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

شبنم جلیلی[۱]، علی اکبر احسانپور[۱*]، غلامرضا اصغری[۲] و محمد رضا عبدی[۳]

[۱] اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

[۲]اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، گروه فارماکوگنوزی

[۳]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. دُزهای 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

درمنه کوهی از خانواده Asteracea و طایفه Anthemedeae بوده و به‌عنوان گیاه غالب اجتماعات گیاهی در استپ‌های خشک و نیمه خشک مطرح می باشد (۲۶). یکی از موارد دارویی بسیار مهم این گیاه آرتمیزینین است. اشعه گاما یکی از مهمترین موتاژن های فیزیکی با پرتوهای الکترومغناطیسی با طول موج کوتاه‌تر از اشعه X است، از این‌رو دارای انرژی بالایی می باشد و میزان نفوذ این پرتوها در مواد مختلف از جمله بافت های موجودات زنده بسیار زیاد است و توانایی ایجاد انواع جهش ها را در مولکول های مهم زیستی دارد (۳۴). مطالعه و بررسی کاربرد اشعه گاما به عنوان یک ترکیب موتاژن همراه با تکنیک کشت بافت می تواند به دانش بهره گیری از این فناوری در جهت تولید متابولیت های ثانویه و فراورده های مهم دارویی بیفزاید. گیاهان طیف وسیعی از ترکیبات آلی موسوم به متابولیت های ثانویه را تولید می کنند. این ترکیبات از بیوسنتز متابولیت های اولیه در مقادیر کمی

تولید می شوند و در بافت های خاص و یا در مراحل نموی خاص یافت می شوند. شرکت در واکنش های دفاعی گیاهان یکی از مهمترین نقش های فیزیولوژیک این ترکیبات می باشد. با تابش اشعه گاما بر گیاهان، مولکولهایی که بر سر راه تابش قرار گرفته اند با اشعه واکنش داده و در زمانی کمتر از $۱۰^{-۱۰}$ ثانیه چندین مولکول برانگیخته شده، و تعدادی یون و رادیکال آزاد بسیار فعال در مسیر تابش به وجود می آید (۱۷ و ۲۱). بنابراین تولید گونه های اکسیژنی فعال سبب افزایش فعال شدن سیستم های آنتی اکسیدانی از جمله ترکیبات فنلی که خود شامل تانن ها، فلاونوئیدها، لیگنین ها و ترکیبات فنلی ساده است، می شود (۱۹). فنل ها دارای یک حلقه آروماتیک با یک گروه هیدروکسیل بوده، آنها اساسا" از سینامیک اسید و توسط آنزیم (alanine ammonio lyase Phenyl PAL) از فنیل آلانین سنتز می شوند که این آنزیم در نقطه انشعاب متابولیسم اولیه (شیکمیک اسید) و متابولیسم ثانویه (فنیل پروپانوئیدها) فعالیت می کند (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 دُزهای ۱۰ تا۳۰ کیلو گری اشعه گاما گزارش کرد (۲۰). تانن ها به طور طبیعی ترکیبات آلی هستند که اصولاً گلیکوزیدی بوده و ممکن است به عنوان مشتقات پلی هیدروکسی بنزوئیک اسید (پلی فنل ها) تعریف شوند. تانن های تغلیظ شده از واحدهای (+) کاتشین و (–) اپی‌کاتشین که مونومر متناوب یکدیگر می باشد، 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 تانن های تغلیظ شده کاهش یافت (۱۵). میزان تانن نمونه های تابش دیده در گیاهان *Morusnigra – Tagetespatula – Zizyphus nummularia - Bryophyllum* بدون تغییر باقی ماند، در حالی که این ترکیب در گیاهان اشعه دیده *Ocimum sanctum – Eruca sativa – Carum copticum* افزایش یافت (۱۸). فلاونوئیدها دومین گروه بزرگی از متابولیت های ثانویه در گیاه آرتمیزیا و همچنین گروهی از ترکیبات فنلی می باشند. این رنگیزه گیاهی سلول های گیاهان را در برابر تابش پرتو گاما محافظت می کند. 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 می نماید. 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 هیچ گونه اثری بر میزان فلاونوئیدها نداشته است (۱۵). در حالی که تابش اشعه گاما بر گیاه آرابیدوپسیس باعث افزایش این ترکیبات و تجمع آنها در بخش های 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 هیچ گونه اثری بر میزان فلاونوئیدها نداشت و اختلاف معنی داری مشاهده نشد (۲۰). هدف از این مطالعه بررسی اثرات مولکولی و استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط اشعه گاما بر فاکتورهای آنتی اکسیدانی گیاه و کالوس درمنه کوهی می باشد.

مواد و روشها

تهیه و تکثیر گیاهان و کالوس: در این مطالعه از گیاهان درمنه کوهی که قبلا 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 جوانه های

جانبی گیاه و کالوس، با توجه به شرایط و امکانات و همچنین با توجه به استفاده محدوده گسترده‌ای از میزان تابش پرتوهای گاما به گیاهان مختلف توسط پژوهشگران، دُزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ گری برای تابش انتخاب گردید. نمونه های مورد نظر به منظور تابش گاما به گروه انرژی هسته ای 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 تانن های تغلیظ شده اندازه گیری 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 اندازه گیری شد. برای هر گروه تیمار سه تکرار محاسبه و میانگین بر حسب واحد گرم گزارش گردید. به منظور اندازه گیری وزن خشک اندام هوایی، پس از جدا کردن ریشه از بخش هوایی نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت در آون ۷۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از خشک شدن نمونه ها، وزن خشک آنها اندازه گیری شد.

بررسی میزان ترکیبات فنلی: عصاره‌گیری: **۰/۱ گرم از هر یک از تیمارها را در هاون چینی ساییده، سپس ۱۰ ml استون ۷۰ درصد به آن افزوده و برای ۲۰ دقیقه در زیر امواج اولتراسونیک W ۳۰۰ در دستگاه سونیکاتور قرار داده شد. سپس نمونه ها برای ۱۰ دقیقه با ۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ^{o}C ۴ سانتریفوژ و محلول رویی جمع آوری 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- سیوکالتو (Folin- ciocalteu) انجام شد (۲۳). ابتدا µl ۵۰ از عصاره تهیه شده را با آب مقطر به حجم µl ۵۰۰ رسانده شد. آنگاه به هریک از نمونه ها µl ۲۵۰ معرف فولین- سیکالتو (1N) اضافه گردید. سپس ml ۱/۲۵ 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 ۷۲۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت شد. با رسم منحنی استاندارد و با قرارگیری مقادیر بدست آمده در معادله خط، مقدار فنل های کل بر حسب (g/100g DW) گزارش گردید.

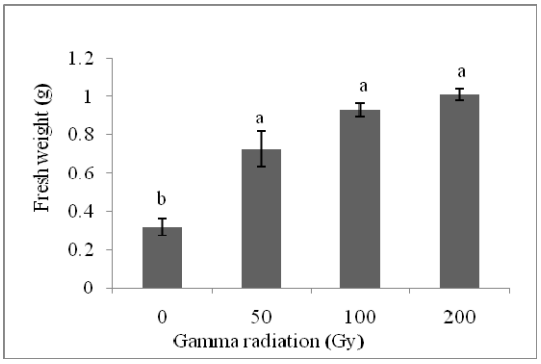
اندازه‌گیری تانن‌های تغلیظ شده: این اندازه گیری بر اساس روش بیان شده توسط Porter انجام شد (۲۹). به این منظور ابتدا µl ۱۰۰ از عصاره تهیه شده را با استفاده از استون ۷۰ درصد به حجم ml ۰/۵ رسانده شد. آنگاه ml ۳ بوتانل-اسید کلریدریک با نسبت ۹۵ : ۵ و بعد ml ۰/۱ محلول فریک به هر یک افزوده و در نهایت مخلوط بدست آمده را ورتکس و به مدت ۶۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای C ° ۱۰۰ قرار گرفت. جذب نمونه ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت و بر حسب (mg/g DW) بیان گردید.

اندازه‌گیری فلاونوئید کل: در ابتدا به µl ۱۰۰ از عصاره تهیه شده µl ۱۰۰ $AlCl_3$ ۲۰ درصد و ۲ قطره گلاسیال استیک اسید اضافه گردید و با استفاده از متانول به حجم cc ۳ رسانده شد و بعد از ۴۰ دقیقه جذب نمونه ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت شد. منحنی کالیبراسیون رسم و با قرار گیری مقادیر بدست آمده در معادله خط مقدار فلاونوئید های کل بر حسب (mg/g DW) محاسبه گردید (۳).

آنالیزهای آماری: اندازه گیری تمام شاخص های رشد بر اساس یک طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار برای هر آنالیز انجام گردید و برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار spss و آزمون توکی استفاده شد.

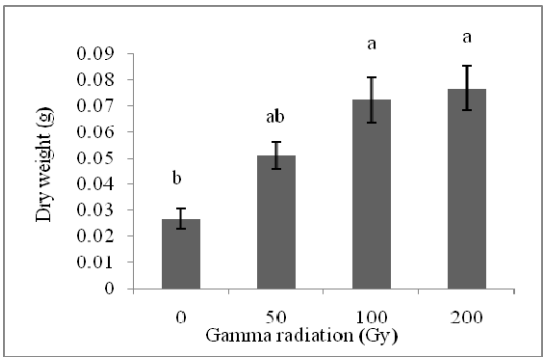
نتایج

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 نمونه های پرتو دیده در مقایسه با نمونه شاهد اندازه گیری شد. همان طور که در شکل ۱ مشاهده می شود، پرتو گاما سبب افزایش وزن تر گیاهان پرتو دیده در هر سه دوز ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ گری گردید و اختلاف معنی داری بین نمونه شاهد و نمونه های 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.



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

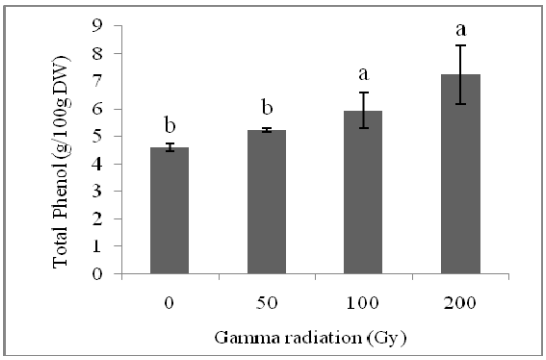
داده‌ها میانگین ۳ تکرار ±SD است. حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P\leq0.05$).



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

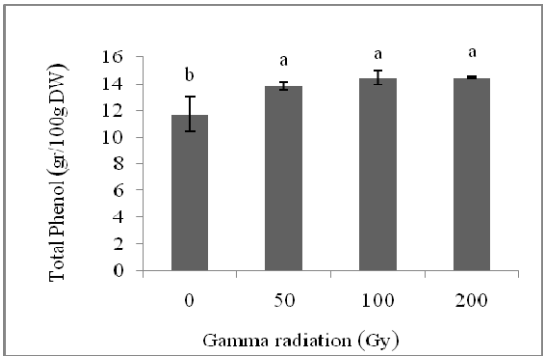
داده‌ها میانگین ۳ تکرار ±SD است. حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P\leq0.05$).

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 می شود، پرتو گاما سبب افزایش مقدار فنل کل در دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ گری نسبت به نمونه شاهد شد. اما دوز ۵۰ گری تفاوت معنی داری با نمونه شاهد نشان نداد. همچنین با اندازه گیری 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 گونه ای که اختلاف معنی داری بین نمونه شاهد و تیمارها وجود داشت، اما از طرف دیگر تفاوت معنی داری 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 ±SD است. حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P\leq0.05$).

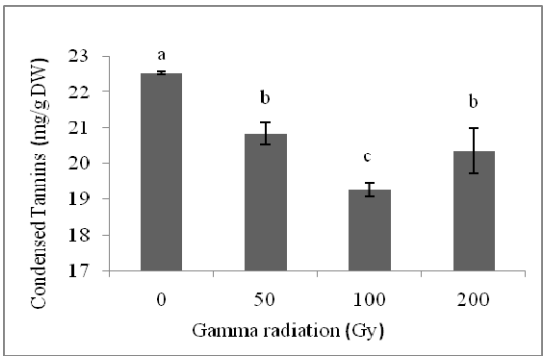


شکل ۴- تأثیر اشعه گاما بر میزان ترکیبات فنلی کالوس

داده‌ها میانگین ۳ تکرار ±SD است. حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P\leq0.05$).

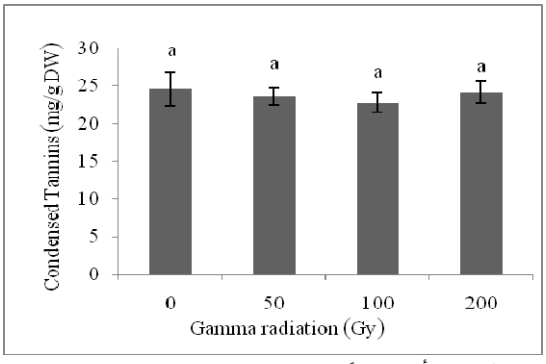
تأثیر اشعه گاما بر تانن‌های تغلیظ شده گیاهان و کالوس درمنه کوهی: پس از چهار هفته رشد هر یک از نمونه ها و ضمن بررسی اثرات پرتوهای گاما بر میزان تانن های

تغلیظ شده گیاهان با توجه به شکل ۵ تفاوت معنی داری 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 تانن های تغلیظ شده در دوز ۱۰۰ گری بود. اندازه گیری تانن های تغلیظ شده در کالوس بیانگر عدم تغییر در میزان این ترکیبات بود و نمونه شاهد در مقایسه با تیمارها تفاوت معنی داری نداشت، همچنین دُزهای ۵۰ ، ۱۰۰ و ۲۰۰ گری اشعه گاما نیز اختلاف معنی داری را با یکدیگر نشان نداد. از این رو با توجه به شکل ۶ به نظر می رسد تابش اشعه گاما اثری بر مقادیر تانن های تغلیظ شده کالوس درمنه کوهی نداشته است.



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

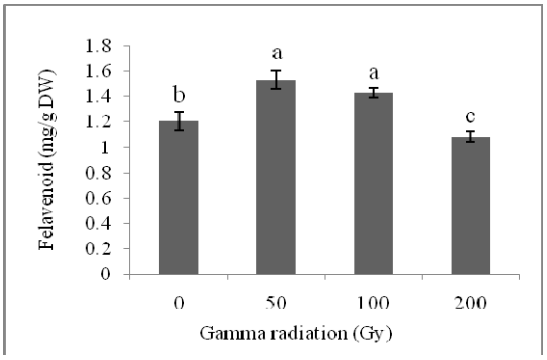
داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± SD است. حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P\leq0.05$).



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

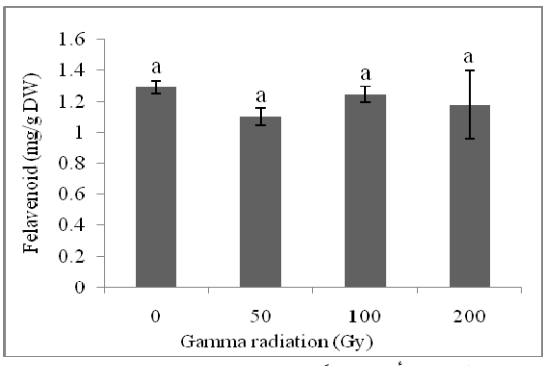
داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± std است. حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P\leq0.05$).

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 اندازه گیری شد. با توجه به شکل ۷ اختلاف معنی داری 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 معنی داری بین هر یک از نمونه ها 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 ± SD است. حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P\leq0.05$).



شکل ۸- تأثیر اشعه گاما بر میزان کل فلاونوئید کالوس

داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± SD است. حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P\leq0.05$).

بحث

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

به دنبال افزایش وزن تر و وزن خشک در گیاهان تابش دیده، به نظر می رسد این افزایش رشد در سلول های جوان مریستمی در حال تقسیم به احتمال زیاد به دلیل افزایش تقسیم سلولی می باشد (۲۸و۴). 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 می باشد. در سلول های گیاهی باید نسبت مناسبی از این دو هورمون در سلول برقرار گردد تا سلول ها تقسیم شوند. یک عامل فیزیولوژیک مهم در رشد گیاهان مقدار اکسین است. شواهدی وجود دارد که به دنبال تابش، مقدار اکسین کاهش می یابد. 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 می رسد که این اثر نتیجه تخریب آنزیمهای اکسین باشد. سیستم آنزیمی که ایندول استالدئید را به ایندول استیک اسید اکسید می کند بلوکه می شود(۱۳). بنابراین در گیاهان اشعه دیده درمنه کوهی احتمالا با افزایش سنتز سیتوکینین و یا کاهش سنتز اکسین در اثر تابش پرتوهای گاما تعادل مناسبتری میان مقدار اکسین و سیتوکینین درون سلولی در سلول های تابش دیده در مقایسه با سلول های تابش ندیده برقرار شد، در نتیجه تقسیم سلولی و رشد افزایش یافت. افزایش مقدار و یا فعالیت آنزیم ها و سایر مواد سیستم آنتی اکسیدانی سلول ها در اثر پرتو ممکن است دلیل دیگری در افزایش رشد و تقسیم سلولی باشد (۳۳و۳). احتمالا افزایش میزان انرژی سلول در اثر پرتو گاما می تواند دلیل دیگری بر افزایش رشد و تقسیم سلولی باشد. بنابراین به نظر می رسد افزایش ATP می تواند باعث افزایش سنتز بسیاری از مواد مورد نیاز برای سنتز و همچنین در تولید بیشتر و سریعتر هگزوزهای فسفاته برای متابولیسم در مسیرهای تولید انرژی و سنتز مواد مورد نیاز مؤثر باشد. از این‌رو به نظر می رسد که شاید پرتوهای گاما توانایی ایجاد انواع جهش و سایر تغییرات را در سلول ها داشته باشند. احتمالا ژنهای بسیار زیادی وجود دارند که تقسیم سلولی و رشد سلول و سایر فرایندهای وابسته به آنها را کنترل می نمایند. بنابراین احتمال ایجاد جهش مطلوب در سلول در جهت افزایش رشد و تقسیم سلولی غیر ممکن نمی باشد 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 آنتی اکسیدان انجام شد. این افزایش مشاهده شده در میزان این ترکیبات به دلایل متعددی امکان پذیر می باشد. احتمالا فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز(PAL) که مسئول سنتز ترکیبات فنلی است و اسید آمینه فنیل آلانین را به سینامیک اسید تبدیل می کند در برابر اشعه گاما افزایش یافته است. بنابراین وجود یک همبستگی مثبت بین شدت تابش و فعالیت آنزیم PAL سبب افزایش میزان فنل ها شده است (۱۱). از طرف دیگر احتمالا 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 می باشد، که توسط مکانیسم غیرمستقیم یعنی رادیولیز آب باعث تولید رادیکال های آزاد مانند پراکسیل و هیدرو پراکسید می شود(۱۷). بنابراین احتمالا این رادیکال ها با شکستن پیوندهای گلیگوزیدی میزان فنل ها 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 احتمالا مقادیر زیادی لیگنین وجود دارد و همین امر یکی از دلایل سخت شدن کالوس

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 می‌کند.

تأثیر اشعه گاما بر میزان تانن‌های 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. احتمالا 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 به‌کار می روند(۱۴)، اثر حفاظتی خود را القاء کند. اگر تانن پس از سنتز به محل ذخیره خود که واکوئل بزرگ مرکزی می باشد انتقال پیدا نکند سنتز آن بلوکه و فیدبک شده، و چون کالوس تمایز نیافته دارای واکوئل بزرگ مرکزی به جهت ذخیره سازی تانن نمی باشد، بنابراین به نظر می رسد که بیوسنتز 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 نمی‌کنند. 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 تابش‌دیده می شود(۳۱). در واقع افزایش بیوسنتز فلاونوئیدها تحت فاکتورهای محیطی مختلف و شرایط تنش زا نوعی سازش با شرایط نامساعد محیطی می باشد(۱۲). یکی از دلایل افزایش بیوسنتز این متابولیت ثانویه احتمالا به علت افزایش مقادیر آمینواسید فنیل آلانین و همچنین افزایش فعالیت آنزیم PAL می‌باشد (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 بیوسنتز فنل ها یعنی فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) شود، نتیجه افزایش فعالیت این آنزیم موجب سنتز فلاونوئید بیشتر در پاسخ به تابش گاما می باشد(۱۲). آنزیم مهم دیگری که بیوسنتز فلاونوئیدها را از دیگر ترکیبات فنلی جدا می کند چالکون سنتتاز می باشد،

احتمالا به نظر می رسد 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، کاهشی نسبت به دوز ۵۰ ، ۱۰۰ گری و نمونه شاهد نشان داد. احتمالا کاهش فلاونوئید می تواند به علت کاهش فعالیت آنزیم های مهمی مانند PAL و CHS باشد و یا شاید به علت ایجاد جهش ژنتیکی یا اپی ژنتیکی باشد. پرتوهای گاما توانایی ایجاد انواع جهش و سایر تغییرات را در سلول ها دارند. بنابراین احتمال ایجاد جهش نامطلوب ممکن است. زیرا در دُزهای بالای اشعه گاما شانس موتاسیون بسیار افزایش یافته و جهش ایجاد شده سبب کاهش میزان این ترکیب شده است. طبق نتایج به دست آمده دُزهای متفاوت اشعه گاما اثری بر میزان فلاونوئید کل کالوس نداشته است. در مورد بیوسنتز آمینواسید فنیل آلانین مدارکی وجود دارد مبنی بر اینکه آنزیم های بیوسنتزی این امینواسید آروماتیک ازجمله کوریزمات موتاز در کلروپلاست وجود دارد (۶) و بیوسنتز فلاونوئید کاملا به مقادیر این آمینواسید وابسته است. احتمالا کالوس هایی که هنگام عدم تمایز در مراحل رشدی خود بودند با قرار گرفتن در معرض نور، تعدادی از سلول های آنها تمایز یافت و به این ترتیب قادر به بیوسنتز کلروپلاست شده است. بنابراین توانایی سنتز فلاونوئید را داشته است اما به دلیل محدودیت و کمبودی که در تعداد کلروپلاست ها در سلول های تمایز یافته می باشد به دنبال تابش گاما قادر به سنتز بیشتر فلاونوئید نبوده است. احتمالا در سلول های در حال تقسیم کالوس به دلیل فعال بودن سیستم آنزیمی ترمیمی سلول ها توان بیشتری برای ترمیم آسیب های ایجاد شده در مولکول DNA را خواهند داشت(۳۰). دلایل ذکر شده در بالا که نشان دهنده مقاومت بالای بافت کالوس در برابر اشعه گاما می باشد باعث شد که حتی این بافت با عدم تغییر میزان فلاونوئید کل بتواند سلول ها 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 دُزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ گری پرتو گاما با تولید رادیکال های آزاد به عنوان یک سیگنال عمل کرده که سبب فعال سازی سیستم های دفاعی و عوامل آنتی اکسیدان 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 تانن های تغلیظ شده کاهش یافت. بنابراین با افزایش فعالیت سیستم دفاعی و ترمیم آسیب های ناشی از تابش گاما و حفظ قدرت زیست سلول ها در برابر اثرات مخرب اشعه گاما گیاه توانست به حیات خود ادامه دهد.

منابع

۱- رضانژاد ف.،طراحی ر.۱۳۹۲.اثر نور و تنظیم کننده های رشد گیاهی بر کالوس زایی و تجمع آنتوسیانین در کالوس های حاصل از جداکشتهای مختلف در رز گالیگا .(Rosa gallica L.) مجله زیست شناسی ایران،۲۶(۲):۱۸۴-۱۹۵.

۲- شرفی ع.،هاشمی سهی ه.، جورابچی ع.۱۳۸۷.بهینه سازی شرایط باززایی گیاه دارویی Artemisia annua.مجله زیست شناسی ایران،۲۱(۴)۵۷۳-۵۶۵.

3- Abdel-Hamed, E.S. and Sayed, S., 2009, Total phenolic contecnts and free radical scavenging activity of certain Egyptain 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 Jeoan, 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. Phtochemical 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 secondry metabolites production of resmary (*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 condenced tannin content in plants. Plant Breeding and Animal Effects. 8: 167-178.

23- Makkar, H.P.S., Siddhuraju, P. and Becker, K., 2007, Plant Scecondary 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 safty of *Hippophae rhamnoides*. Instrum Methods Physics Research. 58: 792-794.

25- Moghadam, S. S., Jaafar, H., Ibrahimi, 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. 2th 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., Nadjet, 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.[1], Ehsanpour A.A.[1], Asghary Gh.R.[2] and Abdi M.R.[3]

[1] Biology Dept., Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran

[2] Pharmaceutical Science Dept., Isfahan University of Medicine, Isfahan, I.R. of Iran

[3] 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 secondry metabolite production. Auxilary 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 antioxidnt 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 felavonoid.