



اثر اتیل متان سولفونات و پرتو گاما بر ویژگی‌های فیزیولوژیک و فیتوشیمیایی شقایق

(*Papaver macrostomum* Boiss. and A. Huet)

فاطمه مینایی^۱، ابوالفضل جوکار^{۱*}، مهدی زهتابیان^۲

۱. بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۲. بخش مهندسی هسته‌ای، دانشکده مهندسی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

✉ ajowkar@shirazu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۸/۸/۲۵، تاریخ پذیرش: ۹۹/۵/۲۵

چکیده

شقایق یک گیاه زینتی علفی است که به صورت وحشی در نواحی مختلف ایران رشد می‌کند و ترکیب‌های گوناگون دارویی دارد. برای بررسی اثر اتیل متان سولفونات و پرتو گاما بر ویژگی‌های فیزیولوژیک و فیتوشیمیایی این گیاه آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح به‌طور کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل اتیل متان سولفونات در چهار سطح صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳٪ و پرتو گاما در چهار سطح صفر، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ گری بود. ویژگی‌های مورد بررسی میزان سبزینه، کاروتنوئید، فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی، فلاونوئید، فنول و قند بود. بیشتر تیمارها سبب افزایش میزان شاخص‌های مورد بررسی شدند. بیشترین میزان سبزینه در تیمار ۰/۱٪ اتیل متان سولفونات دیده شد و بیشترین مقدار کاروتنوئید در تیمار ۵۰ گری گاما و همچنین تیمار ۰/۱٪ اتیل متان سولفونات اندازه‌گیری شد که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند. بیشینه فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی و قند در تیمار ۰/۱٪ اتیل متان سولفونات ثبت شد. بیشترین میزان فنول و فلاونوئید در تیمار ۰/۳٪ اتیل متان سولفونات دیده شد. به‌طور کلی، نتایج نشان داد که استفاده از عوامل جهش‌زا می‌تواند ویژگی‌های فیزیولوژیک و فیتوشیمیایی *P. macrostomum* را تحت تأثیر قرار دهد. با این حال، عامل جهش‌زایی اتیل متان سولفونات به تنهایی موثرتر از سایر تیمارها بود.

واژه‌های کلیدی: انگیزش جهش، پرتو دهی، شقایق، مواد شیمیایی جهش‌زا، *Papaver macrostomum*

مقدمه

به‌صورت وحشی در مناطق مختلف ایران می‌روید (Sharifnia et al., 2010). این گیاه دارای گل‌های زیبایی می‌باشد و ظرفیت استفاده به‌عنوان گیاه زینتی را دارد. این گونه به‌عنوان یک داروی مسکن و ضد سرفه در طب سنتی کاربرد داشته است (Baytop, 1999). استخراج

شقایق با نام علمی *Papaver macrostomum* Boiss. and A. Huet گیاهی علفی، یک‌ساله، با گل‌های قرمز رنگ زود افت، برگ‌های تکی با تقسیم‌های عمیق دندانه‌دار و به ارتفاع ۱۵ تا ۴۵ سانتی‌متر است که



به‌طور معمول منجر به جهش‌های نقطه‌ای می‌شود (Naderi Shahab *et al.*, 2007).

پرتوهای یون‌ساز از جمله پرتو گاما با ورود به درون بافت و یاخته با اتم‌ها و مولکول‌های مختلف واکنش داده و گونه‌های فعال را در یاخته‌ها تولید می‌کند و بسته به شدت پرتو، باعث تغییرهای مثبت یا منفی در فرایندهای مورفولوژیک، فیزیولوژیک و زیست‌شیمیایی در گیاهان ایجاد می‌شود (Wi *et al.*, 2007). گزارش شده که پرتو گاما از راه ایجاد تغییرهای ساختاری، اکسیداسیون و تشکیل گونه‌های فعال مانند آنیون سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن و گونه‌های آزاد فعال هیدروکسیل، مولکول‌های زیستی را زیر اثر قرار می‌دهد. گونه‌های فعال آزاد می‌توانند از راه ایجاد آسیب‌های اکسیداتیو تغییرات ساختاری در پروتئین‌های محلول ایجاد کنند. پرتوتابی بذرها با دُز بالای این پرتو ساخت پروتئین و فعالیت آنزیم‌ها را نیز مختل می‌سازد (Kiong *et al.*, 2008). جهش‌های حاصل از این پرتو بیشتر در گیاهان باعث برداشت یا افزوده شدن یک‌رشته نوکلئوتیدی و بروز جهش‌یافته‌هایی با کارکرد از دست‌رفته ژن‌ها می‌شود (Naderi Shahab *et al.*, 2007).

در جهان تاکنون رقم‌های جهش‌یافته بسیاری در گیاهان با ویژگی‌های زینتی به‌نژادی یافته معرفی شده است. فن جهش به‌تقریب برای بهبود تمام ویژگی‌های مهم ظاهری، زینتی، تحمل به تنش‌های نازیوا (مانند شوری، سرما، اسیدیته و ...)، مقاومت به بیماری‌ها و افزایش کیفیت غذایی تا بازارپسندی و عملکرد محصول به کار گرفته شده است (Fu *et al.*, 2008; Okamura *et al.*, 2012; Shu & Lagoda, 2007). در همین راستا، در پژوهش حاضر برای نخستین بار در ایران اثر مواد شیمیایی

آلکالوئیدهای Aporphine, Benzylisoquinoline, Protopine, Rhoeadine, Isopavin و Quercetin از عصاره این گیاه گزارش شده است (Sariyar *et al.*, 2002). جهش در گیاهان ابزار مؤثری برای به‌نژادگران گیاهان زینتی به‌ویژه در محصولات که پایه ژنتیکی محدودی دارند، می‌باشد. به‌طور کلی هدف از ایجاد جهش‌انگیزی، تغییر یک یا چند ژن نزدیک به هم و شکستن همبستگی بین آن‌ها و افزایش کراسینگ‌اور بین ژن‌ها است (Broertjes, 2012; Kharkwal *et al.*, 2004; Tulmann *et al.*, 2011). جهش در صورتی که موجب سازگاری شود و به حفظ زنده مانی موجودات در محیط‌های متغیر نیز کمک نماید، بیشینه‌گوناگونی قابل وراثت برای عمل‌گزینش را فراهم می‌کند. به‌نژادی به‌وسیله جهش، مقرون به‌صرفه بوده و زمان به‌نژادی یک رقم را کوتاه می‌کند (Siddiqui & Khan, 1999). هدف اصلی در به‌نژادی بر پایه جهش ایجاد سریع ارقام گیاهی با عملکرد و کیفیت بهتر است (Ahloowalia *et al.*, 2004; Stamo *et al.*, 2007).

انگیزش جهش با استفاده از جهش‌زاهای فیزیکی و شیمیایی ایجاد می‌شود. اتیل متان سولفونات یک ماده شیمیایی جهش‌زا است که عامل آلکیلی آن یک گروه متیل یا اتیل به کربن شماره ۷ باز گوانین در رشته DNA می‌افزاید. اگر باز گوانینی (G) که زیر اثر عامل آلکیلی اتیل متان سولفونات قرار گرفته از رشته DNA جدا نشود، در جفت شدن همانند آدنین (A) عمل می‌کند و می‌تواند با تیمین (T) یا سیتوزین (C) جفت شود که این موجب می‌شود دی‌نوکلئوتید GC به AT تبدیل شود (Sujay *et al.*, 2010). در گیاهان اتیل متان سولفونات



جهش‌زا و پرتودهی بر ویژگی‌های فیزیولوژیک و فیتوشیمیایی شقایق بررسی شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در گلخانه پلاستیکی بخش علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز با میانگین دمای روز/شب °C ۲۲/۲۶ و میانگین رطوبت نسبی ۵۰ تا ۶۰٪ در سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۷ به صورت فاکتوریل بر پایه طرح به‌طور کامل تصادفی با سه تکرار و چهار مشاهده در هر تکرار انجام شد. داده‌ها با نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۴) واکاوی و میانگین داده‌ها با آزمون LSD در سطح احتمال $\geq 5\%$ مقایسه شدند. شاخص‌ها شامل ماده شیمیایی اتیل متان سولفونات (EMS) در ۴ سطح ۰، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ و پرتو گاما در ۴ سطح ۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ گری بود.

بذرها به مدت ۱۲ ساعت در آب مقطر خیس‌انده شدند. سپس آب ظرف تخلیه شده و به مدت شش ساعت در محلول اتیل متان سولفونات با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ روی هم‌زن با سرعت ۹۰ دور در دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. پس از آن نمونه‌ها به زیر هود انتقال داده شده و ۵ بار و هر بار به مدت ۲ دقیقه با آب مقطر شسته شدند. در پایان، بذرها ۱۰ دقیقه زیر آب جاری شستشو شدند تا باقیمانده احتمالی اتیل متان سولفونات از سطح بذرها به‌طور کامل از بین برود (Chatterjee *et al.*, 2012).

پرتودهی در آزمایشگاه مرکز تحقیقات تابش بخش هسته‌ای دانشکده مکانیک دانشگاه شیراز انجام شد. برای پرتودهی به‌وسیله پرتو گاما از چشمه رادیوترایی ^{137}Cs با شرایط ۶۶۲ کیلو الکترون ولت و در فاصله ۳۱ سانتی‌متری از چشمه با آهنگ دز ۰/۱۱ گری در دقیقه

استفاده شد و دزهای ۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ گری به کار رفت. برای تیمارهای ترکیبی، بذرها نخست پرتودهی شدند و سپس زیر تیمار اتیل متان سولفونات قرار گرفتند.

پس از کاربرد تیمارها، بذرها درون سینی‌های نشا ۱۱۲ تایی دارای آمیخته کوکوپیت، پیت ماس و پرلایت با نسبت برابر کشت شدند و پس از گذشت ۵۰ روز نشاها به لیوان‌های یک‌بار مصرف با آمیخته ماسه و خاکبرگ با نسبت برابر انتقال داده شدند. دانه‌ها پس از گذشت ۳۰ روز به گلدان‌های پلاستیکی اندازه ۱۴ انتقال داده شدند که با آمیخته ماسه، خاکبرگ و خاک لومی به نسبت برابر پر شده بودند.

اندازه‌گیری سبزینه و کاروتنوئید برگ

مقدار سبزینه و کاروتنوئید از طریق جذب نوری عصاره‌های برگ‌ها به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر Epoch در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر خوانده شد. غلظت سبزینه a، سبزینه b، سبزینه کل و کاروتنوئید با استفاده از رابطه‌های زیر به دست آمد (Arnon, 1949).

$$\text{Chlorophyll a} = (19/3 * A_{663} - 0/86 * A_{645}) / 100W$$

$$\text{Chlorophyll b} = (19/3 * A_{645} - 3/6 * A_{663}) / 100W$$

$$\text{Chl. Total} = \text{Chl. a} + \text{Chl. b}$$

$$\text{Carotenoids} = 100(A_{470}) - 3/27(\text{mg chl. a}) - 104(\text{mg chl. b})/227$$

$$V = \text{حجم محلول}$$

$$A = \text{جذب نور در طول موج‌های } ۴۷۰، ۶۴۵ \text{ و } ۶۶۳ \text{ نانومتر}$$

$$W = \text{وزن تر نمونه برحسب گرم}$$

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به وسیله مهار گونه

فعال آزاد DPPH



فعالیت آنتی اکسیدانی به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر Epoch در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد و با رابطه زیر محاسبه شد (Brand-Williams et al., 1995).

$$I \% = (A \text{ blank} - A \text{ sample} / A \text{ blank}) * 100$$

A = جذب نور در طول موج ۵۱۷ نانومتر

Sample = نمونه

Blank = شاهد

اندازه‌گیری مقدار ترکیب های فلاونوئیدی کل

برای تعیین فلاونوئید از روش تشکیل کمپلکس $AlCl_3$ و استاندارد کوئرستین استفاده شد. جذب نوری محلول در طول موج ۵۱۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Epoch خوانده شد (Khalighi-Sigaroodi et al., 2012; Yoo et al., 2008). منحنی استاندارد فلاونوئید با کاربرد کوئرستین در غلظت‌های ۲۵ تا ۱۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر خوانده و رسم شد. سپس غلظت ترکیب های فلاونوئیدی کل به صورت میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک به دست آمد.

اندازه‌گیری مقدار ترکیب های فنولی کل

تعیین ترکیب های فنولی به روش فولین - سیوکالتیو انجام شد. جذب نوری هر نمونه در طول موج ۷۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Epoch خوانده شد (Khalighi-Sigaroodi et al., 2012; Kim et al., 2003). منحنی استاندارد اسید گالیک در غلظت‌های ۲۵ تا ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر در طول موج ۷۵۰ نانومتر خوانده و رسم شد و با قرارگیری مقادیرهای به دست آمده در معادله مقدار فنول بر حسب میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن خشک گزارش شد.

اندازه‌گیری قندهای محلول

برای اندازه‌گیری قندهای محلول روش دوبویس به کار برده شد (Dubois et al., 1995). جذب نور در طول موج ۴۹۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر Epoch اندازه‌گیری شد (Dubois et al., 1995). منحنی استاندارد قند با استفاده از دی گلوکز با غلظت‌های ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه و در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده و رسم شد و محتوای واقعی قند بر حسب میلی‌گرم بر وزن خشک ارزیابی شد.

نتایج و بحث

سبزینه کل

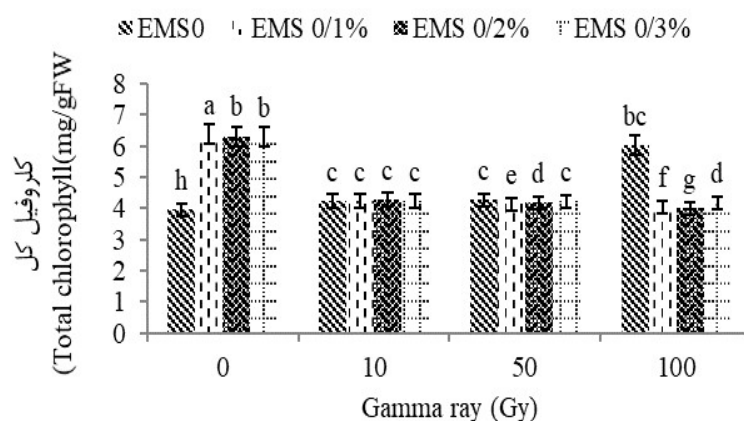
اثر اتیل متان سولفونات و پرتو گاما بر میزان سبزینه کل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود و منجر به افزایش سبزینه کل شد، به طوری که بیشترین سبزینه کل بر اساس نتایج در غلظت ۰/۱٪ اتیل متان سولفونات (با میانگین ۶۷۳ میلی‌گرم در گرم وزن‌تر) به دست آمد که دارای اختلاف معنی‌دار با دیگر تیمارها بود و کمترین میزان سبزینه کل در تیمار شاهد (با میانگین ۳/۹۵ میلی‌گرم در وزن‌تر) به دست آمد که با دیگر تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بود (شکل ۱).

استفاده از پرتو گاما روی آویشن (Salehi et al., 2015)، Patil & Rane,) *Cyamopsis tetragonoloba* L. (Taub.) Abu et al.,) *Vigna unguiculata* Walp. و (2015) و همچنین تیمارهای پرتو گاما و اتیل متان سولفونات در فلفل (Sood et al., 2017) سبب افزایش سبزینه شده است. به نظر می‌رسد که گیاهان برای کاهش اثرهای مخرب ناشی از پرتودهی به نگهداری رنگدانه‌ها و در نتیجه ظرفیت نورساختی خود پرداخته‌اند. گزارش شده است که پرتوهای با دز کم با ایجاد تغییر در سیستم



دیگر اجزای درون‌یاخته‌ای از حساسیت بالایی نسبت به جهش‌زاهای فیزیکی برخوردار هستند، به‌ویژه تیلاکوئیدها که در اثر پرتودهی دچار آماس و تورم شدید می‌شوند. در نتیجه رنگدانه‌های نورساختی بر اثر پرتودهی تخریب‌شده و سبب کاهش ظرفیت نورساختی گیاه می‌شوند (Strid et al., 1990).

هورمون‌های انتقال‌دهنده پیام در یاخته‌های گیاه و یا افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی یاخته برای رویارویی با عوامل تنش‌زا مانند نوسان شدت نور و دما در هنگام رشد، منجر به افزایش میزان سبزینه و ظرفیت نورساختی و در پایان، رشد گیاهان می‌شوند (Kovacs & Keresztes, 2002). بر اساس بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی گزارش شده است که کلروپلاست‌ها نسبت به



پرتو گاما (گری)

شکل ۱- برهمکنش اتیل متان سولفونات و پرتو گاما بر میزان سبزینه کل *P. macrostomum* میانگین‌های دارای حرف (حروف) مشترک تفاوت معنی داری ندارند (آزمون LSD در سطح ۰/۵٪). روی ستون‌ها خطای استاندارد آورده شده است.

Figure 1- Interaction of ethyl methane sulfonate and gamma ray on total chlorophyll content of *P. macrostomum*. Means with the same letter(s) are not significantly different (LSD test at 5% level). Columns are with SE.

کاروتنوئید در وزن تر به دست آمد که با تیمارهای ترکیبی ۰/۱٪ اتیل متان سولفونات با ۱۰ گری پرتو گاما، ۰/۲٪ اتیل متان سولفونات با ۱۰ گری پرتو گاما و تیمار ۱۰۰ گری پرتو گاما با میانگین ۵/۰۴، ۵/۰۷ و ۵/۰۷ میلی‌گرم در گرم وزن تر تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۲).

کاربرد پرتو گاما منجر به افزایش میزان کاروتنوئید گلبرگ زینق شد (Joz-Ghasemi & Rabiei, 2016).

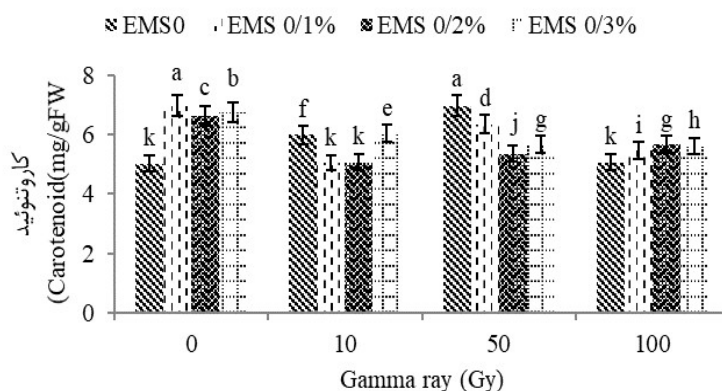
کاروتنوئید

کاربرد اتیل متان سولفونات و پرتو گاما بر مقدار کاروتنوئید تأثیر معنی‌دار در سطح یک درصد داشته است به طوری که بیشترین مقدار کاروتنوئید در تیمار ۰/۱٪ اتیل متان سولفونات و همچنین ۵۰ گری پرتو گاما با میانگین ۶/۹۶ و ۶/۹۷ میلی‌گرم در گرم وزن تر به دست آمد که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. کمترین میزان کاروتنوئید در تیمار شاهد با میانگین ۵/۰۳ میلی‌گرم



فعال آزاد اکسیژن حفظ نمایند. افزون بر این کاروتنوئیدها می‌توانند به‌طور مستقیم اتم اکسیژن را غیر فعال کنند و یا به‌وسیله اتم اکسیژن اکسید شوند. بنابراین به‌طور غیرمستقیم تولید گونه‌های اکسیژن را کاهش می‌دهند. از سوی دیگر کاروتنوئیدها از راه سازوکاری که چرخه زانتوفیل نامیده می‌شود منجر به حفاظت از سبزینه در مقابل اکسیداسیون نوری با مصرف اکسیژن می‌شوند (Kafi et al., 2009).

کاروتنوئیدها تتراترپن‌هایی هستند که در بافت‌های نورساختی و غیر نورساختی یافت می‌شوند و در بافت‌های نورساختی به‌عنوان رنگدانه کمکی بوده و دارای نقش آنتی‌اکسیدانی و جمع‌کنندگی گونه‌های فعال آزاد اکسیژن می‌باشند (Li et al., 1998). برای خنثی کردن اثر سمی گونه‌های اکسیژن فعال ایجاد شده در تنش، یک سیستم آنتی‌اکسیدانی با کارایی بالا نیاز است. به خوبی مشخص شده است که کاروتنوئیدها می‌توانند سیستم جمع‌کننده نور دستگاه نورساختی را از آسیب گونه‌های



پرتو گاما (گری)

شکل ۲- برهمکنش اتیل متان سولفونات و پرتو گاما بر میزان کاروتنوئید *P. macrostomum* میانگین‌های دارای حرف مشترک تفاوت معنی داری ندارند (آزمون LSD در سطح ۵٪). روی ستون‌ها خطای استاندارد آورده شده است.

Figure 2- Interaction of ethyl methane sulfonate and gamma ray on carotenoid content of *P. macrostomum*. Means with the same letter are not significantly different (LSD test at 5% level). Columns are with SE.

معنی‌دار با غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۳ اتیل متان سولفونات (با میانگین ۸۸/۲۸ و ۸۶/۴۵٪) نداشت و کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تیمار ترکیبی ۰/۱ اتیل متان سولفونات با ۱۰۰ گری پرتو گاما (با میانگین ۶۲/۶۴٪) به دست آمد که با تیمارهای ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ اتیل متان سولفونات

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

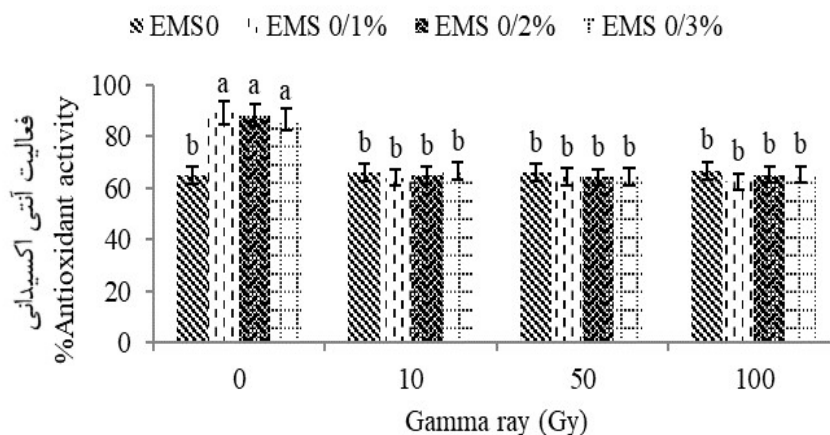
اتیل متان سولفونات و پرتو گاما و برهمکنش اتیل متان سولفونات و پرتو گاما بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود به‌طوری که بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت ۰/۱ اتیل متان سولفونات (با میانگین ۸۹/۱۹٪) به دست آمد که تفاوت



شماری یون و گونه فعال آزاد بسیار فعال در مسیر پرتو به وجود می‌آید. بنابراین تولید گونه‌های اکسیژنی فعال سبب فعال شدن سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود (Kovacs & Keresztes, 2002). اما کاربرد آن روی مامیران اثر معنی‌داری نداشته است (Fatemi et al., 2015)، و کاربرد پرتو گاما روی آویشن سیاه، آویشن باغی و مرزه منجر به کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی شده است (Gumus et al., 2011).

دارای تفاوت معنی‌دار بود اما با دیگر تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۳).

نتایج به دست آمده از پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهد که کاربرد پرتو گاما روی گیاه *Amoora rohituka* (Roxb.) Wight & Arn. (Rajurkar & Gaikwad, 2012)، و زیره سبز (Kim et al., 2009) سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی شده است. گزارش شده است که با پرتو دهی، مولکول‌هایی که بر سر راه پرتو قرار گرفته‌اند با پرتو واکنش داده و چندین مولکول برانگیخته شده و



پرتو گاما (گری)

شکل ۳- برهمکنش اتیل متان سولفونات و پرتو گاما بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی *P. macrostomum*. میانگین‌های دارای حرف مشترک تفاوت معنی‌داری ندارند (آزمون LSD در سطح ۵٪). روی ستون‌ها خطای استاندارد آورده شده است.

Figure 3- Interaction of ethyl methane sulfonate and Gamma ray on antioxidant activity of *P. macrostomum*. Means with the same letter are not significantly different (LSD test at 5% level). Columns are with SE.

سولفونات (با میانگین ۳۱۵۹/۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک) بود (شکل ۴).

نتایج به دست آمده از پژوهش‌ها نشان می‌دهد که کاربرد پرتو گاما روی گیاهان درمنه کوهی (Jalili et al., 2017)، زیره سیاه (Dadkhah et al., 2009) و گیاه L. (Urban.) *Centella asiatica* (Moghaddam et al., 2011) منجر به

فلاونوئید

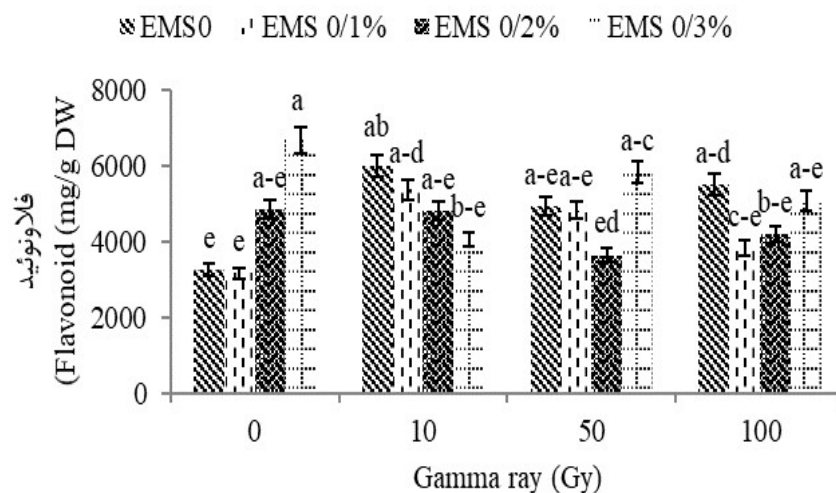
اثر اتیل متان سولفونات و پرتو گاما بر میزان فلاونوئید به‌طور اثرگذاری معنی‌دار بود و بیشترین فلاونوئید کل مربوط به تیمار ۰/۳٪ اتیل متان سولفونات (با میانگین ۶۶۶۶/۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک) بود و کمترین میزان فلاونوئید کل در تیمار ۰/۱٪ اتیل متان



در پاسخ به پرتو دهی می‌باشد (Fini *et al.*, 2011). آنزیم دیگری که در زیست‌ساخت فلاونوئیدها نقش دارد، چالکون سینتیز می‌باشد. به نظر می‌رسد که فعالیت این آنزیم در اثر پرتو دهی افزایش یافته، در نتیجه باعث افزایش زیست‌ساخت فلاونوئیدها به‌عنوان یک عامل دفاعی می‌شود (Dao *et al.*, 2012).

کاهش فلاونوئیدها می‌تواند به علت کاهش فعالیت آنزیم‌های مهمی مانند فنیل آلانین آمونیا لایز و چالکون سینتیز باشد و یا شاید به دلیل ایجاد جهش ژنتیکی و اپی ژنتیکی باشد. پرتوها توانایی ایجاد انواع جهش و دیگر تغییرها در یاخته را دارند. بنابراین احتمال ایجاد جهش نامطلوب وجود دارد، زیرا در دُزهای بالا فرصت جهش بسیار افزایش یافته و جهش ایجاد شده باعث کاهش میزان این ترکیب ها شده است (Chung *et al.*, 2006).

افزایش فلاونوئیدها شده است. گزارش شده است که فلاونوئیدها از راه پیشگیری از ساخت و شکل‌گیری مالون دی آلدئید منجر به پایداری غشا در نمونه‌های پرتو دیده می‌شوند (Seddik *et al.*, 2010). در واقع افزایش فلاونوئیدها در شرایط تنش‌زا نوعی سازش با شرایط نامساعد محیطی است (Fini *et al.*, 2011). یکی از دلایل افزایش زیست‌ساخت فلاونوئید کل به‌احتمال افزایش مقدار آمینواسید فنیل آلانین و همچنین افزایش بیان آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز می‌باشد (El-Beltagi *et al.*, 2011). بنابراین به نظر می‌رسد که با پرتو دهی به‌عنوان یک پیام محیطی آنزیم DAHP synthase فعال شود و افزایش بیان ژن در پاسخ این تغییرهای محیطی صورت گیرد و در نتیجه منجر به افزایش فعالیت آنزیم کلیدی مسیر زیست‌ساخت فنول‌ها یعنی فنیل آلانین آمونیا لایز شود. نتیجه فعالیت این آنزیم موجب ساخت فلاونوئید بیشتر



پرتو گاما (گری)

شکل ۴- برهمکنش اتیل متان سولفونات و پرتو گاما روی میزان فلاونوئید *P. macrostomum* میانگین های دارای حرف (حروف) مشترک تفاوت معنی داری ندارند (آزمون LSD در سطح ۰/۰۵٪). روی ستون ها خطای استاندارد آورده شده است.

Figure 4- Interaction of ethyl methane sulfonate and gamma ray on flavonoid content of *P. macrostomum*. Means with the same letter(s) are not significantly different (LSD test at 5% level). Columns are with SE.



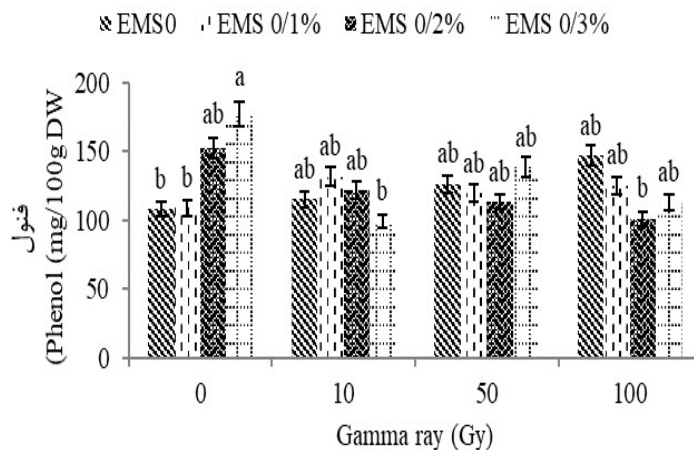
فنول

اثر اتیل متان سولفونات و پرتو گاما بر میزان فنول به طور اثرگذاری معنی دار بود و بیشترین فنول مربوط به تیمار ۰/۳٪ اتیل متان سولفونات (با میانگین ۱۷۷/۲ میلی گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک) بود و کمترین میزان فنول کل در تیمار ترکیبی ۰/۳٪ اتیل متان سولفونات با ۱۰ گری پرتو گاما (با میانگین ۹۹/۱۳ میلی گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک) بود (شکل ۵).

نتایج به دست آمده از پژوهش های دیگر نشان می دهد که استفاده از پرتو گاما روی گیاه رزماری (Koseki et al., 2002)، گیاه *Cymbopogon schoenanthus* L. (Musa et al., 2010)، گیاه *Amoora rohituca* (Rajurkar & Gaikwad, 2012) و زیره سبز (Kim et al., 2009) سبب افزایش ترکیب های فنولی شده است. همچنین گزارش شده است که تنش اکسیداتیو وارد شده توسط پرتو، ساخت ترکیب های فنولی را افزایش می دهد. این افزایش می تواند به دلایل گوناگونی توجیه شود. به احتمال در اثر پرتو دهی فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز که مسئول ساخت ترکیب های فنولی

است و اسید آمینه فنیل آلانین را به سینامیک اسید تبدیل می کند، افزایش یافته است. بنابراین وجود یک همبستگی مثبت بین دُز پرتو و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز سبب افزایش میزان فنول ها شده است (El-Beltagi et al., 2011). از سوی دیگر به احتمال پرتو دهی و فرآیندهای پیاپی اکسیداسیون سبب تجزیه ترکیب های فنولی بزرگ تر به ترکیب های فنولی محلول با وزن مولکولی کمتر شده است و شاید پرتو دهی بتواند سبب تجزیه گلیکوزیدها و آزاد شدن ترکیب های فنولی از اجزای گلیکوزیدی شده باشد (El-Beltagi et al., 2004; Variyar et al., 2011). پرتو دهی دارای اثرهای مستقیم و غیرمستقیمی است. رادیولیز آب باعث تولید گونه های فعال مانند سوپراکسید، هیدروکسید و پراکسید هیدروژن می شود. به احتمال این رادیکال ها با شکستن پیوندهای گلیکوزیدی میزان فنول ها را افزایش داده است (Lee et al., 2013). کاهش مقدار فنول می تواند به دلیل کاهش فعالیت آنزیم های مسیر تولید آن باشد (Gumus et al., 2011).





پرتو گاما (گری)

شکل ۵- برهمکنش اتیل متان سولفونات و پرتو گاما روی میزان فنول *P. macrostomum* میانگین های دارای حرف (حروف) مشترک تفاوت معنی داری ندارند (آزمون LSD در سطح ۰/۵٪). روی ستون ها خطای استاندارد آورده شده است.

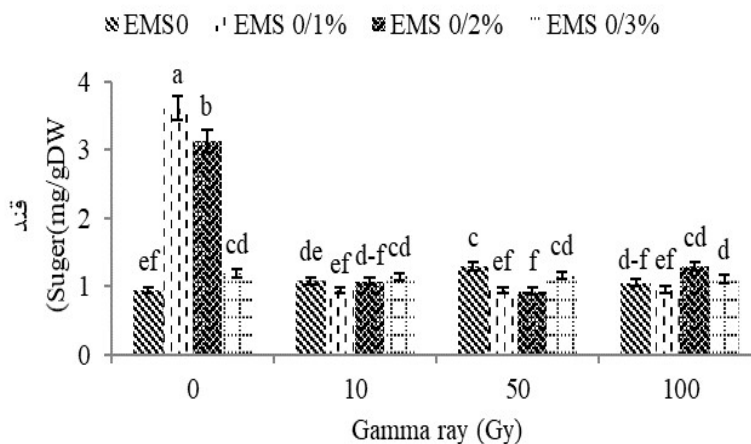
Figure 5- Interaction of ethyl methane sulfonate and gamma ray on phenol content of *P. macrostomum*. Means with the same letter(s) are not significantly different (LSD test at 5% level). Columns are with SE.

قند می شوند. با بررسی اثر پرتوهای یونیزه کننده بر یاخته های گیاه گزارش شده که پرتوها توانایی این را دارند که به طور مستقیم با مولکول های آب واکنش دهند و آن ها را هیدرولیز کنند (Kovacs & Keresztes, 2002). وجود یا نبود اکسیژن در اثر هیدرولیز آب، عاملی اثرگذار در تغییر pH، دما و رقیق شدگی ترکیب های محلول یاخته ای است (Kovacs & Keresztes, 2002). افزایش قندهای محلول به عنوان یکی از اسمولیت های سازگار به عنوان عامل مهمی در حفظ تعادل اسمزی، ادامه جذب آب، حفظ ساختارهای یاخته ای و ترکیب های پروتئینی و آنزیمی می تواند اثرگذار باشد. همچنین گزارش شده که گروه های هیدروکسیل قندها جایگزین آب غشاها و پروتئین ها می شود و با آن ها پیوندهای هیدروژنی تشکیل داده و از تغییر شکل آن ها و به دنبال آن هیدرولیز آب پیشگیری می کند (Kafi et al., 2009).

اثر اتیل متان سولفونات و پرتو گاما بر میزان قند در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود به طوری که بیشترین قند در غلظت ۰/۱٪ اتیل متان سولفونات (با میانگین ۳/۶۱ میلی گرم در گرم وزن خشک) به دست آمد که تفاوت معنی دار با دیگر تیمارها داشت و کمترین میزان قند در تیمار ترکیبی ۰/۲٪ اتیل متان سولفونات با ۵۰ گری پرتو گاما (با میانگین ۰/۹۳ میلی گرم در گرم وزن خشک) به دست آمد (شکل ۶).

افزایش قند در زنبق (Austin, 2005) و گندم (Borzouei et al., 2013) پس از پرتو دهی با پرتو گاما گزارش شده است که در فرایند یونیزاسیون، مولکول های آب هیدرولیز می شوند و گونه های فعال اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن، آنیون سوپراکسید و گونه های فعال هیدروکسیل در اثر پلازما شده مولکول های آب تولید





پرتو گاما (گری)

شکل ۶- برهمکنش اتیل متان سولفونات و پرتو گاما روی میزان قند *P. macrostomum* میانگین های دارای حرف (حروف) مشترک تفاوت معنی داری ندارند (آزمون LSD در سطح ۵٪). روی ستون ها خطای استاندارد آورده شده است.

Figure 6- Interaction of ethyl methane sulfonate and gamma ray on sugar content of *P. macrostomum*. Means with the same letter(s) are not significantly different (LSD test at 5% level). Columns are with SE.

نتیجه گیری

فراهم کنند. بنابراین می تون نتیجه گرفت که استفاده از جهش برای ایجاد گیاهان مختلف با توانایی های گوناگون فیزیولوژیک و فتوشیمیایی مناسب بوده و می تواند بستر لازم را برای معرفی شقایق با ویژگی های زینتی و دارویی بهبود داده شده فراهم کند.

همان گونه که نتایج این پژوهش نشان داد تیمارهای جهش زای اتیل متان سولفونات و پرتو گاما توانستند در ویژگی های فیزیولوژیک و فتوشیمیایی گیاه *P. macrostomum* تغییراتی ایجاد کنند و بستر مناسبی برای گزینش جهش یافته هایی با ویژگی های بهبود یافته

منابع

- Abu, J.O., Müller, K., Duodu, K.G., Minnaar, A. (2006). Gamma irradiation of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) flours and pastes: Effects on functional, thermal and molecular properties of isolated proteins. *Food Chemistry*, 95(1), 138-147.
- Ahloowalia, B., Maluszynski M., Nichterlein, K. (2004). Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica*, 135(2), 187-204.
- Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1), 1-15.
- Austin C. (2005). Irises. *A Gardener's Encyclopedia*: Timber Press, Inc.
- Baytop, T. (1999). *Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present)*. Publication of the Istanbul University.
- Borzouei, A., Kafi, M., Sayahi, R., Rabiei, E., Sayad, P. (2013). Biochemical response of two wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) to gamma radiation. *Pakistan Journal Botany*, 45, 473-477.



- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Broertjes, C. (2012). *Application of Mutation Breeding Methods in the Improvement of Vegetatively Propagated Crops* (Vol. 2): Elsevier.
- Chatterjee, A., Shukla, S., Mishra, B.K., Rastogi, A., Singh, S.P. (2012). Induction of variability through mutagenesis in opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 36(1), 1-11.
- Chung, B., Lee, Y.B., Baek, M.H., Kim, J.H., Wi, S., Kim, J.S. (2006). Effects of low-dose gamma-irradiation on production of shikonin derivatives in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon* S. *Radiation Physics and Chemistry*, 75(9), 1018-1023.
- Dadkhah, A., Khalafi, H., Rajaei, R., Allameh, A., Rezaei, M., Seyhoun, M. (2009). Study of the effects of gamma-irradiation on microbial load and efficient extracts of caraway seeds. *Journal of Nuclear Science and Technology*, 27-34.
- Dao, T., Linthorst, H., Verpoorte, R. (2011). Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochemistry Reviews*, 10(3), 397.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.T., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
- El-Beltagi, H.S., Ahmed, O.K., El-Desouky, W. (2011). Effect of low doses γ -irradiation on oxidative stress and secondary metabolites production of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) callus culture. *Radiation Physics and Chemistry*, 80(9), 968-976.
- Fatemi, F., Asri, Y. Naji, Y. (2015). The effect of gamma irradiation on the biological property of hydroalcoholic extract and essential oils derived from *Chelidonium majus* L. *Journal of Plant Research*, 29 (3), 567-577. (In Persian with English abstract).
- Fini, A., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Tattini, M. (2011). Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants. *Plant Signaling and Behavior*, 6(5), 709-711.
- Fu, H.W., Li, Y.F., Shu, Q.-Y. (2008). A revisit of mutation induction by gamma rays in rice (*Oryza sativa* L.): implications of microsatellite markers for quality control. *Molecular Breeding*, 22(2), 281-288.
- Gumus, T., Albayrak, S., Sagdic, O., Arici, M. (2011). Effect of gamma irradiation on total phenolic contents and antioxidant activities of *Satureja hortensis*, *Thymus vulgaris*, and *Thymbra spicata* from Turkey. *International Journal of Food Properties*, 14(4), 830-839.
- Jalili, Sh., Ehsanpour, A., Asghari, Gh.R., Abdi, M.R. (2017). Effect of Gamma radiation on physiologic and antioxidant factor on and *Artemisia aucheri* Boiss. *Journal of Plant Research*, 29 (4), 741-750 (In Persian with English abstract).
- Joz-Ghasemi, S., Rabiei, V. (2016). Detection and Feasibility of Iranian Iris Correction Using Gamma ray. *Breeding Agronomic and Horticultural Crop*, 4 (1), 89-75. (In Persian with English abstract).
- Kafi, M., Borzouei, A., Salehi, M., Kamandi, A., Masoumi, A., Nabati, C. (2009). *Physiology of Environmental Stresses in Plants*. Mashhad University Press Publications. (In Persian).
- Khalighi-Sigaroodi, F. Ahvazi, M. Yazdani, D., Kashefi, M. (2012). Cytotoxicity and antioxidant activity of five plant species of Solanaceae family from Iran. *Journal Medicinal Plants*, 11(43), 41-53.
- Kharkwal, M., Pandey, R., Pawar, S. (2004). Mutation Breeding for Crop Improvement. In *Plant Breeding*, Springer.



- Kim, D.O., Jeong, S.W., Lee, C.Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81(3), 321-326 .
- Kim, J.H., Shin, M.H., Hwang, Y.J., Srinivasan, P., Kim, J.K., Park, H.J., Lee, J. W. (2009). Role of gamma irradiation on the natural antioxidants in cumin seeds. *Radiation Physics and Chemistry*, 78(2), 153-157 .
- Kiong, A.L.P., Lai, A.G., Hussein, S., Harun, A.R. (2008). Physiological responses of *Orthosiphon stamineus* plantlets to gamma irradiation. *American-Eurasian journal of sustainable agriculture*, 2(2), 135-149 .
- Koseki, P.M., Villavicencio, A.L.C., Brito, M.S., Nahme, L.C., Sebastião, K.I., Rela, P.R., Freitas, P.C. (2002). Effects of irradiation in medicinal and edible herbs. *Radiation Physics and Chemistry*, 63(3-6), 681-684 .
- Kovacs, E., Keresztes, A. (2002). Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. *Micron*, 33(2), 199-210 .
- Lee, M.B., Kim, D.Y., Jeon, W.B., Hong, M.J., Lee, Y.J., Bold, O., Kim, D.S. (2013). Effect of gamma radiation on growth and lignin content in *Brachypodium distachyon*. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 16(2), 105-110 .
- Li, L., Staden, J.V., Jäger, A. (1998). Effects of plant growth regulators on the antioxidant system in seedlings of two maize cultivars subjected to water stress. *Plant Growth Regulation*, 25(2), 81-87 .
- Moghaddam, S.S., Jaafar, H., Ibrahim, R., Rahmat, A., Aziz, M.A., Philip, E. (2011). Effects of acute gamma irradiation on physiological traits and flavonoid accumulation of *Centella asiatica*. *Molecules*, 16(6), 4994-5007.
- Musa, H.A.A., Ahmed, E.E., Osman, G., Ali, H., Müller, J. (2010). Microbial load and phytochemicals stability of camel hay (*Cymbopogon schoenanthus* L.) leaves as affected by gamma irradiation. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(4), 662-670 .
- Naderi Shahab, M.A., Mehrpor, Sh., Jebeli, M., Jafari, A.A. (2007). Mutagenesis effects of EMS and UV-C irradiation doses on *Medicago sativa* L. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 15(3), 183-195 (In Persian with English abstract).
- Okamura, M., Umemoto, N., Onishi, N. (2012). Breeding glittering carnations by an efficient mutagenesis system. *Plant Biotechnology*, 12.0104 a . 29(3), 1-6.
- Patil, B., Rane, G. (2015). Gamma radiation induced chlorophyll mutations in cluster bean *Cyamopsis tetragonoloba* L. Taub Var. NCB-12. *International Journal of Allied, Practice Research and Review*, 2(2), 75-85 .
- Rajurkar, N., Gaikwad, K. (2012). Effect of gamma irradiation on antioxidant activity of *Amoora rohituka*. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 293(1), 409-413 .
- Salehi, F., Khairi, A.S.E., Eskandari, A.S., Satisfaction, M.B. (2015). Effect of gamma irradiation on morphological and phytochemical traits of medicinal plant *Thymus vulgaris* L. *Journal of Ecophytochemistry of Medicinal Plants*, 3 (3), 21-10. (in Persian)
- Sariyar, G., Mat, A., Ünsal, Ç., Özhatay, N. (2002). Biodiversity in the Alkaloids of 7 Annual *Papaver* species of Turkish origin. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 44(3), 159-168.
- Seddik, K., Nadjet, I., Daoud, B.A.H., Lekhmici, A. (2010). Antioxidant and antibacterial activities of extracts from *Artemisia herba alba* Asso. leaves and some phenolic compounds. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(13), 1273-1280 .
- Sharifnia, F., Heydarian, S., Salimpour, F. (2010). Biosystematic study of some *Papaver* (Papaveraceae) species from Iran. *The Iranian Journal of Botany*, 16(1), 54-68 .



- Shu, Q.Y., Lagoda, P.J.L. (2007). Mutation techniques for gene discovery and crop improvement. *Molecular Plant Breeding*, 2: 193-195.
- Siddiqui, B., Khan, S. (1999). Breeding in crop plants, mutations and in vitro mutation breeding. *Journal of Cytological and Genetical*, 34(1), 75-78.
- Sood, S., Jambhulkar, S., Singh, Y., Gupta, N., Sharma, S. (2017). Induced chlorophyll mutations in bell pepper (*Capsicum annuum* L. var. grossum). *Journal of Applied and Natural Science*, 9(2), 1085-1089 .
- Stamo, I., Ylli, A., Dodbiba, A. (2007). Induced mutations for improving production on bread and durum wheat. *Paper presented at the American Institute of Physics Conference Proceedings*, 899(1), 747-747.
- Strid, Å., Chow, W., Anderson, J. M. (1990). Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthesis in *Pisum sativum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1020(3), 260-268 .
- Sujay, R., Kanzaki, H., Matsumura, H., Arunita, R., Fujibe, T., Okuyama, Y., Utsushi, H. (2010). *Use of TILLING for reverse and forward genetics of rice*. The handbook of plant mutation screening: mining of natural and induced alleles, 187-197 .
- Tulmann, N., Ando, A., Figueira, A., Latado, R., Dos Santos, P., Correa, L., Ishiy, T. (2011). Genetic improvement of crops by mutation techniques in Brazil. *Plant Mutation Reports*, 2(3), 24-37 .
- Variyar, P.S., Limaye, A., Sharma, A. (2004). Radiation-induced enhancement of antioxidant contents of soybean (*Glycine max* Merrill). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3385-3388.
- Wi, S.G., Chung, B.Y., Kim, J.S., Kim, J.H., Baek, M.H., Lee, J.W., Kim, Y.S. (2007). Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants. *Micron*, 38(6), 553 - 564.
- Yoo, K.M., Lee, C.H., Lee, H., Moon, B., Lee, C.Y. (2008). Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry*, 106(3), 929-936 .





Effect of ethyl methane sulfonate and gamma ray on physiological and phytochemical characteristics of papaver (*Papaver macrostomum* Boiss. and A. Huet)

Fatemeh Minaei¹, Abolfazl Jowkar^{1*}, Mehdi Zehtabian²

1. Department of Horticultural Science, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

2. Department of Nuclear Engineering, School of Engineering, Shiraz University, Shiraz, Iran

✉ ajowkar@shirazu.ac.ir

Abstract

Papaver macrostomum Boiss. and A. Huet is a herbaceous ornamental plant that grows as a wild flower in different areas of Iran. It produces different medicinal compounds. Experiment was conducted to study the effect of ethyl methane sulfonate and gamma ray on physiological and phytochemical characteristics of papaver. The experiment was carried out as a factorial experiment based on completely randomized design with three replications in greenhouse conditions from 2017-2018. Experimental treatments included ethyl methane sulfonate at four levels (0, 0.1, 0.2 and 0.3%) and Gamma ray at four levels (0, 10, 50 and 100 Gy). Characteristics of chlorophyll, carotenoid, flavonoid, phenol, and sugar content as well as antioxidant activity were measured. The results showed that treatments had a significant effect on the studied factors. Mutation treatments increased the characteristics and the highest amount of chlorophyll, carotenoids, antioxidant activity, and sugar were belonged to the treatment of 0.1% ethyl methane sulfonate and the highest amount of phenol and flavonoid was observed in the treatment of 0.3% ethyl methane sulfonate. Overall, the results showed that the use of mutagenic agents can affect the physiological and phytochemical traits of *P. macrostomum*. However, the mutagenic agent of ethyl methane sulfonate alone was more effective than the other treatments.

Keywords: Chemical mutagens, Mutation induction, Papaver flower, *Papaver macrostomum*, Radiation.