

## بررسی تأثیر تنش پرتوهای فرابنفش B و C بر ترکیب‌های دارویی کالوس‌های پنیرک (*Malva neglecta* Wallr.)

فائزه خاتمی<sup>۱</sup> و فائزه قناتی<sup>۲\*</sup>

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

پست الکترونیک: ghangia@modares.ac.ir

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۱

تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۱

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۰

### چکیده

امروزه به سبب افزایش آلودگی‌های اتمسفری و کاهش اُزن، برخورد پرتوهای فرابنفش به سطح زمین افزایش چشمگیری یافته‌است. در تحقیق حاضر تأثیر پرتوهای فرابنفش B و C بر کالوس‌های گیاه پنیرک (*Malva neglecta* Wallr.) مطالعه شد. ترکیب‌های مهم دارویی پنیرک شامل موسیلاژ و ترکیب‌های فلاونوئیدی و آنتوسیانینی می‌باشد. دو ترکیب اخیر خواص آنتی‌اکسیدانی دارند و در محافظت از سلول‌های گیاهی در برابر پرتوهای فرابنفش نقش بسیار مهمی ایفا می‌کنند. در تحقیق حاضر از قطعات جداگشت برگ‌های گیاه بر روی محیط B5 تغییر یافته، کالوس ایجاد شد. کالوس‌ها پس از ۷ روز ظاهر شدند و بعد هر ۱۰ روز یک بار واکشت شدند. بعد از ۱۱ بار واکشت، کالوس‌ها به مدت ۳ روز و هر روز ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه در معرض پرتوهای فرابنفش B و C قرار گرفتند که به ترتیب معادل ۱۴۴، ۲۸۸، ۴۳۲، ۵۷۶، ۷۲۰، ۸۶۴، ۱۲۹۶ و ۱۷۲۸ ژول بر مترمربع برای پرتوهای فرابنفش B و ۲۰۴، ۴۰۸، ۶۱۲، ۸۱۶، ۱۰۲۰، ۱۲۸۴، ۱۸۳۶، ۱۸۳۶ و ۲۴۴۸ ژول بر مترمربع برای پرتوهای فرابنفش C می‌باشند. نتایج حکایت از تغییرات قابل ملاحظه فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها به‌عنوان ترکیب‌های جاذب پرتو فرابنفش در مقایسه با سلول‌های شاهد داشت. مقدار آپیژنین و دلفینیدین در سلول‌های پنیرک تحت تأثیر پرتوهای فرابنفش B و C کاهش یافت، در حالی که مالویدین در این سلول‌ها تحت تأثیر پرتوهای فرابنفش B و C افزایش یافت. تابش پرتوهای فرابنفش B و C همچنین سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء گردید. بنابراین نتایج پیشنهاد می‌کند که تأثیر پرتوهای فوق بر محتوای فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌های مختلف در سلول‌های پنیرک یکسان نمی‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** پنیرک (*Malva neglecta* Wallr.)، آنتوسیانین، پرتو فرابنفش B، پرتو فرابنفش C، ترکیب‌های جاذب پرتو فرابنفش، فلاونوئید.

### مقدمه

کل طیف پرتو خورشید است. پرتوهای فرابنفش به سه باند UV-A (۳۱۵-۴۰۰nm)، UV-B (۲۸۰-۳۱۵nm) و UV-C (۱۰۰-۲۸۰nm) تقسیم می‌شوند (Kovacs &

پرتوهای فرابنفش بخش غیر یونیزان طیف الکترومغناطیس را تشکیل می‌دهند که تقریباً معادل ۹-۸٪

2004). این ترکیب‌ها خواص آنتی‌اکسیدانی دارند و در محافظت از سلول‌های گیاهی در برابر پرتوهای فرابنفش نقش بسیار مهمی دارند. افزایش ضخامت برگ همراه با افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه فلاونوئیدها در ۴۲ گونه گیاهی تحت تأثیر پرتوهای فرابنفش گزارش شده است (Jansen et al., 1998). افزایش محتوای فلاونوئیدی و آنتوسیانین‌های گیاه دارویی صبر زرد (*Aloe vera*) در اثر پرتو فرابنفش C به‌عنوان یک راهبرد دفاعی برای گیاه در برابر پرتو فرابنفش گزارش شده است (قناتی و همکاران، ۱۳۸۵). همچنین محققان نشان داده‌اند که در گیاه نعنای تحت تأثیر پرتو فرابنفش محتوای فنلی، ایزوپرنی و ترپنوئیدی گیاه افزایش یافت و در بین این ترکیب‌ها افزایش فلاونوئیدها از بقیه چشمگیرتر بود (Dolzhenko et al., 2010).

مطالعه متابولیت‌های ثانویه گیاهی در طی ۵۰ سال اخیر بسیار افزایش یافته است. تکنیک کشت بافت ابزاری برای تولید و مطالعه متابولیت‌های ثانویه و ترکیب‌های دارویی گیاهی با قابلیت آنتی‌اکسیدانی است (طباطبایی و همکاران، ۱۳۷۲). در تحقیق حاضر از تکنیک کشت بافت به‌منظور ارزیابی امکان بکارگیری پرتوهای فرابنفش در افزایش فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها در گیاه پنیرک استفاده شده است.

## مواد و روشها

### مواد شیمیایی

کلیه مواد شیمیایی شامل حلال‌ها و استانداردهای فلاونوئید و آنتوسیانین‌ها از شرکت Merck (آلمان) تهیه گردید.

(Keresztes, 2002). پرتوهای فرابنفش A تقریباً ۶/۳٪ از کل پرتو خورشیدی را شامل می‌شوند و کم‌خطرترین بخش طول موج پرتو فرابنفش می‌باشند (Hollosoy, 2002). پرتوهای فرابنفش C به شدت برای ارگانسیم‌ها مضرند اما در شرایط طبیعی در پرتو خورشیدی شایع نیستند. پرتوهای فرابنفش B به‌رغم این‌که ۱/۵٪ از کل پرتو خورشیدی می‌باشند، اما آسیب‌های متعددی را در گیاهان ایجاد می‌کنند. از آسیب‌های فیزیولوژیکی می‌توان به تأثیر پرتوهای فرابنفش بر آمینواسیدها، پروتئین‌ها، لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک، تنظیم‌کننده‌های رشدی گیاه، رنگیزه‌ها، غشاها و دستگاه فتوسنتزی اشاره کرد (Hollosoy, 2002). پرتوهای فرابنفش همچنین ممکن است از طریق افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) سبب فعال شدن مسیرهای جمع‌آوری ROS نظیر افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مثل کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز یا افزایش آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی نظیر فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها و تانین‌ها گردند (Yannarelli et al., 2006; Mahdavian et al., 2008).

پنیرک از تیره Malvaceae با ۲۵-۳۰ گونه علفی یکساله، دوساله و چندساله با گسترشی در سراسر مناطق معتدل، نیمه‌حاره‌ای و حاره‌ای آفریقا، آسیا و اروپا می‌باشد. دانه آن ۲۱٪ پروتئین و ۱۵/۲٪ لیپید دارد (Celka & Drapikowska, 2008). پنیرک حاوی موسیلاژ، ویتامین‌های A، B، C و ترکیب‌های مهم پلی‌فنلی شامل فلاونوئید، آنتوسیانین و تانین می‌باشد. از جمله ترکیب‌های دارویی مهم گیاه پنیرک می‌توان از مالویدین (Malvidin)، دلفینیدین (Delphinidin) و تانین (Tannin) نام برد (Akcin & Ozbucak, 2006; Mavi et al., 2006).

### ایجاد کالوس و ترسیم منحنی رشد

قطعات کوچکی از برگ‌های پنیرک با مایع ظرفشویی، هیپوکلریت سدیم (شامل ۰.۵٪ کلرین فعال به مدت ۲۰ دقیقه) و بعد اتانول ۷۵٪ (به مدت ۳۰ ثانیه) شستشو و در نهایت به وسیله آب دوبار تقطیر آبکشی شدند. کشت قطعات برگی استریل شده، بر روی محیط B5 جامد حاوی تیامین هیدروکلرید ۲۵mg/L، پیردوکسین هیدروکلرید ۱۲/۵mg/L؛ نیکوتینک اسید ۲۵mg/L؛ بنزیل آدنین ۰/۲۳mg/L؛ نفتالن استیک اسید ۱/۸۶mg/L؛ میواینوزیتول ۱۰۰mg/L و سوکروز ۲۰mg/L، pH ۵/۵ انجام شد. پس از ۷ روز کالوس‌ها ظاهر و هر ده روز یک بار واکشت شدند. پس از یازده بار واکشت، لاین بسیار خوب و مناسبی از سلول‌های یک شکل با سرعت رشد یکسان برای انجام آزمایش‌های زیستی بدست آمد که از سرعت تکثیر بسیار بالایی برخوردار بود. برای رسم منحنی رشد و تعیین میزان رشد سلول‌ها در طول زمان، ابتدا ۲ گرم کالوس به محیط جدید انتقال داده شد و هر ۴ روز یک بار وزن گردید؛ برای هر نمونه، ۳ تکرار در نظر گرفته شد.

### روش پرتودهی

کالوس‌های پنیرک از روز شانزدهم (اواسط فاز لگاریتمی رشد، شکل ۱) به مدت ۳ روز و هر روز ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه در معرض پرتوهای فرابنفش B و C قرار گرفتند که به ترتیب معادل ۱۴۴، ۲۸۸، ۴۳۲، ۵۷۶، ۷۲۰، ۸۶۴، ۱۲۹۶ و ۱۷۲۸ ژول بر مترمربع برای پرتوهای فرابنفش B و ۲۰۴، ۴۰۸، ۶۱۲، ۸۱۶، ۱۰۲۰، ۱۲۸۴، ۱۸۳۶، ۱۸۳۶ و ۲۴۴۸ ژول بر مترمربع برای پرتوهای فرابنفش C می‌باشند. برای تولید پرتوهای فرابنفش B از لامپ TL/12 40 W و برای تولید پرتوهای فرابنفش

C از لامپ Tuv/G30 T8 ساخت شرکت فیلیپس (هلند) استفاده شد. پس از پایان دوره تیمار، سلول‌ها برداشت شده و پس از انجماد با نیتروژن مایع تا زمان انجام آنالیزهای بیوشیمیایی در فریزر  $80^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شدند.

### استخراج و سنجش آنتوسیانین کل

برای سنجش آنتوسیانین کل، ۰/۱ گرم (وزن تر) کالوس در ۳ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول و هیپوکلریک اسید به نسبت ۹۹ به ۱) ساییده شد، سپس عصاره حاصل سانتریفوژ گردید. محلول رویی به مدت یک شب در تاریکی قرار داده شد. میزان جذب این ماده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل GBC, Cintra 6، استرالیا) در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین‌ها از ضریب خاموشی  $33000\text{ cm}^{-2}\text{ mol}^{-1}$  استفاده گردید (Wanger, 1979).

### استخراج و سنجش فلاونوئید کل

برای سنجش فلاونوئید کل، ۰/۱ گرم کالوس (وزن تر) در ۳ میلی‌لیتر اتانول اسیدی (اتانول و استیک اسید به نسبت ۹۹ به ۱) تهیه و بعد سانتریفوژ گردید. محلول رویی به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. میزان جذب نمونه‌ها پس از سرد شدن، توسط اسپکتروفتومتر در سه طول موج ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر خوانده شد. سپس برای محاسبه غلظت فلاونوئیدها از ضریب خاموشی  $33000\text{ cm}^{-2}\text{ mol}^{-1}$  استفاده گردید (Krizek et al., 1993).

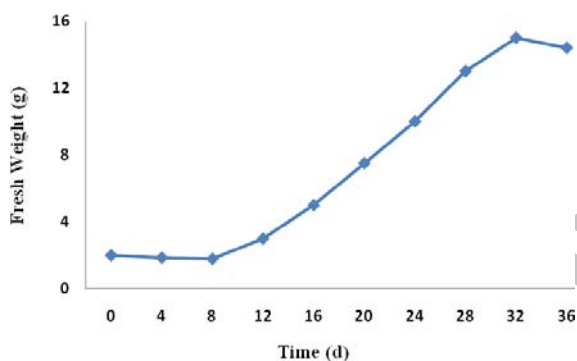
### تعیین میزان پراکسیداسیون لیپدهای غشاء

۰/۱ گرم (وزن تر) کالوس منجمد را در ۳ میلی‌لیتر محلول TCA (Trichloro acetic acid) ساییده، سپس

## نتایج

### منحنی رشد

توده‌های سلولی (کالوس) پنیرک در محیط کشت جامد B5 از حدود روز شانزدهم تا روز سی و چهارم در مرحله لگاریتمی رشد قرار داشته و به‌طور تصاعدی تقسیم می‌شدند. سرعت تقسیم سلول‌ها تقریباً از روز سی و چهارم کاهش می‌یافت و با تولید متابولیت‌های ثانویه همراه بود که منجر به قهوه‌ای شدن کالوس‌ها می‌شد. به همین دلیل بهترین زمان واگشت سلول‌ها و برداشت آنها روزهای شانزدهم تا سی و چهارم پس از هر واگشت بود (شکل ۱).



شکل ۱- منحنی رشد کالوس پنیرک (*Malva neglecta* L.)

### محتوای آنتوسیانین کل

محتوای آنتوسیانین موجود در سلول‌های جداگشت پنیرک در تیمار با پرتو فرابنفش B در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۲). به‌طوری که محتوای آنتوسیانین موجود در کالوس پنیرک در تیمار با پرتو فرابنفش C در مقایسه با شاهد افزایش نشان داد. البته افزایش در تیمارهای ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه نسبت به شاهد معنی‌دار بود (شکل ۳).

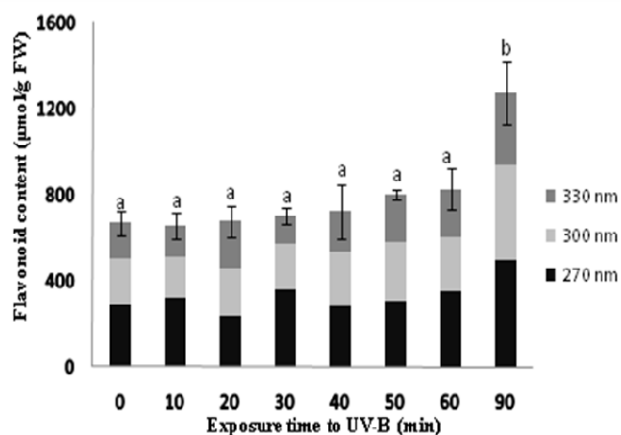
صاف گردید و ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۱ میلی‌لیتر از محلول TBA (Tribarbituric acid) ۰/۵٪ مخلوط شده پس از ورتکس کردن، محلول به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۱۰۰ درجه باقی ماند. پس از سرد شدن میزان جذب MDA (Malondialdehyde) به‌عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپید در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل GBC, Cintra 6، ساخت استرالیا) قرائت و میزان MDA با استفاده از ثابت  $\epsilon=155 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  محاسبه شد (Heath & Packer, 1969).

### استخراج آپیژنین، مالویدین و دلفینیدین

۱/۵ گرم کالوس منجمد شده در ۸ میلی‌لیتر متانول ساییده شد. مخلوط همگن حاصل برای ۹۰ دقیقه سونیکیت شده و بعد در  $g \times 1000$  سانتریفوژ شد. محلول رویی جدا و در زیر هود شیمیایی خشک گردید و قبل از تزریق به دستگاه در متانول حل شد. آپیژنین، مالویدین و دلفینیدین با دستگاه HPLC (KNAUER Germany) با ستون (4.6×250mm) ODS-80 Ts در Flow rate 0.5 mL/min با گرادیان خطی ۱۰۰-۳۰٪ استونیتریل در طول موج ۳۴۰ نانومتر و با استفاده از استاندارد خالص هر یک (Merck) سنجش و اندازه‌گیری شد.

### تجزیه و تحلیل آماری

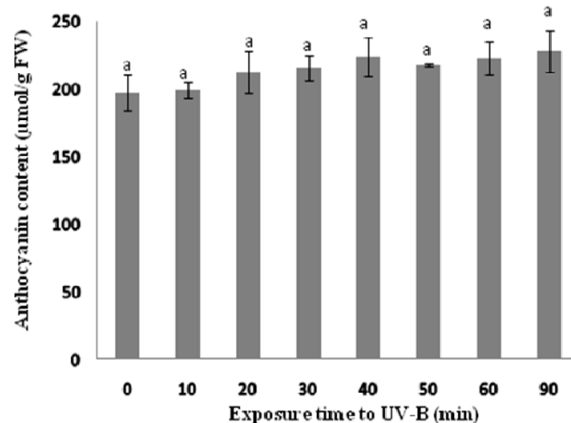
کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار مستقل و هر یک با حداقل سه نمونه انجام شد. رسم شکل‌ها و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ (USA) و آزمون معنی‌دار بودن تفاوت‌ها براساس LSD در سطح  $p \leq 0.05$  انجام شد.



شکل ۴- میزان فلاونوئید موجود در کالوس پنیرک

*(Malva neglecta L.)* در تیمار با پرتو فرابنفش B

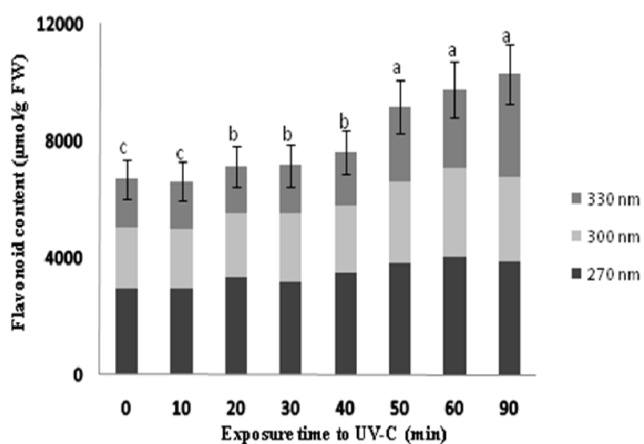
داده‌ها نماینده سه تکرار مستقل می‌باشند. حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت در سطح  $p \leq 0.05$  در مقایسه با شاهد می‌باشند.



شکل ۲- میزان آنتوسیانین کل موجود در کالوس پنیرک

*(Malva neglecta L.)* در تیمار با پرتو فرابنفش B

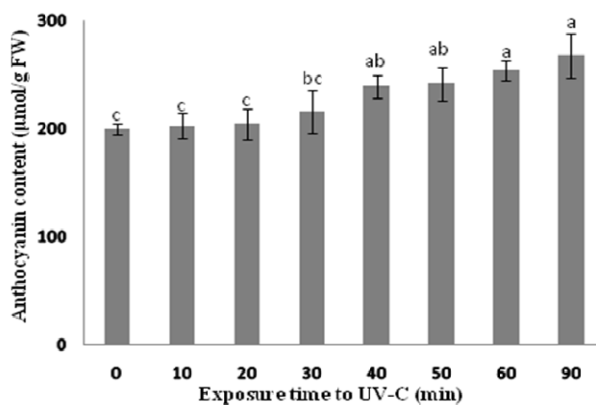
داده‌ها نماینده سه تکرار مستقل می‌باشند. میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت در سطح  $p \leq 0.05$  در مقایسه با شاهد می‌باشند.



شکل ۵- میزان فلاونوئید موجود در کالوس پنیرک

*(Malva neglecta L.)* در تیمار با پرتو فرابنفش C

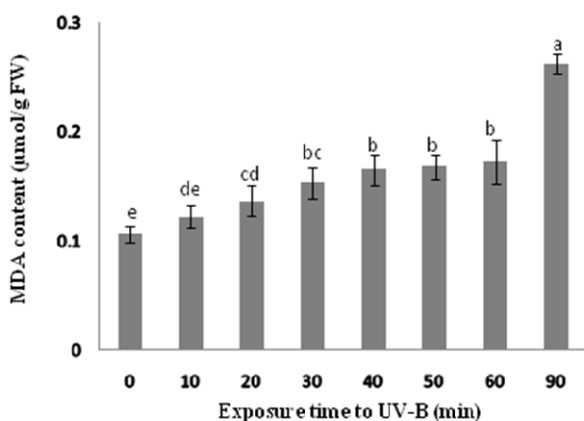
داده‌ها نماینده سه تکرار مستقل می‌باشند. حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت در سطح  $p \leq 0.05$  در مقایسه با شاهد می‌باشند.



شکل ۳- میزان آنتوسیانین موجود در کالوس پنیرک

*(Malva neglecta L.)* در تیمار با پرتو فرابنفش C

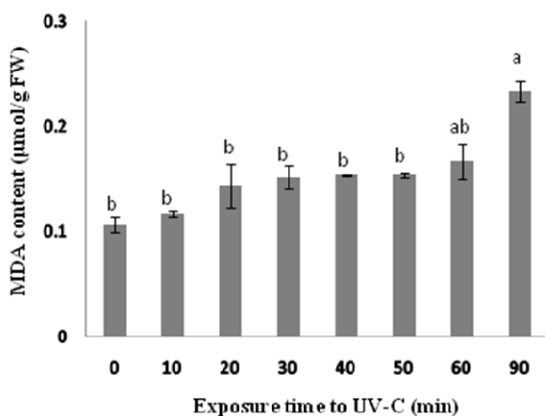
داده‌ها نماینده سه تکرار مستقل می‌باشند. میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت در سطح  $p \leq 0.05$  در مقایسه با شاهد می‌باشند.



شکل ۶- میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء تحت تأثیر

#### پرتو فرابنفش B

داده‌ها نماینده سه تکرار مستقل می‌باشند. میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت در سطح  $p \leq 0.05$  در مقایسه با شاهد می‌باشند.



شکل ۷- میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء تحت تأثیر

#### پرتو فرابنفش C

داده‌ها نماینده سه تکرار مستقل می‌باشند. میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت در سطح  $p \leq 0.05$  در مقایسه با شاهد می‌باشند.

### محتوای فلاونوئید کل

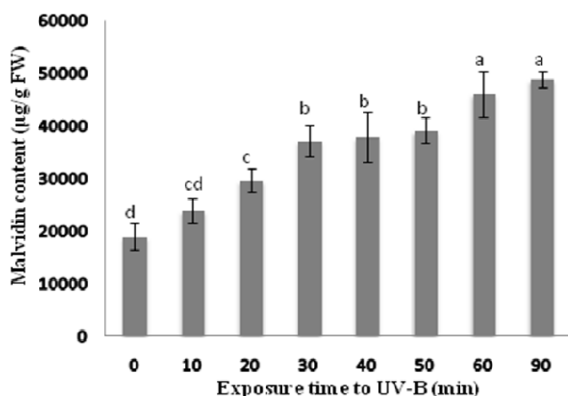
محتوای فلاونوئید کل موجود در کالوس گیاه پنیرک تحت تأثیر پرتوهای فرابنفش B و C در مقایسه با سلول‌های شاهد افزایش نشان دادند. افزایش معنی‌دار تنها در تیمار ۹۰ دقیقه‌ای در مقایسه با گروه شاهد تحت تأثیر پرتو فرابنفش B بود و سایر تیمارها نسبت به یکدیگر تفاوت معنی‌داری نشان ندادند (شکل ۴). محتوای فلاونوئید کل در تیمار با پرتو فرابنفش C از ۲۰ دقیقه به بعد افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان دادند (شکل ۵).

### میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء

پراکسیداسیون‌های لیپیدهای غشاء در سلول‌های جداگشت پنیرک به هنگام تیمار با پرتو فرابنفش B به مدت ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه، افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد داشتند (شکل ۶). پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء تنها در تیمار ۹۰ دقیقه تحت تأثیر پرتو فرابنفش C نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشت. البته سایر تیمارها نسبت به هم تفاوت معنی‌داری نداشتند (شکل ۷).

### محتوای آپیزنین، مالویدین، دلفینیدین

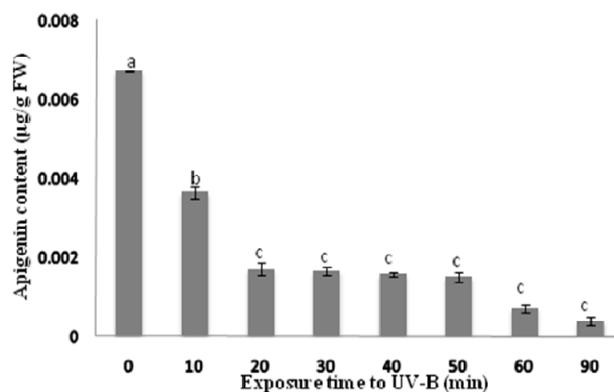
محتوای آپیزنین سلول‌های جداگشت گیاه پنیرک تحت تأثیر پرتو فرابنفش B در مقایسه با شاهد کاهش نشان دادند (شکل ۸). کاهش در سایر تیمارها نسبت به شاهد معنی‌دار بود. در این مورد تیمار ۱۰ دقیقه‌ای نیز با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار داشت (شکل ۸). البته میزان آپیزنین نمونه شاهد تحت تأثیر پرتو فرابنفش C در مقایسه با تیمارهای ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه کاهش معنی‌داری نشان دادند (شکل ۹).



شکل ۱۰- میزان مالویدین موجود در کالوس پنیرک

**B** در تیمار با پرتو فرابنفش *(Malva neglecta L.)*

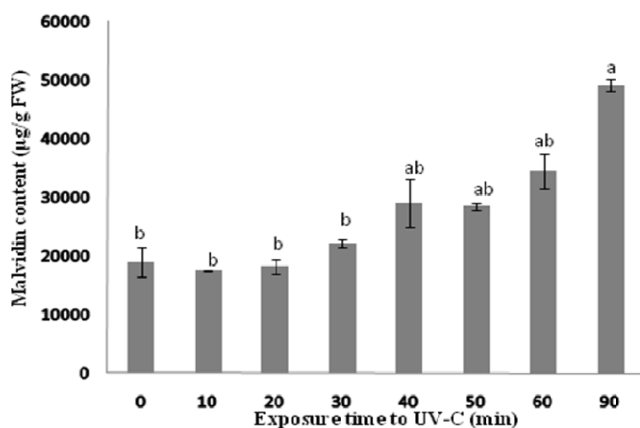
داده‌ها نماینده سه تکرار مستقل می‌باشند. میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت در سطح  $p \leq 0.05$  در مقایسه با شاهد می‌باشند.



شکل ۸- میزان آپیژنین موجود در کالوس پنیرک

**B** در تیمار با پرتو فرابنفش *(Malva neglecta L.)*

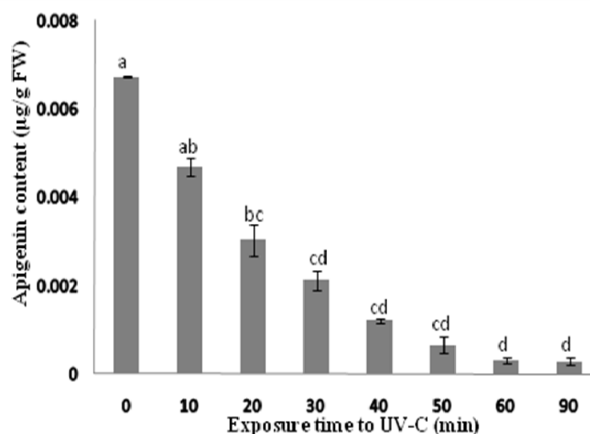
داده‌ها نماینده سه تکرار مستقل می‌باشند. میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت در سطح  $p \leq 0.05$  در مقایسه با شاهد می‌باشند.



شکل ۱۱- میزان مالویدین موجود در کالوس پنیرک

**C** در تیمار با پرتو فرابنفش *(Malva neglecta L.)*

داده‌ها نماینده سه تکرار مستقل می‌باشند. میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت در سطح  $p \leq 0.05$  در مقایسه با شاهد می‌باشند.

شکل ۹- میزان آپیژنین موجود در کالوس پنیرک (*Malva*)**C** در تیمار با پرتو فرابنفش *(neglecta L.)*

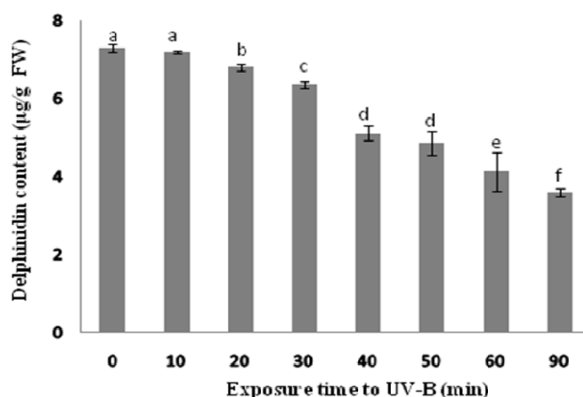
داده‌ها نماینده سه تکرار مستقل می‌باشند. میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت در سطح  $p \leq 0.05$  در مقایسه با شاهد می‌باشند.

نمونه شاهد افزایش معنی داری داشت. در بین تیمارها، تیمار ۹۰ و ۶۰ دقیقه‌ای با سایر تیمارها تفاوت معنی داری نشان داد، در حالی که دو تیمار مذکور نسبت به هم تفاوت معنی داری نداشتند (شکل ۱۰). البته محتوای مالویدین تحت تأثیر پرتو فرابنفش C در سایر تیمارها نسبت به نمونه شاهد افزایش داشتند، ولی تنها در تیمار ۹۰ دقیقه‌ای افزایش معنی دار بود (شکل ۱۱).

محتوای دلفینیدین در تیمارهای ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه نسبت به نمونه شاهد کاهش معنی داری از خود نشان دادند. سایر تیمارها نیز با یکدیگر تفاوت معنی داری داشتند (شکل ۱۲). البته محتوای دلفینیدین در سایر نمونه‌های تیمار داده شده با پرتو فرابنفش C نسبت به نمونه شاهد کاهش معنی داری را نشان داد (شکل ۱۳).

### بحث

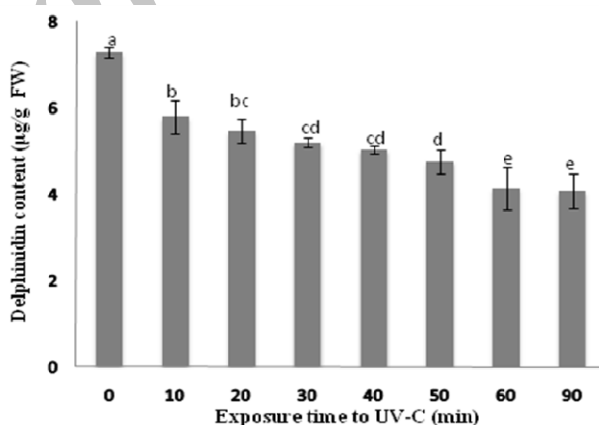
گزارش شده که پرتوهای فرابنفش بر مولکول‌های مهم زیستی نظیر آنزیم‌ها (Gunter *et al.*, 2007)، قندها (قناتی و همکاران، ۱۳۸۵) و پروتئین‌ها (Nasibi & M- Kalantari, 2005) مؤثر می‌باشند. تأثیر پرتوهای فرابنفش بر ساختار و میزان قندها سبب شده است تا این پرتوها به‌عنوان ابزاری برای تغییر ویژگی‌های ساختاری پلی‌ساکاریدهای دیواره پیشنهاد گردند (Gunter *et al.*, 2007). مطالعات در *Brassica napus* نشان داده که پرتوهای فرابنفش B و C منجر به تحریک سیستم آنتی‌اکسیدانی می‌شوند که با افزایش در پراکسیداسیون لیپید و کل محتوای آسکوربات همراه می‌باشد (Nasibi & M-Kalantari, 2005). پرتوهای فرابنفش معمولاً



شکل ۱۲- میزان دلفینیدین موجود در کالوس پنیرک

### (*Malva neglecta* L.) در تیمار با پرتو فرابنفش B

داده‌ها نماینده سه تکرار مستقل می‌باشند. میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی دار بودن تفاوت در سطح  $p \leq 0.05$  در مقایسه با شاهد می‌باشند.



شکل ۱۳- میزان دلفینیدین موجود در کالوس پنیرک

### (*Malva neglecta* L.) در تیمار با پرتو فرابنفش C

داده‌ها نماینده سه تکرار مستقل می‌باشند. میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی دار بودن تفاوت در سطح  $p \leq 0.05$  در مقایسه با شاهد می‌باشند.

میزان مالویدین در تیمار با پرتو فرابنفش B به مدت ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه در مقایسه با



داشتن حلقه آروماتیک تا طول موج ۳۱۰-۳۲۰nm افزایش می‌یابد. به این ترتیب افزایش جذب آنتوسیانین‌ها منجر به این فرضیه شده‌است که آنها از برگ‌های در حال توسعه در برابر پرتوهای فرابنفش حفاظت می‌کنند (Woodall & Stewart, 1998). افزایش بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز آنتوسیانین‌ها در راستای افزایش محتوای آنها در گیاهان شلغم (Zhou et al., 2007)، برنج (Reddy et al., 1994) و واریته‌هایی از سیب (Ubi et al., 2006)، تحت تأثیر پرتوهای فرابنفش نشان داده شده‌است. در مطالعه حاضر محتوای آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدهای موجود در کالوس‌های پنی‌ک تحت تأثیر پرتوهای فرابنفش B و C نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش نشان داد. افزایش محتوای آنتوسیانین موجود در کالوس‌های پنی‌ک با پرتو فرابنفش B نسبت به نمونه‌هایی که با پرتو فرابنفش C تیمار یافتند، قابل توجه است. از این رو می‌توان از پرتو فرابنفش B برای افزایش محتوای آنتوسیانین موجود در کالوس‌های گیاه پنی‌ک بهره برد. افزایش مقدار فلاونوئید در کالوس‌هایی که تحت تأثیر پرتو فرابنفش C قرار گرفتند نسبت به سلول‌هایی که با پرتو فرابنفش B تیمار یافتند، قابل ملاحظه است. بنابراین استفاده از پرتو فرابنفش C برای افزایش محتوای فلاونوئید در کالوس‌های گیاه پنی‌ک توصیه می‌شود.

سیانیدین-۳-روتینوزید و دلفینیدین، آپوپتوزیس را در سلول‌های سرطانی خون القا می‌کنند. این دو آنتوسیانیدین منجر به تأخیر رشد در سلول‌های سرطانی کبد نیز می‌شوند که منجر به حفره‌دارشدگی این سلول‌ها می‌شوند (Feng et al., 2010).

منجر به تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن مانند سوپراکسید و پراکسید هیدروژن می‌شوند. این گونه‌های فعال اکسیژن منجر به آسیب غشاء و افزایش سطح MDA می‌شوند (Rybus-Zajac & Kubis, 2010). در همین راستا، در تحقیق حاضر نیز سطح MDA در کالوس‌های پنی‌ک تحت تأثیر پرتوهای فرابنفش B و C در مقایسه با نمونه‌های شاهد به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش نشان داد. در *Brassica napus* با تأثیر پرتوهای فرابنفش B و C، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها در مقایسه با نمونه‌های شاهد و تیمار داده شده با پرتو فرابنفش A به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش نشان دادند (Nasibi & M-Kalantari, 2005). مطالعات نشان داده که این ترکیب‌ها نقش فیلترهای داخلی را دارند و با فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود در مقابل گونه‌های فعال اکسیژن مانند  $H_2O_2$  مقابله می‌کنند. فلاونوئیدها از نظر دارویی بسیار حائز اهمیت هستند، زیرا در بسیاری از گونه‌های گیاهی موجود می‌باشند و در کاهش چربی خون، جذب کلسترول، مهار ترومبوزیس، و اتساع سرخرگ کرونری نقش دارند و نیز به عنوان آنتی‌اکسیدانت عمل می‌کنند (Deng et al., 2008; Zhu et al., 2010). محققان معتقدند که در مراحل اولیه از توسعه برگی که لایه‌های اپیدرمی و کوتیکولی هنوز به‌طور کامل توسعه نیافته و نقش مؤثری در جذب پرتوهای فرابنفش ندارند، فلاونوئیدهای موجود در مزوفیل نقش مهمی در جذب این پرتوها ایفا می‌کنند (Delucia et al., 1992). آنتوسیانین‌ها قادر به جذب طول موج‌های ۲۹۰-۲۷۰nm و نیز قادر به جذب نور در محدوده طول موج مرئی ۵۵۰-۵۰۰nm می‌باشند. محدوده جذب آنتوسیانین‌ها در طیف فرابنفش با آسیب شدن آنها و

- on medicinal and edible plant *Malva neglecta* Wallr. (Malvaceae). *Pakistan Journal of Biological Science*, 9(14): 2716-2719.
- Celka, Z. and Drapikowska, M., 2008. Relics of cultivation in Central Europe: *Malva alcea* L. as an example. *Vegetation History and Archaeobotany*, 17: 251-255.
  - Delucia, E.H., Day, T.A. and Vogelmann, T.C., 1992. Ultraviolet-B and visible light penetration into needles of two species of subalpine conifers during foliar development. *Plant, Cell and Environment*, 15(8): 921-929.
  - Deng, X.Y., Gao, G.H., Zheng, S.N. and Li, F., 2008. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids in the leaves of *Isatis indigotica* Fort. by ultra-performance liquid chromatography with PDA and electrospray ionization tandem mass spectrometry detection. *Journal of Pharmacology of Biomedical Analysis*, 48(3): 562-567.
  - Dolzhenko, Y., Berteau, C.M., Occhipinti, A., Bossi, S. and Maffei, M.E., 2010. UV-B modulates the interplay between terpenoids and flavonoids in peppermint (*Mentha×piperita* L.). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 100(2): 67-75.
  - Feng, R., Wang, S.Y., Shi, Y.H., Fan, J. and Yin, X.M., 2010. Delphinidin induces necrosis in hepatocellular carcinoma cells in the presence of 3-methyladenine, an autophagy inhibitor. *Journal of Agriculture of Food Chemistry*, 58(7): 3957-3964.
  - Gunter, E.A., Kapustina, O.M., Popeyko, O.V. and Ovodov, Y.S., 2007. Influence of ultraviolet-C on the compositions of cell-wall polysaccharides and carbohydrate activities of *Silene vulgaris* callus. *Carbohydrate Research*, 342(2): 182-189.
  - Heath, R.L. and Packer, L., 1969. Photoperoxidation in isolated chloroplast, I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1): 189-198.
  - Hollosy, F., 2002. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron*, 33: 179-197.
  - Jansen, M.A.K., Gaba, V. and Greenberg, B.M., 1998. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science*, 3(4): 131-135.
  - Kovacs, E. and Keresztes, A., 2002. Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. *Micron*, 33(2): 199-210.
  - Krizek, D.T., Kramer, G.F., Upadyaya, A. and Mirecki, R.M., 1993. UV-B response of cucumber seedling grown under metal halide and high pressure sodium/deluxe lamps. *Physiologia Plantarum*, 88(2): 350-358.
- محتوای دلفینیدین در کالوس های پنیرک تحت تأثیر پرتوهای فرابنفش B و C کاهش یافت. بنابراین برای جلوگیری از کاهش مقدار دلفینیدین که یک ترکیب دارویی است باید کالوس های گیاه پنیرک را از پرتوهای فرابنفش B و C دور نگه داشت.
- آزمایش ها نشان داده که مالویدین تکثیر سلول های سرطانی معده را مهار می کند، این اثر وابسته به زمان استفاده و غلظت آن (مالویدین) می باشد. مهار سلول های سرطانی در گذر از فاز G0/G1 در غلظت  $200\mu\text{M}$  از مالویدین انجام شد (Shih et al., 2005).
- در مطالعه اخیر میزان مالویدین موجود در کالوس های تیمار داده شده با پرتوهای فرابنفش B و C در مقایسه با شاهد افزایش نشان داد. در حالی که افزایش مالویدین در تیمار با پرتو فرابنفش B نسبت به پرتو فرابنفش C در کالوس پنیرک چشمگیرتر است. بنابراین برای افزایش این ترکیب مؤثر در کالوس پنیرک می توان از تأثیر پرتو فرابنفش B استفاده کرد.
- ### سپاسگزاری
- نویسندگان مقاله از حمایت قطب تنش های گیاهی، دانشگاه اصفهان تشکر می نمایند.
- ### منابع مورد استفاده
- طباطبایی، م.، نوری دلویی، م.ر. و تقی بیگلو، چ.، ۱۳۷۲. بیوتکنولوژی مولکولی (ترجمه). مرکز تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی، ۴۹۳ صفحه.
  - قناتی، ف.، احمدی، ز. و عبدالمالکی، پ.، ۱۳۸۵. تأثیر پرتو فرابنفش C بر برخی از پارامترهای فیزیولوژیک در گیاه صبر زرد (*Aloe vera*). تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۲(۴): ۳۳۱-۳۱۵.
  - Akcin, O.E. and Ozbucak, T.B., 2006. Morphological, anatomical and ecological studies

- gastric adenocarcinoma cells. Food and Chemical Toxicology, 43(10): 1557-1566.
- Ubi, B.E., Honda, C., Bessho, H., Kondo, S., Wada, M., Kobayashi, S. and Moriguchi, T., 2006. Expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in apple skin: effect of UV-B and temperature. Plant Science, 170(3): 571-578.
  - Wanger, G.J., 1979. Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. Plant Physiology, 64: 88-93.
  - Woodall G.S. and Stewart G.R., 1998. Do anthocyanins play a role in UV protection of the red juvenile leaves of *syzygium*?. Journal of Experimental Botany, 49(325): 1447-1450.
  - Yannarelli, G.G., Gallego, S.M. and Tomaro, M.L. 2006. Effect of UV-B radiation on the activity and isoforms of enzymes with peroxidase activity in sunflower cotyledons. Environmental and Experimental Botany, 56(2): 174-181.
  - Zhou, B., Li, Y., Xu, Z., Yan, H., Homma, S. and Kawabata, S., 2007. Ultraviolet A-specific induction of anthocyanin biosynthesis in the swollen hypocotyls of turnip (*Brassica rapa*). Journal of Experimental Botany, 58(7): 1771-1781.
  - Zhu, H., Wang, Y., Liu, Y., Xia, Y. and Tang, T., 2010. Analysis of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-Vis spectrophotometry with comparative study on different extraction technologies. Food Analytical Methods, 3(2): 90-97.
  - Mahdavian, K., Ghorbanli, M. and Kalantari, Kh.M., 2008. The effects of ultraviolet radiation on the contents of chlorophyll, flavonoid, anthocyanin and proline in *Capsicum annuum* L. Turkish Journal of Botany, 32: 25-33.
  - Mavi, A., Terzi, Z., Ozgen, U., Yildirim A. and Coskun, M., 2004. Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp. *Verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). Biological Pharmacology Bulletin, 27(5): 702-705.
  - Nasibi, F. and M-Kalantari, K.H., 2005. The effects of UV-A, UV-B and UV-C on protein and ascorbate content, lipid peroxidation and biosynthesis of screening compounds in *Brassica napus*. Iranian Journal of Science and Technology, 29: 40-48.
  - Reddy, V.S., Goud, K.V., Sharma, R. and Reddy, A.R., 1994. UV-B responsive anthocyanin production in a rice cultivar is associated with a specific phase of phenylalanine ammonia lyase biosynthesis. Plant Physiology, 105(4): 1059-1066.
  - Rybus-Zajac, M. and Kubis, J., 2010. Effect of UV-B radiation on antioxidative enzyme activity in cucumber cotyledons. Acta Biologica Cracoviencia-Series Botanica, 52(2): 97-102.
  - Shih, P.H., Yeh, C.T. and Yen, G.C., 2005. Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human

Archive

## The effects of ultraviolet B and C radiation on natural compounds of *Malva neglecta* Wallr. calli

F. Khatami<sup>1</sup> and F. Ghanati<sup>2\*</sup>

1- Department of Plant Biology, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2\*- Corresponding author, Department of Plant Biology, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran  
E-mail: ghangia@modares.ac.ir

Received: August 2011

Revised: May 2012

Accepted: May 2012

### Abstract

It has been widely accepted that the increase of atmospheric pollutants and depletion of ozone, are the main causes for the increase of ultraviolet radiation on the earth. In the present study, the effects of UV-B and UV-C on of *Malva neglecta* calli were investigated. Besides mocusa whose wound healing effects is well known, the plant contains different flavonoides and anthocyanins which are known as good antioxidant and UV protectants as well. Explants from leaves were surface-sterilized and cultured on a modified B5 medium. After 7 days, the calli were emerged and were subcultured every 10 days. After 11 subcultures, the calli were exposed to different doses of UV irradiation as follows: 144, 288, 432, 576, 720, 864, 1296, and 1728 j/m<sup>2</sup> for UV-B and 204, 408, 612, 816, 1020, 1284, 1836, and 2448 j/m<sup>2</sup> for UV-C. The results showed that the flavonoids and anthocyanins contents (UV absorbing compounds) were increased significantly, compared with the control cells. The levels of apigenin and delphinidin in *Malva neglecta* cells decreased after exposure to UV-B and UV-C compared to the control calli. Malvidin increased in UV-B and UV-C exposed *Malva neglecta* cells. In addition, membrane lipid peroxidation increased by longer exposure to UV-C and UV-B, compared to the control cells. The results suggest that the effects of UV-B and UV-C on flavonoids and anthocyanins contents of callus-cultured *Malva neglecta* cells are not identical and therefore they should be differentially suggested as tools for increase of designed components.

**Key words:** *Malva neglecta* Wallr., Anthocyanin, UV-B, UV-C, UV-absorbing compounds, flavonoid.