تغییرات فیتوشیمیایی گیاه چغندرقند (*Beta vulgaris* L.) در پاسخ به پرتوفرابنفش B

Phytochemical variations in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) in response to Ultraviolet-B radiation

پریسا رحیم‌زاده کاروانسرا [۱] و سیدمهدی رضوی [۲] *

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۱/۲۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۹/۱۷

پ. رحیم‌زاده کاروانسرا و س.م. رضوی. ۱۳۹۷. تغییرات فیتوشیمیایی گیاه چغندرقند (*Beta vulgaris* L.) در پاسخ به پرتوفرابنفش B. **چغندرقند، ۳۴(۲): ۲۱۵-۲۲۶.** DOI: 10.22092/jsb.2019.121369.1185

چکیده

موجودات زنده واجد سازوکارهایی برای رویارویی با اثرات مضر پرتو فرابنفش خورشید می‌باشند. در این تحقیق، آثار سه دز پرتو فرابنفشB بر روی برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک رقم BR1 گیاه چغندرقند (*Beta vulgaris* L.) درقالب طرح کاملاً تصادفی درسه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. تمامی گیاهان در اتاقک رشد با دمای ۲۵/۲۰ درجه سانتی‌گراد (شب/روز) با دوره روشنایی/تاریکی ۸/۱۶ ساعت، به مدت ۳۰ روز رشد داده شدند. سپس گیاهان در معرض چهار تیمار شاهد و سه تیمار ۳/۰۴۲، ۶/۰۸۴ و ۹/۱۲۶ کیلوژول بر مترمربع در روز پرتو فرابنفش B به مدت یک هفته قرار داده شدند. بیشترین میزان پرتو فرابنفش (۹/۱۲۶ کیلو ژول بر متر مربع در روز) موجب کاهش ۱۱ درصدی میزان قندهای محلول بافت برگی گیاه شد. همچنین دزهای ۳/۰۴۲، ۶/۰۸۴ و ۹/۱۲۶ کیلوژول بر مترمربع در روز پرتو فرابنفش B موجب افزایش ۸۰، ۸۲ و ۸۶ درصدی فلاوونوئیدها گردیده است. بالاترین میزان پرتو فرا بنفش سبب افزایش ۲۴ درصدی ترکیبات فنلی کل در گیاه چغندرقند شد. پرتو فرا بنفش B موجب افزایش معنی‌دار مقادیر بتالائین‌ها (بتانین و بتاگزانتین) نیز گردید. فعالیت آنتی‌اکسیدانتی عصاره متانولی برگ‌های چغندرقند تحت پرتو فرا بنفش B افزایش معنی‌داری داشت. بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانتی بتالایین‌ها نشان داد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانتی بتاگزانتین بیشتر از بتانین می‌باشد. افزایش شدت پرتو فرابنفش B موجب بالا رفتن میزان متابولیت‌های ثانویه چغندرقند و در نتیجه منجر به ارتقای توان آنتی‌اکسیدانی این گیاه گردید.

واژه‌های کلیدی: بتالائین، پرتو فرابنفشB، چغندرقند، کروماتوگرافی، متابولیت‌های ثانویه

۱- دانشجوی دکتری تخصصی زیست‌شناسی-فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. *- نویسنده مسئول razavi694@gmail.com

مقدمه

در دهه‌های اخیر فعالیت‌های صنعتی بشر باعث افزایش ترکیبات آلوده کننده اتمسفر، به ویژه ترکیبات هالوژن‌دار و ترکیبات ازبین برنده لایه ازون شده است. از جمله این مواد می‌توان کلروفلوروکربن‌ها (CFCs)، هیدروکلروفلوروکربن‌ها (HCFCs) و متیل برومایاد (MeBr) را نام برد. این ترکیبات به دلیل پایداری زیادی که دارند به سطح استراتوسفر می‌رسند و باعث تخریب لایه ازون می‌شوند. با توجه به اهمیت لایه ازون در جلوگیری از رسیدن پرتو فرابنفش B به سطح زمین، کاهش ضخامت لایه ازون باعث افزایش تابش پرتوهای فرابنفش به سطح زمین می‌شود و مشکلاتی را برای موجودات زنده به وجود می‌آورد (Lumsden 1997).

اشعه فرابنفش به سه نوار پرتو فرابنفش C (۲۸۰–۱۰۰نانومتر)، پرتو فرابنفش B (۳۱۵–۲۸۰ نانومتر) و پرتو فرابنفش A (۴۰۰–۳۱۵ نانومتر) تقسیم می‌شود که به دلیل داشتن طول موج کوتاهتر نسبت به نور مرئی دارای انرژی بیشتر برای نفوذ به بافت‌ها می‌باشند. اثر تخریبی پرتو فرابنفش A به سبب داشتن طول موج بلندتر، کمتر می‌باشد. پرتو فرابنفشC نیز کمتر به سمت اتمسفر زمین می‌رسد. بنابراین محدوده پرتو فرابنفش B پر مخاطره‌ترین نوار پرتو فرابنفش است که با شدت زیاد به اتمسفر زمین می‌تابد و به دلیل کاهش روز افزون لایه اوزن و کاهش تدریجی قابلیت فیلتر شدن آن در جو، آسیب‌های جدی بر موجودات زنده سطح زمین وارد می‌کند. در میان موجودات زنده، گیاهان به دلیل احتیاج اجتناب ناپذیرشان به نور برای فتوسنتز، بیشتر تحت تأثیر پرتو فرابنفش قرار می‌گیرند و واجد آسیب‌پذیری بیشتری می‌باشند (Booji-James *et al.* 2000).

پرتو فرابنفش منجربه آسیب‌های متعدد در گیاهان می‌گردد. این آسیب‌ها از جنبه‌های مختلف فیزیولوژیک، بیوشیمیایی، مولکولی و حتی ساختاری دارای اهمیت می‌باشند. مشخص شده است که مهمترین جایگاه‌های هدف اشعه فرا بنفش درگیاهان، پروتئین‌ها، غشـاهای زیستی، رنگدانه‌های فتوسنتـزی، سیستم‌های نوری، هورمون‌های گیاهی و DNA می‌باشند (Ormrod and Hale 2000). گیاهان مختلف حساسیت متفاوتی به پرتو فرابنفش دارند و این تفاوت به دستگاه نوری گونه گیاهی، رقم زراعی، مراحل رشد، منبع نوری، مدت زمان تماس با اشعه فرابنفش و شرایط محیطی وابسته است. در بین گونه‌های گیاهی، مخروطیان بیشترین و دولپه‌ای‌های علفی کمترین توانایی حفاظت در برابر پرتو فرابنفش را دارا می‌باشند (Santos *et al.* 1999). آسیب‌های ساختاری دراغلب گیاهان درمعرض پرتو فرابنفش تغییر در اندازه کلروپلاست، کاهش تعداد و اندازه دانه‌های نشاسته و ظهور ترکیبات شبه‌بلوری در پراکسیزومها است (Santos *et al.* 2004). پرتو فرا بنفش موجب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن نظیر اکسیژن یکتایی، آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن می‌شود که بسیار فعال می‌باشند و می‌توانند با ماکرومولکول‌های حیاتی مانند لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک واکنش نشان دهند و اعمال طبیعی سلول را مختل سازند. همین آسیب در غشاها اگر بر روی غشاهای تیلاکوئیدی صورت گیرد منجربه اختلال یا توقف در فرایند فتوسنتز می‌گردد (Mackerness *et al.* 2001). تمام موجودات زنده‌ای که در معرض پرتو فرابنفش خورشید قرار می‌گیرند، مکانیسم‌هایی برای جلوگیری از ورود پرتو فرابنفش به درون سلول دارند. همچنین، پاسخ‌های ترمیمی یا سازشی به سرعت در پاسخ به قرارگیری در معرض اشعه فرابنفش القاء می‌شوند تا اثرات زیانبار این پرتوها را تقلیل دهند. سطوح مقاومت به پرتو

فرابنفش به طور قابل ملاحظه‌ای در بین جنس‌ها، گونه‌ها و حتی ژنوتیپ‌های نزدیک به هم متفاوت می‌باشند. محافظت در برابر پرتو فرابنفش به ویژه در بین گیاهانی که در مناطقی با سطح بالای پرتو فرابنفش مانند عرض‌های جغرافیایی پایین یا ارتفاعات بالا رشد می‌کنند، یافت می‌شود (Jansen *et al*. 2001). در غالب گیاهان، کاهش ارتفاع گیاه، کاهش سطح برگ و افزایش ضخامت برگ همراه با افزایش شاخه‌های جانبی، کاهش فاصله میان‌گره‌ها و وزن گیاه مکانیسم‌های حفاظتی از نوع ساختاری در مقابل آسیب‌های ناشی از اشعه فرا بنفش می‌باشند (Barnes *et al*. 1990). از طرف دیگر، سازش‌های بیوشیمیایی به پرتو فرابنفش نیز می‌تواند با تغییر در متابولیسم اولیه و ثانویه در گیاهان صورت گیرد. این تغییرات می‌تواند شامل ضخیم شدن دیواره سلولی، اتصال ترکیبات فنلی به دیواره سلولی، افزایش سطح کوتیکول و تجمع متابولیت‌های ثانویه باشد (Jansen *et al*. 2001). تجمع ترکیبات فنلی، پرتو فرابنفش را در اپیدرم و کوتیکول گیاهان جذب می‌کند که مؤثرترین راهبرد برای سازش گیاهان در برابر پرتوهای فرا بنفش محسوب می‌گردد. مکانیسم‌های دفاعی دیگری مانند تغییر در سطوح هورمون‌های گیاهی به ویژه هورمون اکسین و همچنین افزایش فعالیت برخی آنزیم‌های انتی‌اکسیدانی مثل پراکسیدازها وجود دارد. به علاوه، پلی‌آمین‌ها، موم‌ها و آلکالوئیدهای ویژه‌ای نیز ممکن است در تحمل گیاهان در برابر پرتوهای آسیب‌رسان فرا بنفش نقش داشته باشند (Jansen *et al*. 2001).

گیاه چغندرقند متعلق به خانوادهAmaranthaceae است که دارای رنگیزه‌هایی موسوم به بتالائین‌ها می‌باشند. این رنگیزه‌ها متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که جایگزین آنتوسیانین‌ها در گیاهان تیره مذکور شده‌اند و هیچ‌گاه به طور همزمان در بافت‌های گیاه یافت نمی‌شوند، چرا که آنزیم‌هایی که در سنتز بتالائین‌ها نقش دارند هرگز در گیاهان حاوی آنتوسیانین بیان نمی‌شوند. به نظر می‌رسد این رنگیزه‌ها نقش مهمی در مقابله گیاه با انواع تنش‌ها از جمله تنش پرتو فرا بنفش داشته باشند. (Hatlestad *et al*. 2015).

هدف از این آزمایش بررسی میزان مقاومت رقمBR1 گیاه جغندرقند در برابر دوزهای مختلف اشعه فرابنفش بود و آثار سه دوز مختلف پرتو فرا بنفش B بر روی تغییرات فیتوشیمیایی و میزان متابولیت‌های ثانویه گیاه چغندرقند بررسی شد.

مواد و روش‌ها

کشت گیاه و نحوه اعمال تیمارها

این تحقیق در سال ۱۳۹۶ در دانشگاه محقق اردبیلی انجام گرفت. ابتدا بذور رقمBR1 چغندرقند به مدت ۱۰ دقیقه در محلول۱۰ درصد هیپوکلریت سدیم ضدعفونی شد (Lidsey *et al*. 2017) و برای جوانه‌زنی در داخل پتری‌دیش قرار گرفتند. رطوبت از طریق کاغذ صافی‌های خیس شده توسط آب مقطر تأمین شد. پس از چهار روز، حدود ۹۰ درصد بذرها جوانه زدند. بذور جوانه زده به گلدان‌های حاوی پرلیت و کوکوپیت انتقال یافتند. دانه رست‌ها در ۴۵ گلدان رشد یافتند به‌طوری که در هر گلدان چهار عدد بذر جوانه‌زده در عمق ۰/۵ سانتی‌متری کشت شدند. همه گیاهان در اتاقک رشد با دوره روشنایی۱۶ ساعت و دوره تاریکی هشت ساعت و دمای۲۵/۲۰ درجه سانتی‌گراد (شب/روز) و رطوبت ۸۰ درصد به مدت۳۰ روز رشد داده شدند. سپس، گلدان‌ها به چهار گروه تیماری شامل شاهد (بدون دریافت تشعشع فرا بنفش) و سه تیمار دوزهای۳/۰۴۲، ۶/۰۸۴ و ۹/۱۲۶ کیلوژول بر مترمربع در روز پرتو فرابنفش B رابه مدت هفت روز (۱۵ گلدان به ازای هر تیمار) تقسیم شدند. پرتو ماوراء بنفش B توسط لامپ (TL20W/12 RS SLV/25, Philips,

(Germany تأمین و میزان اشعه فرابنفش توسط یووی‌متر (Solar Meter) اندازه‌گیری شد. تمام سنجش‌ها در مرحله پنج برگی و با سه تکرار انجام گرفت.

سنجش قندهای محلول با استفاده از معرف آنترون

برای تعیین محتوای قندهای محلول، ابتدا ۰/۱ گرم بافت تر برگ در ۲/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفت. عصاره حاصل ابتدا با استفاده از کاغذ صافی، صاف و سپس الکل آن تبخیر شد. رسوب حاصل در ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید. سپس، بر روی ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه ۵ میلی‌لیتر معرف آنترون اضافه شد. سپس در بن‌ماری به مدت ۱۷ دقیقه قرار گرفت و پس از آن جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل PG inustrument T80 ساخت انگلستان قرائت شد. از منحنی استاندارد گلوکز برای محاسبه مقدار قند مورد استفاده قرار گرفت (Roe 1955).

سنجش فلاوونوئید

برای سنجش میزان فلاوونوئید، ابتدا ۰/۱ گرم بافت تازه برگ در ۰/۵ میلی لیتر متانول ساییده، سپس عصاره حاصل با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آمونیوم (۱۰ درصد متانولی)، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم (۱ مولار) و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. پس از این مدت، جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. غلظت نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین به‌دست آمدند (Chang *et al.* 2002).

سنجش محتوی ترکیب‌های فنلی کل

ابتدا ۰/۱ گرم بافت تازه برگ در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول۹۶ درصد ساییده سپس عصاره حاصل بعد از قرارگیری در تاریکی به مدت ۲۴ ساعت، با یک میلی‌لیتر اتانول ۹۵درصد، ۰/۵ میلی‌لیتر فولین ۵۰ درصد و ۱ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵ درصد مخلوط شد. بعد از۶۰ دقیقه قرار گرفتن در تاریکی، جذب نمونه ها در طول موج ۷۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه غلظت ترکیب‌های فنلی از منحنی استاندارد اسید گالیک استفاده گردید (Ronald and laima 1999).

سنجش محتوی تانن

یک میلی‌لیتر از عصاره اتانولی برگ گیاه که قبلاً نیز برای سنجش فنول استفاده شده بود، با ۱۰۰ میلی‌گرم پلی‌وینیل پلی‌پیرولیدون (pvpp) مخلوط شده و بعد از نگه‌داری در چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. با توجه به اینکه تانن توسط pvpp رسوب داده می‌شود، محلول بالایی فاقد تانن می‌باشد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۲۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. سپس عدد جذب نمونه‌ها از اعداد مربوط به جذب فنول کل کم شد تا باقی‌مانده دقیقاً جذب مربوط به تانن‌ها را مشخص نماید. برای محاسبه غلظت، از منحنی استاندارد اسید گالیک استفاده گردید (Makkar and Becker 1993).

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانتی

برای این منظور از رادیکال آزاد دی‌فنیل پیکریل هیدرازول (2,2-Diphenyl- Picryl- Hydrazyl= DDPH) استفاده شد. ابتدا عصاره‌های متانولی در غلظت‌های متفاوت ۱۰۰، ۵۰ و ۲۵ پی‌پی‌ام (قسمت در میلیون) در متانول خالص تهیه

شدند. سپس مخلوطی به نسبت ۱:۱ از محلول DPPH (۸۰ppm) و عصاره‌های گیاهی با غلظت‌های متفاوت تهیه و جذب نمونه‌ها بعد از ۳۰ دقیقه در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه‌ها با استفاده از رابطه (۱) به‌دست آمد:

$$R\% = AD-AS/AD \times 100 \qquad (۱)$$

در این رابطه R%:درصد مهار، AD: جذب DPPH در طول موج ۵۱۷ نانومتر و AS: جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر می‌باشد.

برای مقایسه فعالیت عصاره‌ها از فراسنجه IC_{50} (غلظتی از عصاره که ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد را مهار می‌کند) استفاده شده است (Brand-Williams *et al*. 1995)

سنجش بتانین و بتاگزانتین

سنجش میزان بتالائین‌ها بر اساس یک روش تغییر یافته از روش (Sturzoiu *et al*. 2011) انجام شد. دراین روش ۵ گرم نمونه برگی درون ترکیب حلالی متشکل از ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۲۰ درصد و ۱۰ میلی‌لیتر اسید سیتریک ۰/۵ درصد ساییده شد. بعد از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در تاریکی، نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی، صاف گردیدند. جهت جداسازی بتالائین‌ها از محلول حاصل از کروماتوگرافی ستونی استفاده شد. فاز ثابت کروماتوگرافی ستونی از ۱۰ گرم سیلیکاژل متراکم شده تشکیل شده بود. شستشو با حلال مضاعف شامل متانول/ آب به نسبت ۸:۲ و محلول یک درصد اسید استیک گلاسیال صورت گرفت. سرعت شستشو در حد ۰/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه تنظیم شد. بعد از استخراج بتالائین‌های مختلف با زمان بازداری متفاوت جهت تعیین غلظت و کمی‌سازی از رابطه (۲) استفاده شد:

$$(\text{mg of betaline/100 gr FW}) = \frac{A\,.DF.M}{\varepsilon.l}.\frac{V}{1000.m} \qquad (۲)$$

در این رابطه A: جذب نمونه‌ها (حداکثر جذب بتانین در طول موج ۵۳۶ نانومتر و حداکثر جذب بتاگزانتین در طول موج ۴۷۲ نانومتر)، M: وزن مولکولی، ε: ضریب خاموشی، V: حجم عصاره، m: مقدار نمونه مورد استفاده و DF: فاکتور رقت می‌باشد.

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانتی بتالائین‌ها

بعد از جداسازی بتاگزانتین و بتانین به روش کروماتوگرافی ستونی، سه غلظت متفاوت (ppm ۱۰۰، ۵۰ و ۲۵) از هر کدام از رنگیزه‌ها تهیه و فعالیت آنتی‌اکسیدانتی (IC_{50}) همان‌گونه که پیشتر شرح داده شد (Brand-Williams *et al*. 1995)، مورد ارزیابی قرار گرفت.

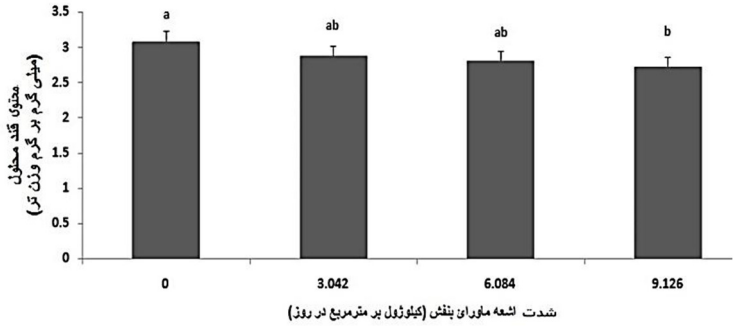
تجزیه وتحلیل آماری

داده‌های به‌دست آمده بااستفاده ازنرم افزار آماری SPSS برای هر تیمار با سه تکرار مورد تحلیل قرار گرفتند و مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون چنددامنه‌ای دانکن باضریب اطمینان ۹۵ درصد انجام گرفت ($p\leq ۰/۰۵$) و رسم نمودارها نیز با استفاده از نرم افزار اکسل انجام شد.

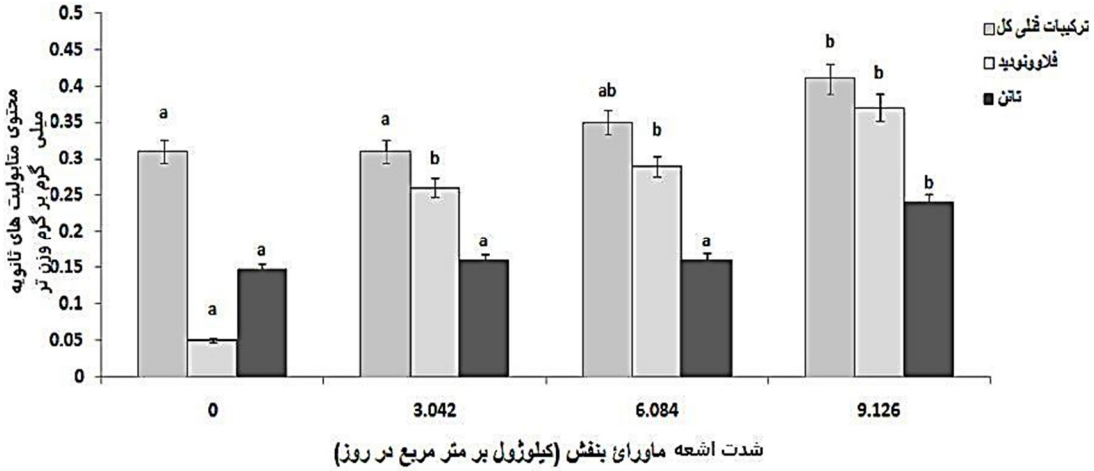
نتایج

نتایج به دست آمده نشان داد که مقدار ۹/۱۲۶ کیلوژول بر متر مربع در روز پرتو فرابنفش B موجب افزایش معنی‌دار محتوی قندهای محلول در مقایسه با تیمار شاهد شد. این در حالی است که محتوی قندهای محلول در سایر گیاهان تحت تیمار اشعه فرابنفش تغییرات معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان ندادند (شکل۱).

طبق شکل (۲) مقادیر۶/۰۸۴ و ۹/۱۲۶ کیلوژول بر مترمربع در روز پرتو فرابنفش B موجب افزایش معنی‌دار محتوی فلاوونوئید در مقایسه با تیمار شاهد شدند. این در حالی است که گیاهان تیمار یافته با مقدار ۳/۰۴۲ کیلوژول بر مترمربع در روز پرتو فرابنفش B تغییرات معنی‌داری درمحتوی فلاوونوئید نشان ندادند. همچنین بالاترین میزان پرتو فرابنفش B (۹/۱۲۶کیلوژول بر مترمربع در روز) موجب افزایش معنی‌دار محتوی فلاوونوئید گردیده است. در حالی که میزان۳/۰۴۲ و۶/۰۸۴ کیلوژول بر مترمربع در روز پرتو فرابنفش B تغییرات معنی‌داری را در میزان فلاوونوئید موجب نشده‌اند. به‌علاوه گیاهانی که با میزان۹/۱۲۶ کیلوژول بر مترمربع در روز اشعه فرابنفش B تیمار شدند، افزایش معنی‌دار تانن را نسبت به بقیه گروه‌ها نشان دادند (شکل۲).



شکل۱ تاثیر سه دوز مختلف پرتو فرا بنفش B برمحتوی قندهای محلول بافت برگی چغندرقند
(حروف نامشابه نشانگر تفاوت معنی‌دار در سطح p≤۰/۰۵ می‌باشند.)

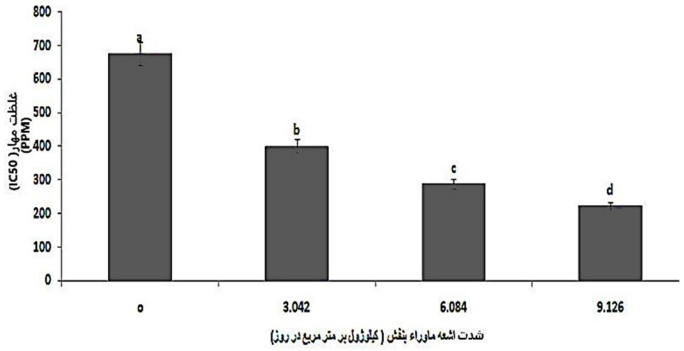


شکل۲ تاثیر سه دوز مختلف پرتو فرابنفش B (۳/۰۴۲، ۶/۰۸۴ و ۹/۱۲۶ کیلوژول بر مترمربع در روز) برمحتوی ترکیبات فنلی کل، فلاوونوئید و تانن بافت برگی چغندرقند. (حروف نامشابه نشانگر تفاوت معنی‌دار در سطح p≤۰/۰۵ می‌باشند.)

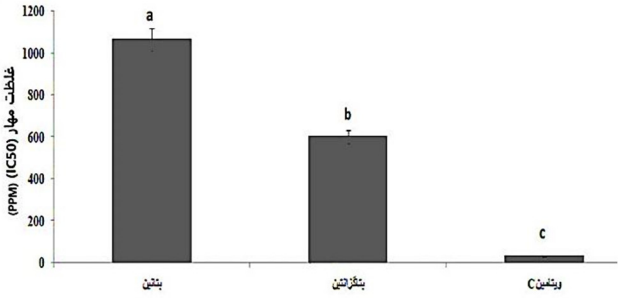
نتایج به‌دست آمده نشان دادندکه افزایش میزان پرتو فرابنفش B، موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانتی گیاه چغندرقند می‌شود (شکل۳). همچنین مشاهده شد که فعالیت آنتی‌اکسیدانتی رنگیزه بتاگزانتین بیشتر از بتانین می‌باشد. هر دو رنگیزه در مقایسه با ویتامین C، به عنوان شاخص استاندارد IC_{50}, فعالیت

آنتی اکسیدانتی کمتری از خود نشان می‌دهند به‌طوری‌که میزان IC50 ارائه شده برای ویتامین C، ۲/۳ پی‌پی‌ام می‌باشد (شکل۴)

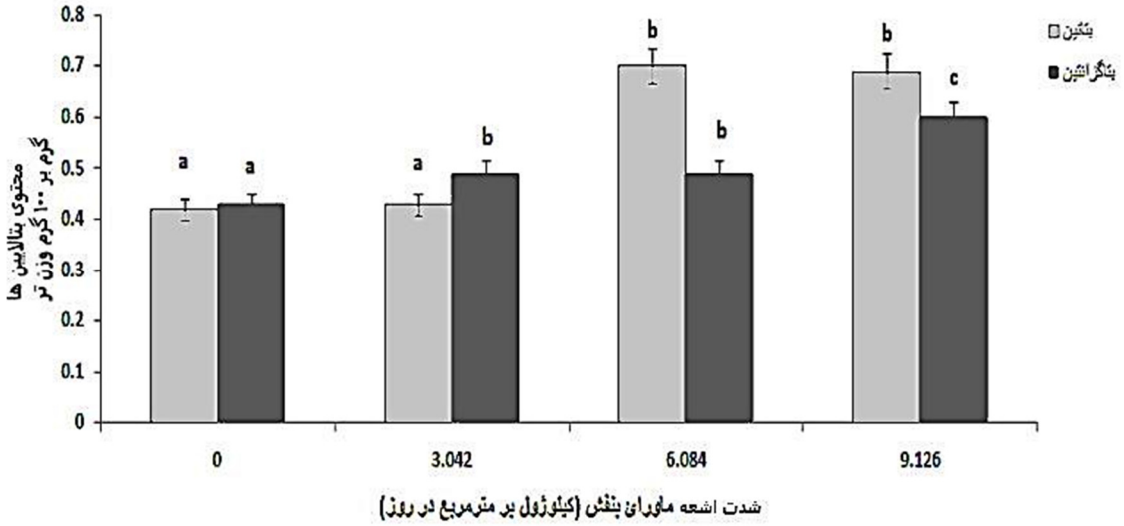
به‌علاوه نتایج به دست آمده نشان دادند که پرتو فرابنفش B موجب افزایش معنی‌دار بتالائین‌ها در گیاه چغندرقند شده است. به طوری که میزان ۶/۰۸۴ و ۹/۱۲۶ کیلوژول بر مترمربع در روز پرتو فرابنفش B موجب افزایش معنی‌دار بتانین در مقایسه با شاهد گردید. این در حالی است که میزان ۳/۰۴۲ کیلوژول بر مترمربع در روز پرتوفرابنفش B نسبت به شاهد تغییر معنی‌داری در میزان بتانین‌ها ایجاد نکرده است. همچنین تمام گیاهان تیمار شده با اشعه فرا بنفش B در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش معنی‌دار در میزان بتاگزانتین‌ها را نشان می‌دهند (شکل۵).



شکل ۳ تأثیر سه دوز مختلف پرتو فرابنفشB (۳/۰۴۲، ۶/۰۸۴ و ۹/۱۲۶ کیلوژول بر مترمربع در روز) بر فعالیت آنتی‌اکسیدانتی (IC_{50}) بافت برگی چغندرقند (حروف نامشابه نشانگر تفاوت معنی‌دار در سطح $p\leq۰/۰۵$ می‌باشند.)



شکل٤ فعالیت آنتی‌اکسیدانتی (IC_{50}) بتانین، بتاگزانتین و بتاگزانتین (حروف نامشابه نشانگر تفاوت معنی‌دار در سطح $p\leq۰/۰۵$ می‌باشند.)



شکل ۵ تأثیر سه دوز مختلف پرتو فرا بنفش B بر محتوی بتانین و بتاگزانتین چغندرقند (حروف نامشابه نشانگر تفاوت معنی‌دار در سطح $p\leq۰/۰۵$ می‌باشند.)

بحث

نتایج این مطالعه نشان دادند که محتوای قندهای محلول در اثر تابش فرابنفش B کاهش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد داشتند. به نظر می‌رسد این کاهش به علت آسیب جدی به روند فتوسنتز گیاه تحت تأثیر اشعه ماورای بنفش باشد. دی‌یو و همکارانش (Du *et al.* 2003) نشان دادند که پرتو فرابنفش در گیاه *Taxuscuspidata* موجب ایجاد پراکسیداسیون لیپید غشایی کلروپلاست‌ها می‌شود که دلیلی برای کاهش فعالیت انتقال الکترون دستگاه نوری II می‌باشد. این روند در نهایت موجب کاهش کارایی فتوسنتز و بیوسنتز کربوهیدرات‌ها می‌شود. درگونه‌های مختلف اوکالیپتوس و آکاسیا غلظت قندهای محلول در گیاهان تیمار شده با پرتو فرا بنفش B کاهش پیدا کرده است (Liu *et al.* 2005). در مقابل، در گیاهان نخودفرنگی (He *et al.* 1994) و ذرت (Santos *et al.* 1993) غلظت کربوهیدرات در اثر پرتو فرابنفش B افزایش پیدا کرد. در این خصوص به نظر می‌رسد آسیب میتوکندری در اثر پرتو فرابنفش باعث کاهش مصرف سوبسترای تنفسی و افزایش مقدارآن شده باشد (He *et al.* 1994).

از طرف دیگر نتایج این پژوهش نشان دادکه میزان بالای پرتو فرابنفش موجب افزایش ترکیبات فنلی کل اعم از فلاوونوئیدها و تانن‌ها در چغندرقند گردید. به نظر می‌رسد این افزایش، راه‌کاری برای جبران خسارات ناشی از نور فرابنفش می‌باشد. شواهد نشان می‌دهدکه ترکیبات فنلی خصوصاً فلاوونوئیدها موجب کاهش آسیب‌های وارده به DNA توسط پرتو فرا بنفش می‌شوند زیرا این ترکیبات به عنوان صافی عمل می‌کنند و سبب کاهش تشعشعات مضر پرتو فرا بنفش می‌شوند (Bieza and Lois 2001). فلاوونوئیدها نور را به شدت در دامنه طول موج ۳۸۰-۲۲۰ نانومتر جذب می‌کنند و در برابر این نور از ثبات بالایی برخوردار می‌باشند (Harborne 1986; Stapleton and Walbot 1994). گزارشات قبلی حاکی از این است که در گیاه سیب‌زمینی پرتو فرابنفش علاوه‌بر این که انباشت فلاوونوئیدهای ضروری را تحریک می‌کند، باعث القاء سنتز دو نوع فلاوونوئید جدید می‌شود (Santos *et al.*2004). ترکیبات فنلی موجب حفاظت سلول‌ها در برابر انواع گونه‌های فعال اکسیژن که به موجب واکنش‌های اکسیداسیون-احیاء و در جریان احیاء ناقص اکسیژن تولیدمی‌شوند، می‌گردند (Stefanowska *et al.* 2002).

همچنین نتایج این تحقیق مشخص کرد که که پرتو فرابنفش B موجب افزایش بتالائین‌ها (بتانین و بتاگزانتین) در گیاهان تیمار شده گردید. پاوکویچ و همکاران (Pavokovic *et al.* 2009) نشان دادند که سنتز بتالائین‌ها به‌شدت وابسته به نور می‌باشد. علاوه بر این، آنها نشان دادند که ژن‌های تنظیم شونده توسط قند نیز در سنتز بتالائین‌ها دخیل هستند. به‌طوری که سنتز بتانین‌ها در حضور فروکتوز بسیار بیشتر از گلوکز و ساکاروز بوده است. همچنین گزارش شده است که میزان بتالائین‌ها با افزایش نمک‌های پتاسیمی در خاک افزایش مییابد (Delgado-Vargas *et al.* 2000). این یافته‌ها اثباتی است بر این‌که سنتز بتالائین‌ها به‌شدت تحت تأثیر تغییرات محیطی می‌باشد. برخی محققان اثبات کرده‌اند که بتالائین‌ها موجب حذف رادیکال‌های آزاد می‌گردند. همچنین، گزارش شده است که درگیاه Ice plant بتالائین‌ها به عنوان جاذب پرتو فرابنفش عمل می‌کنند. افزایش این رنگیزه‌های ایندولی دراثر پرتو فرابنفش B در گیاه چغندر نیز نقش این ترکیبات به عنوان صافی‌گرهای پرتو فرا بنفش را قوت می‌بخشد. علاوه بر این، نشان داده شده است که میزان بیان

ژن‌های کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز درگیاه بالغ *Riviniahumilis*، یعنی زمانی که میزان بتالائین‌ها در حداکثر میزان خود دراین گیاه حضوردارند،کاهش می‌یابد. علت کاهش بیان ژن‌های مربوط به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت اینگونه بیان شده است که گیاه با انباشته کردن آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی مانند بتالائین‌ها بیان ژن‌های مربوط به آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی را کاهش می‌دهد (Khan *et al*. 2016).

اختلاف معنی‌دار در قابلیت آنتی اکسیدانتی عصاره برگ گیاه چغندرقند تحت مقادیر مختلف پرتو فرابنفش B نشان داد که اشعه فرابنفش به عنوان یک تنش محیطی موجب تحریک سیستم آنتی اکسیدانی گیاه چغندرقند می‌گردد که احتمالاً با افزایش تراز متابولیت‌های ثانویه چغندرقند عملی می‌شود. نتایج مربوط به میانگین ترکیبات فنلی تام، فلاوونوئید، تانن و بتالائین‌ها تحت تأثیر نور ماورای بنفش تأییدکننده این تغییرات است. احتمالاً تجمع ترکیبات فنلی، پرتوهای فرابنفش را در اپیدرم و کوتیکول گیاهان جذب می‌کند که کارآمدترین راهبرد جهت مقاومت گیاهان در برابر پرتوهای فرابنفش محسوب می‌شود. از سوی دیگر، ترکیبات فنلی (فلاوونوئیدها، آنتوسیانتین‌ها، تانن‌ها) به صورت مؤثری به‌عنوان دهنده هیدروژن عمل می‌نمایند و بر این اساس به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت مؤثر نقش ایفاء می‌کنند (Golluce *et al.* 2007). دراین راستا، نتایج به دست آمده نشان داد که بتالائین‌ها موجب مهار DPPH می‌شوند و این فعایت آنتی‌اکسیدانتی بتالائین‌ها در سال ۲۰۱۴ توسط بوکر و همکاران (Bucur *et al.* 2014) نیز گزارش شده است.

بتاگزانتین و بتانین به عنوان دوگروه اصلی از بتالاین‌ها درگیاه چغندرقند محسوب می‌شوند که به ترتیب رنگ زرد و قرمز ایجاد می‌کنند. یافته‌های ما نشان داد که توان آنتی‌اکسیدانتی بتاگزانتین بیشتر از بتانین می‌باشد. قابل ذکر است که تفاوت در توان آنتی اکسیدانتی بتالائین‌ها ممکن است به دلیل تفاوت در ساختار شیمیایی این رنگیزه باشد. بتاگزانتین‌ها مشتق شده از اسید بتالامیک وآمینواسیدها (و یا آمین‌ها) می‌باشند، درحالی که بتانین‌ها از اسید بتالامیک وسیکلو- دوپا (سیکلو-۳- (۳و۴ دی هیدروکسی فنیل آلانین) حاصل می‌گردند (Slavov *et al.* 2013). با توجه به اینکه توان آنتی‌اکسیدانی بتالائین‌ها در حد متوسط می‌باشد می‌توان عنوان کرد که افزایش این ترکیبات در چغندرقند تحت تأثیر اشعه فرابنفش علاوه بر حذف رادیکال‌های آزاد عملکرد دیگری همچون جذب پرتوهای ماورا بنفش را عهده‌دار باشد. اگرچه بتالائین‌ها از لحاظ ساختاری در ارتباط با آلکالوئیدها می‌باشند و گاهاً از آنها به‌عنوان کروموآلکالوئید یاد می‌شود (Goncalves *et al.* 2012) ولی این رنگیزه‌ها بر خلاف آلکالوئیدها هیچ اثر سمی در بدن موجودات زنده از جمله انسان ندارند. بلکه اثرات آنتی‌ویروسی و آنتی‌میکروبی این رنگیزه‌ها موجب شده است که چغندرقند به‌عنوان ماده غذایی واجد خواص درمانی مد نظر قرار گیرد (Delgado-Vargas *et al.* 2000).

نتیجه‌گیری

به عنوان نتیجه گیری کلی می‌توان گفت افزایش شدت پرتو فرابنفش B هرچند به عنوان یک معضل زیست محیطی مطرح می‌باشد ولی در گیاه چغندرقند موجب بالا رفتن میزان پارامترهای فیتوشیمیایی می‌گردد. افزایش تراز فلاونوئیدها، تانن‌ها و مجموعاً فنل کل از یک طرف و افزایش میزان رنگیزه‌های بتاگزانتین و بتانین در چغندرقند منجر به ارتقای توان آنتی‌اکسیدانی این گیاه می‌گردد که در این تحقیق مورد توجه قرار گرفت.

References: منابع مورد استفاده:

Barnes PW, Flint SD, Caldwell MM. Morphological responses of crop and weed species of different growth forms to ultraviolet-B radiation. American Journal of Botany. 1990; 77: 1354-1360.

Bieza K, Lois R. An *Arabidopsis* mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. Plant Physiology. 2001; 126: 1105-1115.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm Wiss Technology. 1995; 28:25-30.

Booji-James IS, Dube SK, Jansen MAK, Edelman M, Mattoo AK. Ultra violet-B radiation impacts light-mediated turnover of the photosystem II reaction center heterodimer in *Arabidopsis* mutant altered in phenolic metabolism. Plant Physiology. 2000; 124: 1275-1283.

Chang CC, Yang MH, Wen HM,Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by twocomplementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis. 2002; 10: 178-182.

Delgado- Vargas F, Jiménez AR, Paredes-LópezO. Natural pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains characteristics. Critical Reviews in Food Science and Nutrition.2000; 40(3):173-289.

Du Y, Jiang P, Wang B,Shi Y. Effects of ultraviolet-C irradiation on memberane lipid peroxidation and activity of PSII electron transport in Chloroplasts of *Taxus cuspidate* needles. The journal of applied ecology. 2003; 14: 1218-1222.

Golluce M, Sahin F, Sokmen M, Ozkan H, Daferera D, Sokmen A, PolissiouM, Adiguzel A,Ozkan H. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Menthalongifolia* L. ssp. Longifolia. FoodChemistry.2007; 103:1449-1456.

Goncalves LCP, De Souza Trassi MA, Lopes NB, Dorr FA, Dos Santos MT, Baader WJ, OliveiraJrVX. A comparativ study of the purification of betanin. Food Chemistry. 2012; 131: 231-238.

Harborne JB. Nature, distribution and function of plant flavonoids.Progress in Clinical and Biological Research. 1986; 213: 14-24.

Hatlestad GJ, Akhavan NA, Sunnadeniya RM, Elham L, Cargile S, Hembd AS, Gonzalez A, McGrath JM, Lioyd A. The beet Y locus encodes an anthocyanin MYB-like protein that activates the betalain red pigment pathway. Nature Genetics. 2015; 47: 92-96.

He J, Huang LK, Chow WS, Whitecross MI, Anderson JM. Chloroplast altrastructure changes in *Pisumsativum* associated with supplementary ultraviolet (UV-B) radiation. Plant, Cell & Environment.1994; 17: 771-775.

Jansen MAK, Noort REV, Tan MYA. Phenol oxidation peroxidass contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress. Plant Physiology. 2001; 126: 1012-1023.

Khan MI, Kumar A, Giridhar P. Betalains and expression of antioxidant enzymes during development and abiotic stress in *Rivinahumilis*L.berries. Turkish Journal of Botany. 2016; 40: 28-36.

Lidsey BE , Rivero L, Calhoun CS, Grotewold E, Brkljacic J. Standardized method for high-throughput sterilization of Arabidopsis seeds.Journal of Visualized Experiments. 2017;128: 56-87.

Liu LX, Xu SM, Woo KC. Solar UV-B -B radiation on growth, photosynthesis and the xanthophylls cycle in tropical acacias and eucalyptus. Environmental and Experimental Botany. 2005; 54: 121-130.

Lumsden P. Plants and UV-B -B: responses to environmental change. Cambridge University Press, NewYork.,1997; p. 339.

Mackerness SAH, John CF, Jordan B,Thomas B. Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. FEBS Letters. 2001; 489: 237-242.

Makkar HPS, Becker K. Behaviour of tannic acid from various commercial sources towards some chemical and protein precipitation assays, Journal of the Science of Food and Agriculture. 1993. 62:29–299.

Ormrod DP, Hale BA. Physiological responses of plants and crops to ultraviolet-B radiation stress. Air pollution. John wiley & sons. INC., 2000; P. 761.

Pavokovic D, Rusak G, Besendorfer V, Krsnik-Rasol M. Light- dependent betanin production by transformed cells of sugar beet. Food Technology and Biotechnology. 2009. 47 (2) 153–158.

Roe JH. The determination of sugar in blood and spinalfluid with anthrone reagent.The Journal of Biological Chemistry. 1955; 212: 335-343.

Ronald SF, Laima SK. Phenolicsand cold tolerance of *Brassica napus*. Plant Agriculture. 1999; 1: 1-5.

Santos I, Almeida JM, Salema R. Plants of *zea mays* L. developed under enhanced UV-B radiation. I. Some ultrastructural and biochemical aspects. Journal of Plant Physiology. 1993; 141: 450-456.

Santos I, Almeida J,Salmea R. The influence of UV-B radiation on the superoxide dismutase of maize, potato, sorghum, and wheat leaves. Canadian Journal of Botany. 1999. 77: 70-76.

Santos I, Filalgo F, Almeida JM, Salmea R. Biochemical and altrastructural changes in leaves of potato plants grown under supplementary UV-B radiation. Plant Science. 2004; 167: 925-935.

Slavov A, Karagyozov V, Denev P, Kratchanova M, Kratchanov C. Antioxidant activity of red beet juices obtained after microwave and thermal pretreatments. Czech Journal of Food Sciences. 2013; 31 (2): 139–147.

Stapleton AE, Walbot V. Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. Plant Physiology. 1994; 105: 881-889.

Stefanowska M, Kuras M, Kacperska A. Low temperature-induced modifications in cell ultrastructure and localization of phenolics in winter oilseed rape (*Brassica napus var. oleifera L.*) leaves. Annals of Botany. 2002; 90: 1-9.

Sturzoiu A,Stroescu M, Stoica A, Dobre T. Betanine extraction from *Beta vulgaris*- Experimental research and statistical modeling. UPB Scientific Bulletin. 2011; 73(1):145-156.