اثر پرتوهای گاما بر برخی مکانیسم‌های بیوشیمیایی دو ژنوتیپ گندم (*Triticum aestivum* L.) در شرایط گلخانه

اعظم برزوئی[۱]، محمد کافی[۲] و عباس مجد آبادی [۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۲۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۲/۳)

چکیده

به منظور مطالعه تأثیر دزهای مختلف پرتوهای گاما بر ویژگی‌های بیوشیمیایی دو ژنوتیپ گندم، آزمایشی در گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده کشاورزی، پزشکی و صنعتی کرج انجام پذیرفت. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. بذرهای دو ژنوتیپ گندم به نام‌های روشن و موتانت T-65-58-8 با دزهای۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ گری پرتودهی شده و بذرهای پرتو ندیده از هر ژنوتیپ نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. بلافاصله پس از پرتوتابی، کشت بذرها در بلوک‌های خاکی موجود در گلخانه به صورت ردیفی انجام گردید و در مرحله گرده افشانی از برگ‌های پرچمی برای آنالیزهای بیوشیمیایی نمونه‌گیری شد. نتایج نشان داد که پرتوتابی با دزهای ۳۰۰ و ۴۰۰ گری سبب سبز نشدن بذرهای ژنوتیپ روشن گردید. تأثیر دزهای مختلف پرتوهای گاما بر میزان مالوندآلدئید لاین T-65-58-8 و ژنوتیپ روشن افزایشی بود. اما این افزایش در لاین T-65-58-8 در مقایسه با رقم روشن بسیار نامحسوس دیده شد. در هر دو ژنوتیپ مورد بررسی، میزان کلروفیل در دز ۱۰۰ گری و میزان پرولین و قندهای محلول در دز ۲۰۰ گری افزایش یافت. لاین T-65-58-8 و ژنوتیپ روشن در دز ۲۰۰ گری به ترتیب کمترین (۲۸/۹۱ Ug/g FW) و بیشترین (۷۰/۹۸ Ug/g FW) میزان پروتئین‌های محلول را داشتند. با افزایش دزهای پرتودهی از ۱۰۰ به ۴۰۰ گری، میزان فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان پراکسیداز افزایش یافت. بررسی پارامترهای اندازه‌گیری شده، از جمله میزان مالوندآلدئید و فعالیت آنزیم سوپراکسیداز، حاکی از آن است که ژنوتیپ روشن در مقایسه با لاین موتانت از حساسیت بیشتری نسبت به تنش پرتوتابی برخوردار است. هم‌چنین در بین تیمارهای به‌کار رفته برای پرتودهی، دزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ گری (با توجه به نوع ژنوتیپ) تغییرات مثبتی را در شاخص‌های بیوشیمیایی مورد مطالعه ایجاد کردند. به نظر می‌رسد اندازه‌گیری صفاتی همچون میزان کلروفیل، پروتئین‌های محلول و مالوندآلدئید در شناسایی و تشخیص دز مناسب پرتودهی ژنوتیپ‌های گندم برای دست یافتن به موتانتی با ویژگی‌های مطلوب مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: مالوندآلدئید، پروتئین‌های محلول، کلروفیل، پرتو گاما

مقدمه

کاربرد تکنیک‌های هسته‌ای به عنوان تحولی جدید در تحقیقات کشاورزی، بخصوص در حفاظت و اصلاح نباتات و تولید موتانت‌های جدید مورد توجه قرار گرفته است (۱۰). موتاسیون‌های طبیعی یا خود بخودی اغلب در اثر پرتوهای کیهانی و با فرکانس کم در طبیعت به وقوع می‌پیوندند. فراوانی این موتاسیون‌ها بسیار کم است. اما موتاسیون‌های القائی به کمک موتاژن‌های فیزیکی یا شیمیایی در موجودات ایجاد می‌شود (۲).

۱. استادیار پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی هسته‌ای کرج

۲. استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: aborzouei@gmail.com

موتاژن‌های فیزیکی که اغلب شامل پرتوها و تشعشعات می‌شوند، به عنوان ابزاری مناسب در اصلاح نباتات برای غنی کردن ژرم‌پلاسم و بهبود ارقام شناخته شده‌اند (۷).

پرتوهای گاما، اشعه ایکس، نور قابل مشاهده و اشعه ماورای بنفش همگی از انواع پرتوهای الکترومغناطیس و از دسته موتاژن‌های فیزیکی به شمار می‌روند. در این میان پرتوی گاما پر انرژی‌ترین فرم از پرتوهای الکترومغناطیس است و لذا قدرت نفوذپذیری بیشتری نسبت به پرتوهای آلفا و بتا دارد (۲۵). مطالعات نشان داده است که می‌توان از بذر، جوانه گل‌ها و یا بخشی از گیاه به منظور بررسی اثر اشعه گاما استفاده کرد (۱۷). القای موتاسیون، اصلاح کنندگان را قادر به انتخاب ژنوتیپ‌های جدید با ویژگی‌های مطلوب مانند زودرسی، تحمل به شوری، عملکرد مطلوب و کیفیت می‌سازد (۴). در برزیل، استفاده از فناوری پرتوتابی به عنوان روشی مناسب در بهبود نارسایی در گندم و افزایش زودرسی در سویا مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۷). پرتوهای یون ساز ازجمله پرتو گاما، با ورود به داخل بافت و سلول با اتم‌ها و مولکول‌های مختلف واکنش داده و رادیکال‌های آزاد را در سلول‌ها تولید می‌کنند و بسته به شدت پرتو، تغییرات مثبت و یا منفی در فرایندهای مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در گیاهان ایجاد می‌شود (۲۵). گزارش شده که پرتو گاما از طریق ایجاد تغییرات ساختاری، اکسیداسیون و تشکیل رادیکال‌های آزاد، مانند آنیون‌سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل، مولکول‌های زیستی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۲). رادیکال‌های آزاد می‌توانند از طریق ایجاد صدمات اکسیداتیو تغییرات ساختاری در پروتئین‌های محلول ایجاد کنند. پرتوتابی بذرها با دز بالای این تشعشع سنتز پروتئین و فعالیت آنزیم‌ها را نیز مختل می‌سازد (۱۲). بر اساس بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی، کلروپلاست‌ها نسبت به سایر اجزای درون سلولی از حساسیت بالایی نسبت به موتاژن‌های فیزیکی برخوردار هستند، به‌خصوص تیلاکوئیدها که در اثر پرتوتابی دچار آماس و تورم شدید می‌گردند. رنگدانه‌های فتوسنتزی نیز در نتیجه تشعشع گاما تخریب شده و به دنبال آن ظرفیت فتوسنتزی گیاه کاهش می‌یابد (۲۳). یکی دیگر از اثرات پرتوتابی، افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدها است. راگوژین و همکاران (۲۰) گزارش نمودند که با پرتوتابی طولانی مدت بذرهای گندم (به مدت ۱ تا ۶ ساعت) پراکسیداسیون لیپیدها در گیاهچه‌های گندم افزایش می‌یابد. این افزایش به دلیل تجزیه اسیل گلیسرول‌ها طی فرایند تشعشع و رها شدن اسیدهای چرب آزاد است. حامد و همکاران (۷) نیز کاهش میزان تری‌اسیل گلیسرول و افزایش میزان اسیدهای چرب آزاد را در نخود و در نتیجه پرتوگاما گزارش نمودند. هم‌چنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، بخصوص آنزیم پراکسیداز پس از پرتوتابی جهت مقابله با صدمات حاصل از تنش اکسیداتیو ایجاد شده، افزایش می‌یابد (۲۶). پرتو گاما به عنوان یک عامل موتاژن مؤثر شناخته شده است که می‌تواند جهت انجام مطالعات بیشتر در سطح ژنومی و آنالیز تغییرات صورت گرفته روی ژن‌های کد کنندهٔ تولیدات مهم درون سلولی مفید و مؤثر واقع گردد. این آزمایش با هدف بررسی تأثیر دزهای مختلف پرتو گاما بر برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی گندم، امکان‌سنجی ایجاد موتانت‌های جدید با استفاده از دز منجر به تغییرات مفید در شاخص‌های بیوشیمیایی گیاه و بررسی حساسیت به پرتودهی در ژنوتیپ روشن و لاین T-65-58-8 گندم انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش، بذرهای ژنوتیپ‌های روشن (حساس به تنش خشکی) و موتانت T-65-58-8 (مقاوم به تنش خشکی) برای پرتودهی انتخاب شدند. میزان رطوبت بذرها قبل از پرتودهی در حد ۱۳٪ تنظیم شد. پرتو گاما توسط منبع کبالت-۶۰ با سرعت ۰/۸۶۴ کیلوراد بر ساعت اعمال گردید. پرتودهی با دزهای ۱۰۰-۴۰۰ گری با فاصله ۱۰۰ گری در پژوهشکده کشاورزی، پزشکی و صنعتی کرج انجام شد و دانه‌های پرتو ندیده از هر ژنوتیپ به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. بلافاصله پس از پرتوتابی، کشت بذرها روی ردیف‌هایی با فاصله ۲۰ سانتی‌متر که در سه بلوک خاکی موجود در گلخانه این پژوهشکده آماده شده بودند، انجام گردید. آبیاری گیاهان به صورت هفته‌ای و بر حسب نیاز انجام شد. در مرحله گرده افشانی، از آخرین برگ توسعه یافته (برگ پرچمی) نمونه‌هایی جهت آنالیزهای بیوشیمیایی تهیه شد.

جدول۱- میانگین صفات میزان کلروفیل *a* ، کلروفیل *b* و کل کلروفیل، پروتئین‌های محلول، مالوندآلدئید، پرولین و قندهای محلول در دو ژنوتیپ مورد بررسی و دزهای مختلف پرتوتابی

	ژنوتیپ		دز پرتوتابی (گری)				
	روشن	T-65-58-8	۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰
کلروفیل *a* (mg/g FW)	۳۶۳/۹ a	۳۹۹/۹ a	۳۷۸/۹ a	۴۰۳/۷a	۳۶۳ a	۳۷۴/۹ a	۴۰۴/۱ a
کلروفیل *b* (mg/g FW)	۱۵۱/۴ a	۱۷۱/۹ a	۱۴۹/۰ a	۱۷۹/۱ a	۱۵۶/۸ a	۱۵۶/۳ a	۱۷۵/۱ a
کلروفیل کل (mg/g FW)	۵۱۵/۴ a	۵۷۱/۸ a	۵۲۷/۸ a	۵۸۳/۱ a	۵۱۹/۸ a	۵۳۱/۲ a	۵۷۹/۲ a
پروتئین‌های محلول (ug/g FW)	۶۴/۷ a	۴۲/۴ b	۵۴/۳ a	۵۶/۵ a	۴۹/۸ a	۴۹/۱ a	۴۹/۷ a
مالوندآلدئید (umol/g FW)	۵/۰ a	۴/۶ a	۴/۴ b	۴/۵ ab	۵/۵ a	۴/۷ ab	۴/۵ ab
پرولین (umol/gFW)	۵/۳ a	۵/۹ a	۵/۶ a	۴/۲ b	۶/۷ a	۶/۰ a	۵/۳۹ ab
قندهای محلول (u lit/ g FW)	۲۱۵/۲ b	۱۶۷/۱ b	۱۷۸/۷ b	۱۵۴/۶ b	۲۴۰/۱ a	۱۴۲/۵ bc	۹۲/۵ c
آنزیم پر اکسیداز (u mol guaiacol oxidized .min^{-1}.g Fw $^{-1}$)	۱۵/۶ b	۱۸/۷ a	۹/۶ b	۱۷/۸ a	۱۹/۸ a	۲۲/۵ a	۲۳/۰ a

در هر ردیف میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌داری ندارند.

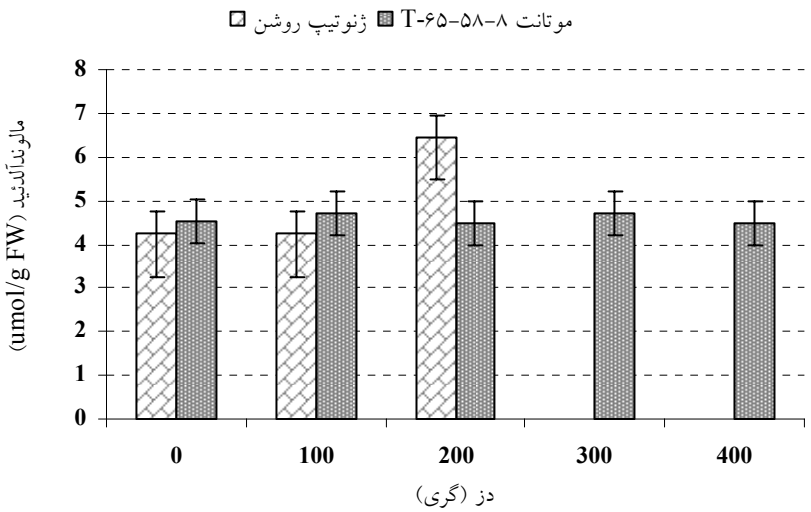
نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه با نیتروژن مایع پودر شدند و سپس اندازه‌گیری میزان پرولین و کربوهیدرات‌های محلول در نمونه‌های تهیه شده انجام گردید. کربوهیدارت‌ها با استفاده از اتانول ۹۵٪ و بر اساس روش اسید سولفوریک تعیین شد (۳). اندازه‌گیری پرولین به روش بیتس و همکاران (۵) انجام گردید. مقدار ۰/۲ گرم از نمونه برگ به همراه ۱۰ میلی‌لیتر اسید ۵- سولفوسالسیلیک ۳٪ در هاون کوبیده و از کاغذ صافی واتمن عبور داده شد. پس از اضافه کردن ۲ میلی‌لیتر اسید استیک و ۲ میلی‌لیتر اسید نینهیدرین و قرار گرفتن در حمام بن ماری، در نهایت میزان نور جذبی در طول موج ۵۲۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید.

میزان کلروفیل نمونه‌ها به روش سایرام و همکاران (۲۱) اندازه‌گیری گردید. در این روش بعد از تهیه عصاره، میزان نور جذب شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۴۷ و ۶۶۳ نانومتر قرائت شده و توسط فرمول‌های مربوطه محتوای کلروفیل *a*،*b* و کل میزان کلروفیل برگ‌های پرچمی محاسبه شد. هم‌چنین میزان مالوندآلدئید که به عنوان شاخصی از پراکسیداسیون چربی‌ها هستند، مطابق با روش ترکان و همکاران (۲۴) مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) نیز با استناد به روش ریوس - گنزالز و همکاران (۱۹) اندازه‌گیری شد. جهت تعیین غلظت پروتئین‌های محلول برگی از روش برادفورد (۶) استفاده شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. فاکتور اول شامل ژنوتیپ‌های گندم روشن و موتانت T-65-58-8 و فاکتور دوم پرتوهای گاما در چهارسطح (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ گری) بودند. آنالیز آماری توسط نرم‌افزار SPSS و مقایسات میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

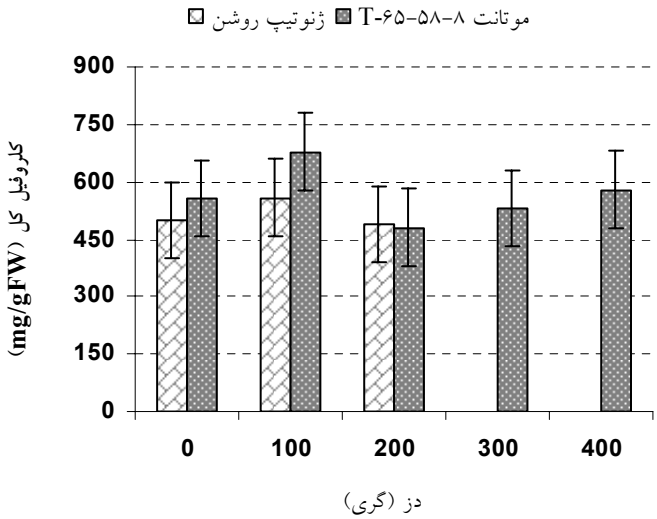
نتایج و بحث

تأثیر پرتوهای گاما بر میزان مالوندآلدئید

نتایج حاصل از آزمایش نشان می‌دهد که با افزایش دز پرتوتابی، میزان مالوندآلدئید و به دنبال آن پراکسیداسیون چربی‌ها افزایش می‌یابد. این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (جدول۱). لازم به ذکر است که پرتوتابی با دزهای ۳۰۰ و ۴۰۰ گری سبب سبز نشدن بذرهای ژنوتیپ روشن در گلخانه گردید.



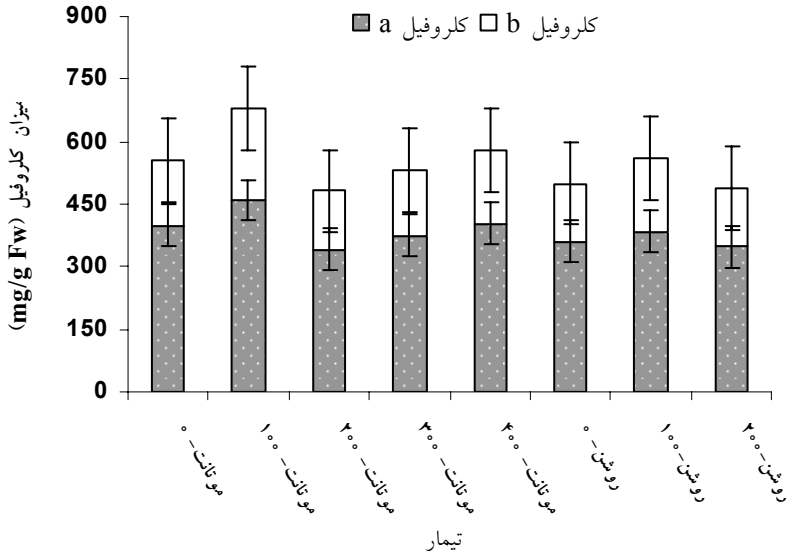
شکل ۱. تأثیر دزهای مختلف پرتو گاما بر میزان مالوندآلدئید دو ژنوتیپ گندم



شکل ۲ . تأثیر دزهای مختلف پرتو گاما بر میزان کل کلروفیل دو ژنوتیپ گندم

این امر در حالی است که افزایش دز پرتو از ۱۰۰ به ۲۰۰ گری میانگین صفت مذکور را در ژنوتیپ روشن به طور معنی‌داری افزایش داد. تأثیر دزهای مختلف پرتو گاما از ۱۰۰ تا ۴۰۰ گری بر میزان مالوندآلدئید لاین T-65-58-8 افزایشی بود، اما این افزایش در مقابل رقم روشن بسیارجزئی بود (شکل۱). در ژنوتیپ روشن، افزایش دز از ۱۰۰ به ۲۰۰ گری میزان مالوندآلدئید را ۵۴/۳ درصد افزایش داد. در حالی‌که این افزایش در لاین T-65-58-8 تنها ۲/۲ درصد بود.

شکل ۲ نشان می‌دهد که لاینT-65-58-8 قادر بوده که با افزایش دز پرتوتابی از اکسید شدن چربی‌ها و به دنبال آن کاهش پایداری غشاء سلول جلوگیری کند. شاید بتوان این امر را به حساسیت بیشتر ژنوتیپ روشن به تنش پرتوتابی نسبت داد. حامد و همکاران (۷) گزارش کردند که با افزایش دز پرتوتابی از ۱۰۰ به ۱۰۰۰ گری میزان مالوندآلدئید که شاخصی از پراکسیداسیون چربی‌ها می‌باشد، در گیاهچه‌های نخود افزایش می‌یابد.



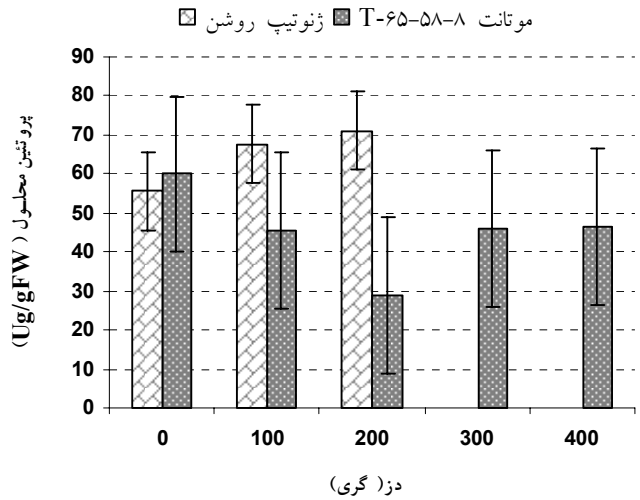
شکل۳ . تأثیر دزهای مختلف پرتو گاما بر میزان کلروفیل *a* و *b* در دو ژنوتیپ گندم

تأثیر پرتوگاما برمیزان کلروفیل

تأثیر دزهای مختلف پرتو گاما بر میزان کل کلروفیل در دو ژنوتیپ مورد بررسی در شکل ۲ نشان داده شده است. پرتوتابی با دز ۱۰۰ گری سبب افزایش میزان کلروفیل در هر دو ژنوتیپ شده است، هر چند که این افزایش از نظر آماری اختلاف معنی‌داری باگیاهان شاهد ندارد. هم‌چنین افزایش دز پرتو از ۱۰۰ به۲۰۰ گری باعث کاهش صفت مذکور در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه گردید. قراردادن بذرهای لاین موتانت T-65-58-8 در معرض پرتو با دزهای ۳۰۰ و ۴۰۰ گری منجر به کاهش معنی‌دار در میزان کلروفیل نشد (شکل ۲). به نظر می‌رسد که موتانت T-65-58-8 در راستای کاهش اثرات مخرب ناشی از تنش پرتوتابی به حفظ رنگدانه‌ها و در نتیجه ظرفیت فتوسنتزی خود پرداخته است. گزارش شده دزهای کم با ایجاد تغییر در سیستم هورمون‌های منتقل کننده پیام در سلول‌های گیاه و یا افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی سلول جهت مقابله با فاکتورهای تنش مانند نوسان شدت نور و دما در هنگام رشد، منجر به افزایش میزان کلروفیل و ظرفیت فتوسنتزی و در نهایت برانگیختن رشد گیاه می‌گردند (۱۱). وی و همکاران (۲۵) خاطر نشان کردند که ممکن است رنگدانه‌های فتوسنتزی در اثر تابش پرتو گاما تخریب شوند که این امر با کاهش ظرفیت فتوسنتزی گیاه همراه است. روند تغییرات کلروفیل *a* و*b* نیز در هر دو ژنوتیپ، مشابه میزان کل کلروفیل بود (جدول۱). نمودار ۳ نشان می‌دهد که میزان کلروفیل *b* در مقایسه با کلروفیل *a* در تمامی تیمارهای مورد بررسی کمتر است. مارووود و گرین‌برگ (۱۶) میزان کمتر کلروفیل *b* را به دلیل تخریب انتخابی بیشتر این کلروفیل یا کاهش ماده تشکیل دهنده آن در شرایط اعمال تیمار پرتودهی نسبت دادند. نتایج حاصل از آزمایش‌های مختلف نشان داده است که با افزایش دزهای تابش میزان کلروفیل برگ کاهش می‌یابد. اما نتیجه قطعی در رابطه با تأثیر پرتو گاما بر مقادیر کلروفیل‌های *a* و *b* گزارش نشده است (۱۲).

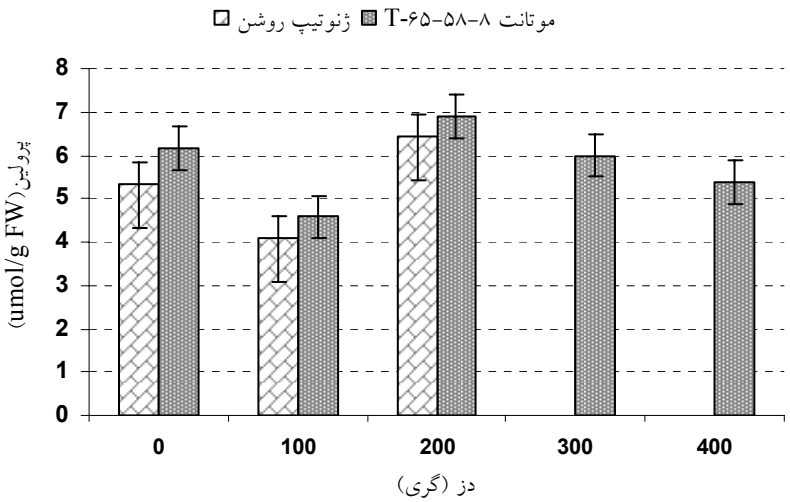
تأثیر پرتو گاما بر میزان پروتئین‌های محلول

میزان پروتئین‌های محلول در دو ژنوتیپ مورد مطالعه بسته به دز پرتوتابی تغییر کرد. تغییرات بیوشیمیایی بر اساس پروتئین‌های محلول حاکی از آن است که اعمال پرتودهی تأثیر معنی‌داری بر میانگین صفت مذکور نداشته است. اما نتایج حاصل از اثرات متقابل ژنوتیپ و دزهای مختلف پرتوتابی نشان داد که در ژنوتیپ روشن پرتودهی با دزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ گری سبب افزایش میزان پروتئین‌های محلول در این ژنوتیپ



شکل۴. تأثیر دزهای مختلف پرتو گاما بر میزان پروتئین‌های محلول دو ژنوتیپ گندم

شده است، در حالی‌که در لاین T-65-58-8 روند دیگری مشاهده گردید. در این موتانت اعمال تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ گری میزان پروتئین‌های محلول را کاهش داد. اما پس از آن دزهای ۳۰۰ و ۴۰۰ گری سبب افزایش میانگین صفت مذکور گردیدند. لاین T-65-58-8 و ژنوتیپ روشن در دز ۲۰۰ گری به ترتیب کمترین (۲۸/۹۱) و بیشترین (۷۰/۹۸) میزان پروتئین‌های محلول را داشتند که این مقادیر از ۵۱/۸ درصد کاهش و ۲۷/۷۲ درصد افزایش نسبت به نمونه‌های شاهد برخوردار بودند. به نظر می‌رسد که افزایش میزان پروتئین‌های محلول در دزهای مختلف پرتودهی به عنوان مکانیسمی دفاعی جهت مقابله با صدمات ناشی از این تنش استفاده شده است. اما نکته قابل ذکر تفاوت دو ژنوتیپ مورد مطالعه در حساسیت به دزهای پرتوتابی است. دزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ گری در لاین T-65-58-8، پروتئین‌های محلول را کاهش داده است اما افزایش این صفت در دزهای ۳۰۰ و ۴۰۰ گری حاکی از افزایش شدت تنش بوده که لاین مذکور با افزایش میزان پروتئین‌ها سعی در حفظ بقاء و مقابله با صدمات ناشی از تنش داشته است. پرتوتابی بذرهای ژنوتیپ روشن در دزهای ۳۰۰ و ۴۰۰ گری باعث سبز نشدن آنها گردید. اما پرتوتابی آنها با دز ۲۰۰ گری پروتئین‌ها را افزایش داده است. شاید بتوان گفت که اعمال این تیمار در این ژنوتیپ که برای اولین بار در معرض تنش پرتوتابی قرار می‌گیرند، بسیار بالا بوده است. این مطالعه نشان می‌دهد که توزیع پروتئین‌های محلول الگوی منظمی نداشته است. هومرا (۸) گزارش کرده است که واکنش گیاهان به تنش اغلب منجر به تغییر در متابولیسم پروتئین‌ها می‌گردد. در دامنه‌ای از شرایط تنش چندین پروتئین سنتز شده و در بافت‌های گیاه تجمع پیدا می‌کنند. چنین پروتئین‌هایی که تحت عنوان پروتئین‌های تنش شناخته می‌شوند، مسئول پاسخ‌های گیاه به شرایط تنش می‌باشند. مهمترین واکنش گیاهان در پاسخ به تنش پرتو گاما، توسعه سیستم‌های دفاعی است. این سیستم با تغییر در الگوی بیان ژن‌ها ایجاد می‌شود و این امر تغییر مسیرهای متابولیک و دفاعی را به همراه دارد. هم‌چنین تعویض الگوی بیان ژن‌ها در اثر پرتو گاما، دگرگونی کیفیت و کمیت پروتئین‌های محلول را به دنبال دارد (۱۳). در واقع تغییرات شیمیایی ناشی از پرتوگاما بر پروتئین‌ها شامل خرد شدن (Fragmentation)، کراس لینک یا پیوندهای حد واسط (Cross- linking)، تجمع پروتئین‌ها (Aggregation) و اکسیداسیون به‌وسیله رادیکال‌های تولید شده ناشی از هیدرولیز آب می‌باشد. پرتو گاما با شکست پیوندهای کووالان در زنجیره پلی‌پپتیدها سبب ایجاد تغییرات غیر قابل برگشت در ساختار پروتئینی و در سطح مولکولی می‌گردند. لازم به ذکر است که این تغییرات به ویژگی‌های شیمیایی پروتئین، وضعیت

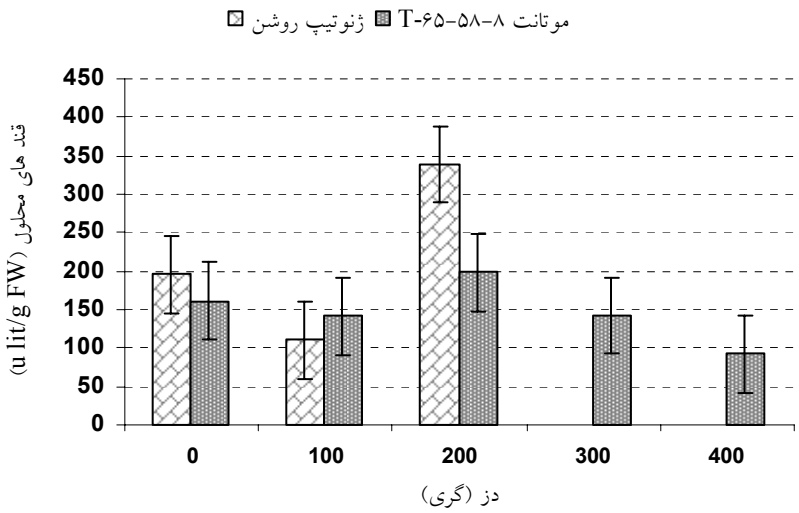


شکل ۵. تأثیر دزهای مختلف پرتو گاما بر میزان پرولین دو ژنوتیپ گندم

فیزیکی آنها و شرایط پرتوتابی وابسته است. بخصوص در مورد تأثیر پرتو گاما بر ساختار پروتئین، فاکتورهایی مانند غلظت پروتئین، حضور اکسیژن و ساختار چهارم پروتئین از اهمیت زیادی برخوردار است (۲۵). با این حال گزارش ثابتی درارتباط با اثر پرتو گاما بر اسیدهای نوکلوئیک، پروتئین‌ها و نیتروژن وجود ندارد. بعضی از تحقیقات، افزایش یا کاهش اندکی را گزارش کردند، در حالی‌که برخی از مقالات تغییرات غیر معنی‌داری را گزارش کردند (۸، ۱۲ و۱۵). به طور کلی شواهد حاکی از آن است که پرتوتابی می‌تواند به طور مستقیم و یا غیر مستقیم بر پروتئین‌ها تأثیر داشته باشد و باعث افزایش یا کاهش سنتز پروتئین‌ها شود (۱۲). لازم به ذکر است که اختلال در فعالیت پروتئین‌ها واحیاء مجدد آنها بخشی از واکنش گیاهان در مقابل تنش‌های محیطی می‌باشد. پرتوگاما منجر به ممانعت از رشد، تخریب RNA و سنتز پروتئین می‌شود (۲۰).

تأثیر پرتو گاما بر میزان پرولین

بررسی نتایج حاصل از تأثیر پرتو گاما بر میزان پرولین نشان داد که پرتوتابی تأثیر معنی‌داری بر میزان پرولین داشت. افزایش دز پرتو گاما به بیش از ۱۰۰ گری، میزان پرولین را افزایش می‌دهد. داده‌های حاصل از آزمایش حاکی از آن است که بالاترین میزان پرولین در تیمار ۲۰۰ گری به دست آمده است (جدول۱). بررسی میزان پرولین در تیمارهای مختلف پرتوتابی و در دو ژنوتیپ گندم نیز نشان داد که دز ۲۰۰ گری افزایش قابل توجه و معنی‌داری را در میزان پرولین ایجاد کرد. در صورتی که اعمال پرتو با دز ۱۰۰ گری میزان پرولین را در هر دو ژنوتیپ مورد مطالعه در مقایسه با شاهد کاهش داد. کاهش و افزایش میزان پرولین ژنوتیپ‌ها در دزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ گری نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار نبود. اما افزایش دز پرتو گاما از ۱۰۰ به ۲۰۰ گری منجر به افزایش معنی‌دار در میزان پرولین شد. گزارش شده که پرولین یک اسید آمینه تنظیم کننده اسمز است که در اثر شرایط تنش در طیف وسیعی از موجودات، نه تنها در گیاهان بلکه جلبک‌ها، گیاهان ساحلی، پروتوزوآها و باکتری‌ها نیز تجمع می‌یابد (۱). کوزنتسوف و شفیاکوف (۱۴) با تأکید بر ضروری بودن پرولین در امر سازگاری گیاه به تنش‌ها، آثار بیولوژیک زیادی مثل تنظیم اسمزی، اثر حمایتی سلول، عمل آنتی اکسیدانی، انتقال انرژی، ذخیرهٔ کربن و نیتروژن و چندین نقش دیگر که برای پایداری سلول و انتقال از یک حالت به حالت سازگاری جدید لازم است، را برای پرولین بر شمردند. پرولین بر حلالیت بسیاری از پروتئین‌ها اثر می‌گذارد و می‌تواند آنها را از تخریب در شرایط تنش پرتودهی محافظت نماید. به علت اثر متقابل پرولین با دنباله‌های آب‌گریز روی سطح پروتئین‌ها،

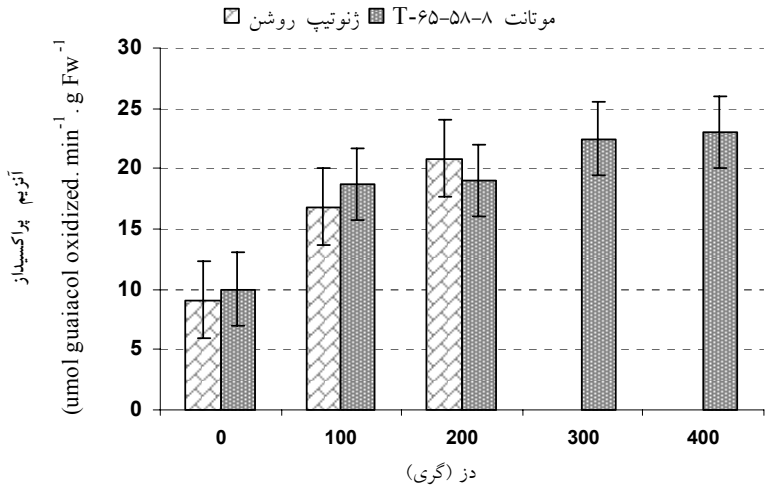


شکل ۶. تأثیر دزهای مختلف پرتو گاما بر میزان قندهای محلول دو ژنوتیپ گندم

پایداری پروتئین افزایش می‌یابد (۹). شاید بتوان با مقایسه نمودارهای میزان پروتئین و پرولین اینگونه بیان کرد که افزایش میزان پرولین در ژنوتیپ روشن و در دز ۲۰۰ گری سبب حفظ میزان پروتئین‌های محلول و در نتیجه تحمل تنش در ژنوتیپ مذکور تا دز ذکر شده گردیده است و به همین ترتیب زیاد شدن میزان پرولین در لاین T-65-58-8 در دزهای ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ گری نوعی مکانیسم دفاعی به منظور حفظ پروتئین‌ها و سایر مسیرهای متابولیک بقاء و رسیدن به انتهای فصل رشد به حساب می‌آید.

تأثیر پرتو گاما بر میزان قندهای محلول

نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که پرتودهی تأثیر معنی‌داری بر میزان قندهای محلول گیاهان مورد بررسی داشت. به نحوی که به غیر از تیمار ۲۰۰ گری، پرتوتابی بذرها با دزهای ۱۰۰، ۳۰۰ و۴۰۰ گری به ترتیب سبب کاهش معنی‌دار میزان قندهای محلول در مقایسه با گیاهان شاهد شد (جدول ۱). پرتوتابی بذرها با دزهای مختلف اشعه گاما سبب شد که هر دو ژنوتیپ مورد مطالعه (روشن و لاین T-65-58-8) بالاترین میزان قندهای محلول را در دز ۲۰۰ گری نشان دهند. شکل ۶ حاکی از آن است که استفاده از پرتو با دزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ گری تأثیر معنی‌داری بر میزان قندهای محلول لاین T-65-58-8 نداشت در حالی‌که باعث افزایش چشمگیر صفت مذکور در ژنوتیپ روشن و در دز ۲۰۰ گری گردید. به‌طوری که اعمال این تیمار میزان قندهای محلول را در ژنوتیپ روشن ۷۳/۱ درصد نسبت به شاهد افزایش داد. به طور کلی طی فرایند یونیزاسیون، مولکول‌های آب هیدرولیز می‌شوند و گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species (ROS)) مانند پراکسید هیدروژن، آنیون سوپر اکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل در اثر پلاریزه شدن مولکول‌های آب تولید می‌شوند. کواکس و کرستز (۱۳) با بررسی اثر پرتوهای یون ساز بر سلول‌های گیاه گزارش کردند که پرتوهای گاما قادرند مستقیماً با مولکول‌های آب واکنش داده و آنها را هیدرولیز نمایند. از طرفی این محققین حضور و یا عدم حضور اکسیژن را در اثر هیدرولیز آب، عاملی مؤثر در تغییر pH، دما و رقیق شدگی ترکیبات محلول سلول معرفی نمودند. بنابراین افزایش قندهای محلول به عنوان یکی از اسمولیت‌های سازگار می‌تواند به عنوان عاملی مهم در حفظ تعادل اسمزی، ادامه جذب آب، حفظ ساختارهای سلولی، ترکیبات پروتئینی و آنزیمی مؤثر واقع شود (۱). هم‌چنین گزارش شده که گروه‌های هیدروکسیل قندها جایگزین آب غشاها و پروتئین‌ها می‌شوند و با آنها پیوندهای هیدروژنی تشکیل داده و از تغییر شکل آنها به دنبال هیدرولیز آب جلوگیری می‌کنند (۱).



شکل ۷. تأثیر دزهای مختلف پرتو گاما بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در دو ژنوتیپ گندم

تأثیر پرتو گاما بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز

نتایج حاصل از آزمایش حاکی از تأثیر معنی‌دار دزهای مختلف پرتو گاما بر میزان فعالیت آنزیم پر اکسیداز می‌باشد ($p<۰/۰۵$). جدول ۱ نشان می‌دهد که با افزایش دزهای پرتودهی میزان فعالیت آنزیم مذکور افزایش یافته است. نتایج حاصل از اثر متقابل ژنوتیپ و دزهای پرتو گاما نشان داد که پرتودهی تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم پر اکسیداز در ژنوتیپ‌های مورد بررسی نسبت به گیاهان شاهد داشت ($p<۰/۰۵$). به طوری‌که دزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ گری میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز را در ژنوتیپ روشن به ترتیب ۸۳/۹ و ۱۲۸/۴ درصد افزایش داد. این روند افزایش در فعالیت آنزیم، در مورد لاین T-65-58-8 نیز قابل مشاهده بود. شکل ۷ نشان می‌دهد که دزهای مختلف پرتوتابی، فعالیت آنزیم مورد بررسی را جهت از بین بردن رادیکال‌های آزاد افزایش داده است. به نحوی که فعالیت پراکسیداز در لاین T-65-58-8 و در دزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ گری حدود ۲ برابر بیشتر از شرایط عدم پرتوتابی بود. بیشترین میانگین صفت مذکور در لاین T-65-58-8 و در دز ۴۰۰ گری ملاحظه شد. لازم به ذکر است که در هر دو ژنوتیپ مورد مطالعه افزایش دز پرتو گاما فعالیت آنزیم پراکسیداز را افزایش داد. اما اختلاف معنی‌داری در بین دزهای مختلف پرتوتابی دیده نشد. ترکان و همکاران (۲۴) گزارش کردند که پراکسیداز در بین آنزیم‌های آنتی اکسیدان نقش مهمی را در از بین بردن پراکسید هیدروژن در سلول‌ها برعهده دارد. بنابراین اجزای درون سلولی مانند پروتئین‌ها و چربی‌ها را در برابر اکسیداسیون محافظت می‌کند. پراکسیداز جهت یکسری از وظایف درون سلولی مانند لیگنینی شدن، ایجاد بافت چوب پنبه‌ای، طویل شدن سلول‌ها، رشد و تنظیم سنتز دیواره سلولی لازم و ضروری است و کلیه فرایندهای ذکر شده ممکن است در اثر تابش پرتو گاما دچار تغییر شوند (۲۵). محققین افزایش زیاد فعالیت آنزیم پراکسیداز مخصوصاً پس از تابش با دزهای بالایی از پرتو گاما را گزارش کرده‌اند. هم‌چنین شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد فعالیت آنزیم‌های درگیر (مانند پراکسیداز، گلوتاتیون ریداکتاز و کاتالاز) در اثر از بین رفتن گونه‌های فعال اکسیژن به‌وسیله تنش‌های محیطی و پرتوتابی با اشعه گاما افزایش می‌یابد (۱۶، ۱۸ و ۲۲). بررسی الگوی بیان ژن‌های پراکسیداز نیز حاکی از افزایش نسخه برداری از ژن‌های مذکور به محض پرتوتابی با اشعه گاما می‌باشد. این امر علت افزایش تدریجی فعالیت آنزیم به دنبال افزایش دز پرتوتابی را توجیه می‌کند (۲۰). این آنزیم ممکن است در سیتوسول، واکوئل، دیواره سلولی و فضای بین سلولی حضور داشته باشد. سلول‌های پارانشیم در مقایسه با آوندها، با تولید پراکسید هیدروژن و به دنبال آن افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز، از

حساسیت بیشتری برخوردار هستند. بدین لحاظ نتایج مطالعه حاضر مبنی بر افزایش این صفت در اثر پرتوتابی با گزارش پژوهشگران فوق مطابقت دارد (۲۵).

نتیجه‌گیری

در این آزمایش حساسیت و واکنش دو ژنوتیپ گندم مورد بررسی نسبت به دزهای بیشتر از ۲۰۰ گری متفاوت بود. به نحوی که بذرهای ژنوتیپ روشن در دزهای ۳۰۰ و ۴۰۰ گری سبز نشدند. اما افزایش کلیه صفات مورد نظر در هر دو ژنوتیپ مورد بررسی در دزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ گری مشاهده شد. نتایج حاصل از این آزمایش حاکی از آن بود که واکنش گیاه در پاسخ به برخی از دزهای پرتو گاما، تغییراتی را در مسیرهای متابولیک و سنتز مولکول‌های زیستی موجود در سلول‌های گیاهی به همراه دارد. تغییرات حاصل از پرتودهی، در صورتی که با کاهش عملکرد همراه نبوده و هم‌چنین از نظر ژنتیک دارای وراثت پذیری بالایی باشند، می‌توانند به عنوان روزنه امیدی در زمینه ایجاد موتانت‌های متحمل به تنش‌های زیستی و غیر زیستی به حساب آیند. تا کنون با انجام این آزمایش شاید بتوان پرتوتابی با دزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ گری (با توجه به ژنوتیپ) را برای ایجاد تغییرات بیوشیمیایی مناسب در گندم معرفی نمود. اما همان‌طور که ذکر شد این امر مستلزم بررسی روند تغییرات عملکرد و اجزای عملکرد ژنوتیپ‌های مورد بررسی پس از پرتوتابی می‌باشد. ضمن اینکه بررسی صفات مورد مطالعه در این آزمایش (اندازه‌گیری صفات مرتبط با تحمل به تنش) در شناسائی و تشخیص اولیه دز مناسب پرتودهی جهت دست یافتن به موتانتی با ویژگی‌های مطلوب، مفید می‌باشند.

منابع مورد استفاده

۱. کافی، م.، ا. برزوئی، م. صالحی، ع. کمندی، ع. معصومی و ج. نباتی. ۱۳۸۸. فیزیولوژی تنش‌های محیطی در گیاهان. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

۲. مجد، ف. و م.ر. اردکانی. ۱۳۸۲. تکنیک‌های هسته‌ای در علوم کشاورزی. انتشارات دانشگاه تهران.

3. Ashraf, M. and M.R. Foolad. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environ. and Exper. Bot. 59: 206-216.
4. Bajaj, Y.P.S. 1970. Effect of gamma-irradiation on growth, RNA, protein, and nitrogen contents of bean callus cultures. J. of Bot. 23: 231-236.
5. Bates, L.S. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant Soil 39: 205-207.
6. Bradford, M.M.1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities in utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem. 72: 248-254.
7. Hameed. A., T.M. Shah, B.M. Atta, M.A. Haq and H. Syed. 2008. Gamma irradiation effects on seed germination and growth, protein content, peroxides and protease activity, lipid peroxidation in desi and kabuli chickpea. Pak. J. Bot. 40(3): 1033-1041.
8. Humera, A. 2006. Biochemical and molecular markers of somaclonal variants and induced mutants of potato (*Solanum tuberosum* L.). PhD Thesis, University of the Punjab Lahore, Pakistan.
9. Irigoyen, J.J., D.W. Emerich and M. Sanchez-diaz. 1992. Water stress induced change in concentration of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. Physiol. Plantarum 84: 55-60.
10. Khan, A.A., S.A. Rao and T. McNeilly. 2003. Assessment of salinity tolerance based upon seedling root growth response functions in maize (*Zea mays* L.). Euphytica 131: 81-89.
11. Kim, J.H., M.H. Baek, B.Y. Chung, S.G. Wi and J.S. Kim. 2004. Alterations in the photosynthic pigments and antioxidant machineries of red pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings from gamma-irradiated seeds. J. Plant Biotechnol. 47(2): 314-321.
12. Kiong, A., A. Lai, S. Hussein and A.R. Harun. 2008. Physiological responses of *Orthosiphon stamineus* plantlets to gamma irradiation. Amer.-Eurasian J. Sustain. Agric. 2: 135-149.
13. Kovacs, E. and A. Keresztes. 2002. Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cell. Micron. 33: 199–210.
14. Kuznetsov, VI. V. and Shevyakov, N. L. 1999. Proline- under stress: Biological role, metabolism and regulation.

Russian J. Plant Physiol. 46: 274-287.
15. Ling, A., J.Yi Chia, S. Hussein and A.R. Harun. 2008. Physiological responses of *Citrus sinensis* to gamma irradiation. World Appl. Sci. J. 5: 12-19.
16. Marwood, C.A. and B.M. Greenberg. 1996. Effect of supplementary gamma irradiation on chlorophyll synthesis and accumulation of photosystems during chloroplast development in *Spirodela oligorrhiza*. Photochem. 64: 664-670.
17. Melki, M. and Th. Dahmani. 2009. Gamma irradiation effects on durum wheat (*Triticum aestivum* Desf.) under various conditions. Pakis. J. Biol. Sci. 12(23): 1531-1534.
18. Polesskaya, O.G., E.I. Kashirina and N.D. Alekhina. 2004. Changes in the activity of antioxidant enzymes in wheat leaves and roots as a function of nitrogen source and supply. Russian J. Plant Physiol. 51: 615-620.
19. Rios- Gonzalez, K., L. Erdei and S.H. Lips. 2002. The activity of antioxidant enzymes in maze and sunflower seedlings as affected by salinity and different nitrogen sources. Plant Sci. 162: 923-930.
20. Rogozhin, V.V., T.T. Kuriliuk and N.P. Filippova. 2000. Change in the reaction of the antioxidant system of wheat sprouts after UV-irradiation of seeds. Biofizika 45: 730-736.
21. Sairam, R.K., K. Veerabhadra Rao and G.C. Srivastava. 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Sci. 163: 1037-1046.
22. Sgherri, C.L.M., M. Maffei and F. Navari-Izzo. 2000. Antioxidant enzymes in wheat subjected to increasing water deficit and rewatering. J. Plant Physiol. 157: 273-279.
23. Strid, A., W.S. Chow and J.M. Anderson. 1990. Effects of supplementary gamma irradiation on photosynthesis in *Pisum sativum*. Biochem. 1020: 260-268.
24. Turkan, I., M. Bor, F. Ozdemir and H. Koca. 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought - tolerant *P. acutifolius* gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. Plant Sci. 168: 223-231.
25. Wi, S.G., B.Y. Chung and J.S. Kim. 2007. Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants. Micron. 38: 553–564.
26. Zaka, R., C.M. Vandecasteele and M.T. Misset. 2002. Effects of low chronic doses of ionizing radiation on antioxidant enzymes and G_6PDH activities in *Stipa capillata* (Poaceae). J. Exp. Bot. 53: 1979-1987.
27. Zimmer P.D., A.T. Mattos, A.C. Oliveira, FI. F. Carvalho, JR., A. Magalhaes, M.M. Kopp and F.A. Freitas. 2003. Identification of rice mutants (*Oryza sativa* L.) for agronomical and root system traits. R. Bras. Agrociencia 9: 195-199.