DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2017.109720

دوماهنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۳، شماره ۱، صفحه ۱۶۷-۱۵۷ (۱۳۹۶)

بررسی و مقایسه فنول‌ها و فلاوونوئیدها درگیاه و کالوس درمنه کوهی (*Artemisia aucheri* Boiss.) در برابر محرک‌های نوری و اشعه UV در کشت آزمایشگاهی (In Vivo)

زهره بختیاری[1*]، غلامرضا اصغری[2]، شکوفه انتشاری[3] و نگین مهدی‌نژاد[4]

۱*- نویسنده مسئول، کارشناس پژوهشی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران

پست الکترونیک: donyaelina@gmail.com

۲- استاد، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور اصفهان، ایران

۴- کارشناس ارشد، آزمایشگاه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۴ تاریخ اصلاح نهایی: شهریور ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۵

چکیده

عوامل اقلیمی بر تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان تأثیرگذار هستند. فنول‌ها و فلاوونوئیدها از مهمترین ترکیب‌های ثانویه گیاهان می‌باشند. در این مقاله هدف بررسی تأثیر نور با فرکانس‌های متفاوت بر تولید فنول‌ها و فلاوونوئیدها در گیاه *Artemisia aucheri* یا درمنه کوهی بود. از محیط کشت جامد موراشینگ و اسکوگ بدون تنظیم‌کننده‌های رشد استفاده شد. محیط کشت‌ها در اتاق کشت در شرایط استریل، تحت دمای ۲±۲۵ و شرایط نوری متفاوت با تیمارهای مختلف بودند. شرایط نوری آزمایش، استفاده از تابش‌های نوری ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ لوکس بود. علاوه‌بر آن تیمار اشعه UV با شدت ۳۲۰ نانومتر و تیمار تاریکی هم در نظر گرفته شد. سنجش فنول‌ها و فلاوونوئیدها با روش اسپکترومتری انجام شد و برای تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها از نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۲۰ و برنامه Excel استفاده شد. در طول آزمایش داده‌های حاصل میانگین سه تکرار ±SD بوده و نتایج براساس آزمون ANOVA یک‌طرفه، پس آزمون Tukey و اختلاف معنی‌دار براساس $P\leq 0.05$، بررسی شد. با توجه به آنالیز آماری نتایج، مشخص گردید که اشعه UV بر روی تولید فنول‌ها و فلاوونوئیدها تأثیرگذار است، به‌طوری که اشعه باعث کاهش میزان فلاوونوئیدها و افزایش فنول‌ها شده است. تأثیر نور متفاوت بوده و به بررسی‌های بیشتری نیاز دارد. در مورد کالوس‌ها نیز نتایج متفاوتی بدست آمد. با توجه به داده‌های حاصل می‌توان نتیجه گرفت که نور و به‌ویژه اشعه UV بر تولید تعدادی از ترکیب‌های ثانویه گیاه (فنول‌ها و فلاوونوئیدها) مؤثر است و با توجه به ارتباط این ترکیب‌ها با فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه، بررسی چگونگی تأثیرات این فاکتور محیطی می‌تواند مورد توجه قرار بگیرد.

واژه‌های کلیدی: نور، درمنه (*Artemisia aucheri* Boiss.)، اشعه UV، فنول، فلاوونوئید.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

گیاهان در طول زندگی خود مواد آلی شیمیایی پیچیده‌ای تولید می‌کنند که در رشد و نمو و فعالیت‌های حیاتی گیاه نقشی ندارند و به آنها متابولیت‌های ثانویه گفته می‌شود. در مفهوم کلی، متابولیت‌های ثانویه ترکیب‌های آلی هستند، که نقش ضروری در رشد و نمو موجود زنده ندارند و گیاهان برای بیوسنتز این مواد انرژی زیادی را بکار می‌برند. زمانی‌که این ترکیب‌ها اثری بر رشد و تمایز گیاه نداشته باشند، قاعدتاً باید منافع دیگری داشته باشند. بنابراین به‌نظر می‌رسد که متابولیت‌های ثانویه، به‌عنوان موادی طبیعی، نقش‌های اکولوژیکی مهمی در واکنش‌های دفاعی گیاهان و همچنین گرده‌افشانی و انتشار دانه‌های گیاهان به‌وسیله حشرات و حیوانات دارند. بعضی از این ترکیب‌ها به‌عنوان علف‌کش و حشره‌کش در صنعت استفاده می‌شوند، در حالیکه دسته بزرگی از متابولیت‌های ثانویه کاربرد دارویی و پزشکی دارند. ترکیب‌های دیگری از این گروه نیز نقش مهمی در تغذیه انسان و دام دارند. در واقع می‌توان گفت مواد معطر، مواد مؤثره دارویی، فرمون‌ها، حشره‌کشها، علف‌کش‌ها، هورمون‌های گیاهی و مواد آللوپاتیک (ایجادکننده انواع مقاومت‌ها و یا بازدارنده رشد و نمو) از متابولیت‌های ثانوی هستند (Rao, 2002).

مهمترین متابولیت‌های ثانویه آلکالوئیدها، فنولیکها، روغن‌های ضروری، استروئیدها، لیگنین‌ها، تانن‌ها و فلاوونوئیدها می‌باشند. متابولیت‌های ثانویه عمدتاً در گونه‌ها و خانواده‌های خاصی از سری گیاهان تولید می‌شوند. این ترکیب‌ها به مقدار کمی در سلول ذخیره شده و عمدتاً در سلول‌های تخصصی و در مرحله خاصی از چرخه زندگی گیاه تولید می‌شوند و همین امر استخراج و تلخیص آنها را در مقایسه با متابولیت‌های اولیه که در تمام سلول‌ها تولید می‌شوند، دشوار می‌کند. گیاهان دارویی از لحاظ میزان متابولیت‌های ثانویه بسیار غنی می‌باشند و ترکیب‌های آنها را در انگلیسی Medicinal یا Officinal می‌نامند. این ترکیب‌ها که از گروه متابولیت‌های ثانویه می‌باشند، از مهمترین ترکیب‌های دارویی هستند. برای تعیین خصوصیات شیمیایی و شناسایی یک متابولیت ثانویه، جداسازی آن به‌صورت کاملاً خالص الزامیست. اصولاً روش‌های جداسازی، گوناگون و مراحل آن اکثراً طولانی است (Rao, 2002). گیاه *Artemisia aucheri* Boiss. یا درمنه کوهی، گیاهی است بوته‌ای، از خانواده Asteraceae که اهمیت آن به‌دلیل حضور ترکیب‌های دارویی مهم و اثرات درمانی قابل توجه آن می‌باشد. ترکیب‌های جنس درمنه در حال حاضر به‌عنوان داروی ضدمالاریا، ضدباکتری، ضدقارچ، آنتی‌اکسیدان و ضد مسمومیت استفاده می‌شوند، بنابراین بررسی ترکیب‌های شیمیایی این گیاه و تأثیر محرک‌ها بر میزان و نوع ترکیب‌ها، اهمیت زیادی دارد. از محرک‌هایی که می‌توانند بر ترکیب‌های شیمیایی گیاهان تأثیر بگذارند، محرک‌های نوری را می‌توان نام برد. در کل محرک‌ها می‌توانند آغازگر مسیرهای متابولیکی در کشت سلول گیاهی باشند و باعث القاء و تحریک سلول گیاهی شوند (Dornenburg, 2008). درباره اثر نور بر رشد گیاهان مطالعات فراوانی انجام شده است. طبق مطالعات قبلی بین خصوصیات مختلف نور (کمّیت، کیفیت و تداوم) و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان ارتباط نزدیکی وجود دارد. فنول‌ها احتمالاً بزرگترین گروه متابولیت‌های ثانویه گیاهی را تشکیل می‌دهند. ترکیب‌های فنولی پراکندگی زیادی در طبیعت داشته و در اغلب دسته‌های ترکیب‌های طبیعی که در ساختمان خود دارای واحدهای آروماتیک هستند، یافت می‌شوند.

فنول‌ها اجزاء مهم موجود در برخی گیاهان دارویی بوده و در صنایع غذایی از آنها به‌عنوان عوامل رنگ‌کننده، طعم‌دهنده، خوش‌بوکننده و آنتی‌اکسیدان استفاده می‌گردد (Ding *et al.*, 2010). فلاوونوئیدها که به شکل آزاد و گلیکوزیدی یافت می‌شوند، بزرگترین فنول‌های موجود در طبیعت را تشکیل می‌دهند و تاکنون بیش از ۲۰۰۰ ترکیب فلاوونوئیدی شناسایی شده‌است که تقریباً ۵۰۰ عدد از آنها به حالت آزاد وجود دارند. این ترکیب‌ها از سه واحد استات و یک واحد فنیل پروپان تشکیل می‌گردد و براساس موقعیت اکسیژن‌ها روی واحد C3، یعنی روی کربن ۲، ۳ و

Archive of SID

www.SID.ir

یا ۴ مشخص می‌شوند. فلاوونوئیدها به حالت آزاد و گلیکوزید و آن هم بیشتر به‌صورت O گلیکوزیدی وجود دارند، ولی تعداد قابل توجهی از آنها به شکل C–گلیکوزید شناسایی شده‌اند. در واقع فلاوونوئیدها یک اصطلاح عمومی برای دسته بزرگی از پیگمان‌های گیاهی می‌باشند که تقریباً محلول در آب بوده و مسئول رنگ گلها، میوه‌ها و برخی مواقع برگها هستند. بیش از ۴۰۰۰ نوع فلاوونوئید در گیاهان یافت شده است (Carew *et al.*, 2013). فنول‌ها و فلاوونوئیدها از ترکیب‌های مهم درمنه کوهی هستند که در این آزمایش تغییر این ترکیب‌ها با توجه به القاء محرک‌های نوری بررسی شد.

مواد و روش‌ها

گیاهچه‌های اولیه و کالوسها از دانشکده علوم دانشگاه اصفهان تهیه شد و کشت‌ها در آزمایشگاه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام گردید. برای کشت، از محیط کشت جامد موراشینگ و اسکوگ بدون تنظیم‌کننده‌های رشد استفاده شد. کشت‌ها در شرایط کاملاً استریل در زیر دستگاه لامینار ائرفلو انجام گردید. محیط کشت‌ها در اتاق کشت در شرایط استریل، در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری متفاوت با تیمارهای مختلف بودند. شرایط نوری آزمایش استفاده از تابش‌های نوری ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ لوکس بود. علاوه‌بر آن تیمار اشعه UV-B با شدت ۳۴۰ نانومتر و تیمار تاریکی هم در نظرگرفته شد. برای این‌کار اتاقک‌های مختلف به‌صورت قفسه مانند تهیه و تیمارها که از هر مورد حداقل سه نمونه بودند، در زمانی مشخص در آن اتاقک‌ها قرار داده شد. اتاقکی نیز به‌عنوان شاهد وجود داشت. وضعیت در نظر گرفتن تیمارها در زیر نشان داده شده‌است. این آزمایش چندین بار در مدت پنج ماه با واکشت‌های زیادی که از تیمارها شد، تکرار گردید تا از ایجاد خطای احتمالی جلوگیری شود.

تیمار گیاهچه ۱: گیاهچه‌های در تابش ۱۰۰۰ لوکس، تیمار گیاهچه ۲: گیاهچه‌های در تابش ۲۰۰۰ لوکس، تیمار گیاهچه ۳: گیاهچه‌ها در تابش ۳۰۰۰ لوکس، تیمار گیاهچه ۴: گیاهچه‌ها در اشعه UV، تیمار گیاهچه ۵: گیاهچه‌ها در شرایط تاریکی، تیمار گیاهچه ۶: گیاهچه‌های شاهد (در شرایط نور طبیعی بدون وجود هیچگونه محرکی).

کالوس ۱: کالوس در تابش ۱۰۰۰ لوکس، کالوس ۲: کالوس در تابش ۲۰۰۰ لوکس، کالوس ۳: کالوس در تابش۳۰۰۰ لوکس، کالوس ۴: کالوس در اشعه UV، کالوس ۵: کالوس در شرایط تاریکی، کالوس ۶: کالوس شاهد (در شرایط نور طبیعی بدون وجود هیچگونه محرکی).

برای تهیه عصاره جهت اندازه‌گیری ترکیب‌های فنولی و فلاوونوئیدی، ۱۰۰ میلی‌گرم از پودر هر تیمار در یک لوله آزمایش درپیچ‌دار ریخته و به آن ۱۰ میلی‌لیتر استون ۷۰٪ اضافه شد. سپس لوله‌ها برای مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه سونیکاتور (Ultra sonic) با قدرت قرار گرفته و به‌دنبال آن برای مدت ۳۰ دقیقه نمونه‌ها در دمای یخچال (۴°C) نگهداری شدند و در نهایت پس از سانتریفیوژ، محلول رویی مورد استفاده قرار گرفت.

برای اندازه‌گیری فنولیک‌های کل، مقدار ۵۰ میکرولیتر عصاره در لوله آزمایش ریخته و به‌وسیله آب مقطر حجم آن به ۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس مقدار ۲۵۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتیو ۱ نرمال به آن اضافه گردید و در نهایت با افزودن ۱/۲۵ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۲۰٪، حجم لوله به ۲ میلی‌لیتر رسید. بعد از مخلوط کردن محتویات لوله به‌وسیله دستگاه ورتکس، مدت۴۰ دقیقه در شرایط تاریکی و دمای اتاق نگهداری شده و بعد جذب نمونه در مقابل بلانک که غلظت استاندارد اسید تانیک در آن صفر میکرولیتر بود، در طول موج ۷۲۵ نانومتر قرائت گردید. برای رسم منحنی کالیبراسیون فنولیک‌های کل، ۲۵ میلی‌گرم تانیک اسید در ۲۵cc آب مقطر و بعد به نسبت ۱۰: ۱ رقیق شد، یعنی cc ۱ استوک را به حجم ۱۰ رسانده و از آن مقادیر مختلف، برحسب میلی‌لیتر در لوله‌های کالیبراسیون ریخته شد. برای رسم منحنی کالیبراسیون از رقت‌های ۱۰۰–۰ میکرولیتر استاندارد اسید تانیک (۰/۱mg/ml) استفاده شد. رابطه خط بدست‌آمده عبارت بود از:

Archive of SID

www.SID.ir

R^2=۰/۹۹۴۱ ،y=۰/۰۳۳۱ x + ۰/۰۱۴۹

(که در آن x محور غلظت‌ها و y محور جذب می‌باشد.)

برای اندازه‌گیری فلاوونوئیدهای کل، به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره تهیه شده، ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۲۰٪ کلرید آلومینیوم ($AlCl_3.6H_2O$) در اسید استیک ۵٪ در متانول اضافه و بعد از افزودن ۲ قطره اسید استیک گلاسیال، حجم نهایی محتویات لوله به‌وسیله متانول به ۳ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از نگهداری نمونه آماده شده در دمای اتاق و تاریکی به مدت ۴۰ دقیقه، جذب آن در مقابل بلانک و در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت گردید. برای رسم منحنی کالیبراسیون فلاوونوئیدهای کل، از استاندارد کوئرستین، رقت‌های ۴، ۲۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه و بعد با همان شیوه ذکرشده در بالا، میزان فلاوونوئیدها در آنها اندازه‌گیری شد. رابطه خط بدست‌آمده عبارت بود از:

R^2=۰/۹۹۳۳ ،y=۰/۰۰۲۴ x−۰/۰۲۵۹

(که در آن y محور جذب‌هاست.)

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها از نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۲۰ و برنامه Excel استفاده شد. در طول آزمایش داده‌های حاصل میانگین سه تکرار ±SD بوده و نتایج براساس آزمون ANOVA یک‌طرفه، پس آزمون Tukey و اختلاف معنی‌دار براساس $P\leq0.05$ بررسی شد.

نتایج

پس از انجام آزمایش‌های مربوط و تکرار برای جلوگیری از خطای احتمالی، اطلاعات حاصل در برنامه نرم‌افزاری Spss version 20 وارد گردید و مقایسات انجام شد. میزان فلاوونوئید با استفاده از منحنی استاندارد براساس میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره گزارش شد.

یافته‌های حاصل از تغییرات فلاوونوئیدهای کل

پس از انجام آزمایش‌های لازم بر روی عصاره‌ها، درصد فلاوونوئیدهای کل اندازه‌گیری شد، که نتایج آن به‌صورت کلی در جدول ۱ آورده شده‌است. ضمن اینکه شکل ۱، تغییرات فلاوونوئیدهای گیاهچه‌ها و کالوس‌ها را نشان می‌دهند. مقایسه فلاوونوئیدهای بدست آمده در گیاهچه‌ها، اختلاف معنی‌داری را در بین تعدادی از تیمارها نشان می‌دهد. طبق آنالیز داده‌های مربوط به گیاهچه‌ها، تیمار تحت تابش ۲۰۰۰ لوکس و تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار نداشتند، ولی بقیه تیمارها با همدیگر و تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار نشان دادند. تیمار تحت تاریکی کمترین میزان فلاوونوئید و تیمار تحت تابش ۳۰۰۰ لوکس بیشترین میزان فلاوونوئید را نشان داد. بعد از تیمار تحت تاریکی کمترین میزان فلاوونوئید در تیمار تحت اشعه UV دیده شد. تیمارها براساس میزان درصد فلاوونوئید گیاهچه‌ها به‌صورت زیر بودند.

تیمار تحت تابش ۳۰۰۰ لوکس> تیمار تحت تابش ۲۰۰۰ لوکس و تیمار شاهد> تیمار تحت تابش ۱۰۰۰ لوکس > تیمار تحت اشعه UV> تیمار تاریکی

در مورد کالوس‌ها نیز بین تمام تیمارها و تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار بود. بعکس گیاهچه‌ها در کالوس‌ها بیشترین میزان فلاوونوئید در تیمار تحت تاریکی و کمترین آن در تیمار تحت تابش ۳۰۰۰ لوکس دیده شد. تیمارها براساس میزان درصد فلاوونوئید در کالوس‌ها به‌شرح زیر بودند:

تیمار تحت تاریکی> تیمار تحت تابش ۱۰۰۰ لوکس> تیمار تحت تابش ۲۰۰۰ لوکس> تیمار تحت تابش UV> تیمار شاهد> تیمار تحت تابش ۳۰۰۰ لوکس

Archive of SID
www.SID.ir

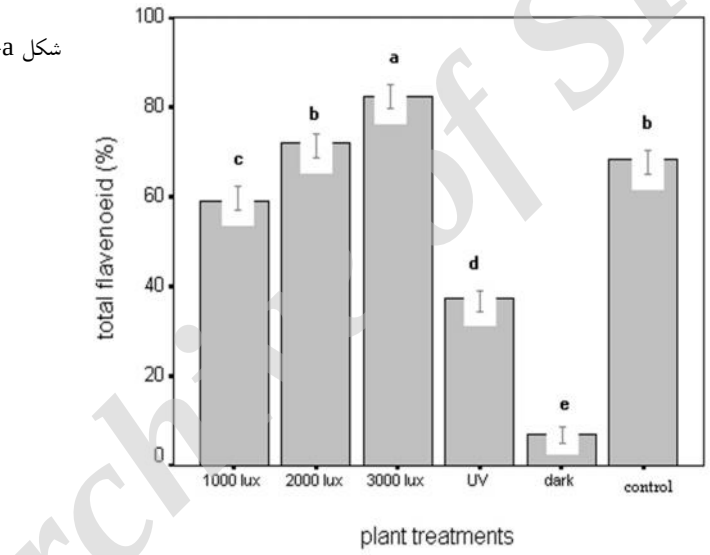
جدول ۱- مقایسه میزان فلاوونوئیدهای کل در بین تیمارها (گیاهچه‌ها و کالوس‌ها)

تیمارها	فلاوونوئیدهای کل (٪)	کالوس‌ها	فلاوونوئیدهای کل (٪)
تیمار ۱	۰/۵۹±۰/۲۳۵ c	کالوس ۱	۰/۶۵±۰/۱۷ b
تیمار ۲	۰/۷۲±۰/۲۱۳ b	کالوس ۲	۰/۵۷±۰/۱۱ c
تیمار ۳	۰/۸۱±۰/۲۰۵ a	کالوس ۳	۰/۱۷±۰/۰۳ f
تیمار ۴	۰/۳۲±۰/۱۰۸ d	کالوس ۴	۰/۵۱±۰/۲۱ d
تیمار ۵	۰/۰۷±۰/۰۲۳ e	کالوس ۵	۰/۸۳±۰/۱۶ a
تیمار ۶ (شاهد)	۰/۶۸±۰/۲۳۴۸ b	کالوس شاهد	۰/۲۵±۰/۰۵ e

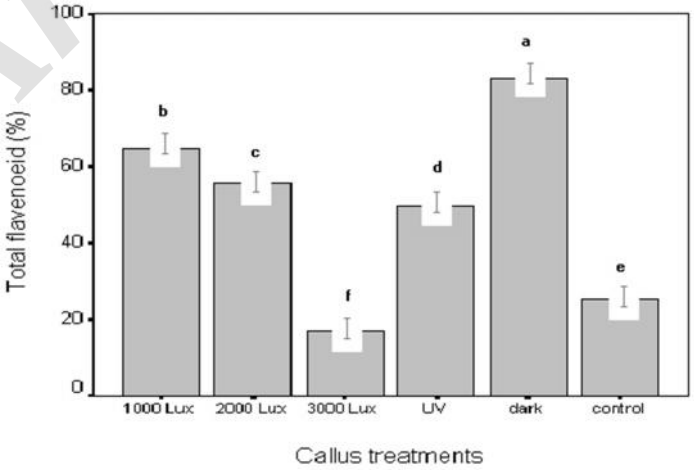
در این جدول میزان فلانوئیدهای کل به‌صورت درصد بیان شده است.

از نظر آماری حروف اندیس شده مشابه به‌منزله معنی‌دار نبودن و حروف غیرمشابه نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف بین تیمارها می‌باشد (داده‌ها میانگین ۳ تکرار ±SD است). این نتایج براساس آزمون ANOVA یک‌طرفه، پس آزمون Tukey و با احتساب $P \leq 0.05$ انجام شده است.

شکل ۱-a



شکل ۱-b



شکل ۱- بررسی اثر تیمارهای نوری بر میزان فلاوونوئیدهای کل در گیاهچه‌ها (شکل a-۱) و کالوس‌های آرتمیزیا (شکل b-۱)

Archive of SID

www.SID.ir

یافته‌های حاصل از تغییرات فنولیک‌های کل

مقادیر فنول کل با روش فولین سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. غلظت‌های مختلف اسید تانیک برای رسم منحنی استاندارد مورد استفاده قرارگرفت.

پس از انجام آزمایش‌های لازم بر روی عصاره‌ها، درصد فنولیک‌های کل اندازه‌گیری شد، که نتایج آن به‌صورت کلی در جدول ۲ آورده شده‌است. ضمن اینکه شکل ۲، درصد فنولیک‌های کل گیاهچه‌ها و کالوس‌ها را نشان می‌دهند. طبق آنالیز داده‌ها در گیاهچه‌ها تیمار تحت تابش ۱۰۰۰ لوکس و ۳۰۰۰ لوکس با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار نداشتند و بقیه تیمارها با تیمار شاهد و با همدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند. در مورد کالوس‌ها بجز تیمار تحت اشعه UV، بین هیچ‌یک از تیمارها با هم و همچنین با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری دیده نشد. در تیمار تحت اشعه UV میزان درصد فنولیک‌ها بالاتر از بقیه تیمارها بود.

جدول ۲- مقایسه میزان فنولیک‌های کل در بین تیمارها (گیاهچه‌ها و کالوس‌ها)

تیمارها	فنولیک‌های کل (٪)	کالوس‌ها	فنولیک‌های کل (٪)
تیمار ۱	۲/۱۲±۰/۸۵ bc	کالوس ۱	۲/۰۶±۰/۲۸ b
تیمار ۲	۱/۹۸±۰/۱۳ c	کالوس ۲	۲/۰۷±۰/۴۷ b
تیمار ۳	۲/۳۵±۰/۵۸ b	کالوس ۳	۲/۰۶.±۰/۳۵ b
تیمار ۴	۲/۹۸±۰/۱ a	کالوس ۴	۲/۱۵.±۰/۴۱ a
تیمار ۵	۱/۵۷±۰/۳۶ d	کالوس ۵	۲/۰۳±۰/۱۷ b
تیمار شاهد	۲/۲۸±۰/۱۲ b	کالوس شاهد	۲/۰۷±۰/۷۸ b

حروف اندیس شده مشابه به‌منزله معنی‌دار نبودن و حروف غیر مشابه نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف بین تیمارها می‌باشد (داده‌ها میانگین ۳ تکرار SD± است).

این نتایج براساس آزمون ANOVA یک‌طرفه، پس آزمون Tukey و با احتساب $P\leq 0.05$ انجام شده است.

ترتیب میزان درصد فنولیک‌های کل در بین تیمارهای گیاهی آزمایش

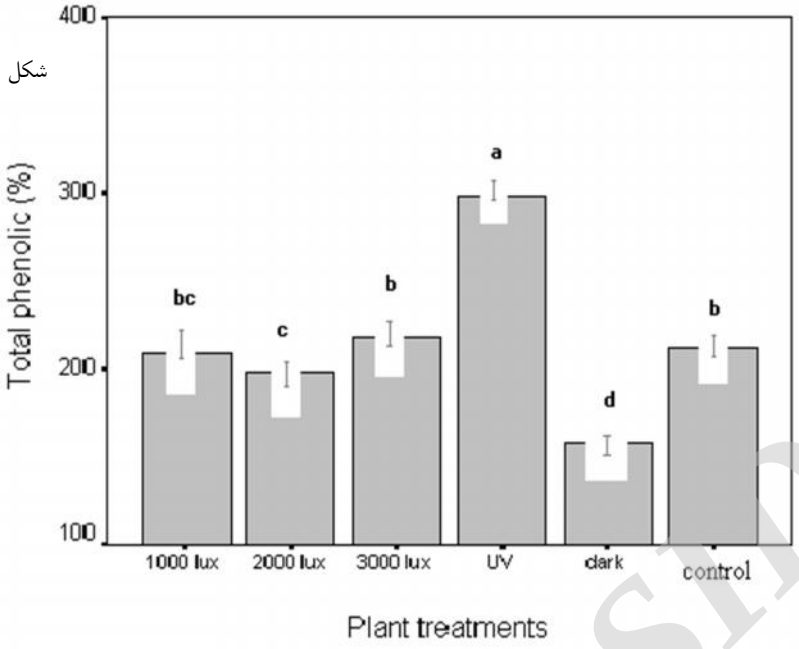
تیمار تحت اشعه UV> تیمار تحت تابش ۳۰۰۰ لوکس، تیمار شاهد، تیمار تحت تابش ۱۰۰۰ لوکس> تیمار تحت تابش ۲۰۰۰ لوکس> تیمار تحت تاریکی

ترتیب میزان درصد فنولیک‌های کل در بین تیمارهای مربوط به کالوس‌های آزمایش

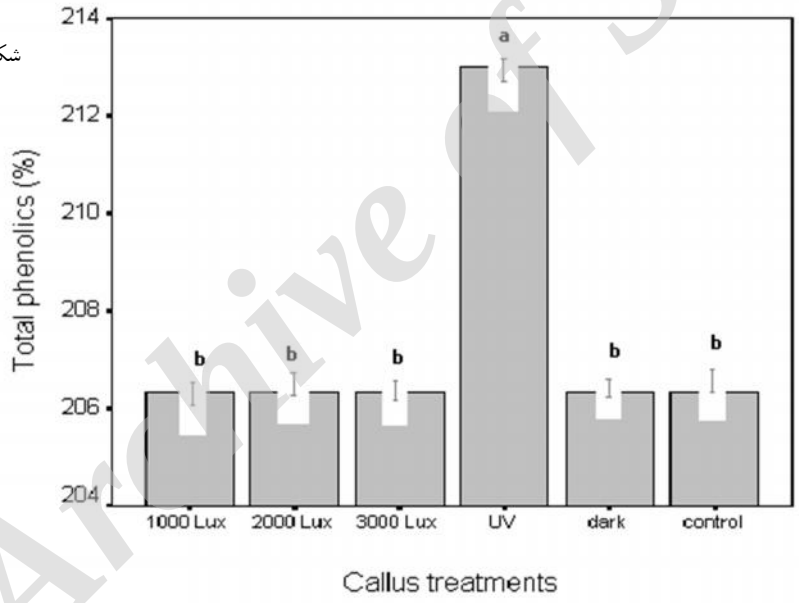
تیمار تحت اشعه UV> تیمار تحت تابش ۳۰۰۰ لوکس= تیمار شاهد= تیمار تحت تابش ۱۰۰۰ لوکس= تیمار تحت تابش ۲۰۰۰ لوکس= تیمار تحت تاریکی

Archive of SID
www.SID.ir

شکل ۲-a



شکل ۲-b



شکل ۲- بررسی اثر تیمارهای نوری بر میزان ترکیب‌های فنولی کل در گیاهچه‌ها (شکل a-۲) و کالوس‌های آرتمیزیا (شکل b-۲)

حروف اندیس شده مشابه به‌منزله معنی‌دار نبودن و حروف غیر مشابه نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف بین تیمارها می‌باشد (داده‌ها میانگین ۳ تکرار SD± است). این نتایج براساس آزمون ANOVA یک‌طرفه، پس آزمون Tukey و با احتساب $P\leq0.05$ انجام شده است.

بحث

گیاهان طیف وسیعی از ترکیب‌های آلی موسوم به متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند. این ترکیب‌ها از بیوسنتز متابولیت‌های اولیه و در مقادیر کمی تولید می‌شوند و در بافت‌های خاص یا در مراحل نموی خاص یافت می‌شوند. مطالعه در زمینه نقش و وظیفه این ترکیب موضوع مهم برای تحقیقات است و نقش این ترکیب‌ها اهمیت زیادی دارد.

میزان متابولیت‌های ثانویه گیاهی مانند فنول و فلاوونوئید تام و ویژگی آنتی‌اکسیدانی آنها به عوامل متعددی از قبیل آب و هوا، گونه، روش استخراج و روش اندازه‌گیری

Archive of SID

www.SID.ir

آنتی‌اکسیدان بستگی دارد (Kumar *et al*., 2014). همانطور که بررسی‌ها و نتایج آزمایش‌ها نشان می‌دهد، میزان نور و نوع آن می‌تواند بر هر یک از ترکیب‌های شیمیایی گیاهان اثرگذار باشد. به‌عنوان مثال، کاهش شدت روشنایی از ۱۰۰۰۰ به ۱۶۰۰۰ لوکس، استروئیدهای غیرقندی موجود در گیاه تاجریزی (*Solanum laciniatum*) را تا ۲۵٪ کاهش می‌دهد و یا گلیکوزیدهای گل انگشتانه *Digitalis lanata* با شدت روشنایی، افزایش می‌یابند. در گیاه بابونه ارتباط نزدیکی بین سنتز اسانس این گیاه، به‌ویژه ماده مؤثره کامازولن در آن، با شدت روشنایی است. کاهش نور در طول رویش گیاه بابونه سبب کاهش تعداد گل، اندازه گل‌ها و در نهایت کاهش مقدار اسانس موجود در آن شده است (Meitinger *et al*., 2015). در گیاه خارمریم تولید فلاونولیگنان‌ها در کشت کالوس تحت تأثیر رژیم نوری است (Rahimi & Hamta, 2009). کیفیت و طول موج نور هم در ترکیب‌های شیمیایی گیاه مؤثر هستند، بنابراین اشعه UV می‌تواند تأثیرات متفاوتی بر ترکیب‌های شیمیایی گیاه داشته باشد.

از سوی دیگر میزان حساسیت کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها به تشعشعات فرابنفش متفاوت است، به‌طوری که کاروتنوئیدها نسبت به کلروفیل‌ها کمتر تحت تأثیر این تشعشعات قرار می‌گیرند و گزارش شده که اشعه UV بیشتر روی کلروفیل نوع b تأثیر می‌گذارد. در این آزمایش فلاوونوئیدها و فنولیک‌های کل گیاه درمنه کوهی مورد بررسی قرار گرفتند.

نقش محرک‌های نوری در تولید فلاوونوئیدها

فلاوونوئیدها از ترکیب‌های فیتوشیمیایی هستند که برای دفاع و مقابله با شرایط نامساعد محیطی مانند نور شدید، پرتوها، کم‌آبی وآلاینده‌ها، همچنین کاهش آسیب در برخی گیاهان ساخته شده و یا دچار تغییر می‌شوند. تغییرات فیتوشیمیایی فلاوونوئیدها به‌عنوان یکی از سازوکارها و واکنش‌های دفاعی گیاهان برای مقابله و یا سازش در برابر تنش‌های محیطی شناخته شده‌است. در بررسی‌های این آزمایش و مقایسات بین فلاوونوئیدهای بدست آمده، اختلاف معنی‌دار بین تیمارها دیده شد. طبق نتایج به‌غیر از تیمار تحت تابش ۲۰۰۰ لوکس بقیه تیمارها با شاهد اختلاف معنی‌دار نشان دادند. این تیمارها با همدیگر نیز اختلاف معنی‌دار داشتند. کمترین میزان فلاوونوئید در تیمار تحت تاریکی دیده شد و بیشترین آن در تیمار تحت تابش شدت نور۳۰۰۰ لوکس. چون در تیمار تحت تابش ۱۰۰۰ لوکس میزان فلاوونوئید کمتر از شاهد و در تیمار تحت تابش ۳۰۰۰ لوکس بیشتر از شاهد بود، از این‌رو در اینجا نمی‌توان نتیجه‌گیری کلی مبنی بر تأثیر مثبت نور بر میزان فلاوونوئید گرفت، ولی با توجه به اینکه در تیمار تحت تاریکی کمترین میزان درصد فلاوونوئید گزارش شده‌است، می‌توان گفت نبودن نور بر میزان فلاوونوئید موجود در گیاه درمنه کوهی اثرگذار بوده است. در مقایسات بین کالوس‌ها بین تمام تیمارها، با شاهد و بقیه تیمارها اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. البته در کالوس‌ها وضعیت کاملاً متفاوت بود و تیمار تحت تاریکی بیشترین درصد میزان فلاوونوئید را نشان داد و تیمار تحت تابش ۳۰۰۰ لوکس کمترین میزان فلاوونوئید را نشان داد. در کالوس‌ها اشعه UV بر تولید فلاوونوئید تأثیر داشت و باعث تغییر و افزایش نسبت به تیمار شاهد در میزان آن شد. براساس نتایج حاصل تغییرات متفاوتی در میزان درصد فلاوونوئیدها دیده می‌شد، ولی چگونگی تغییر و افزایش و کاهش میزان درصد فلاوونوئید گیاه با توجه به شدت نور و اشعه UV، قابل بررسی و پیش‌بینی نبود. البته در مطالعات قبلی، افزایش میزان فلاوونوئیدها در اسفناج، اطلسی و توس (Lavola, 1998) تحت تأثیر اشعه UV گزارش شده‌است. همچنین در مطالعه‌ای که بر روی علف چای انجام شده بود، افزایش فلاوونوئیدها نیز تحت تأثیر اشعه UV-B گزارش شده بود (Germ *et al*., 2010).

نقش محرک‌های نوری در تولید فنولیک‌های کل

ترکیب‌های فنولیک، گروه متابولیت‌های ثانویه آروماتیک گیاهی هستند که به‌طور گسترده در سراسر گیاه پخش

Archive of SID

www.SID.ir

شده‌اند و تأثیرات بیولوژیکی متعددی مانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی دارند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیب‌های فنولیک عمدتاً به علت ویژگی‌های اکسایش-کاهش و ساختار شیمیایی آنهاست که نقش مهمی در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، احاطه کردن فلزات انتقالی و فرو نشاندن مولکول‌های اکسیژن یگانه و سه‌گانه از طریق تغییر مکان یا تجزیه پراکسیدها دارند. این ویژگی‌ها با تأثیرات مفید آنتی‌اکسیدان‌های فنولیک بر روی سلامت در ارتباط است که به‌دلیل تأثیرات بازدارندگی این ترکیب‌ها در مقابل پیشرفت بسیاری از بیماریهای وابسته به تنش مانند بیماری‌های قلبی عروقی، سندرم روده التهابی و بیماری آلزایمر است (Fazli & Ebrahimzadeh, 2013). به‌طور طبیعی بیش از ۸۰۰۰ ترکیب فنولی مختلف با تأثیراتی از قبیل دخالت در ساخت دیواره سلولی، سازوکار دفاعی گیاه و خصوصیات میوه مانند رنگ، عطر و طعم و مزه در گیاه وجود دارد. همچنین ترکیب‌های فنولی به‌عنوان شاخص‌هایی برای مراحل فیزیولوژیکی در طول رشد گیاه نیز در نظر گرفته می‌شوند (Macheix *et al.*, 1990). ساخته شدن ترکیب‌های فنولی در گیاهان از طریق جداشدن عامل آمینی از فنیل آلانین و توسط آنزیم‌های مربوط انجام می‌شود (Simon *et al.*, 1988). از سوی دیگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان متناسب با پلی‌فنول‌های موجود در آنهاست. گیاهانی که ترکیب‌های فنولی بالاتری دارند، فعالیت ضدرادیکال‌های آزاد بالاتری را نشان می‌دهند (Jamshidi *et al.*, 2010). تحقیقات نشان می‌دهد، منبع دریافت فنول‌ها و فلاوونوئیدها در نقاط مختلف جهان متفاوت بوده و به نوع رژیم غذایی مردم منطقه وابسته است. در واقع منطقه و محل زندگی بر تولید ترکیب‌های فنولی و فلاوونوئیدی در گیاهان تأثیر می‌گذارد، چنانچه در تحقیقی نیز با نمونه‌برداری از گیاه *Pterocarya fraxinifolia* Lam. در شیب‌های مختلف جغرافیایی نشان داده شد که برگ‌های گیاه در عرض جغرافیایی بالاتر، از ترکیب‌های فنولی و فلاوونوئید و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به گیاهان رشد کرده در عرض جغرافیایی پایین‌تر برخوردارند (Naderi *et al.*, 2013). همچنین براساس مطالعات قبلی اثبات شده که میزان فنول و خواص آنتی‌اکسیدانی گیاهان هر منطقه بستگی به پارامترهای زیادی ازجمله آب و هوا، ارتفاع و گونه‌های مختلف گیاه دارد (Burk *et al.*, 2010). این مسئله نشان می‌دهد که عوامل محیطی تأثیر زیادی بر تولید ترکیب‌های شیمیایی گیاه دارند که یکی از این عوامل نور می‌باشد. طبق نتایج این آزمایش نور بر روی کالوس‌ها بی‌تأثیر بود و میزان درصد ترکیب‌های فنولی تحت تأثیر تابش‌های مورد مطالعه در کالوس‌ها تغییری نداشت و بین تیمارهای نوری مختلف این آزمایش و تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری دیده نشد. اما در گیاهچه‌ها تأثیر نور متفاوت و غیرقابل پیش‌بینی بود، و با توجه به درصد میزان فنول موجود در تیمار تحت تاریکی، مشخص شد که تابش نور تأثیر مثبت بر درصد ترکیب‌های فنولی دارد. چنانچه در آزمایشی که بر روی گیاه زنجبیل انجام شده بود، این مسئله نیز قابل تأیید بود (Ghasemzadeh *et al.*, 2010).

از سویی در آزمایش دیگری که بر روی چهار گیاه *Acacia pennata*، *Cynometra leonensis*، *Diopyros thomasii* و *Trema guineensis*، موجود در جنگل‌های آفریقا انجام گردید، نشان داده شد که نور می‌تواند بر سطوح فنولیک موجود در گیاهان تأثیر گذاشته و با افزایش شدت تابش نور میزان فنولیک‌ها افزایش یابد (Mole *et al.*, 1988). همچنین نتایج مطالعه بر صنوبر و زغال‌اخته که در آمریکا انجام شد، تأثیر نور بر افزایش فنول را تأیید می‌کند. از سویی براساس نتایج حاصل و آنالیز داده‌ها بیشترین میزان درصد ترکیبات فنولی، چه در گیاهچه‌ها و چه در کالوس‌ها، در تیمار تحت تابش اشعه UV دیده شد. از این‌رو به نظر می‌رسد، تابش اشعه UV باعث تحریک گیاه و کالوس برای تولید ترکیب‌های فنولی شده باشد. براساس یافته‌های آزمایش‌های مختلف، اثبات شده که اولین مرحله در فعالیت دفاعی گیاه، تجمع ترکیب‌های فنولی است (Matern, 1998)، از این‌رو ممکن است گیاه برای دفاع در برابر تابش اشعه UV شروع به سنتز ترکیب‌های فنولی کرده باشد. در این آزمایش کمترین میزان درصد ترکیب‌های

Archive of SID
www.SID.ir

فنولی مربوط به تیمار تحت تاریکی بود که از تیمار شاهد و بقیه تیمارها کمتر بود. البته در مورد کالوس‌ها، بجز تیمار تحت تابش اشعه UV هیچیک از تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشتند و طبق نتایج حاصل می‌توان گفت که تأثیر اشعه UV بر ترکیب‌های فنولی بارزتر از تابش نور می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از زحمات صمیمانه سرکار خانم نگین مهدی‌نژاد (کارشناس آزمایشگاه فارماکوگنوزی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان) تشکر می‌کنند.

منابع مورد استفاده

- Burk, D.R., Cichacz, Z. and Daskalova, S., 2010. Aqueous extract of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) inflorescences suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 murine macrophages. Journal of Medicinal Plants Research, 4(3): 225-234.
- Carew, A.L., Smith, P., Close, D.C., Curtin, C. and Dambergs, R.G., 2013. Yeast effects on pinot noir wine phenolics color and tannin composition. Journal Agricalture Food Chemistry, 61(41): 25-31.
- Ding, Y., Liang, C., Yang, S.Y., Ra, J.C., Choi, E.M., Kim, J.A. and Kim, Y.H., 2010. Phenolic compounds from *Artemisia iwayomogi* and their effects on osteoblastic MC3T3-E1 cells. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 33(8): 1448-1453.
- Dornenburg, H., 2008. Plant cell culture technology-harnessing a biological approach for competitive cyclotides production. Biotechnolgy Letter, 30(8): 1311-1321.
- Fazli, R. and Ebrahimzadeh, M., 2013. Evaluate the amount of phenol and flavonoid total and antioxidant activity the bark of beech, hornbeam and spruce. Journal of the forest and wood products, 3(66): 339-349.
- Germ, M., Stibilj, V., Kreft, S., Gaberscik, A. and Kreft, I., 2010. Flavonoid, tannin and hypericin concentrations in the leaves of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) are affected by UV-B radiation levels. Food Chemistry, 122(3): 471-474.
- Ghasemzadeh, A., Hawa, Z., Jaafar, E., Rahmat, A., Wahab, P. and Halim, M., 2010. Effect of different light intensities on total phenolics and flavonoids synthesis and anti-oxidant activities in young ginger varieties (*Zingiber officinale* Roscoe). International Journal Molecule Science, 11(10): 3885-3897.
- Jamshidi, M.A.H., Rezazadeh, S.H.A. and FathiAzad, F., 2010. Study and comparison, phenolic compounds and antioxidant activity a few plant species indigenous in Mazandaran. Herbal Medicine, 34(9): 177-183.
- Kumar, M.S., Chaudhury, S. and Balachandran, S., 2014. In vitro callus culture of *Heliotropium indicum* Linn for assessment of total phenolic and flavonoid content and antioxidant activity. Appleid Biochemictry Biotechnology, 174(8): 2897-909.
- Lavola, A., 1998. Accumulation of flavonoids and related compounds in birch induced by UV-B irradiance. Tree Physiology, 18(1): 53-58.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A. and Billot, J., 1990. Fruit Phenolics. CRC Press, 392p.
- Matern, U.A.K., 1998. Phenolic compounds in plant disease resistance. Phytoparasitica, 16: 153-170.
- Meitinger, N., Geiger, D., Augusto, T.W., Maia de Padua, R. and Kreis, W., 2015. Purification of delta (5)-3-ketosteroid isomerase from *Digitalis lanata*. Phytochemistry, 109: 6-13.
- Mole, S., Ross, J.A. and Waterman, P.G., 1988. Light-induced variation in phenolic levels in foliage of rain-forest plants. Chemical changes. Journal Chemistry Ecology, 14(1): 1-21.
- Naderi, P., EbrahimZadeh, M. and NaghiNejad, A., 2013. Influence of environmental factors on the amount of phenol compounds and flavonoids of *Pterocarya fraxinifolia* Lam. in different habitats. Paper Presented at the Second National Conference on Environmental Protection and Underlying Applications. Iran, 26-27 Augest: 18-19.
- Rahimi, S. and Hamta, M.B., 2009. Comparison of production Flavnolygnan in cell suspension culture herb (*Silybum marianum*) treated with Pb2 + Ag + salicylic acid and yeast extract. Paper presented at the The Sixth Congress of Horticultural Sciences. Tehran, 4-7 September: 17-18.
- Rao, S.R., 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advance, 20(2): 101-153.
- Simon, M., Jane, A.M.R. and Waterman, P.G., 1988. Light-induced variation in phenolic levels in foliage of rain-forest plants. Journal of Chemical Ecology, 14(1): 1-21.

Archive of SID

www.SID.ir

Comparison of phenols and flavonoids in plant and callus of *Artemisia aucheri* Boiss against light stimulus and UV radiation under *in vitro* culture

Z. Bakhtiari[1*], Gh. Asghari[2], Sh. Enteshari[3] and N. Mehdinejad[2]

1*- Corresponding author, Research Center of Clinical Toxicology, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran, E-mail: donyaelina@gmail.com
2- Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Department of Biology, Payam Noor University, Isfahan, Iran

Received: August 2015 Revised: September 2016 Accepted: October 2016

Abstract

Climatic factors affect the production of secondary metabolites. Phenols and flavonoids are the most important secondary compounds. This research was aimed to investigate the effects of light at different frequencies on the production of phenols and flavonoids in *Artemisia aucheri* Boiss. Murashige and Skoog solid culture medium was used without growth regulators. The culture media were placed in the room culture under sterile conditions, a temperature of 25 ± 2°C and different light conditions with various treatments. Different light intensities of 1000, 2000, and 3000 lux were the light conditions of the experiment. In addition, the UV radiation treatment with intensity of 320 nm and darkness treatment were considered. Phenols and flavonoid were measured by spectrometric method. For data analysis and drawing diagrams, SPSS version 20 and Excel software were used. Data analysis was performed using one-way ANOVA and the means were compared with Tukey's post-test at $P \leq 0.05$. According to the results, the UV radiation affected the production of phenols and flavonoids, so that it reduced the amount of flavonoids and increased the phenols content. The effect of light was different and further investigation is required. Different results were also obtained for calli.Therefore, it could be concluded that light and particularly UV radiation affected the production of a number of secondary compounds (phenols and flavonoids), and the effects of this environmental factor should be taken into consideration.

Keywords: Light, *Artemisia aucheri* Boiss., rays UV, phenols, flavonoids.

Archive of SID

www.SID.ir