

## اثر اشعه گاما بر برخی از شاخص‌های فیزیولوژیکی و آنتی‌اکسیدانی گیاه درمنه کوهی (*Artemisia aucheri* Boiss)

شبمنم جلیلی<sup>۱</sup>، علی اکبر احسانپور<sup>۱\*</sup>، غلامرضا اصغری<sup>۲</sup> و محمد رضا عبدی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

<sup>۲</sup> اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، گروه فارماکولوژی

<sup>۳</sup> اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه فیزیک

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۲۷

### چکیده

در این پژوهش اثر پرتوهای گاما با میزان انرژی و قدرت نفوذ بالا مورد بررسی قرار گرفت، می‌توان بیان کرد که باعث ایجاد جهش زیان‌آور و همچنین سبب بیان ژنهای نهفته و ایجاد تنوعات ژنتیکی جدید مفید در گیاه مورد مطالعه شد. در نتیجه توانایی ایجاد گیاهی با پتانسیل بسیار بالای تولید متابولیت‌های ثانویه را داراست. در این مطالعه جوانه‌های جانبی گیاه پس از دو هفته رشد در محیط کشت MS در معرض سه دوز ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ گری پرتو گاما قرار داده شد و پس از چهار هفته رشد در شرایط کشت درون شیشه، فاکتورهای فیزیولوژیکی و عوامل آنتی‌اکسیدان اندازه‌گیری شد. طبق نتایج حاصل شده در این تحقیق، پرتو گاما سبب افزایش میزان وزن تر و خشک گیاهان گردید. میزان فنل کل در گیاهان و کالوس افزایش یافت که میزان آن در کالوس بیشتر از گیاه بود. میزان تانن‌های تغلیظ شده در گیاهان با تابش پرتو گاما کاهش یافت و در دوز ۱۰۰ گری به حداقل خود رسید. دزهای ۵۰ و ۱۰۰ گری اشعه گاما سبب افزایش و دوز ۲۰۰ گری باعث کاهش میزان فلاونوئید کل گیاهان گردید، همچنین از سوی دیگر پرتو گاما اثری بر میزان تانن‌های تغلیظ شده و فلاونوئید کل کالوس درمنه کوهی نداشت و اختلاف معنی‌داری بین هریک از تیمارها و نمونه شاهد مشاهده نشد. به طور کلی نتایج نشان داد با توجه به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی، گیاه توانایی لازم را برای مقابله با استرس اکسیداتیو و اثرات بیومولکولی اشعه گاما بدست آورده است.

واژه‌های کلیدی: درمنه کوهی، اشعه گاما، فنل کل، تانن‌های تغلیظ شده، فلاونوئید کل

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۱۱۳۵۵۲۰، پست الکترونیکی: ehsanpou@sci.ui.ac.ir

### مقدمه

بسیار زیاد است و توانایی ایجاد انواع جهش‌ها را در مولکول‌های مهم زیستی دارد (۳۴). مطالعه و بررسی کاربرد اشعه گاما به عنوان یک ترکیب موتاژن همراه با تکنیک کشت بافت می‌تواند به دانش بهره‌گیری از این فناوری در جهت تولید متابولیت‌های ثانویه و فراورده‌های مهم دارویی بیفزاید. گیاهان طیف وسیعی از ترکیبات آلی موسوم به متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند. این ترکیبات از بیوستز متابولیت‌های اولیه در مقادیر کمی

درمنه کوهی از خانواده Asteracea و طایفه Anthemedeae بوده و به‌عنوان گیاه غالب اجتماعات گیاهی در استپ‌های خشک و نیمه خشک مطرح می‌باشد (۲۶). یکی از موارد دارویی بسیار مهم این گیاه آرتیمیزینین است. اشعه گاما یکی از مهمترین موتاژن‌های فیزیکی با پرتوهای الکترومغناطیسی با طول موج کوتاه‌تر از اشعه X است، از این‌رو دارای انرژی بالایی می‌باشد و میزان نفوذ این پرتوها در مواد مختلف از جمله بافت‌های موجودات زنده

*Ocimum sanctum – Eruca sativa – Carum copticum* افزایش یافت (۱۸). فلاونوئیدها دومین گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه در گیاه آرتمیزیایا و همچنین گروهی از ترکیبات فنلی می‌باشند. این رنگیزه گیاهی سلول‌های گیاهان را در برابر تابش پرتو گاما محافظت می‌کند. فلاونوئیدها از سه حلقه A، B و C تشکیل شده‌اند (شامل ۱۵ کربن) که شامل دو حلقه آروماتیک (A و B) و یک پل سه کربنی (C) است که این پل سه کربنی دو حلقه آروماتیک را به هم متصل می‌نماید. آنزیم کلیدی مسیر سنتز، چالکون سنتاز (CHS) است (۳۵). آنالیزهای TLC در گیاه *Camel hay* که تحت تابش اشعه گاما با دزهای ۵، ۱۰ و ۱۵ کیلو گری قرار گرفته است، نشان داد که اشعه هیچ‌گونه اثری بر میزان فلاونوئیدها نداشته است (۱۵). در حالی که تابش اشعه گاما بر گیاه آرابیدوپسیس باعث افزایش این ترکیبات و تجمع آنها در بخش‌های هوایی گیاه شده است (۲۱). همچنین دوز ۲۰ گری اشعه گاما به طور مثبتی سبب افزایش فلاونوئیدهای کل در کالوس رزماری شد (۹). در گیاه *Sea buckthorn* تابش ۲۰ کیلو گری اشعه گاما سبب کاهش بسیار زیاد میزان فلاونوئیدها شد (۲۴) و تابش ۱۰-۳۰ گری اشعه گاما بر گیاهان رزماری، ریحان، کنگر فرنگی و شاهی آبی هیچ‌گونه اثری بر میزان فلاونوئیدها نداشت و اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (۲۰). هدف از این مطالعه بررسی اثرات مولکولی و استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط اشعه گاما بر فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی گیاه و کالوس درمنه کوهی می‌باشد.

### مواد و روشها

**تهیه و تکثیر گیاهان و کالوس:** در این مطالعه از گیاهان درمنه کوهی که قبلاً در شرایط کشت بافت در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشگاه اصفهان تهیه شده بود، استفاده شد. جوانه این گیاهان بر روی محیط کشت MS (۲۷) کشت داده شد. برای بررسی تابش اشعه گاما بر جوانه‌های

تولید می‌شوند و در بافت‌های خاص و یا در مراحل نموی خاص یافت می‌شوند. شرکت در واکنش‌های دفاعی گیاهان یکی از مهمترین نقش‌های فیزیولوژیک این ترکیبات می‌باشد. با تابش اشعه گاما بر گیاهان، مولکول‌هایی که بر سر راه تابش قرار گرفته‌اند با اشعه واکنش داده و در زمانی کمتر از  $10^{-10}$  ثانیه چندین مولکول برانگیخته شده، و تعدادی یون و رادیکال آزاد بسیار فعال در مسیر تابش به وجود می‌آید (۱۷ و ۲۱). بنابراین تولید گونه‌های اکسیژنی فعال سبب افزایش فعال شدن سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله ترکیبات فنلی که خود شامل تانن‌ها، فلاونوئیدها، لیگنین‌ها و ترکیبات فنلی ساده است، می‌شود (۱۹). فنل‌ها دارای یک حلقه آروماتیک با یک گروه هیدروکسیل بوده، آنها اساساً از سینامیک اسید و توسط آنزیم (*alanine ammonio lyase*) از فنیل آلانین سنتز می‌شوند که این آنزیم در نقطه انشعاب متابولیسم اولیه (شیکمیک اسید) و متابولیسم ثانویه (فنیل پروپانوئیدها) فعالیت می‌کند (۶). در آنالیزهای ترکیبات فنلی گیاه *Camel hay* میزان فنل با افزایش شدت تابش اشعه گاما افزایش یافت (۱۵). همچنین *Koseki* کاهش معنی‌داری را در میزان فنل کل در رزماری دهیدراته شده در دزهای ۱۰ تا ۳۰ کیلو گری اشعه گاما گزارش کرد (۲۰). تانن‌ها به طور طبیعی ترکیبات آلی هستند که اصولاً گلیکوزیدی بوده و ممکن است به عنوان مشتقات پلی‌هیدروکسی بنزوئیک اسید (پلی فنل‌ها) تعریف شوند. تانن‌های تغلیظ شده از واحدهای (+) کاتشین و (-) اپی‌کاتشین که مونومر متناوب یکدیگر می‌باشد، تشکیل شده و این واحدها از طریق پیوندهای کربن-کربن شکل گرفته‌اند (۱۹). در گیاه *Camel hay* و بادام زمینی دیده شد، با افزایش دوز تابش گاما مقدار تانن‌های تغلیظ شده کاهش یافت (۱۵). میزان تانن نمونه‌های تابش دیده در گیاهان *Morusnigra – Tagetespatula* – *Zizyphus nummularia - Bryophyllum* بدون تغییر باقی ماند، در حالی که این ترکیب در گیاهان اشعه دیده

مقطر به حجم  $500 \mu\text{l}$  رسانده شد. آنگاه به هریک از نمونه ها  $250 \mu\text{l}$  معرف فولین-سیکالتو (1N) اضافه گردید. سپس  $1/25 \text{ ml}$  محلول ۲۰ درصد سدیم کربنات افزوده و برای مخلوط شدن کامل ترکیبات آنها را ورتکس و در نهایت محتوای بدست آمده به مدت ۴۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت و بعد جذب نمونه‌ها در طول موج  $725 \text{ nm}$  نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر قرائت شد. با رسم منحنی استاندارد و با قرارگیری مقادیر بدست آمده در معادله خط، مقدار فنل‌های کل بر حسب (g/100g DW) گزارش گردید.

**اندازه‌گیری تانن‌های تغلیظ شده:** این اندازه‌گیری بر اساس روش بیان شده توسط Porter انجام شد (۲۹). به این منظور ابتدا  $100 \mu\text{l}$  از عصاره تهیه شده را با استفاده از استون ۷۰ درصد به حجم  $0.5 \text{ ml}$  رسانده شد. آنگاه  $3 \text{ ml}$  بوتانل-اسید کلریدریک با نسبت ۹۵ : ۵ و بعد  $0.1 \text{ ml}$  محلول فریک به هر یک افزوده و در نهایت مخلوط بدست آمده را ورتکس و به مدت ۶۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای  $55^\circ \text{C}$  قرار گرفت. جذب نمونه‌ها در طول موج  $550 \text{ nm}$  نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر قرائت و بر حسب (mg/g DW) بیان گردید.

**اندازه‌گیری فلاونوئید کل:** در ابتدا به  $100 \mu\text{l}$  از عصاره تهیه شده  $100 \mu\text{l}$   $\text{AlCl}_3$  ۲۰ درصد و ۲ قطره گلاسیال استیک اسید اضافه گردید و با استفاده از متانول به حجم  $1 \text{ cc}$  رسانده شد و بعد از ۴۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج  $415 \text{ nm}$  نانومتر قرائت شد. منحنی کالیبراسیون رسم و با قرارگیری مقادیر بدست آمده در معادله خط مقدار فلاونوئید‌های کل بر حسب (mg/g DW) محاسبه گردید (۳).

**آنالیزهای آماری:** اندازه‌گیری تمام شاخص‌های رشد بر اساس یک طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار برای هر آنالیز انجام گردید و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار spss و آزمون توکی استفاده شد.

جانبی گیاه و کالوس، با توجه به شرایط و امکانات و همچنین با توجه به استفاده محدود و گسترده‌ای از میزان تابش پرتوهای گاما به گیاهان مختلف توسط پژوهشگران، دزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ گری برای تابش انتخاب گردید. نمونه‌های مورد نظر به منظور تابش گاما به گروه انرژی هسته‌ای دانشگاه اصفهان منتقل شد و تحت تابش پرتو گاما با راکتور با منبع کبالت ۶۰ قرار گرفت. بر روی کالوس و گیاهان پرتو دیده پس از چهار هفته رشد وزن تر و خشک، میزان فنل تام، میزان فلاونوئید و مقدار تانن‌های تغلیظ شده اندازه‌گیری شد.

**اندازه‌گیری وزن تر و خشک:** وزن تر گیاهان پرتو دیده و نمونه شاهد، پس از چهار هفته رشد با خارج کردن گیاهان از محیط کشت و جدا کردن ریشه از بخش هوایی اندازه‌گیری شد. برای هر گروه تیمار سه تکرار محاسبه و میانگین بر حسب واحد گرم گزارش گردید. به منظور اندازه‌گیری وزن خشک اندام هوایی، پس از جدا کردن ریشه از بخش هوایی نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آون  $70^\circ \text{C}$  درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از خشک شدن نمونه‌ها، وزن خشک آنها اندازه‌گیری شد.

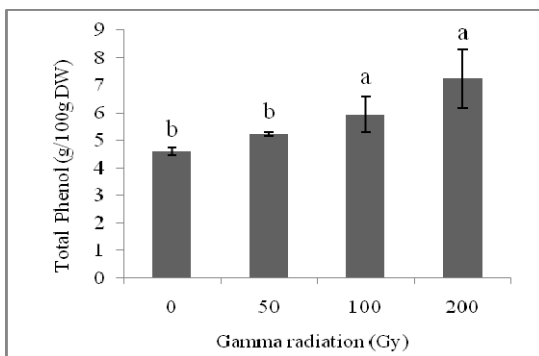
**بررسی میزان ترکیبات فنلی:** عصاره‌گیری:  $0.1 \text{ g}$  از هر یک از تیمارها را در هاون چینی ساییده، سپس  $10 \text{ ml}$  استون ۷۰ درصد به آن افزوده و برای ۲۰ دقیقه در زیر امواج اولتراسونیک  $300 \text{ W}$  در دستگاه سونیکاتور قرار داده شد. سپس نمونه‌ها برای ۱۰ دقیقه با  $3000$  دور در دقیقه در دمای  $4^\circ \text{C}$  سانتریفوژ و محلول رویی جمع‌آوری و در یخچال قرار گرفت تا آنالیزهای فنل کل، تانن تغلیظ شده و فلاونوئید کل توسط این عصاره انجام شود (۲۳).

**اندازه‌گیری فنل‌های کل:** تعیین مقدار ترکیبات فنلی با استفاده از روش فولین-سیکالتو (Folin-ciocalteu) انجام شد (۲۳). ابتدا  $50 \mu\text{l}$  از عصاره تهیه شده را با آب

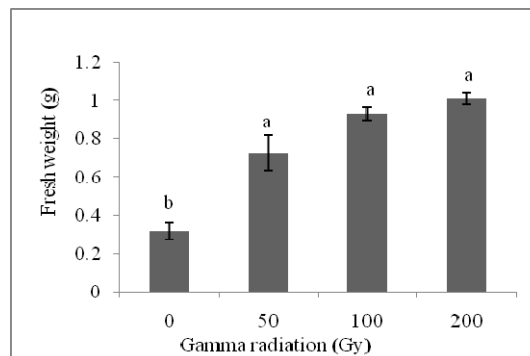
## نتایج

اثر اشعه گاما بر وزن تر و خشک گیاهان درمنه کوهی: پس از چهار هفته رشد گیاهان درمنه کوهی وزن تر و خشک هر یک از نمونه‌های پرتو دیده در مقایسه با نمونه شاهد اندازه‌گیری شد. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، پرتو گاما سبب افزایش وزن تر گیاهان پرتو دیده در هر سه دوز ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ گری گردید و اختلاف معنی‌داری بین نمونه شاهد و نمونه‌های پرتو دیده وجود نداشت. همچنین با توجه به شکل ۲ وزن خشک گیاهان با تابش اشعه گاما در دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ گری افزایش یافت.

گاما سبب افزایش مقدار فنل کل در دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ گری نسبت به نمونه شاهد شد. اما دوز ۵۰ گری تفاوت معنی‌داری با نمونه شاهد نشان نداد. همچنین با اندازه‌گیری مقادیر ترکیبات فنلی در کالوس درمنه پس از چهار هفته رشد که در شکل ۴ نشان داده شده است، در کالوس‌های تابش دیده در پاسخ به اثرات ناشی از تابش پرتو گاما افزایش ترکیبات فنلی در هر سه دوز رخ داد. به گونه‌ای که اختلاف معنی‌داری بین نمونه شاهد و تیمارها وجود داشت، اما از طرف دیگر تفاوت معنی‌داری میان دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ گری مشاهده نشد.

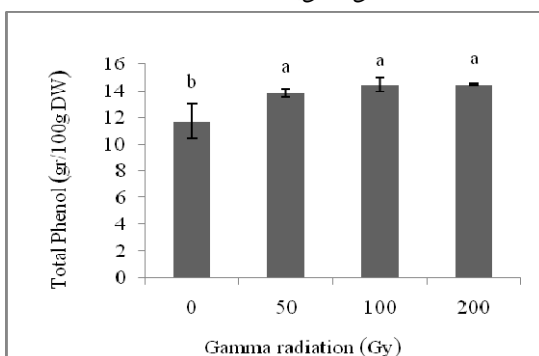


شکل ۳- تأثیر اشعه گاما بر میزان ترکیبات فنلی گیاهان درمنه کوهی داده‌ها میانگین ۳ تکرار  $\pm$  SD است. حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد ( $P \leq 0.05$ ).



شکل ۱- تأثیر اشعه گاما بر وزن تر گیاهان درمنه کوهی

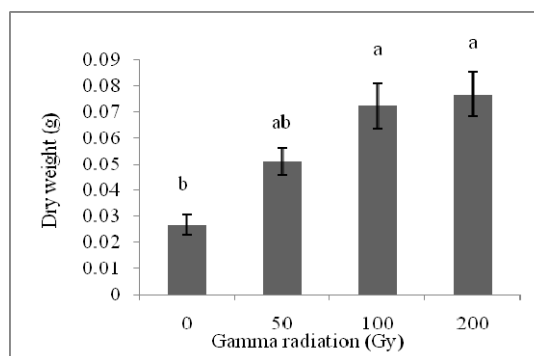
داده‌ها میانگین ۳ تکرار  $\pm$  SD است. حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد ( $P \leq 0.05$ ).



شکل ۴- تأثیر اشعه گاما بر میزان ترکیبات فنلی کالوس

داده‌ها میانگین ۳ تکرار  $\pm$  SD است. حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد ( $P \leq 0.05$ ).

تأثیر اشعه گاما بر تانن‌های تغلیظ شده گیاهان و کالوس درمنه کوهی: پس از چهار هفته رشد هر یک از نمونه‌ها و ضمن بررسی اثرات پرتوهای گاما بر میزان تانن‌های

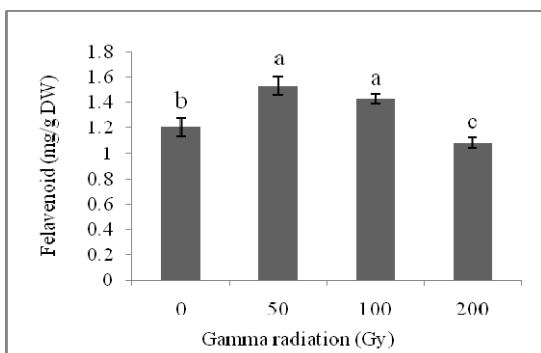


شکل ۲- تأثیر اشعه گاما بر وزن خشک گیاهان درمنه کوهی

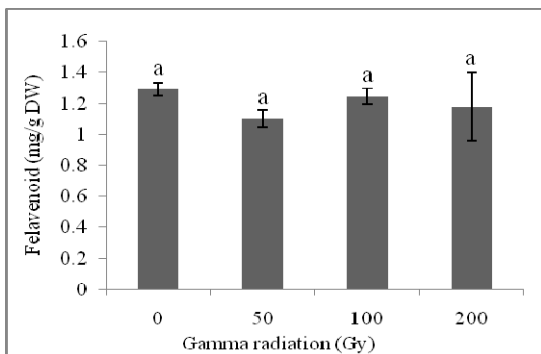
داده‌ها میانگین ۳ تکرار  $\pm$  SD است. حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد ( $P \leq 0.05$ ).

تأثیر اشعه گاما بر فنل کل گیاهان درمنه کوهی و کالوس: ضمن بررسی اثر اشعه گاما بر میزان ترکیبات فنلی گیاهان درمنه کوهی که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، پرتو

تأثیر اشعه گاما بر فلاونوئید کل گیاهان درمنه کوهی و کالوس: با تابش سه دوز اشعه گاما و پس از چهار هفته رشد میزان فلاونوئید کل اندازه‌گیری شد. با توجه به شکل ۷ اختلاف معنی‌داری بین نمونه شاهد و هر یک از تیمارها مشاهده شد. مقدار فلاونوئید کل در دوز ۵۰ و ۱۰۰ گری نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت، از طرفی در دوز ۲۰۰ گری میزان این ترکیب کاهش یافته است. به منظور بررسی اثر اشعه گاما بر مقادیر فلاونوئید کل در کالوس پرتو دیده با توجه به شکل ۸ اختلاف معنی‌داری بین هر یک از نمونه‌ها مشاهده نشد، بنابراین تابش پرتو گاما اثری بر میزان فلاونوئید کل کالوس نداشته است.



شکل ۷- تأثیر اشعه گاما بر میزان کل فلاونوئید گیاهان درمنه کوهی داده‌ها میانگین ۳ تکرار  $\pm$  SD است. حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد ( $P \leq 0.05$ ).

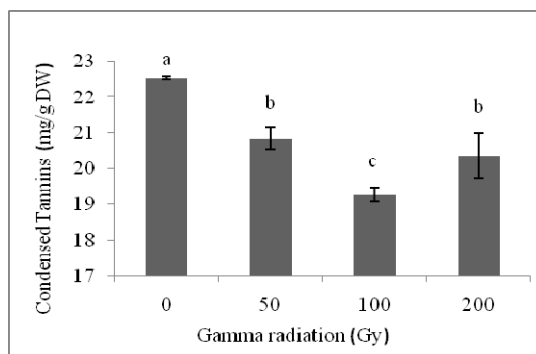


شکل ۸- تأثیر اشعه گاما بر میزان کل فلاونوئید کالوس داده‌ها میانگین ۳ تکرار  $\pm$  SD است. حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد ( $P \leq 0.05$ ).

### بحث

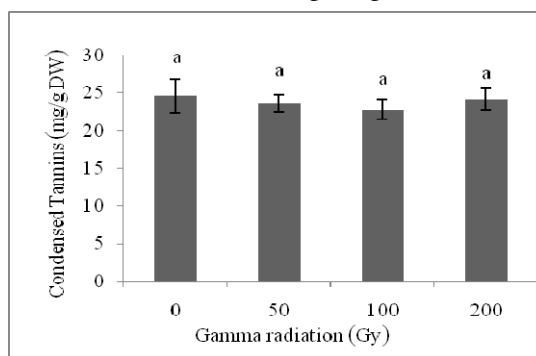
تأثیر اشعه گاما بر وزن تر و خشک گیاهان درمنه کوهی:

تغلیظ شده گیاهان با توجه به شکل ۵ تفاوت معنی‌داری بین نمونه شاهد و هر یک از تیمارها دیده شد. میزان این ترکیب در هر سه دوز ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ گری کاهش یافت و بیشترین میزان کاهش ترکیبات تانن‌های تغلیظ شده در دوز ۱۰۰ گری بود. اندازه‌گیری تانن‌های تغلیظ شده در کالوس بیانگر عدم تغییر در میزان این ترکیبات بود و نمونه شاهد در مقایسه با تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت، همچنین دزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ گری اشعه گاما نیز اختلاف معنی‌داری را با یکدیگر نشان نداد. از این رو با توجه به شکل ۶ به نظر می‌رسد تابش اشعه گاما اثری بر مقادیر تانن‌های تغلیظ شده کالوس درمنه کوهی نداشته است.



شکل ۵- تأثیر اشعه گاما بر میزان تانن‌های تغلیظ شده گیاهان درمنه کوهی

داده‌ها میانگین ۳ تکرار  $\pm$  SD است. حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد ( $P \leq 0.05$ ).



شکل ۶- تأثیر اشعه گاما بر میزان تانن‌های تغلیظ شده کالوس

داده‌ها میانگین ۳ تکرار  $\pm$  std است. حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد ( $P \leq 0.05$ ).

سرریزتر هگزوزهای فسفات‌ها برای متابولیسم در مسیرهای تولید انرژی و سنتز مواد مورد نیاز مؤثر باشد. از این رو به نظر می‌رسد که شاید پرتوهای گاما توانایی ایجاد انواع جهش و سایر تغییرات را در سلول‌ها داشته باشند. احتمالاً ژنهای بسیار زیادی وجود دارند که تقسیم سلولی و رشد سلول و سایر فرایندهای وابسته به آنها را کنترل می‌نمایند. بنابراین احتمال ایجاد جهش مطلوب در سلول در جهت افزایش رشد و تقسیم سلولی غیر ممکن نمی‌باشد که در نتیجه آن سبب افزایش وزن تر و خشک شده است.

**تأثیر اشعه گاما بر میزان فنل‌های کل گیاهان و کالوس درمنه کوهی:** در نتیجه استرس اکسیداتیو وارد شده توسط اشعه گاما، سنتز ترکیبات فنلی حاوی آنتی‌اکسیدان انجام شد. این افزایش مشاهده شده در میزان این ترکیبات به دلایل متعددی امکان‌پذیر می‌باشد. احتمالاً فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیا‌لاز (PAL) که مسئول سنتز ترکیبات فنلی است و اسید آمینه فنیل‌آلانین را به سینامیک اسید تبدیل می‌کند در برابر اشعه گاما افزایش یافته است. بنابراین وجود یک همبستگی مثبت بین شدت تابش و فعالیت آنزیم PAL سبب افزایش میزان فنل‌ها شده است (۱۱). از طرف دیگر احتمالاً تابش اشعه گاما و فرایندهای پیاپی اکسیداسیون سبب تجزیه ترکیبات فنلی بزرگتر به ترکیبات فنلی محلول با وزن مولکولی کمتر شده است و شاید اشعه گاما بتواند سبب تجزیه گلیکوزیدها و آزاد شدن ترکیبات فنلی از اجزای گلیکوزیدی شده باشد (۱۱ و ۳۲). زیرا تابش گاما دارای اثرات مستقیم و غیرمستقیم می‌باشد، که توسط مکانیسم غیرمستقیم یعنی رادیولیز آب باعث تولید رادیکال‌های آزاد مانند پراکسیل و هیدرو پراکسید می‌شود (۱۷). بنابراین احتمالاً این رادیکال‌ها با شکستن پیوندهای گلیکوزیدی میزان فنل‌ها را افزایش داده است (۵). بافت کالوس با توجه به گونه گیاهی ممکن است از نظر ساختمانی و چگونگی رشد با یکدیگر متفاوت باشد. در کالوس درمنه کوهی احتمالاً مقادیر زیادی لیگنین وجود دارد و همین امر یکی از دلایل سخت شدن کالوس

به دنبال افزایش وزن تر و وزن خشک در گیاهان تابش دیده، به نظر می‌رسد این افزایش رشد در سلول‌های جوان مرستمی در حال تقسیم به احتمال زیاد به دلیل افزایش تقسیم سلولی می‌باشد (۲۸ و ۴). البته افزایش رشد و افزایش تقسیم سلولی گیاهان تابش دیده ممکن است به دلیل تغییر درون سلولی میزان نسبت سیتوکینین به اکسین باشد. با توجه به این مسئله که هورمون سیتوکینین در تقسیم سلولی نقش مهمی دارد. این هورمون در چرخه سلولی روی مرحله گذر  $G_1$  به  $S$  و  $G_2$  به  $M$  و پیشرفت کامل فاز  $S$  اثرگذار است (۹). البته اکسین نیز تا حدودی بر روی تقسیم سلولی مؤثر می‌باشد. در سلول‌های گیاهی باید نسبت مناسبی از این دو هورمون در سلول برقرار گردد تا سلول‌ها تقسیم شوند. یک عامل فیزیولوژیک مهم در رشد گیاهان مقدار اکسین است. شواهدی وجود دارد که به دنبال تابش، مقدار اکسین کاهش می‌یابد. گوردون بیان کرد که با تابش پرتو گاما کاهش کلی اکسین به قدری زیاد است که نمی‌توان تنها اکسایش مولکول اکسین را دلیل آن دانست و به نظر می‌رسد که این اثر نتیجه تخریب آنزیم‌های اکسین باشد. سیستم آنزیمی که ایندول استال‌دئید را به ایندول استیک اسید اکسید می‌کند بلوکه می‌شود (۱۳). بنابراین در گیاهان اشعه دیده درمنه کوهی احتمالاً با افزایش سنتز سیتوکینین و یا کاهش سنتز اکسین در اثر تابش پرتوهای گاما تعادل مناسبتری میان مقدار اکسین و سیتوکینین درون سلولی در سلول‌های تابش دیده در مقایسه با سلول‌های تابش ندیده برقرار شد، در نتیجه تقسیم سلولی و رشد افزایش یافت. افزایش مقدار و یا فعالیت آنزیم‌ها و سایر مواد سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها در اثر پرتو ممکن است دلیل دیگری در افزایش رشد و تقسیم سلولی باشد (۳۳ و ۳). احتمالاً افزایش میزان انرژی سلول در اثر پرتو گاما می‌تواند دلیل دیگری بر افزایش رشد و تقسیم سلولی باشد. بنابراین به نظر می‌رسد افزایش ATP می‌تواند باعث افزایش سنتز بسیاری از مواد مورد نیاز برای سنتز و همچنین در تولید بیشتر و

بلوکه و فیدبک شده، و چون کالوس تمایز نیافته دارای واکنش بزرگ مرکزی به جهت ذخیره سازی تانن نمی باشد، بنابراین به نظر می رسد که بیوستنز و تجمع این متابولیت ثانویه وابسته به تمایز سلولی است (۱۰) و (۲۲). در این صورت سیستم های تنظیمی و آنزیم های تولید کننده، سیگنالی مبنی بر تابش اشعه گاما دریافت نمی کنند. در نتیجه میزان این ترکیبات در کالوس ثابت باقی ماند، زیرا کالوس توانایی بیشتری برای سنتز این متابولیت ثانویه نداشته است.

**تأثیر اشعه گاما بر میزان فلاونوئید کل گیاهان و کالوس درمنه کوهی:** طبق نتایج بدست آمده در این پژوهش دُزهای ۵۰ و ۱۰۰ گری اشعه گاما سبب افزایش فلاونوئید کل شد اما در دوز ۲۰۰ گری مقدار این ترکیب کاهش پیدا کرده است. به نظر می رسد که در دوز ۵۰ و ۱۰۰ گری فلاونوئیدها از طریق ۱- جاروب کردن انواع اکسیژن های واکنش گر ۲- با شکستن واکنش های زنجیره ای رادیکالی از پراکسیدیشن لیپیدها جلوگیری می کنند (۲۵). فلاونوئید از طریق جلوگیری از سنتز و شکل گیری MDA باعث پایداری غشاء و نفوذپذیری غشاء در نمونه های تابش دیده می شود (۳۱). در واقع افزایش بیوستنز فلاونوئیدها تحت فاکتورهای محیطی مختلف و شرایط تنش زا نوعی سازش با شرایط نامساعد محیطی می باشد (۱۲). یکی از دلایل افزایش بیوستنز این متابولیت ثانویه احتمالاً به علت افزایش مقادیر آمینواسید فنیل آلانین و همچنین افزایش فعالیت آنزیم PAL می باشد (۱۱). بنابراین به نظر می رسد که با تابش اشعه گاما به عنوان یک سیگنال محیطی آنزیم DAHP synthase فعال شود و افزایش بیان ژن در پاسخ به این تغییرات محیطی انجام شود و در نهایت سبب افزایش فعالیت آنزیم کلیدی مسیر بیوستنز فنل ها یعنی فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) شود، نتیجه افزایش فعالیت این آنزیم موجب سنتز فلاونوئید بیشتر در پاسخ به تابش گاما می باشد (۱۲). آنزیم مهم دیگری که بیوستنز فلاونوئیدها را از دیگر ترکیبات فنلی جدا می کند چالکون سنتتاز می باشد،

می باشد. طبق عوامل ذکر شده در بالا، گیاهان و کالوس تابش دیده برای مقابله با آسیب ها و رادیکال های آزاد تولید شده و رخ داد پی در پی واکنش های اکسیداسیون، با توجه به خاصیت آنتی اکسیدانی فنل ها و با جاروب کردن انواع ROS ها و افزایش فعالیت سیستم دفاعی، گیاه را در برابر استرس اکسیداتیو و اثرات بیومولکولی اشعه گاما حفظ می کند.

**تأثیر اشعه گاما بر میزان تانن های تغلیظ شده گیاهان و کالوس درمنه کوهی:** با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق، میزان تانن های تغلیظ شده در هر سه دوز ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ گری نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت و بیشترین کاهش در دوز ۱۰۰ گری رخ داده است. احتمالاً از عوامل این کاهش، تجزیه شیمیایی تانن ها توسط رادیکال های آزاد می باشد و این کاهش می تواند سبب افزایش فنل کل شود. مطالعات نشان داده است که با تابش اشعه بر تانن های تغلیظ شده، این ترکیبات به واحد های کوچکتری تقسیم می شوند (۷ و ۴). نتیجه این شکست تشکیل مولکول های کوچکتر با ترکیب شیمیایی شبیه به مولکول اصلی ولی با قابلیت و کارایی متفاوت است (۱۷). در نتیجه با تابش اشعه گاما بر گیاهان میزان این متابولیت ثانویه کاهش یافته است. ضمن بررسی اثر اشعه گاما بر کالوس درمنه در واقع می توان بیان کرد که اشعه گاما اثری بر میزان تانن حتی در شدت بالای تابش نداشته است. با توجه به محدودیتی که در اندازه گیری آنزیم های آنتی اکسیدان در این پژوهش وجود داشت، اما این احتمال وجود دارد که با افزایش فعالیت آنزیم های SOD، APX، GR و CAT که دارای خاصیت آنتی اکسیدان می باشند و یا با فعال کردن سومین خط دفاعی گیاه یعنی آنزیم هایی که برای ترمیم آسیب های DNA، پروتئین، لیپید و آسیب های بیومولکولی و همچنین تجدید ساخت غشاهای سلولی آسیب دیده به کار می روند (۱۴)، اثر حفاظتی خود را القاء کند. اگر تانن پس از سنتز به محل ذخیره خود که واکنش بزرگ مرکزی می باشد انتقال پیدا نکند سنتز آن

داشته است اما به دلیل محدودیت و کمبودی که در تعداد کلروپلاست‌ها در سلول‌های تمایز یافته می‌باشد به دنبال تابش گاما قادر به سنتز بیشتر فلاونوئید نبوده است. احتمالاً در سلول‌های در حال تقسیم کالوس به دلیل فعال بودن سیستم آنزیمی ترمیمی سلول‌ها توان بیشتری برای ترمیم آسیب‌های ایجاد شده در مولکول DNA را خواهند داشت (۳۰). دلایل ذکر شده در بالا که نشان‌دهنده مقاومت بالای بافت کالوس در برابر اشعه گاما می‌باشد باعث شد که حتی این بافت با عدم تغییر میزان فلاونوئید کل بتواند سلول‌ها را در برابر تابش گاما حفظ کند، در نتیجه به رشد و حیات خود ادامه دهد.

### نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش، تابش دزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ گری پرتو گاما با تولید رادیکال‌های آزاد به عنوان یک سیگنال عمل کرده که سبب فعال‌سازی سیستم‌های دفاعی و عوامل آنتی‌اکسیدان شده است. با توجه به نتایج بدست آمده میزان فنل کل در گیاه و کالوس افزایش یافت. از این‌رو میزان فلاونوئید کل در گیاه افزایش و مقدار تانن‌های تغلیظ شده کاهش یافت. بنابراین با افزایش فعالیت سیستم دفاعی و ترمیم آسیب‌های ناشی از تابش گاما و حفظ قدرت زیست سلول‌ها در برابر اثرات مخرب اشعه گاما گیاه توانست به حیات خود ادامه دهد.

احتمالاً به نظر می‌رسد فعالیت این آنزیم تحت تأثیر تابش اشعه گاما افزایش یافته، در نتیجه سبب افزایش بیوسنتز فلاونوئید به عنوان یک عامل دفاعی گردد (۸). اما از طرف دیگر در گیاه درمنه کوهی که تحت تابش اشعه گاما با دوز ۲۰۰ گری قرار گرفته بود، کاهش نسبت به دوز ۵۰، ۱۰۰ گری و نمونه شاهد نشان داد. احتمالاً کاهش فلاونوئید می‌تواند به علت کاهش فعالیت آنزیم‌های مهمی مانند PAL و CHS باشد و یا شاید به علت ایجاد جهش ژنتیکی یا اپی‌ژنتیکی باشد. پرتوهای گاما توانایی ایجاد انواع جهش و سایر تغییرات را در سلول‌ها دارند. بنابراین احتمال ایجاد جهش نامطلوب ممکن است. زیرا در دزهای بالای اشعه گاما شانس موتاسیون بسیار افزایش یافته و جهش ایجاد شده سبب کاهش میزان این ترکیب شده است. طبق نتایج به دست آمده دزهای متفاوت اشعه گاما اثری بر میزان فلاونوئید کل کالوس نداشته است. در مورد بیوسنتز آمینواسید فنیل آلانین مدارکی وجود دارد مبنی بر اینکه آنزیم‌های بیوسنتزی این آمینواسید آروماتیک از جمله کوریزمات موتاز در کلروپلاست وجود دارد (۶) و بیوسنتز فلاونوئید کاملاً به مقادیر این آمینواسید وابسته است. احتمالاً کالوس‌هایی که هنگام عدم تمایز در مراحل رشدی خود بودند با قرار گرفتن در معرض نور، تعدادی از سلول‌های آنها تمایز یافت و به این ترتیب قادر به بیوسنتز کلروپلاست شده است. بنابراین توانایی سنتز فلاونوئید را

### منابع

- ۱- رضانزاد ف، طراحی ر. ۱۳۹۲. اثر نور و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و تجمع آنتوسیانین در کالوس‌های حاصل از جداکشت‌های مختلف در رز گالیگا (*gallica L.* (Rosa) مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۶(۲): ۱۸۴-۱۹۵.
- ۲- شرفی ع، هاشمی سهی ه، جورابچی ع. ۱۳۸۷. بهینه‌سازی شرایط باززایی گیاه دارویی *Artemisia annua*. مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۱(۴): ۵۷۳-۵۶۵.
- 3- Abdel-Hamed, E.S. and Sayed, S., 2009, Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples. *Food Chemistry*. 114: 1271-1277.
- 4- Bogs, J., Downey, M., Harvey, J., Ashton, A., Tanner, G. J. and Robinson, s., 2005, Proanthocyanidin synthesis and expression of encoding leucc 'oanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiology*. 139: 652-663.
- 5- Bo Lee, M., Yoen Kim, D., Bae Jeon, W., Jeong Hong, M., Jin Lee, Y., Bold, o., Jang, J., Jeong Kim, Y., Yong Kang, S., Sub Kim, D., Baekkim, J., Buhm Chun, J. and Weonseo, Y., 2013, Effect of gamma radiation on growth and lignin content in *Brachypodium distachyon*. *Journal Crop Science Biotech*. 16: 105-110.



- 6- Buchanan, B., Gruissem, W. and Jones, R. L., 2000, Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. 1367 Page.
- 7- Costa de Camargo, A., Ferreira de souzaviera, T. M., Aparecida, M., Calori Domingues, M. A. and Canniatti-Brazaca, S. G., 2012, Gamma radiation effects on peanut skin antioxidants. International Journal of Molecular Sciences. 13: 3073-3084.
- 8- Dao, T. T. H., Linthorst, H. J. H., Verpoorte, R. V., 2011, Chalcon synthase and its functions in plant resistance. Phytochemical Review. 10: 397-412.
- 9- Dewitte, W. and Murray, J. A. H., 2003, The plant cell cycle. Annual Review of Plant Biology. 54: 235-264.
- 10- Downey, M., 2010, Tannin management in the vineyard. Grape and Wine Research and Development corporation. Fact Sheet.
- 11- El-Beltagi, H., Ahmed, O. K. and El-Desouky, W., 2011, Effect of low dose gamma radiation on oxidative stress and secondary metabolites production of rosemary (*Rosmarinum officinalis L.*) callus culture. Radiation Physics and chemistry. 80: 968-976.
- 12- Fini, A., Brunetti, C., Ferdinande, M., Ferrini, F. and Tattini, M., 2011, Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plant. Plant Signaling and Behavior. 6: 709-711.
- 13- Gordons, S. A., 1957, The effects of ionizing radiation on plant: biochemical and physiological aspects. The Quarterly Review of Biology. 32: 3-14.
- 14- Gupta, V. K. and Sharma, S. K., 2006, Plant as a natural antioxidant. Natural Product Radiance. 5: 326-334.
- 15- Hala Ahmed Abdolla, M., Eltayeb Elhag, A., Gamma Abdelgadir, M. O., Hiba Abdelrahman, A. and Jutta, L. M., 2010, Microbial load and phytochemicals stability of Camel hay (*Cymbopogon schoenanthus L.*) leaves as affected by gamma irradiation. Agriculture Journal. 1: 662-670.
- 16- Harrison, K. and Were, L. M., 2007, Effect of gamma irradiation on total phenolic content yield and antioxidant capacity of Almond Skin extracts. Food Chemistry. 102: 932-937.
- 17- Kasart, A. P., Didevar, F. and Raei, M., 1989, Principles of radiation biology. Center for Academic Publication. 150 pages.
- 18- Khattak, K. F., 2013, Proximate composition, phytochemical profile and free radical scavenging activity of radiation processed *Emblica officinalis*. International Food Research Journal. 20: 1125-1131.
- 19- Korkina, L. G., 2007, Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants from plant defence to human health. Cellular and Molecular Biology. 53: 15-25.
- 20- Koseki, P. M., Villavicencio, A. L. C. H., Brito, M. S., Nahme, L. C., Sebastiao, K. I. and Rela, P. R., 2002, Effect of irradiation in medicinal and eatable herbs. Radiation Physics Chemistry. 63: 681-684.
- 21- Kovacs, E. and Keresztes, A., 2002, Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. Micron. 33: 199-210.
- 22- Larkin, P. J., Tanner, G. J., Joseph, R. G. and Kelman, W. M., 2006, Modifying condensed tannin content in plants. Plant Breeding and Animal Effects. 8: 167-178.
- 23- Makkar, H.P.S., Siddhuraju, P. and Becker, K., 2007, Plant Secondary Metabolites (Methods in Molecular Biology). Series volume number 393, Humana Press, New Jersey. 130 page
- 24- Minea, R., Nemtanu, M. R., Manea, S. and Mazila, E., 2007, Use of electron beam irradiation to improve the microbiological safety of *Hippophae rhamnoides*. Instrum Methods Physics Research. 58: 792-794.
- 25- Moghadam, S. S., Jaafar, H., Ibrahim, R., Rahmat, A., Abdul Aziz, M. and Philip, E., 2011, Effect of acute gamma irradiation on physiological traits and flavonoid accumulation of *Centella asiatica*. Molecules. 16: 4994-5007.
- 26- Mozafarian, V. A., 2004, The culture of the Iranian plant name. 2<sup>th</sup> Ed. Iran: Contemporary culture company.
- 27- Murashige, T. and Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bio assay with *Tobacco* tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.
- 28- Nagata, T., Todoriki, S., Hayashi, T., Shiba, Y., Mori, M., Kanegae, H. and Kikuchi, S., 1999, Gamma radiation induced leaf trichome formation in *Arabidopsis*. Plant Physiology. 120: 113-119.
- 29- Porter, L. J., Hrtiseh, L. N., Chan, B. C., 1986, The conversion of procyanidins and

- prodelphinidins to cyaniding and delphinidin. *Phytochemistry*. 25: 223-230.
- 30- Preuss, S. B. and Britt, A. B., 2003, A DNA-Damage-Induced cell cycle checkpoint in *Arabidopsis*. *Genetics Society of America*. 164: 323-334.
- 31- Seddik, K., Nadjat, I., Abderrahmane, B., Daoud, H., and Lekhmici, A., 2010, Antioxidant and antibacterial activities of extracts from *Artemisia herba alba* Asso. Leaves and some phenolic compounds. *Journal of Medicinal Plant Research*. 4: 1273-1280
- 32- Variyar, P. S., Limaye, A. and Sharma, A., 2004, Radiation induced enhancement of antioxidant content of soybean (*Glycinemax Merrill*). *Journal Agriculture Food Chemistry*. 52: 3385-3888.
- 33- Wi, S. G., Chung, B. Y., Kim, J. S., Kim, J. H., Beak, M. H., Lee, J. W. and Kim, Y. S., 2007, Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plant. *Micron*. 38: 553-564.
- 34- Wiley J, Sons A., 1995, Turner, atoms, radiation, and radiation protection. *International Journal of Radiation*, 9: 46-87.
- 35- Winkel-Shirley, B., 2002, Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Physiology and metabolism*. 5: 218-223.

## Effect of Gamma radiation on physiological and antioxidant factors of *Artemisia aucheri* Boiss

Jalili Sh.<sup>1</sup>, Ehsanpour A.A.<sup>1</sup>, Asghary Gh.R.<sup>2</sup> and Abdi M.R.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Biology Dept., Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Pharmaceutical Science Dept., Isfahan University of Medicine, Isfahan, I.R. of Iran

<sup>3</sup> Physics Dept., Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran

### Abstract

In this study, the gamma rays with high energy was investigated. This radiation can cause gene expression and genetic variation and induce undesirable recessive genes and useful trait. Consequently is able to produce plants with high potential for secondary metabolite production. Auxillary buds from *Artemisia aucheri* Boiss grown in MS medium after two weeks were exposed to 50, 100 and 200 Gy and were then grown *in vitro* culture. Then physiologic and antioxidant factors measured after four weeks. Dry and fresh weight increased with gamma rays. Total phenolic increased in radiated plants and calli. The amount of condensed tannins in plant was decreased in 50 and 100 while was increased in 200 Gy. Amount of condensed tannins in callus didn't display difference between control and treated samples. Total flavonoid in plant significantly was increased in 50, 100 Gy and was decreased in 200 Gy.

**Key words** : *Artemisia aucheri* Boiss, Gamma rays, Total phenol, Condensed tannins, Total flavonoid.