 100 میکرومولار اسید سالیسیلیک توانسته است رشد را با وزن تر پایین‌تری حفظ کند (شکل 4).

سولفورافان: تغییر غلظت سولفورافان تولیدی توسط جوانه‌های رشدیافته تحت تیمارهای شوری و اسید سالیسیلیک در شکل 5 دیده می‌شود. بدون استفاده از نمک، استفاده از اسیدسالیسیلیک تأثیری در تولید سولفورافان نداشته است. طبق تحقیقات پرز و همکاران (28) استفاده از اسید سالیسیلیک در تولید گلوکورافانین (پیش ماده سولفورافان) تأثیر ندارد، بنابراین می‌توان عدم تغییر در میزان سولفورافان در حضور اسید سالیسیلیک را به ثابت بودن پیش ماده ارتباط داد. زمانی‌که تنش شروع می‌شود؛ میزان سولفورافان تغییر می‌کند و تأثیر اسید سالیسیلیک مشهودتر می‌شود. در همه تیمارهای نمکی کم‌ترین مقدار سولفورافان مربوط به زمانی است که اسید سالیسیلیک استفاده نشده و از لحاظ عددی استفاده از اسید سالیسیلیک باعث بالا رفتن میزان سولفورافان شده است؛ اگرچه در بعضی موارد از لحاظ آماری معنی‌دار نیست. به‌نظر می‌رسد منطبق با نتایجی که در جوانه‌زنی بیان شد، هر زمان اسیدسالیسیلیک بیش‌تر تنش ناشی از نمک را کنترل کرده است، میزان حفظ و ماندگاری سولفورافان بیش‌تر بوده و یا مسیر تولید آن از طریق فعالیت مناسب آنزیم‌ها فعال‌تر بوده‌است و باعث شده تحت تنش تفاوت آماری در استفاده از اسید سالیسیلیک نسبت به محیط‌های فاقد اسید سالیسیلیک ایجاد گردد.



شکل 4- وزن تر جوانه‌ها تحت تأثیر اثر متقابل تیمارهای شوری (NaCl) و اسیدسالیسیلیک (SA)



شکل 5- غلظت سولفورافان تحت تأثیر تیمارهای شوری (NaCl) و اسیدسالیسیلیک (SA)

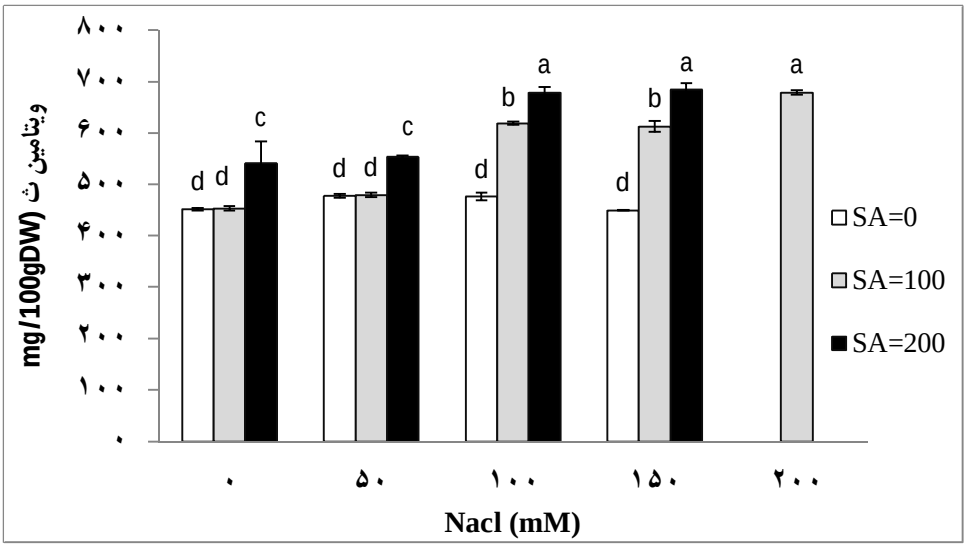
در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در سطح 5 درصد دارای تفاوت معنی‌داری نمی‌باشند.

غلظت سولفورافان در حضور 100 و 200 میکرومولار اسید سالیسیلیک همراه با غلظت‌های 100، 150، 200 نمک تفاوت آماری نشان نداد. در نتیجه تیمار 100 میکرو مولار اسید سالیسیلیک و 100 میلی‌مولار کلرید سدیم بهترین شاخص‌های رشد و بهترین غلظت سولفورافان را ایجاد کرده است، و تیمار قابل توصیه برای کشت جوانه‌های براکلی می‌باشد.

ویتامین ث:

طبق شکل 6 اسید سالیسیلیک تأثیر معنی‌دار بر میزان ویتامین ث دارد، تأثیر اسید سالیسیلیک به‌طور غیر مستقیم و از طریق افزایش کربوهیدرات‌هایی مانند گلوکز و ساکارز می‌باشد. این قندها فاکتورهای کلیدی مسیر آنزیمی هستند که در طی آن گلوکز به اسکوربات تبدیل می‌شود (17 و 22).

پرز و همکاران (28) در تحقیق خود به این نکته اشاره کرده‌اند که ویتامین ث تحت تأثیر اسید سالیسیلیک 200 میکرومولار افزایش می‌یابد ولی غلظت‌های پایین‌تر بی‌تأثیر هستند. در آزمایش ما، نه تنها اسید سالیسیلیک 200 میکرومولار بلکه اسید سالیسیلیک 100 میکرومولار نیز در تأثیر متقابل با رژیم‌های نمکی این افزایش را نشان داد. نتیجه مهمی که می‌توان به آن اشاره نمود، افزایش همزمان سولفورافان و ویتامین ث است.



شکل 6- غلظت ویتامین ث تحت تأثیر تیمارهای شوری (NaCl) و اسید سالیسیلیک (SA)

در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در سطح 5 درصد دارای اختلاف معنی‌داری نمی‌باشند.

همان‌طور که توضیح داده شد اسید سالیسیلیک 100میکرومولار همراه تنش شوری باعث افزایش سولفورافان می‌شود. در شکل 6 دیده می‌شود که تولید ویتامین ث در اسید سالیسیلیک 100 میکرومولار و سطوح مختلف شوری با میزان تولید شده در 200 میکرومولار اسید سالیسیلیک تفاوت معنی‌دار نداشته است. به‌نظر می‌رسد این تأثیر به دلیل فعال‌شدن فرآیندهایی باشد که تحت تأثیر آنزیم‌های متفاوتی قرار دارند. تحقیقات نشان دادند که سولفورافان در بیان ژن‌هایی مانند KEAP1[1] , NRF2[2] , AER[3] مؤثر است (15، 16، 35). این آنزیم‌ها در سم‌زدایی فاز دوم سرطان نقش مهمی دارند (37). هم‌چنین قادر به جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد اکسیژن در مسیرهای مختلف و حفظ فعالیت آنتی‌اکسیدانی ویتامین‌ها از جمله ویتامین ث می‌باشند (2). زمانی‌که ویتامین ث به‌طور مستقیم فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد با از دست دادن یک الکترون به فرم فعال سمی دهیدروکسی اسکوربات (SDA)[4] تبدیل می‌شود؛ که می‌تواند دهیدرو آسکوربات (DHA) [5] را به‌وجود آورد. هر دوی SDA و DHA می‌توانند دوباره به آسکوربات و ویتامین ث تبدیل شوند (5). هم‌چنین گلوتاتیون و آسکوربات در سلول وابستگی نزدیکی به هم دارند. سولفورافان در تولید گلوتاتیون نقش مستقیم دارد و می‌تواند از این راه در میزان اسید اسکوربیک مؤثر باشد و هم‌چنین از طریق القای تولید تیوردوکسین ردوکتاز (TXNRD)[6] و گلوتاتیون ترنسفراز (GST)[7] نقش غیر مستقیم در تولید و فعالیت SDA و DHA و تبدیل آن‌ها به اسکوربات دارد (27). بنابراین تولید سولفورافان و ویتامین ث وابستگی مستقیم با هم دارند.

نتیجه‌گیری کلی

هورمون گیاهی[8] اسید سالیسیلسک، نقش مهمی در تنظیم رشد و نمو گیاه دارد و مکانیسم دفاعی گیاه در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده را ایجاد می‌کند (34 و 38). این مکانیسم از طریق فعال‌سازی مسیرهای بیوشیمیایی متفاوتی امکان‌پذیر می‌شود، مثلاً بازدارندگی کاتالاز، جمع‌آوری H_2O_2 (14)، جذب مواد غذایی، عملکرد غشا، تعادل آب و فعالیت روزنه‌ها. تعادلی که بین شرایط اسمزی گیاه و مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی آن به‌وجود می‌آید باعث مقاومت در برابر شرایط شوری و افزایش رشد می‌گردد (9). در این تحقیق بذرهای کلم براکلی بهترین رشد و کوتاه‌ترین زمان رسیدن به کیفیت لازم برای برداشت را در 100 میکرومولار اسید سالیسیلیک تحت تیمارهای متفاوت شوری نشان دادند. بذرها با این تیمار توانستند در غلظت (200 میلی‌مولار) کربنات سدیم جوانه‌زده و رشد کنند.

1- Kelch-like ECH associated protein 1
2- Nuclear factor (erythroid-derived2)-like 2
3- Antioxidant response element
4- Semidehydroasccorbate
5- Ddehydroascorbate;

6- Thioredoxin reductase.
7- Glutathione S-transferase
8- Phytohormon

درحالی‌که بدون استفاده از اسید سالیسیلیک جوانه‌زنی و رشد در این غلظت وجود نداشت، زمانی‌که شوری وجود نداشت، اسید سالیسیلیک تأثیری در رشد و جوانه‌زنی نداشت. غلظت بالاتر اسید سالیسیلیک یعنی 200 میکرومولار اگرچه وضعیت بهتری نسبت به تیمار بدون اسید سالیسیلیک برای بذرها ایجاد نمود؛ همواره در سطحی پایین‌تر از 100 میکرومولار قرار گرفت. آنتی‌اکسیدان‌های سولفورافان و ویتامین ث در تیمارهای 100، 150 و 200 کلریدسدیم و در اثر متقابل با اسید سالیسیلیک افزایش معنی‌دار نسبت به تیمار 0و 50 میلی‌مولار نمک با اسید سالیسیلیک و یا بدون استفاده از اسید سالیسیلیک داشتند. طبق تحقیقات انجام شده تنش مناسب القا کننده تولید گلوکورافانین است (17، 19، 21، 30). اما طبق تحقیق یوان و همکاران (39) شوری بر آنزیم میروسیناز[1] که تبدیل‌کننده گلوکورافانین به سولفورافان می‌باشد نیز موثر است و زمانی‌که تنش زیاد می‌شود، باعث کاهش فعالیت این آنزیم می‌گردد. تولید سولفورافان بالا در بیش‌ترین غلظت نمک (میلی‌مولار200) تحت تیمار 100 میکرومولار می‌تواند به دلیل از بین رفتن تأثیر تنش زیاد بر آنزیم میروسیناز و تبدیل کامل مولکول‌های گلوکورافانین به سولفورافان تحت تیمار شوری اعمال شده باشد. طبق نتایج این آزمایش میزان آنتی‌اکسیدان‌ها در حضور اسید سالیسیلیک 100 و 200 میکرو مولار و نمک 100 ، 150 و 200 میلی‌مولار تفاوت آماری ندارند. بنابراین با انطباق نتایج حداکثر تولید ترکیبات فراسودمندی مانند سولفورافان و ویتامین ث با بهترین شرایط رشد، استفاده از غلظت 100 میکرومولار اسید سالیسیلیک به‌همراه 100 میلی مولار کلریدسدیم می‌تواند راهکار قابل توصیه برای رشد جوانه‌های کلم براکلی باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان از دانشگاه تهران که این تحقیق در قالب طرح پژوهشی شماره 7103002/6/25 با استفاده از اعتبارات آن انجام شده و هم‌چنین از بخش متابولیت‌های ثانویه پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه مرکزی کشور کمال تشکر را دارند.

منابع

1-Alzamora S., Salvatori D., and Tapia M. 2005. Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds. Journal of Food Engineering, 67: 205-214.

2-Boddupalli S., Mein R. J., Lakkanna Sh., and Don R. J. 2012. Induction of Phase 2 Antioxidant Enzymes by Broccoli Sulforaphane: Perspectives in Maintaining the Antioxidant Activity of Vitamins A, C, and E. Journal of frontiers in GENETICS.

3-Boivin D., Lamy S., Lord-Dufour S., Jackson J., Beaulieu E., Moghrabi A., Barrette S.P., Gingras D., and Bliveau R. 2009. Antiproliferative and antioxidant activities of common vegetables: A comparative study. Food Chemistry 112: 374-380.

4-Brennan P., Hsu C.C., Moullan N., Szeszenia-Dabrowska N., Lissowska J., Zaridze D., Rudnai P., Fabianova E., Mates D., Bencko V., Foretova L., Janout V., Gemignani F., Hall A. J., Hung R.J., Boffetta P. and Canzian F. 2005. Effect of cruciferous vegetables on lung cancer in patients stratified by genetic status: a mendelian randomisation approach. The Lancet, 366: 1558-1560.

5-Buettner G. R. 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. Arch. Biochem. Biophys, 300, 535–543.

6-Campas O.N. D. I., Sanchez-Machado C. Bueno-Solano B., Ramirez-Wong and Lopez-Cervantes J. 2009: HPLC method validation for measurment of sulforaphane level in broccoli by-products. Biomed. Chromatogr, 24:387-392.

7-Clarke J. D., Dashwood R.H. and Ho E. 2008. Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. Cancer Letters, 269: 291-304.

8-Cruz M.S. R., Vieira C. M., and Silva L. M. C. 2008. Effect of heat and thermosonication treatments on watercress (Nasturtium officinale) vitamin C degradation kinetics. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 9, 483–488.

9-Deef E. H. 2007. Influence of Salicylic Acid on Stress Tolerance During Seed Germination of *Triticum aestivum* and *Hordeum vulgare* . Advances in Biological Research, (1-2): 40-48.

10-Fahey J.W., Zhang Y. and Talalay P. 1997. Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducer of enzymes that protect against chemical carcinogens. proc. Natl. Acad. Sci.USA. 94: 10367-10372.

11-Guo R., Gaofeng Y., and Qiaomei W. 2011. Effect of sucrose and mannitol on the accumulation of health-promoting compounds and the activityu of metabolic enzymes in broccoli sprouts. Scientia Horticulturae, 128: 159-165.

1- Myrosinase

12-Hare P.D., Cress W.A. and Staden J. 1998. Dissecting the role of osmolyte accumulation during stress. Plant Cell Environment, 21: 535-553.
13-Hayat S. and Ahmad A. 2007. Salicylic acid – A Plant Hormone. Springer. ISBN 1-4020-5183-2 .
14-Horvath E., Janda T., Szalai G. and Paldi E. 2002. In vitro salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: differences between the iso-enzymes and a possible role in the induction of chilling tolerance. Plant Science, 163: 1129-1135.
15-Hu R., Hebbar V., Kim B. R., Chen C., Winnik B., Buckley B., Soteropoulos P., Tolias P., Hart R. P. and Kong A. N. 2004. In vivo pharmacokinetics and regulation of gene expression profiles by isothiocyanate sulforaphane in the rat. Jornal Pharmacology Experimental Therapeatics, 310, 263–271.
16-Hu R., Xu C., Shen G., Jain M. R., Khor T. O., Gopalkrishnan A., Lin W., Reddy B., Chan J. Y. and Kong A. N. 2006. Gene expression profiles induced by cancer chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in the liver of C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (-/-) mice. Cancer Letters. 243, 170–192.
17-Jahangir M., Bayoumi Abdel-Farid I., Kim. H., Chio. Y., and Verpoorte R., 2009. Healthy and unhealthy plants: The effect of stress on the metabolism of Brassicaceae. Enviromental and Exprimental Botany, 67: 23-33.
18-Johnston N. 2004. Sulforaphane halts breast cancer cell growth. Drug Discovery Today, 9: 908-908.
19-Kiddle A. G., Doughty. K. J., and Wallsgrove R. M. 1994. Salicylic acid-induced accumulation of glucosinolates in oilseed rape (*Brassica napua* L.) leaves. Jornal of experimental Botany, 54(9): 1343-1349.
20-Leo A. T., and Joyce D. C., 2004. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. Postharvest Biology and Tecnology, 32(1), 1-13.
21-Li Y. C., Kiddle G., Bennett R., Doughty K., and Wallsgrove R. 1999. Variation in the glucosinolate content of vegetative tissues of Chinese lines of *Brassica napus* L. Ann. App. Biology, 134: 131-136.
22-Linster C.L., and Clarke S. G., 2008. L-Ascorbate biosynthesis in higher plants: the role of VTC2. Trends in Plant Science, 13(11), 567-573.
23-Lopez A. O., and . Barney D. L. 2008. Modeling the Effects of Temperature and Gibberellic Acid Concentration on Red Huckleberry Seed Germination. Seed Technology, 43(1):223–228.
24-Lopez-Berenguer C., Martines- Ballesta M., Carcia-Viguera C., and Carvajal M., 2008. Leaf water balance mediated by aquaporins under salt stress and associated glucosinolate synthesis in broccoli. Plant Science, 174(3):321-328.
25-Marschner H., 1995. Mineral nutrition of higher plants. London Academic Press, pp: 889.
26-Martinez-Villaluenga C., Frias J., Gulewicz P., Gulewicz K. and Vidal-Valverde C. 2008. Food safety evaluation of broccoli and radish sprouts. Food and Chemical Toxicology, 46: 1635–1644.
27-May J. M., Cobb C. E., Mendiratta S., Hill K. E., and Burk R. F. 1998. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. J. Biol. Chem. 273, 23039–23045.
28-Perez-Balibrea S., Moreno D.A. and Garcia-Viguera C. 2011. Improving the phytochemical composition of broccoli sprouts by elicitation, Food Chemistry, 35-44.
29-Pérez-Balibrea S., Moreno D.A., and García-Viguera C. 2008. Influence of light on health-promoting phytochemicals of broccoli sprouts. Journal of the Science of Food and Agriculture, 88(5), 904-910.
30-Schreiner M., Krumbeint A., Dietrich K., and Smetanska I. 2011. Enhanced Glucosinolates in root exudates of *Brassica rapa* ssp. rapa mediated by salicylic acid and methyl jasmonate. Food Chemistry, 59 (4): 1400–1405.
31-Silvana B.D., Susana M.G., Maria P.B and. Maria L.T. 2003. Behavior of antioxidant defense system in the adaptive response to salt stress in *Helianthus annuus* L. cells. Plant Growth Regul., 40: 81-88.
32-Sivakumar G., Aliboni A. and Bacchetta L. 2007. HPLC screening of anti-cancer sulforaphane from important European Brassica species. Food Chemistry, 104: 1761-1764.
33-Smetanska I., Krumbein A., Schreiner. M., and Knorr D. 2005. Influence of salicylic acid and methyl jasmonate on glucosinolate levels in turnip. The Journal of Horticultural Science & Biotechnology . 82: 690-694.
34-Szalai G., Tari I., Janda T., Pestenacz. A. and Paldi. E. 2000. Effects of cold acclimation and salicylic acid on changes in ACC and MACC contents in maize during chilling. Plant Biology, 43: 637-640.
35-Thimmulappa R. K., Mai K. H., Srisuma S., Kensler T. W., Yamamoto M. and Biswal S. 2002. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. Cancer Res., 62, 5196–5203.
36-Van Huijsduijnen R.A.M.H., Alblas S. W., De Rijk R. H., and Bol J. F. 1986. Induction by Salicylic Acid of Pathogenesis-related Proteins and Resistance to Alfalfa Mosaic Virus Infection in Various Plant Species. Journal of General Virology, 67 (10): 2135.
37-Xu C., Yuan X., Pan Z., Shen G., Kim J.H., Yu S., Khor T. O., Li W., Ma J. and Kong A. N. 2006. Mechanism of action of isothiocyanates: the induction of ARE-regulated genes is associated with activation of ERK and JNK and the phosphorylation and nuclear translocation of Nrf2.Mol. Cancer Therers, 5: 1918–1926.
38-Yalpani N., Enyedi A.J. Leon. J. and Raskin. I. 1994. Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic

acid and pathogenesis related proteins and virus resistance in tobacco Plant, 193: 373-376.
39-Yuan G., Wang X., Guo R. and Wang Q. 2010. Effect of salt stress on phenolic compounds, glucosinolates, myrosinase and antioxidant activity in radish sprouts. Food Chemistry, 121(4): 1014- 1019.