فصلنامهٔ علمی - پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۲ شمارهٔ ۲ ، صفحهٔ ۱۴۰- ۱۴۵ ، (۱۳۸۵)

کاربرد باندهای مختلف اشعه ماوراء بنفش در بالا بردن میزان برخی از ترکیبهای ثانویه در دو گونه بنگ دانه (*Hyoscyamus*)

*فاطمه نصیبی[۱] و خسرو منوچهری کلانتری[۲]

۱- دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، e-mail: Nasibi2002@yahoo.com

۲- مرکز بین المللی علوم، تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان، e-mail: Kh_kalantari@yahoo.com

چکیده

اشعه ماوراء بنفش قسمتی از طیف خورشیدی است که دارای انرژی بالایی است و بر اساس طول موج به سه طیف A، B و C تقسیم میشود. گیاهان، بیش از سایر موجودات در معرض این اشعه قرار دارند، بدین دلیل گیاهان برای حفاظت از خود، سازوکارهای دفاعی شامل مکانیسم های آنزیمی و غیر آنزیمی در مقابل این اشعه در خود ایجاد می نمایند. از این سازوکار دفاعی می توان در مورد گیاهان دارویی استفاده نمود. در این مطالعه اثر باندهای(UV-B(280-320 و (UV-C(254-280 در افزایش مقدار برخی ترکیبها (فلاوونوئید ها، آنتوسیانین ها و قندهای احیا کننده) در دو گونه گیاه بنگ دانه مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور بذر های این گیاه از محل رویش آنها جمع آوری و در شرایط اتاق کشت با دمای ۱±۲۱ °C و دوره نوری ۱۶/۸ تاریکی/نور کشت داده شد. پس از سه هفته رشد معمول، این گیاهان به مدت ۲ هفته هر روز ۳۰ دقیقه به طور جداگانه تحت تیمارUV-B وUV-C قرار گرفتند. پس از این مدت گیاهان برداشت شده و در نیتروژن مایع منجمد گردیدند. از این نمونه ها برای اندازه گیری مولفه های مورد نظر استفاده گردید. تجزیه و تحلیل فلاوونوئیدها بااستفاده از تکنیک HPLC نشان داد که در هر دو گونه گیاهی میزان فلاوونوئیدها در UV-B و UV-C به مقدار قابل ملاحظه ای افزایش یافته است. غلظت آنتوسیانین ها با استفاده از جذب اسپکتروفتومتری و بکار بردن ضریب خاموشی محاسبه شد. این ترکیبهای نیز در طول موج UV-B وUV-C به ترتیب افزایش ۳۵ و ۵۰ درصدی را نشان دادند. اندازه گیری قند های احیاکننده ریشه و برگ کاهش مقدار قند را در هر دو گونه گیاه نشان داد. این احتمال وجود دارد که چون سنتز ترکیبهای ثانویه افزایش یافته اند میزان این ترکیب اولیه کاهش یافته باشد.

واژه های کلیدی: اشعه ماوراء بنفش، ترکیبهای ثانویه، آنتوسیانین، فلاوونوئید، بنگ دانه

مقدمه

اشعه ماوراء بنفش قسمتی از طیف خورشیدی است که با چشم انسان قابل رویت نیست . این اشعه به دلیل داشتن طول موج کوتاه دارای انرژی بالایی است و بر اساس طول موج به سه طیف A(320-390)، B(280-320) و C(254-280) نانومتر تقسیم می شود (Mackerness, 2000). گیاهان به دلیل احتیاج اجتناب ناپذیرشان به نور برای فتوسنتز، بیش از سایر موجودات در معرض این اشعه قرار دارند. بنابراین در این گیاهان سازوکارهای دفاعی شامل سازوکارهای آنزیمی و غیر آنزیمی در مقابل این اشعه تکامل یافته و این گیاهان را در مقابل این اشعه حفاظت می کند (Hollosy, 2002). مکانیسم های آنزیمی شامل فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز و گلوتاتیون ردوکتاز و غیره است (Foyer *et al.*, 1997; Mittler, 2002; Palner *et al.*, 2002). در حفاظت غیر آنزیمی سنتز ترکیبهایی چون اسید آسکوربیک، کاروتنوییدها، فلاوونوئیدها، آنتوسیانین ها و آلکالوئیدها افزایش می یابد(Middleton & Teramura, 1993 ; Smirnoff & Wheller, 2000; Sharma, 1998). بسیاری از این ترکیبهای ثانویه از جمله فلاوونوییدها،

آنتوسیانین ها و آلکالوئیدها دارای خواص دارویی هستند (Hollosy, 2002).

گزارش شده است که فلاوونوئیدها در گیاهان نقش پر اهمیتی مانند حفاظت در برابر اشعه ماوراء بنفش، دفاع در برابر حمله پاتوژن ها و جذب حشرات گرده افشان را ایفا می کنند و همچنین به عنوان سیگنالی برای شروع همزیستی می‌باشند. در بسیاری از مطالعات نقش آنتی اکسیدانی فلاوونوئید ها نیز گزارش شده است (Yamasaki *et al.*, 1997).

ترکیبهای فلاوونوئیدی نقشی اساسی در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی بدن بازی می کنند و نشان داده شده که برای قلب، رگهای خونی، کبد، سیستم ایمنی، بافت های همبند، غده آدرنالی، کلیه ها، سیستم عصبی و ماهیچه ای از اهمیت خاصی برخوردارند و به میزان زیادی جذب و تاثیر ویتامین C را در جلوگیری از نشت مویرگها افزایش می دهند و به همین دلیل این مواد را ویتامین P نامگذاری کرده اند. ترکیبهای فلاوونوئیدی از تشکیل مواد سمی مانند مالون دآلدئید و استالدئید نیز جلوگیری می نمایند، زیرا تجمع این ترکیبها باعث تخریب پروتئین و DNA می شود (nisbett). خواص ضد التهابی و ضد تشنجی نیز در مورد فلاوونوئید ها به اثبات رسیده است (Nijveldt, 2001). آنتوسیانین ها از دیگر ترکیبهای فنولی بوده که در جذب حشرات و جلوگیری از نفوذ اشعه UV به درون سلول نقشی اساسی بازی می نمایند (nisbett). آنتوسیانین همچنین دارای خواص دارویی بوده، خواص آنتی اکسیدانی، ضد التهاب، حفاظت از رگهای خونی و مویرگها، حفاظت از بافت مغزی و سیستم عصبی، جلوگیری از صدمات ناشی از دیابت و جلوگیری از رشد تومورها در بدن، در آنها به اثبات رسیده است (Sterling, 2000).

با توجه به خواص دارویی ترکیبهای فنولی در سلامتی انسان و همچنین با توجه به نقش دفاعی که این ترکیبها در مقابل اشعه UV برای گیاهان ایفا می نمایند، می توان به طور موثر از اشعه UV برای افزایش این ترکیبهای دارویی در گیاه استفاده کرد. بر این اساس در این تحقیق اثر دو باند UV-B و UV-C بر افزایش ترکیبهای ثانویه دارویی شامل فلاوونوئیدها و آنتوسیانین ها در گیاه بنگ دانه مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روشها

گیاه بنگ دانه (Hyoscyamus) متعلق به خانواده سیب زمینی *Solanaceae* است که از تیره های مهم نهاندانگان محسوب می شود ودر مناطق گرمسیری پراکنش زیادی دارند.

بذرهای دو گونه گیاه بنگ دانه *Hyoscyamus niger* L. و *Hyoscyamus muticus* Bornm. از محل رویش آنها (اطراف شهرستان کرمان) جمع آوری و در شرایط اتاق کشت با دمای ۱±۲۱ درجه سلسیوس و دوره نوری ۸/۱۶ نور/ تاریکی کشت داده شد. پس از سه هفته رشد معمول، این گیاهان به مدت ۲ هفته هر روز ۳۰ دقیقه در دو گروه جداگانه تحت تیمار باند های UV-B و UV-C قرار گرفتند. پس از این مدت گیاهان برداشت شده و در نیتروژن مایع منجمد گردیدند. از این نمونه ها برای اندازه گیری مولفه های مورد نظر استفاده شد.

سنجش میزان فلاوونوئیدها

مقدار فلاوونوئید ها با استفاده از تکنیک HPLC Reverse phase اندازه گیری شد. بدین منظور ۰/۲ گرم برگ تازه گیاه بنگ دانه در متانول ۸۰٪ ساییده شد و بعد توسط ستون Sep Pack جنس C_{18} ساخت کارخانه Varian صاف گردید . در این روش ابتدا ستون آماده سازی شد و سپس عصاره از آن عبور داده شد .عصاره حاصل با فیلتری به قطر ۰/۲ میکرون فیلتر شد.عصاره جمع آوری گردیده، با Heat block و عبور گاز N_2 خشک گردید وسپس عصاره خشک شده در ۱سی سی متانول خالص حل گردید. با استفاده از سرنگ هامیلتون، ۲۰ میکرولیتر از نمونه آماده شده به دستگاه HPLC (مدل

Lachrom ساخت کارخانه Merck) تزریق گردید. در این روش از استونیتریل و اسید فسفریک یک میلی مولار به عنوان فاز متحرک استفاده شد و گرادیان غیر خطی به صورت (۳ دقیقه ۱۰٪، ۵ دقیقه ۱۱/۵٪ ، ۱۰ دقیقه ۱۴٪ ، ۲ دقیقه ۱۹٪ ، ۹ دقیقه ۲۲٪، ۶ دقیقه ۱۰۰٪ استونیتریل) به نرم افزار دستگاه داده شد.

این تجزیه و تحلیل با کمک ستون RP18 به مدت ۳۵ دقیقه انجام شد و شدت جریان حلال آن ml/min ۱بود. جذب نمونه ها در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه گیری شد (Greenberg *et al.*, 1996).

سنجش میزان آنتوسیانین ها

برای سنجش آنتوسیانین ها ۰/۱ گرم از برگ تازه گیاه برداشته و در ۱۰ میلی لیتر متانول اسیدی (متانول : کلریدریک اسید ۹۹: ۱) عصاره گیری شد. عصاره گیاهی حاصل به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار داده شد. سپس جذب اسپکتروفتومتری نمونه ها در ۵۵۰ نانومتر اندازه گیری گردید. غلظت نمونه ها با استفاده از ضریب خاموشی معادل $33000\ mol^{-1}\ cm^{-1}$ محاسبه گردید (Wanger, 1979).

سنجش میزان قند های احیا کننده

میزان قند های احیا کننده با استفاده از سولفات مس و فسفومولیبدیک اسید و با روش سوموگی و نلسون اندازه‌گیری شد (Somogy, 1952). این آزمایش با طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از آزمون دانکن تجزیه و تحلیل گردید.

نتایج

در کروماتوگرام های ، ۲ و ۳ که به ترتیب مربوط به تجزیه و تحلیل فلاوونوئیدهای گیاه کنترل، تیمار UV-B و تیمار UV-C گونه *H. niger* می باشد وهمچنین در کروماتوگرام های ۴، ۵ و ۶ که به ترتیب مربوط به تجزیه و تحلیل فلاوونوئیدهای گیاه کنترل، تیمارUV-B و تیمار UV-C گونه *H. muticus* است مشاهده می شود که مقدار این ترکیبها تحت تاثیر اشعه UV افزایش داشته است . این افزایش در تیمار اشعه UV-C بسیار چشمگیر است و افزایش سطح زیر پیک کاملاً مشهود می باشد و البته چون گونه های این دو گیاه با یکدیگر متفاوت بودند بنابراین الگوی افزایش آنها با یکدیگر تفاوت داشت.

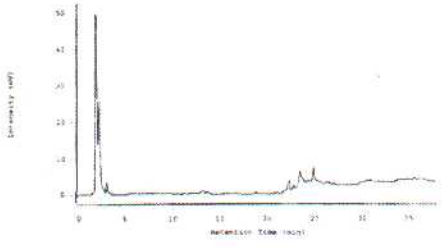
شکلهای ۷ و ۸ مقایسه مقدار آنتوسیانین ها در گیاه کنترل و تیمارهای UV دوگونه *H. niger* و *H. muticus* را نشان می دهد. همان گونه که از نمودار ها مشخص می شود مقدار آنتوسیانین ها نیز تحت تیمار اشعه UV افزایش می یابد. البته افزایش آنتوسیانین ها به اندازه فلاوونوئید ها نیست و شاید نشانگر نقش حفاظتی کمتر آنها در برابر اشعه UV باشد. شکلهای شماره ۹ و ۱۰ مقایسه مقدار قند های احیاکننده در برگ و ریشه گونه های *H. niger* و *H. muticus* را نشان می دهد.

همان طور که در شکلها مشاهده می شود مقدار قند های احیاکننده ریشه تفاوت معنی داری در تیمارهای مختلف ندارد. به ویژه در گونه *H. niger* تفاوت خیلی کم است. اما مقدار قندهای احیاکننده برگ در تیمارهای UV به شدت کاهش می یابد و این کاهش در مقایسه با کنترل کاملاً معنی دار است.

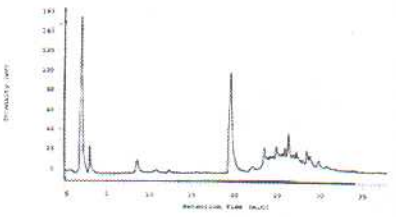
بحث

نتایج این تحقیق نشان می دهد که مقدار فلاوونوئید ها در تیمارهای UV نسبت به کنترل، افزایش قابل توجهی پیدا کرده اند. افزایش مقدار فلاوونوئیدها در تیمار با اشعه UV از خصوصیات دفاعی برخی گیاهان در برابر اشعه UV است که این ترکیبهای یا با فیلتر کردن اشعه UV و جلوگیری از نفوذ آن به درون بافت های حساس از ایجاد خسارت جلوگیری می کنند ویا نقش آنتی اکسیدانی در برابر رادیکالهای آزاد ناشی از تنش UV در گیاه ایفا نموده و تنش اکسیداتیو را تخفیف می دهد.گزارش شده است که افزایش سنتز فلاوونوئید ها یکی از اساسی ترین سازوکارهای دفاعی گیاه در برابر اشعه UV است

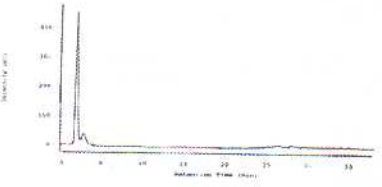
(Yamasaki *et al.*, 1997 ; Sharma, 1998). علت افزایش فلاوونوئید ها همان طور که Jenkins گزارش کرده است احتمالاً بیان ژن مسئول سنتز آنزیم های فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL)، چالکون سنتتاز (CHS) و چالکون ایزومراز (CHI) است که این آنزیم ها مهمترین آنزیم های شرکت کننده در بیوسنتز فلاوونوئید ها می باشند (Jenkins, 1999). تحقیق حاضر نشان داد که گیاه بنگ دانه برای مقابله با اشعه UV بر مقدار فلاوونوئید خود می افزاید و از آنجایی که برخی فلاونوئیدها نقش دارویی دارند شاید بتوان از تیمار اشعه UV برای افزایش این ترکیبها در گیاهان دیگر استفاده نمود. گزارش شده روتین (Rutin) که یکی از فلاونوئید های اساسی گیاه محسوب می شود با جلوگیری از خونریزی مویرگی مانع از سکته های مغزی می شود(nisbett) و یا در برخی موارد خواص انتی آلرژیک برخی فلاونوئید ها در گزارشها اشاره شده است(Nijveldt, 2001). این احتمال وجود دارد که با شناسایی گیاهان حاوی این ترکیبها و تیمار آنها با اشعه UV بتوان تولید طبیعی این قبیل مواد را افزایش داد.



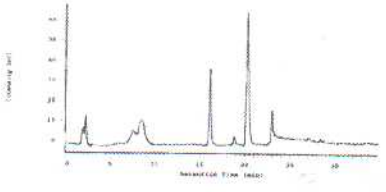
شکل ۱- نمودار حاصل از تجزیه و تحلیل فلاونوئیدهای گیاه کنترل *H. niger*



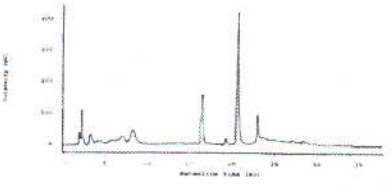
شکل ۲- نمودار حاصل از تجزیه و تحلیل فلاونوئیدهای گیاه *H.niger* تحت تیمار UV-B



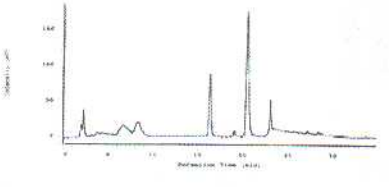
شکل ۳- نمودار حاصل از تجزیه و تحلیل فلاونوئیدهای



شکل٤- نمودار حاصل از تجزیه و تحلیل فلاونوئیدهای گیاه *H. niger* تحت تیمار UV-C گیاه کنترل *H. muticus*



شکل ۵- نمودار حاصل از تجزیه و تحلیل فلاونوئیدهای گیاه *H muticus* تحت تیمار UV-B



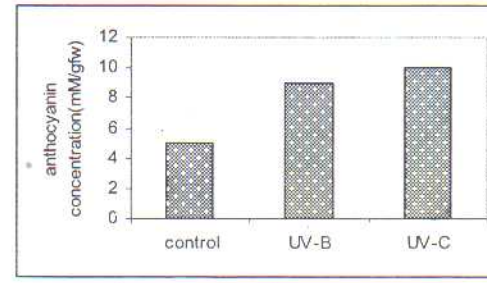
شکل ٦- نمودار حاصل از تجزیه و تحلیل فلاونوئیدهای گیاه *H. muticus* تحت تیمار UV-C

آنتوسیانین ها از دیگر ترکیبهای فنولی مشتق شده از مسیر بیوسنتز فلاوئونوئید ها می باشند که خاصیت فیلتراسیون اشعه UV را دارا می باشند (Greenberg *et al.*, 1996; Mann, 1996).

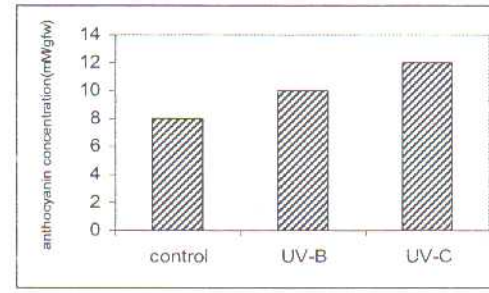
خواص آنتی اکسیدانی آنتوسیانین ها نیز در برخی مطالعات گزارش شده است (Sterling, 2000) . افزایش میزان آنتوسیانین ها در دو گونه گیاهی مورد مطالعه در این تحقیق در پاسخ به اشعه ماوراء بنفش نیز بیانگر نقش دفاعی گیاه در مقابله با این اشعه بوده است و احتمالاً خطرات ناشی از تابش اشعه UV را کاهش میدهد و از آنجایی که بسیاری از آنتوسیانین ها نیز دارای خواص دارویی هستند بنابراین با استفاده از اشعه UV شاید بتوان اقدامی عملی در جهت افزایش ماده موثره دارویی در بسیاری از گیاهان انجام داد

کاهش میزان قندهای احیا کننده که در تیمار با اشعه UV در برگ گیاه بنگ دانه مشاهده شد این احتمال را تقویت می کند که چون سنتز ترکیبهای ثانویه تحت شرایط اشعه UV افزایش یافته است میزان ترکیبهای اولیه مانند قند ها کاهش می یابد و مواد اصلی گیاه به سمت سنتز ترکیبهای ثانویه مانند آنتوسیانین ها گرایش می یابد.

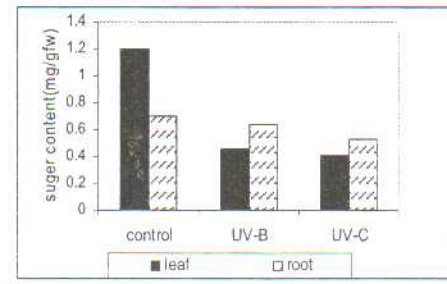
از نتایج این تحقیق چنین نتیجه گیری می شود که می توان از اثرات اشعه UV در افزایش ترکیبهای ثانویه دارویی در گیاهان دارویی مورد نظر استفاده های تجاری نمود و با تیمار این گیاهان با اشعه UV در شرایط گلخانه ای سطح بالایی از این ترکیبها را استخراج نمود. با توجه به اینکه بیشترین مقدار ترکیبهای فنولی در UV-C مشاهده شده و این لامپها با قیمت نسبتاً ارزانی در دسترس است این فکر از نظر اقتصادی می تواند حائز اهمیت زیادی باشد.



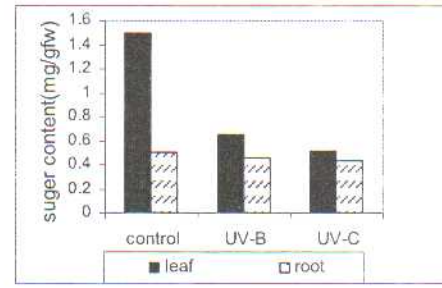
شکل ۷- مقایسه میزان آنتوسیانین ها در گیاه کنترل و تیمارهای اشعه UV در گونه *H. niger*



شکل ۸- مقایسه میزان آنتوسیانین ها در گیاه کنترل و تیمارهای اشعه UV در گونه *H. muticus*



شکل ۹- مقایسه میزان قند های احیاکننده در گیاه *H. niger* در شرایط کنترل و تیمار با اشعه UV



شکل ۱۰- مقایسه میزان قندهای احیاکننده در گیاه *H. muticus* در شرایط کنترل و تیمار با اشعه

منابع مورد استفاده

- Foyer, C.H., Delgado, H., Dat, J.F. and Scott, I., 1997. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling. Physiologia plantarum, 100: 240-254.

American journal of clinical nutrition, 74(4): 418-425.
- Nisbett. www.nisbett.com/nutrition.
- Palner, H., Ohta, M. and Suzuki, T., 2002. Oxidative stress-induced cellular damage caused by UV and methylviologen in *Euglena gracilis* and its suppression with rutin. Photochemistry and Photobiology, 67(2): 116-129.
- Sharma, P.K., Anand, P., Sankhalkar, S. and Shety, R., 1998. Photochemical and Biochemical changes in Wheat seedlings exposed to supplementary Ultraviolet-B radiation. plant sciences, 132: 21-30.
- Smirnoff, N. and Wheller, G.L., 2000. Ascorbic acid in plants; Biosynthesis and function. Critical review in plant sciences, 19(4): 267-290.
- Somogy, M., 1952. Notes on sugar determination. Journal of Biological chemistry, 195: 19-29.
- Sterling, M., 2000. Anthocyanins are a separate class of flavonoids from proontho cyanidins, discussed in NSN. 5(6): 231-240.
Wanger, G.J., 1979. Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugar, free amino acids and anthocyanin in protoplast. Plant Physiology, 64: 88-93.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y. and Ikehara, N., 1997. Flavonoid- peroxidase reactions detoxification mechanism of plant cells against hydrogen peroxide. Plant Physiology, 115: 1405-1415.
- Greenberg, B.M., Wilson, M.I., Gerhardt, K.E and Wilson, K.E., 1996. morphologycal and physiological responses of *Brassica napus* to Ultraviolet radiation: photomodification of ribulose 1,5 bis phosphate carboxilase/oxygenase and potential acclimation processes. Plant Physiology, 148: 78-85.
- Hollosy, F., 2002. Effects of Ultraviolet radiation on plant cells. *Micron*. 33(2):179-197.
- Jenkins, G.I. 1999. Regulation of phenylpropanoids and flavonoid biosynthesis genes by UV-B in *Arabidopsis* :Plant responses to environmental stress. BIOS. Scientific publishers, Oxford.
- Mackerness, S.A., 2000. Plant responses to ultraviolet-B stress: what are the key regulators? Plant Growth Regulation,32: 27-39.
- Mann, J., 1987. Secondary metabolism.2nd edition .Oxford University press.*ISBN*:0-19-855529-6, pp: 275-285.
- Middleton, E.M. and Teramura, A.H., 1993. The role of flavonol glycosidases and carotenoids in protection of soybean from Ultraviolet-B damage. Plant Physiology, 103: 741-752
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in plant Sciences, 7(9): 405-410.
- Nijveldt, R.J., 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications.

Application of Different Bands of UV for Increasing Amount of Secondary Metabolite of Two Species of *Hyoscyamus*

F. Nasibi[1] and K. Manuchehri Kalantari[2]

1- Shahid Bahonar University of Kerman, Faculty of Sciences-Biology Department, e-mail: nasibi2002@yahoo.com
2- International Center of Sciences, High Technology and Environmental Sciences, e-mail: Kh_kalantari@yahoo.com

Abstract

Ultraviolet spectrum of sunlight has high energy. It was divided into three bands A, B, and C, due to the wavelength. Plants protected themselves from this kind of radiation, by two mechanisms, enzymatic and non-enzymatic. These mechanisms can be used for medicinal plants. Many of the secondary metabolites including flavonoids, anthocyanin and alkaloids are medicinally important and they as well have a vital role in scavenging of the free radical created by UV radiation. Therefore, UV radiation seems to be able to increase these compounds in plants. In this research the effect of UV-B and UV-C on the amounts of these compounds (flavonoids, anthocyanin and alkaloids) in *hyoscyamus niger* and *hyoscyamus muticus* was studied. The seeds were collected from their habitat, sown in pots in growth cabinet at 21±1°C and light period of 16/8 light /dark. After 3 weeks, these plants were treated with UV-B and UV-C for 30 minutes every day, during 2 weeks. After 2 weeks, plant materials were harvested and freezed using liquid nitrogen. The samples were used for determination these parameters. Flavonoids were measured by HPLC method. The amount of flavonoids increased in comparison to the control. Anthocyanins concentration were measured using spectrophotometer. The extinction coefficient was used to calculate the concentration. This compound was shown to increase 35% and 50% in UV-B and UV-C, respectively in comparison to the control. The calculation of reducing sugar showed that these sugars decreased in both species when treated either with UV-B or UV-C.

Key words: UV radiation, secondary metabolites, anthocyanins, flavonoid, *hyoscyamus*.