

آثار مورفو فیزیولوژیک پرتو گاما بر گونه چمانواش بلند

رحیم امیری خواه^۱، نعمت اله اعتمادی^{۱*}، محمدرضا سبزلعلیان^۲ و علی نیکبخت^۱^۱ گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان^۲ گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۲۸، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۰۷/۱۲)

چکیده

پرتوگاما از پرتوهای یونساز است که به منظور القاء جهش در گونه‌های مختلف گیاهی استفاده می‌گردد. این مطالعه به منظور بررسی پاسخ‌های رشدی و فیزیولوژیکی دو ژنوتیپ 75C (ژنوتیپ بومی) و Pacer (ژنوتیپ خارجی) از گونه چمانواش بلند به پرتوگاما و همچنین تعیین دز مناسب پرتوگاما جهت استفاده در برنامه به‌نژادی از طریق جهش این گونه صورت گرفت. بذره‌های هر دو ژنوتیپ در معرض دزهای مختلف پرتو شامل ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ گری حاصل از چشمه کبالت ۶۰ قرار گرفتند. نمونه‌های پرتودیده به همراه نمونه‌های شاهد در گلدان کشت و در شرایط گلخانه نگهداری شدند. نتایج نشان داد که دز پایین پرتوگاما (۵۰ گری) اثر محرکی بر میزان رشد گیاهچه هر دو ژنوتیپ مورد بررسی داشت. به‌هرحال، دزهای بالای پرتو (۱۰۰ تا ۴۰۰ گری) سبب کاهش معنی‌داری در صفات درصد زنده‌مانی و ارتفاع گیاه و افزایش تعداد روز تا سبزشدن در هر دو ژنوتیپ گردید. همچنین، دزهای بالای پرتو سبب کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش معنی‌داری در میزان پرولین و مالون‌دی‌آلدئید در گیاهچه هر دو ژنوتیپ در مقایسه با گیاهان شاهد گردید. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که همبستگی مثبتی بین زنده‌مانی و رشد گیاه با میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی وجود دارد. با این حال، رشد گیاه همبستگی منفی با میزان پرولین و مالون‌دی‌آلدئید بعد از پرتودهی نشان داد. در ژنوتیپ بومی چمانواش (75C) حساسیت بیشتری به تنش پرتوگاما از لحاظ میزان رشد نسبت به ژنوتیپ خارجی Pacer مشاهده گردید. براساس تجزیه پروبیت، دزهای ۲۱۲ و ۲۲۳ گری پرتوگاما به‌عنوان دزهای ۵۰ درصد کشندگی (LD₅₀) به ترتیب در ژنوتیپ 75C و Pacer تعیین شد. براساس نتایج حاصل از این بررسی، تنش پرتوگاما تأثیر منفی بر زنده‌مانی، ویژگی‌های مورفولوژیکی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی چمانواش بلند نشان داد و دزهای ۲۰۰ تا ۲۵۰ گری می‌تواند به‌عنوان دز مناسب پرتوگاما جهت استفاده در برنامه‌های به‌نژادی از طریق جهش در این گونه مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: پرتوگاما، چمانواش بلند، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، دز ۵۰ درصد کشندگی (LD₅₀)

مقدمه

سایر گیاهان در فضای سبز شناخته شده است (امیری خواه و همکاران، ۱۳۹۳). به‌هرحال، بسیاری از گونه‌های چمنی متداول در فضای سبز نیاز آبی زیادی دارند و نیازمند مدیریت قوی

یکی از عناصر اصلی فضای سبز، گیاهان چمنی هستند که به‌عنوان مهم‌ترین گیاه پوششی و زمینه‌ای اصلی برای کاشت

است؛ بنابراین، به‌نژادی از طریق جهش می‌تواند یک ابزار مناسب برای توسعه موتانت‌های تجاری چمن باشد (Cakir et al., 2017). نوع عامل جهش‌زا و مقدار جهش‌زا از مهم‌ترین عوامل مؤثر در موفقیت یک برنامه به‌نژادی از طریق جهش است (باقری و همکاران، ۱۳۹۶). جهش‌زاهای فیزیکی اهمیت بیشتری نسبت به جهش‌زاهای شیمیایی از لحاظ کارآمدی و سلامت زیست‌محیطی دارند به‌طوری‌که ۹۰٪ موتانت‌های بدست‌آمده از طریق کاربرد جهش‌زاهای فیزیکی حاصل گردیده است که در بین جهش‌زاهای فیزیکی پرتو گاما (۶۴٪ موتانت‌ها بدست‌آمده) بیشترین کاربرد را به خاطر قدرت نفوذ و اثربخشی بیشتر دارد (Cakir et al., 2017; IAEA, 2021).

پرتوگاما یکی از پرتوهای یونساز قوی است که سبب یونیزه‌کردن مستقیم مولکول‌های مختلف در سیستم‌های زنده و همچنین تولید گونه‌های فعال اکسیژن به‌صورت غیرمستقیم می‌گردد. تجمع بالای گونه‌های فعال اکسیژن و شکست در مولکول‌های DNA سلول‌های پرتودیده سبب ایجاد طیف‌های گوناگونی از تغییرات ژنومی و کروموزومی می‌شود که باعث صدمات شدید به ساختار سلول و نهایت مرگ سلول می‌گردد (Fan et al., 2014; Gudkov et al., 2019). تعدیل گونه‌های فعال اکسیژن برای محافظت در برابر تنش اکسیداتیو ضروری است، بنابراین برای مقابله با تنش اکسیداتیو حاصل از پرتو گاما، گیاهان سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی از جمله آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز (Ascorbate Peroxidase (APX)، کاتالاز [Catalase (CAT)]، پراکسیداز (Superoxide dismutase (SOD)) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD)] و غیر آنزیمی را بکار می‌گیرد. سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی نقش اصلی در جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد و تنظیم سطح گونه‌های فعال اکسیژن درون سلولی را ایفا می‌کنند که سبب محافظت گیاه در برابر تنش‌های مختلف زیستی و غیر زیستی مثل پرتوهای یونساز می‌گردند. حساسیت گیاه به پرتو براساس گونه، رقم و شرایط فیزیولوژیکی گیاه متفاوت است (Amirikhah et al., 2019; Gudkov et al., 2019). بنابراین برای استفاده از پرتوهای یونساز به‌عنوان عامل جهش‌زا در

برای نگهداری و حفظ کیفیت مطلوب هستند و حتی ممکن است تحت شرایط تنش به‌سرعت از بین بروند (مصطفایی و همکاران، ۱۳۹۴). جایگزینی چمن‌های متداول با گراس‌های بومی متحمل به خشکی یکی از راه‌های مهم کاهش مصرف آب در فضای سبز شهری است (روح‌الهی و همکاران، ۱۳۹۴؛ نعمت‌الهی و همکاران، ۱۳۹۷). بالین‌وجود، گونه‌های بومی چمن از لحاظ کیفیت ظاهری قابلیت رقابت با چمن‌های وارداتی را ندارند که استفاده از آن‌ها را محدود کرده است. چمن‌های بومی به خاطر بافت درشت و خشن، طول بالای میانگره‌ها، تراکم کم، رشد سریع در طول فصل رشد و ارتفاع چمن‌زنی بالا از زیبای مطلوبی برخوردار نیستند (اعتمادی، ۱۳۸۴). برای رفع این مشکل استفاده از برنامه‌های به‌نژادی به‌منظور تولید ارقام پاکوتاه و بافت‌ریز از ژرم‌پلاسماهای بومی ضروری به‌نظر می‌رسد.

به‌نژادی از طریق جهش به‌طور موفقیت‌آمیزی در جهت اصلاح ارقام جدید در بسیاری از گونه‌های گیاهی به‌کاررفته است (باقری و همکاران ۱۳۹۶؛ Sever Mutlu et al., 2015). بر طبق آمار منتشرشده توسط واحد مشترک سازمان انرژی اتمی و سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (FAO/IAA)، تعداد ارقام موتانت که به‌طور رسمی آزادشده بیش از ۳۳۶۴ رقم جدید از ۲۱۴ گونه گیاهی است که اکثر آن‌ها با استفاده از فن‌آوری پرتودهی بدست آمدند (IAEA, 2021). همچنین، جهش‌زایی با پرتو به‌ویژه پرتوگاما به‌طور مؤثری به‌منظور تغییرات مورفولوژیکی مطلوب در به‌نژادی گراس‌های چمنی فصل گرم و فصل سرد مورد استفاده قرار گرفت (Sever Mutlu et al., 2015; Li et al., 2010; Li et al., 2016) که در نتیجه آن، ۲۳ رقم موتانت بدست آمد که به‌صورت تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرند (IAEA, 2021). پاکوتاهی رایج‌ترین صفت بدست‌آمده در روش به‌نژادی گیاهان از طریق جهش است و از طرفی تقاضا برای ارقام پاکوتاه چمن به خاطر کاهش دفعات سرزنی، نیاز به آبیاری و کوددهی کمتر به‌دلیل افزایش هزینه‌های نگهداری چمن‌ها از قبیل انرژی، کارگری، ماشین‌آلات و کود و محدودبودن منابع آب در حال افزایش

خودگشن و تحمل به خشکی انتخاب (جدول ۱) و بذور خودگشن ژنوتیپ‌های انتخابی به‌عنوان ماده گیاهی در این بررسی مورد استفاده قرار گرفت.

پرتودهی با پرتو گاما: با در نظر گرفتن رطوبت بذرهای سالم و یکدست هر ژنوتیپ در محدود ۱۱ تا ۱۳ درصد (وزنی/وزنی)، بذرها با دزهای مختلف پرتو گاما شامل ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ گری حاصل از چشمه کبالت ۶۰ با شدت پرتودهی ۵ گری در دقیقه به‌ترتیب در مدت زمان ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ دقیقه در پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای کرج پرتودهی شدند. بذرهای پرتودهی نشده هر ژنوتیپ به‌عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفتند.

شرایط رشد: پس از پرتودهی، بذرهای پرتودیده به‌همراه بذرهای شاهد هر ژنوتیپ در داخل گلدان‌های (۱۵ سانتی‌متری) پر شده با خاک لومی رس کشت و در شرایط گلخانه با دمای ۱۸ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و نور طبیعی نگهداری شدند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل با دو سطح ژنوتیپ و هفت سطح دز پرتوگاما در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و تعداد ۱۰۰ بذر در هر تکرار اجرا گردید. مدت زمان از کاشت بذر تا سبز شدن ۱۰ درصد از بذرها در هر گلدان به‌عنوان صفت روز تا سبز شدن در نظر گرفته شد. سه هفته پس از کاشت، اندازه‌گیری صفات مختلف از جمله ارتفاع گیاه، درصد زنده‌مانی و خصوصیات فیزیولوژیکی شامل رنگیزه‌های فتوسنتزی، میزان پرولین، میزان مالون دی‌آلدئید و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بر روی گیاهچه‌های سبز شده صورت گرفت.

کلروفیل و کاروتنوئید: میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی کلروفیل و کاروتنوئید برگ‌ها به روش Lichtenthaler و Buschmann (۲۰۰۱) توسط حلال استون اندازه‌گیری شد. میزان ۰/۱ گرم نمونه برگی با کمک ۱۰ میلی‌لیتر استون ۱۰۰٪ عصاره‌گیری شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. میزان جذب محلول رویی نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-2100 A در سه طول‌موج ۶۴۴/۸، ۶۶۱/۶ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد و میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید کل برحسب میلی‌گرم بر

برنامه به‌نژادی از طریق جهش ضروری است که واکنش گیاه به پرتو مورد ارزیابی قرار گیرد.

یکی از مراحل مهم در به‌نژادی از طریق جهش، انتخاب دز مناسب جهش‌زا است. دزهای بالای پرتو در روش به‌نژادی از طریق جهش به‌منظور ایجاد تک بوته‌های موتانت بیشتر مؤثر هستند ولی بالاترین دز قابل کاربرد به خاطر از بین رفتن گیاه و عدم باروری در ایجاد جهش مورد استفاده قرار نمی‌گیرند (باقری و همکاران، ۱۳۹۶). دز مناسب جهت پرتودهی بایستی به‌گونه‌ای انتخاب شود که اولاً فراوانی وقوع جهش به اندازه کافی باشد. ثانیاً دز کاربردی نباید به حدی زیاد باشد که گیاهان را از بین ببرد (رزمی و همکاران، ۱۳۹۸). کاهش میزان رشد یا آسیب به گیاهچه که بعد از جوانه‌زنی بذر مشاهده می‌شود معمولاً به‌عنوان شاخص صدمات ژنتیکی به گیاه در نظر گرفته می‌شود. به‌طورکلی، با افزایش میزان دز پرتو، آسیب‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی بیشتری در نسل اول مشاهده می‌شود (باقری و همکاران، ۱۳۹۶).

گونه چمانواش بلند (*Festuca arundinacea*) از مهم‌ترین گونه‌های گیاهان باریک برگ است که به‌منظور تولید علوفه، حفاظت خاک و احداث چمن بکار می‌رود. همچنین، چمانواش بلند از جمله گونه‌های پرکاربرد چمن به‌واسطه تحمل بالا به سایه و خشکی در بین سایر چمن‌های فصل سرد متداول در فضای سبز است که توده‌های بومی آن نیز در ایران به‌وفور یافت می‌شود. لذا؛ این آزمایش به‌منظور بررسی واکنش‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی ژنوتیپ‌های چمانواش بلند به دزهای مختلف پرتوگاما و همچنین تعیین دز مناسب پرتو جهت استفاده در برنامه‌های به‌نژادی از طریق جهش در این گونه صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این پژوهش، براساس پژوهش‌های قبلی دانشگاه صنعتی اصفهان در ژنوتیپ‌های چمانواش بلند بومی و ذخیره ژرم‌پلاسما موجود، یک ژنوتیپ بومی و یک ژنوتیپ خارجی برتر از لحاظ ویژگی‌های چمنی، توانایی تولید بذر

جدول ۱- ژنوتیپ‌های انتخابی از آزمایش‌های مقدماتی جهت استفاده در مطالعه حاضر

ردیف	نام ژنوتیپ	منشأ	کیفیت چمنی (۱-۹)	درصد خودسازگاری	تحمل به خشکی
۱	75C	استان کردستان	متوسط (۶/۲)	٪۴۵	متحمل
۲	Pacer	امریکا	متوسط (۶)	٪۴۱	متحمل

گرم وزن تر محاسبه گردید.

پروکلین: میزان پروکلین آزاد نمونه‌های برگ به روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) اندازه‌گیری شد. برای این کار، عصاره بدست‌آمده از ۰/۲ گرم نمونه برگ به کمک ۱۰ میلی‌لیتر محلول اسید سولفوسالیسیلیک سه درصد تهیه گردید. سپس مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. دو میلی‌لیتر از عصاره گیاه با دو میلی‌لیتر معرف ناین‌هیدرین و دو میلی‌لیتر اسید استیک خالص مخلوط و به مدت یک ساعت در حمام آب گرم صد درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سرد شدن نمونه‌ها، فاز حاوی اسید آمینه پروکلین به کمک چهار میلی‌لیتر تولوئن جداسازی و جذب آن در طول موج ۵۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر [مدل UV-2100A] خوانده شد. میزان پروکلین با استفاده از نمودار استاندارد محاسبه و برحسب میکرومول در گرم وزن تر نمونه بیان گردید.

میزان مالون‌دی‌آلدهید: سطح پراکسیداسیون لیپیدها بر اساس اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدهید در بافت به‌عنوان محصول ثانویه پراکسیداسیون چربی‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. مقدار ۰/۱ گرم از نمونه برگ با کمک ۲ میلی‌لیتر از محلول ۱/۵ درصد (وزنی/حجمی) تری کلرواستیک اسید در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد عصاره‌گیری گردید. پس از سانتریفوژ به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ دور در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، عصاره بدست‌آمده (۲ میلی‌لیتر) با ۲ میلی‌لیتر محلول اسید تری‌کلرو استیک ۲۰ درصد (وزنی/حجمی) که حاوی ۰/۵ درصد اسید تیوباریتیوریک بود مخلوط گردید. مخلوط بدست‌آمده در حمام آب داغ با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد، سپس به سرعت درون حمام یخ قرار گرفت تا سرد شود. پس از سانتریفوژ در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، میزان جذب مخلوط به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر

خوانده گردید و در طول موج ۶۰۰ نانومتر برای جذب‌های غیراختصاصی تصحیح گردید. در محاسبه مقدار مالون‌دی‌آلدهید ضریب خاموشی ۱۵۵ میلی‌مول بر ثانیه در سانتی‌متر نیز در نظر گرفته شد (Yasmin et al., 2019).

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی: برای اندازه‌گیری فعالیت ویژه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ۰/۱ گرم از پودر بافت گیاهی با یک میلی‌لیتر بافر استخراج به‌طور کامل همگن شد. بافر استخراج از پلی‌ونیل پیرولیدین یک درصد، ۵۰۰ میلی‌لیتر تریتون X100 و بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH برابر با ۷/۰) تهیه گردید. عصاره حاصل با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت زمان ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد. عصاره حاصل جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی برحسب واحد فعالیت آنزیم بر میلی‌گرم پروتئین مورد استفاده قرار گرفت. میزان پروتئین عصاره براساس روش Bradford (۱۹۷۶) اندازه‌گیری شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز با تعیین مقدار تجزیه پراکسید هیدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Aebi, 1983). ۲/۹۵ میلی‌لیتر بافر واکنش (بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷) و پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار) با ۰/۰۵ میلی‌لیتر از عصاره آنزیم مخلوط شد. فعالیت پراکسیداز با اندازه‌گیری افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر و در مدت زمان دو دقیقه بدست آمد. ۳ میلی‌لیتر بافر واکنش شامل بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار، پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار، ۳/۹ میکرولیتر گایاکول و ۰/۰۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی مخلوط شد (Putter, 1974). فعالیت آسکوربات پراکسیداز با استفاده از روش طیف‌سنجی و با اندازه‌گیری کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر تخمین زده شد. برای شروع واکنش، ۳ میلی‌لیتر بافر واکنش شامل فسفات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH= ۷)، هیدروژن پراکسید ۰/۵ میلی‌مولار و

روز تا سبزشدن، درصد زنده‌مانی و ارتفاع گیاه: نتایج نشان داد که در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی از نظر صفات روز تا سبز شدن و ارتفاع گیاه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت. همچنین، دزهای مختلف پرتو گاما در صفات روز تا سبزشدن، درصد سبزشدن و ارتفاع گیاه تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد نشان دادند. برهمکنش معنی‌داری بین دز و ژنوتیپ برای ارتفاع گیاه در سطح احتمال پنج درصد مشاهده گردید (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که ژنوتیپ 75C مدت زمان بیشتری جهت سبزشدن نیاز داشت. همچنین، با افزایش دز پرتو گاما مدت زمان لازم جهت سبزشدن به تدریج افزایش یافت به طوری که بیشترین زمان تا سبزشدن در بالاترین دز پرتو گاما (۴۰۰ گری) مشاهده گردید که نسبت به بذور پرتوندیده حدود ۴ واحد (روز) بیشتر بود. درصد سبزشدن گیاه با افزایش دز پرتو از ۵۰ گری، به طور معنی‌داری کاهش یافت و بیشترین کاهش زنده‌مانی (۶۶٪) در دز ۴۰۰ گری مشاهده گردید (شکل ۱).

مقایسه میانگین برهمکنش بین ژنوتیپ و پرتو گاما بر ارتفاع گیاه نشان داد که با افزایش دز پرتو گاما از ۵۰ گری، ارتفاع بوته در هر دو ژنوتیپ روند کاهشی نشان داد و بیشترین ارتفاع بوته در ژنوتیپ Pacer تیمار شده با دز ۵۰ گری و کمترین میزان در ژنوتیپ 75C تیمار شده با دز ۴۰۰ گری مشاهده گردید. با این حال، پاسخ دو ژنوتیپ مورد بررسی نسبت به پرتو کمی متفاوت بود به طوری که با افزایش دز پرتو به ۱۰۰ گری کاهش ناگهانی در ارتفاع بوته ژنوتیپ 75C مشاهده گردید. در حالی که در ژنوتیپ Pacer طول بوته با افزایش دز پرتو به تدریج کاهش یافت. در هر دز پرتو گاما، ژنوتیپ Pacer ارتفاع بوته بیشتری نسبت به ژنوتیپ بومی نشان داد. همچنین، دز پایین پرتو گاما (۵۰ گری) سبب تحریک به رشد بیشتر در هر دو ژنوتیپ گردید (شکل ۵a).

رنگی‌های فتوسنتزی: نتایج نشان داد که تیمار پرتو گاما به طور معنی‌داری رنگی‌های فتوسنتزی را تحت تأثیر قرار داد (جدول ۲). میزان کلروفیل a، کلروفیل b و میزان کاروتنوئید کل به تدریج با افزایش دز پرتو گاما تا ۱۵۰ گری به طور

محلول آسکوربات ۵ میلی‌مولار و ۰/۰۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی مخلوط شدند (Nakano and Asada, 1981). فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز براساس روش Giannopolitis و Ries (۱۹۷۷) با ردیابی بازدارندگی از کاهش نیتروبلوتترازولیوم توسط رادیکال سوپراکسید مورد سنجش قرار گرفت. ۳ میلی‌لیتر بافر واکنش شامل بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH = ۷/۸) همراه با ۰/۰۳ میلی‌مولار EDTA، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، نیتروبلوتترازولیوم ۶۳ میکرومولار، ۰/۰۵ میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی و ۱/۳ میکرومولار ریوفلاوین به مدت ۱۵ دقیقه در معرض نور لامپ فلورسنت ۳۰ وات قرار گرفت و پس از این مدت، شدت جذب نوری در طول موج ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به عنوان مقدار آنزیمی است که باعث ۵۰ درصد بازدارندگی در تبدیل نیتروبلوتترازولیوم به فرمازان گردید.

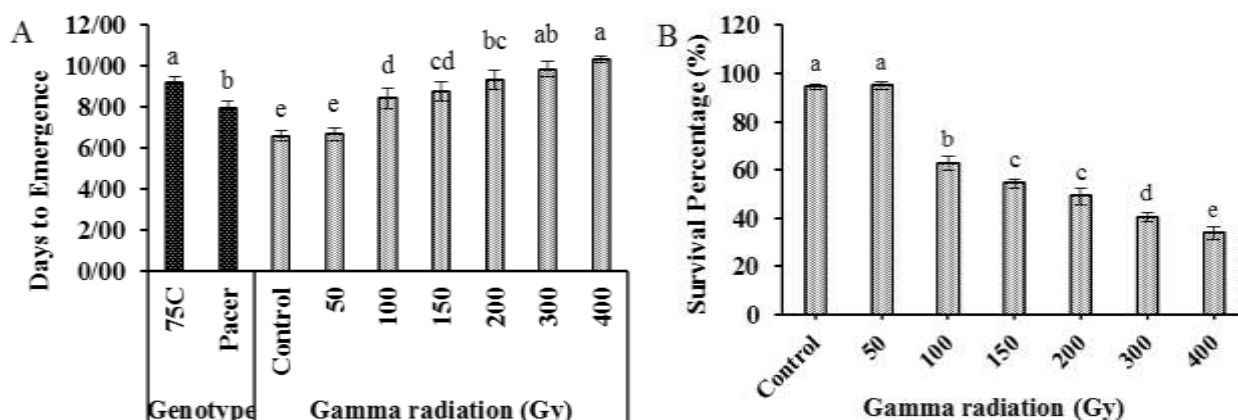
تجزیه واریانس داده‌ها به کمک نرم‌افزار سیستم پردازش آماری SAS (نسخه ۹/۴) انجام و مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت. تجزیه رگرسیون رابطه صفات (به عنوان متغیر وابسته) و پرتو گاما (متغیر مستقل) و تجزیه پروبیت جهت تعیین دز ۵۰ درصد کشندگی (LD₅₀) پرتو گاما در هر دو ژنوتیپ به ترتیب با کمک برنامه‌های PROC REG و PROC PROBIT در نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۴ صورت گرفت. در روش تجزیه پروبیت، درصد مرگ‌ومیر گیاه در پاسخ به پرتو گاما مورد آزمون قرار گرفت که در محور X لگاریتم مقدار دز پرتو بر پایه ۱۰ و در محور Y مقدار پروبیت درصد مرگ‌ومیر گیاه قرار داشت. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با استفاده از نرم‌افزار Statgraphics نسخه ۱۸ جهت بررسی روابط بین صفات در طول تیمارهای مختلف پرتو گاما صورت گرفت. برای انجام محاسبات جبری و رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل (نسخه ۲۰۱۶) استفاده گردید.

نتایج

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثر دزهای مختلف پرتو گاما بر صفات روز تا سبزشدن، درصد بقاء، ارتفاع گیاه و رنگیزه‌های فتوسنتزی ژنوتیپ‌های چمانواش بلند

میانگین مربعات					درجه آزادی	منابع تغییرات
کاروتنوئید	کلروفیل کل	کلروفیل b	کلروفیل a	ارتفاع گیاه	روز تا سبز شدن	درصد زنده‌مانی
۰/۰۰۲ ns	۰/۰۷ ns	۰/۰۰۸ ns	۰/۰۷ ns	۶۸/۳۵ **	۱۵/۴۸ **	۱۱۸/۱۲ ns
۰/۰۴۲ **	۱/۵۷ **	۰/۱۹۴ **	۰/۷۴ **	۷۹/۲۶ **	۱۲/۹۱ **	۳۶۳۳/۶۶ **
۰/۰۰۴ ns	۰/۰۷ ns	۰/۰۰۴ ns	۰/۰۳ ns	۰/۱۹ *	۰/۱۳ ns	۲۱/۳۵ ns
۰/۰۰۷	۰/۰۲	۰/۰۳۴	۰/۰۲	۰/۸۷	۰/۴۹	۳۰/۰۱
۲۵/۶۲	۱۳/۹۱	۱۹/۳۷	۱۲/۶۲	۱۰/۳۲	۸/۲۱	۸/۹۳
					۱	ژنوتیپ
					۶	پرتوگاما
					۶	ژنوتیپ × پرتوگاما
					۲۸	خطای آزمایشی
						ضریب تغییرات

ns، *، ** به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد، پنج درصد و عدم معنی‌داری

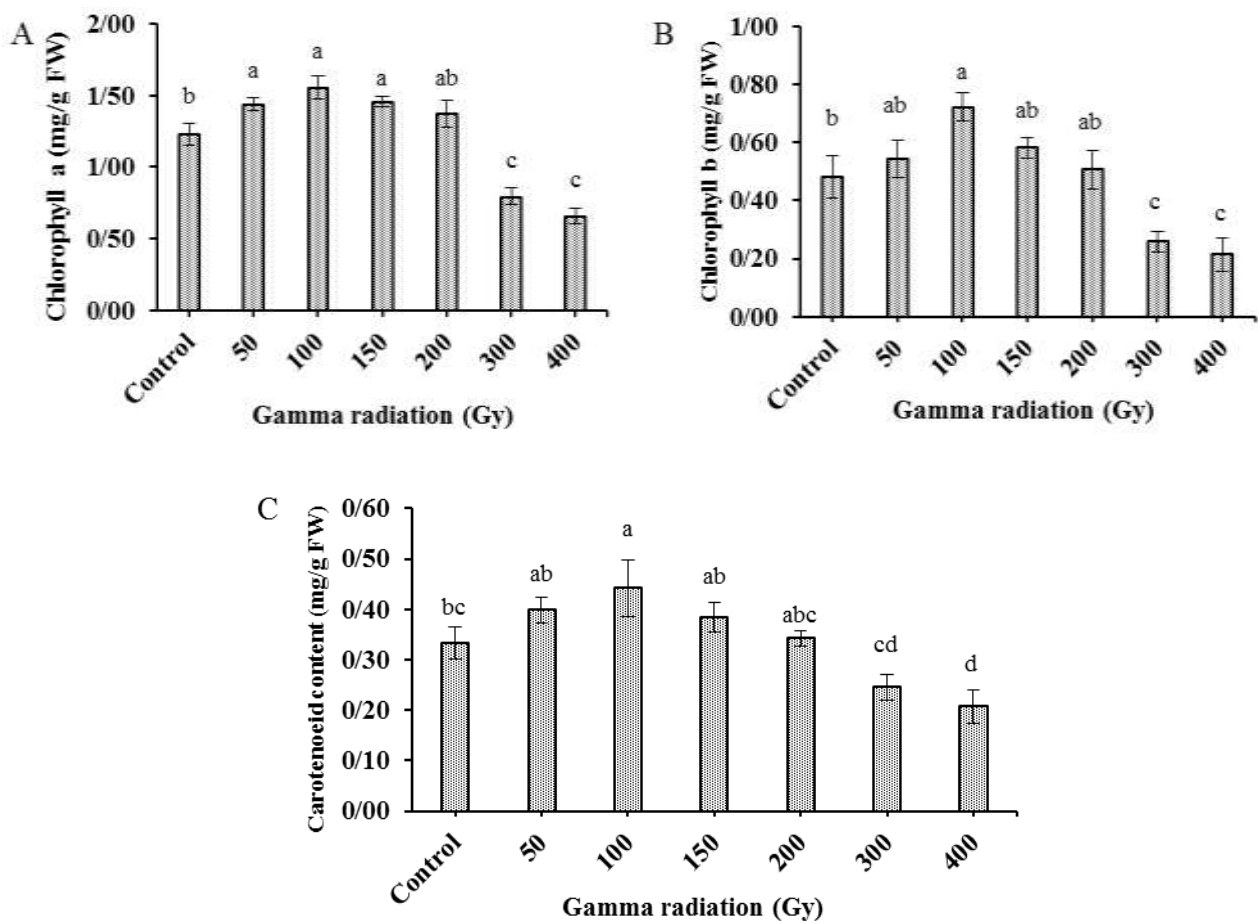


شکل ۱- اثر دزهای مختلف پرتو گاما بر روز تا سبزشدن (A) و درصد زنده‌مانی (B) در چمانواش بلند. بار نشان‌دهنده خطای استاندارد (Standard Error) می‌باشد. برای هر صفت، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس اثر دزهای مختلف پرتو گاما بر میزان پرولین، میزان مالون دی‌آلدهید و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ژنوتیپ‌های چمانواش بلند

میانگین مربعات					درجه آزادی	منابع تغییرات
پراکسیداز	سوپراکسید دیسموتاز	کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز	پرولین	مالون دی‌آلدهید	ژنوتیپ
۲۰/۴۷ ns	۷۰/۸۶ ns	۶/۹۸ ns	۲۲/۶۸ ns	۰/۰۷ ns	۱۲/۱۸ ns	۱
۱۴۳/۰۴ *	۱۷۷۸/۱۶ **	۲۶۸۷/۶۳ **	۴۲۱/۴۵ **	۰/۶۴ **	۵۷۰/۳۸ **	۶
۷۷/۴۴ ns	۳۴/۶۷ ns	۱۱۰/۴۰ **	۱۸/۶۲ ns	۰/۰۵ ns	۱۶/۸۹ ns	۶
۴۷/۱۷	۲۱/۹۷	۳۰/۰۰	۹/۹۲	۰/۱۳	۱۰/۴۳	۲۸
۲۴/۸۴	۹/۶۶	۲۲/۷۶	۱۸/۴۴	۱۷/۴۰	۲۲/۷۴	ضریب تغییرات

ns، *، ** به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد، پنج درصد و عدم معنی‌داری

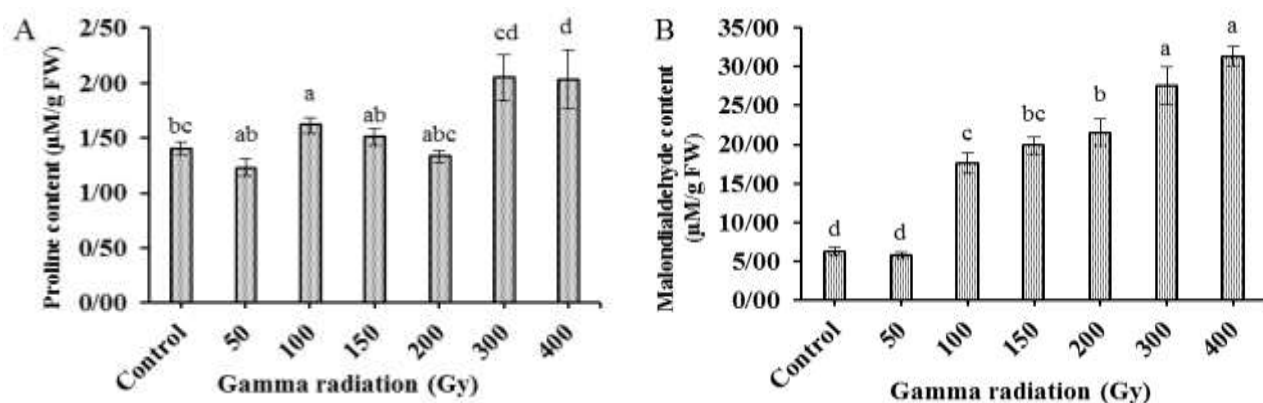


شکل ۲- اثر دزهای مختلف پرتو گاما بر میزان کلروفیل آ (A)، کلروفیل ب (B) و کاروتنوئید کل (C) در چمانواش بلند. بار نشان‌دهنده خطای استاندارد (Standard Error) می‌باشد. برای هر صفت، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

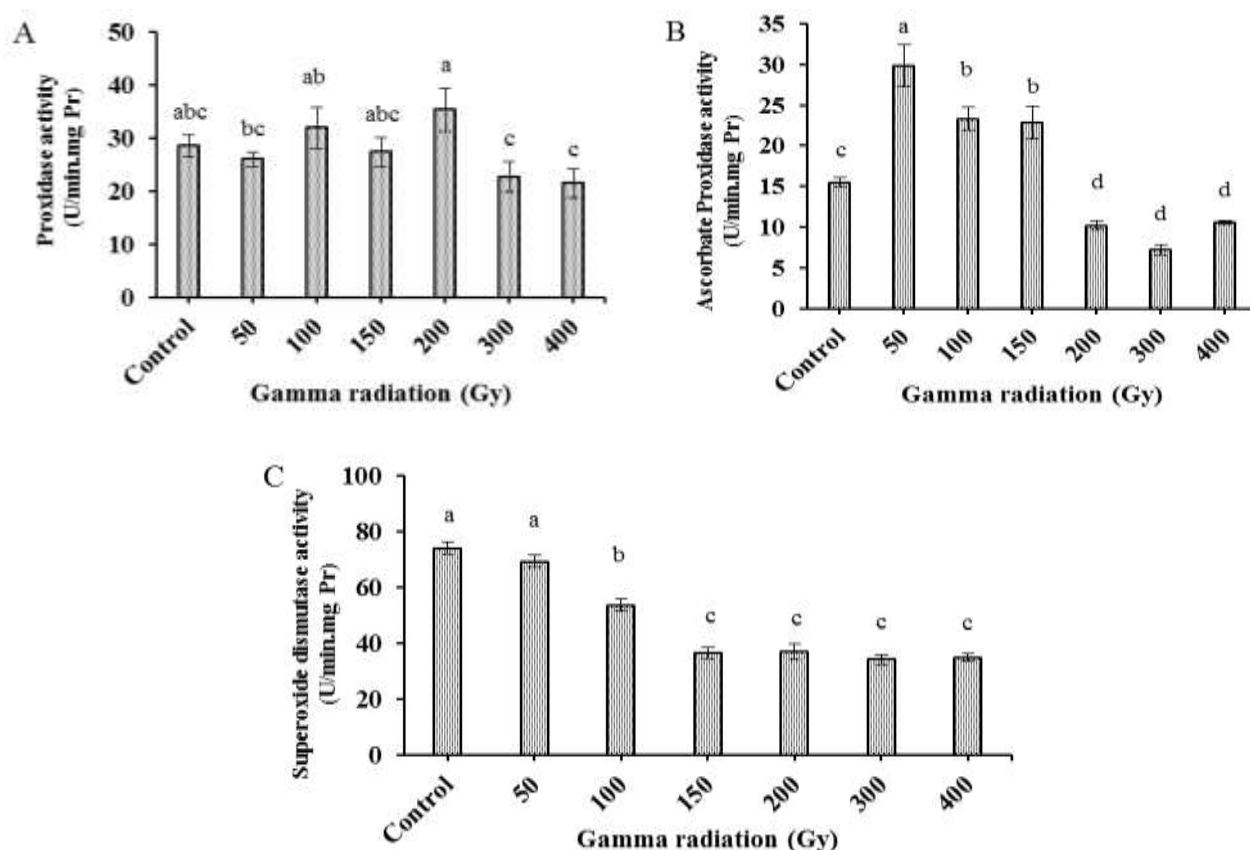
کلروفیل کمتری نسبت به گیاهان پرتوننیده (شاهد) نشان دادند (شکل ۵b).

میزان پرولین و مالون‌دی‌آلدهید: نتایج نشان داد تیمار پرتوگاما به‌طور معنی‌داری میزان پرولین و مالون‌دی‌آلدهید را در گیاه چمانواش بلند تحت تأثیر قرار داد (جدول ۳). میزان پرولین و مالون‌دی‌آلدهید گیاه به‌تدریج با افزایش دز پرتو گاما به‌طور معنی‌داری افزایش یافتند به‌طوری‌که بیشترین میزان تجمع پرولین (۲/۰۹ میکرومول بر گرم وزن تر) و مالون‌دی‌آلدهید (۲۸/۶۴ میکرومول بر گرم وزن تر) در گیاهان تیمار شده با دز ۴۰۰ گری مشاهده گردید. باین‌حال، دز پایین پرتو گاما (۵۰ گری) تأثیر معنی‌داری بر میزان پرولین و مالون‌دی‌آلدهید نسبت به شاهد نشان نداد (شکل ۳).

معنی‌داری افزایش یافتند. درحالی‌که از دز ۲۰۰ گری روندی کاهشی داشتند به‌طوری‌که در دز ۳۰۰ و ۴۰۰ گری نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری مشاهده گردید (شکل ۲). برهمکنش معنی‌داری بین ژنوتیپ و پرتو گاما بر کلروفیل کل مشاهده گردید (جدول ۲). نتایج نشان داد که با افزایش دز پرتو گاما تا ۱۵۰ گری، میزان کلروفیل در هر دو ژنوتیپ روند افزایشی نشان داد و بیشترین میزان کلروفیل در ژنوتیپ 75C تیمار شده با دز ۱۰۰ گری و کم‌ترین میزان در گیاهان تیمار شده همین ژنوتیپ با دز ۴۰۰ گری مشاهده گردید. باین‌حال، افزایش دز پرتو گاما از ۱۵۰ گری سبب کاهش در میزان کلروفیل گردید و در هر دو ژنوتیپ مورد بررسی، گیاهان پرتودهی شده با دزهای بالا پرتو گاما (۳۰۰ و ۴۰۰ گری) به‌طور معنی‌داری میزان



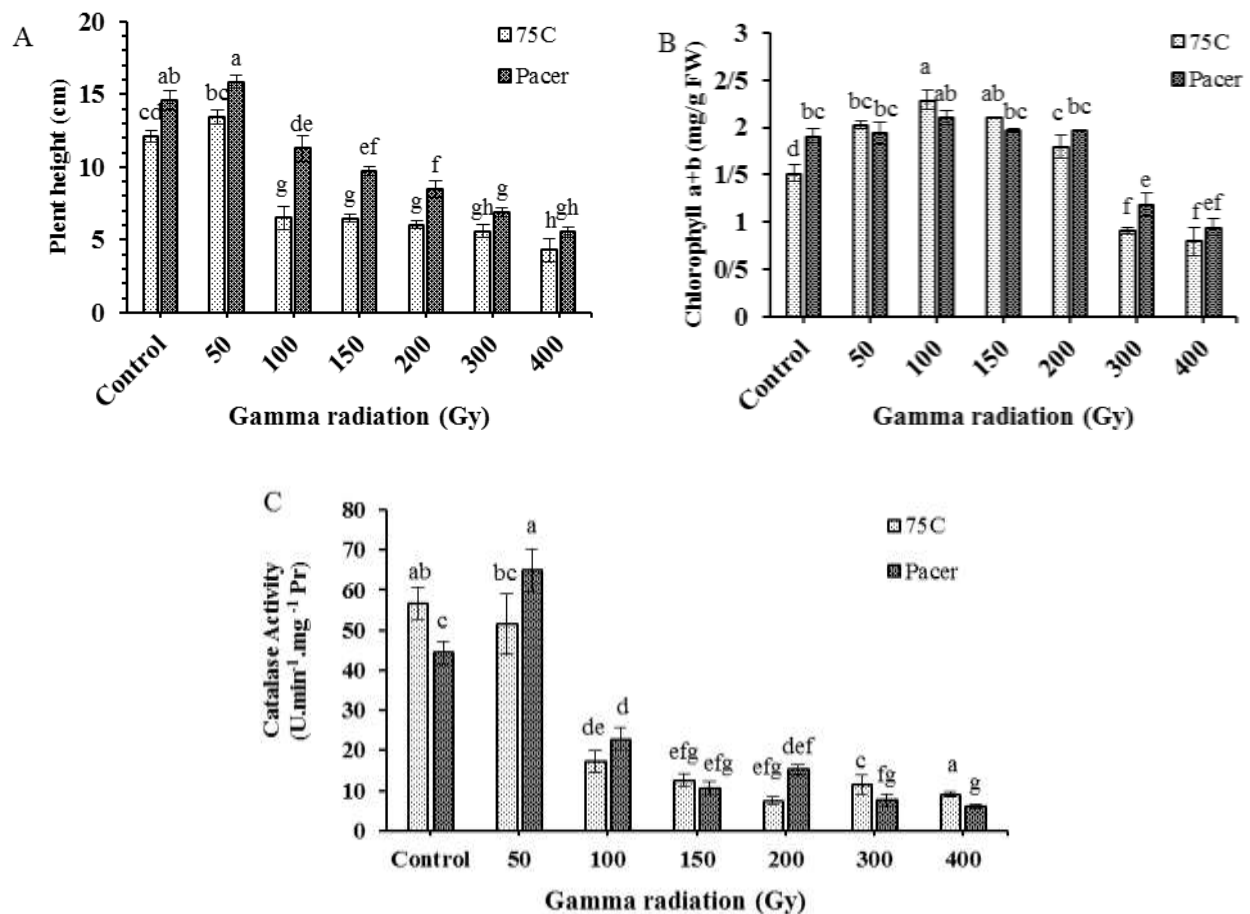
شکل ۳- اثر دزهای مختلف پرتو گاما بر میزان پرولین (A) و مالون دی آلدئید (B) در چمانوش بلند. بار نشان دهنده خطای استاندارد (Standard Error) می باشد. برای هر صفت، میانگین های دارای حداقل یک حرف مشترک بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی دار ندارند.



شکل ۴- اثر دزهای مختلف پرتو گاما بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی پراکسیداز (A)، آسکوربات پراکسیداز (B) و سوپراکسید دیسموتاز (C) در چمانوش بلند. بار نشان دهنده خطای استاندارد (Standard Error) می باشد. برای هر صفت، میانگین های دارای حداقل یک حرف مشترک بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی دار ندارند.

بررسی داشت (جدول ۳). مقایسه میانگین داده ها نشان داد که تغییر در فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی بسته به دز پرتو

آنزیم های آنتی اکسیدانی: نتایج نشان داد که تیمار پرتو گاما تأثیر طور معنی داری بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی مورد

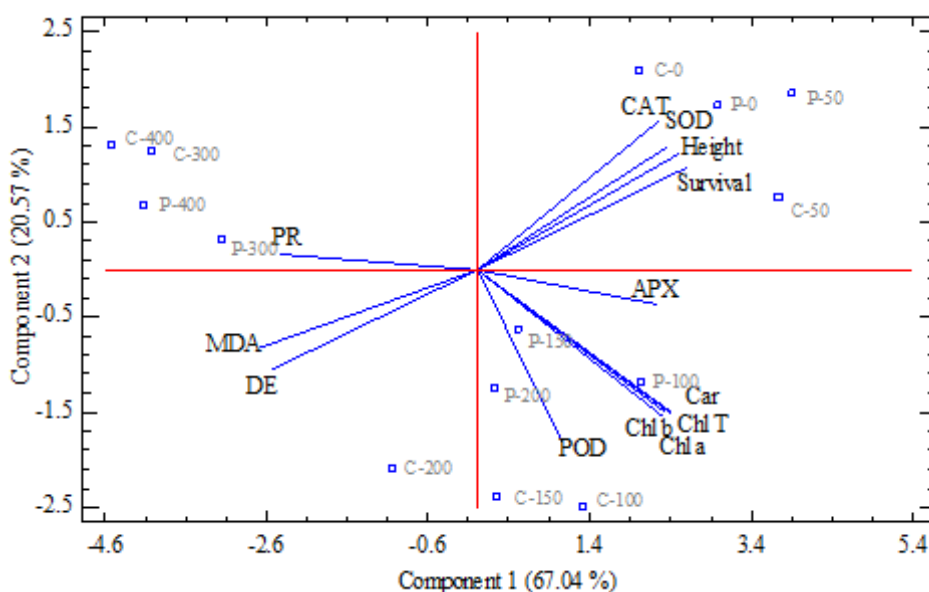


شکل ۵- اثر برهمکنش دزهای مختلف پرتو گاما و ژنوتیپ بر ارتفاع گیاه (A)، میزان کلروفیل (B) و فعالیت آنزیم کاتالاز (C) در چمانوش بلند. بار نشان‌دهنده خطای استاندارد (Standard Error) می‌باشد. برای هر صفت، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

برهمکنش معنی‌داری بین ژنوتیپ و پرتو گاما بر فعالیت آنزیم کاتالاز مشاهده گردید (جدول ۳). نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان پرتودیده ژنوتیپ Pacer با دز ۵۰ گری به میزان ۱۰ درصد نسبت به شاهد افزایش یافت درحالی‌که در ژنوتیپ دیگر دز ۵۰ گری سبب کاهش فعالیت کاتالاز گردید. دزهای بالای پرتو (۱۰۰ تا ۴۰۰ گری) سبب کاهش شدید فعالیت آنزیم کاتالاز در هر دو ژنوتیپ مورد بررسی گردید (شکل ۱c).

روابط بین صفات در شرایط تنش پرتودهی: براساس نتایج بای‌پلات (شکل ۶)؛ (۱) همبستگی مثبت و بالایی بین میزان رشد و زنده‌مانی گیاه با فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز (۲) همبستگی مثبت و بالایی بین رنگیزه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و

متفاوت بود. با افزایش دز پرتو گاما تا ۱۵۰ گری، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز روند افزایشی نسبت به شاهد نشان داد درحالی‌که دزهای ۲۰۰ تا ۴۰۰ گری سبب کاهش معنی‌دار فعالیت این آنزیم در گیاهان پرتودیده گردید (شکل ۴). در گیاهان پرتودهی شده حتی با دز پایین پرتو گاما (۵۰ گری) فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کاهش یافت. با این وجود، فعالیت این آنزیم در گیاهان پرتودهی شده با دزهای ۱۵۰ تا ۴۰۰ گری تفاوت معنی‌داری با همدیگر نشان ندادند. بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) در گیاهان پرتودهی شده با دز ۲۰۰ گری مشاهده گردید که نسبت به شاهد ۵۱ درصد افزایش یافت. فعالیت این آنزیم تا دز ۲۰۰ گری روند افزایشی نشان داد. با این حال، دز ۳۰۰ و ۴۰۰ گری به میزان ۱۴ و ۲۰ درصد فعالیت آنزیم را نسبت به شاهد کاهش داد (شکل ۴).



شکل ۶- نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی صفات مختلف ژنوتیپ‌های چماناوش بلند پرتوده‌ی شده با دزهای مختلف پرتو گاما. صفات شامل: Height: ارتفاع گیاه؛ Survival: درصد زنده‌مانی؛ DE: روز تا سبزشدن؛ Chl T: کلروفیل کل؛ Chl a: کلروفیل a؛ Chl b: کلروفیل b؛ Car: کاروتنوئید؛ PR: پرولین؛ MDA: مالون‌دی‌آلدهید؛ CAT: کاتالاز؛ POD: گایاکول پراکسیداز؛ APX: آسکوربات پراکسیداز؛ SOD: سوپراکسید دیسموتاز. C و P به ترتیب نشان‌دهنده ژنوتیپ 75C و Pacer هست.

نتایج نشان داد که دزهای بالای پرتو گاما (بالتر از ۵۰ گری) تأثیر مخربی بر پارامترهای رشدی و زنده‌مانی هر دو ژنوتیپ مورد بررسی داشت. این نتایج با نتایج بررسی‌های گذشته که نشان دادند دزهای بالا پرتو سبب کاهش رشد در چندین گونه گیاهی گردید همخوانی دارد. با این حال، میزان تأثیر بستگی به گونه گیاهی دارد. به عنوان مثال، دزهای ۱۰۰ گری و بالاتر در گونه *Agrostis palustris* (Kim et al., 2019)، ۱۵۰ گری در گونه *Arabidopsis thaliana* (Qi et al., 2015)، ۲۰۰ گری و بالاتر در گونه *Zea mays* (Marcu et al., 2013)، بالاتر از ۳۰۰ گری در گونه *Lycopersicon esculentum* (Norfadzrin et al., 2007) و ۴۰۰ گری در گونه *Trigonella foenum-graecum* (Hanafy and Akladios, 2018) سبب کاهش جوانه‌زنی و میزان رشد گردید. علاوه بر این، در این بررسی، پاسخ رشدی و جوانه‌زنی ژنوتیپ‌های مورد بررسی به پرتو گاما تا حدودی باهم متفاوت بود به طوری که کاهش ناگهانی در رشد ژنوتیپ بومی (75C) وقتی در معرض دز ۱۰۰ گری قرار گرفتند مشاهده گردید؛ اما در ژنوتیپ Pacer رشد گیاه با بالا

آسکوربات پراکسیداز (۳) همبستگی مثبت و بالایی بین روز تا سبزشدن گیاه با میزان مالون‌دی‌آلدهید و پرولین وجود دارد. علاوه بر این، میزان رشد و زنده‌مانی گیاه رابطه منفی با سطوح مالون‌دی‌آلدهید و پرولین گیاه نشان داد. نتایج بای‌پلات داده‌ها همچنین نشان داد که گیاهان شاهد و پرتوده‌ی شده با دز ۵۰ گری دارای بیشترین رشد و زنده‌مانی و همچنین فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز هستند. با این حال، بیشترین میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهان تیمار شده هر دو ژنوتیپ با دزهای ۱۰۰ و ۱۵۰ گری مشاهده گردید. علاوه بر این، بالاترین سطوح پرولین و مالون‌دی‌آلدهید در گیاهان تیمار شده با دزهای ۳۰۰ و ۴۰۰ گری مشاهده گردید.

بحث

این مطالعه که به منظور بررسی واکنش ژنوتیپ‌های چماناوش بلند به پرتوده‌ی جهت تعیین دز مناسب صورت گرفت، اثر پرتو گاما بر زنده‌مانی و رشد گیاه چماناوش بلند و همچنین پاسخ‌های فیزیولوژیکی این گونه مورد ارزیابی قرار گرفت.

(ROS) در سلول می‌شود که به ساختارهای سلول آسیب می‌زند. مالون‌دی‌آلدهید یکی از مهم‌ترین فراورده‌های حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء است که به‌عنوان نشانگری جهت تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب به غشاءهای سلولی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد (Amirikhah et al., 2019). در این بررسی نتایج نشان داد که از دز ۱۰۰ گری یک افزایش ناگهانی شدید در میزان مالون‌دی‌آلدهید گیاهان پرتودیده مشاهده گردید و با افزایش دز مقدار آن در گیاه افزایش یافت. چنین افزایشی در پراکسیداسیون چربی‌ها در اثر تنش پرتو در گونه‌های دیگر مثل برنج (Kim et al., 2012)، گیاهان سویا (Stajner et al., 2009) و چمن زئوشیا (Lee et al., 2016) مشاهده گردید که در تطابق با نتایج این بررسی می‌باشند. تولید رادیکال‌های آزاد در اثر تأثیر مستقیم و غیرمستقیم دزهای بالای پرتو گاما بر ساختارهای سلولی و فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف سلول سبب افزایش میزان آسیب به بخش‌های مختلف سلولی شامل غشاء پلاسمایی و بالارفتن سطح پراکسیداسیون لیپیدی در بافت می‌شود. همچنین، نتایج بای‌پلات نشان داد که همبستگی منفی و بالایی بین میزان رشد و زنده‌مانی گیاه با سطح مالون‌دی‌آلدهید وجود دارد (شکل ۲). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و دیگر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نقش کلیدی در کاهش سطح رادیکال‌های آزاد سمی به‌ویژه در شرایط نامساعد محیطی دارند؛ که سبب تنظیم شرایط اکسایشی سلول در حالت نرمال برای انجام واکنش‌های مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سلول می‌گردد (Hassanpour et al., 2017; Gudkov et al., 2019). تجمع پرولین به‌عنوان یک تنظیم‌کننده اسمزی، سلول‌ها را از طریق تعادل اسمزی بین سیتوپلاسم، واکونل و محیط اطراف در برابر تنش‌های محیطی محافظت می‌کند. علاوه براین، پرولین به خاطر خاصیت آنتی‌اکسیدانی در حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژنی و کاهش اثرات تنش‌های اکسیداتیو نقش دارد (Wang et al., 2017). در پژوهش حاضر، میزان پرولین با افزایش دز پرتو گاما در گیاهان پرتودهی شده افزایش یافت که با نتایج Wang و همکاران (۲۰۱۷) در گیاه جو و El-Beltagi و همکاران (۲۰۱۳) در گونه *Vigna*

رفتن میزان دز پرتو از ۱۰۰ گری به‌تدریج کاهش یافت. به‌هرحال، رشد گیاه در هر دو ژنوتیپ در دزهای بالای پرتو (۲۰۰ تا ۴۰۰ گری) به‌شدت کاهش یافت. برخی از بررسی‌های گذشته نشان دادند که کاهش زنده‌مانی و رشد گیاه با توقف مستقیم چرخه سلولی ارتباط دارد (Amirikhah et al., 2021). شکست در مولکول‌های DNA به‌ویژه شکست‌هایی که در هر دو رشته اتفاق می‌افتد از مهم‌ترین خسارت‌های است که در گیاهان تیمار شده با پرتوهای یونیزه‌کننده مثل پرتو گاما ایجاد می‌شود و سبب انواع گوناگونی از آسیب‌ها به تقسیم و مولد می‌گردد (Amirikhah et al., 2019; Gudkov et al., 2019).

در این بررسی، بسته به دز، پرتو گاما تأثیر متفاوتی بر روی رنگیزه‌های فتوسنتزی نشان داد. در گیاهان تیمار شده با دزهای ۱۰۰ تا ۲۰۰ گری مقدار کلروفیل و کاروتنوئید کل افزایش یافت. در تطابق با این نتایج، بررسی‌های گذشته تأثیر مثبت دزهای پایین پرتو بر افزایش محتوی کلروفیل برگ را نشان دادند (Beyaz et al., 2016; El-Beltagi et al., 2013; Amirikhah et al., 2019). به‌هرحال، در این بررسی دزهای بالای پرتو گاما (۳۰۰ و ۴۰۰ گری) سبب کاهش معنی‌دار رنگیزه‌های فتوسنتز در چمانواش بلند گردید. نتایج مشابهی که نشان دادند میزان کلروفیل بعد از تیمار با دزهای بالای پرتو کاهش یافت در دیگر گونه‌ها مثل *Glycine max* L. (Celik et al., 2014)، *Allium sativum* L. (Kebeish et al., 2015) و *Cullen corylifolium* L. (Jan et al., 2013) مشاهده گردید. در تضاد با این نتایج، در برخی از گیاهان حتی دزهای پایین پرتو (کمتر از ۱۰۰ گری) غلظت کلروفیل را کاهش دادند (Sengupta et al., 2013; Ling et al., 2008). افزایش میزان کلروفیل با تیمار پرتو گاما ممکن است در ارتباط با افزایش فعالیت ژن پروتئین اتصال‌دهنده کلروفیل *b/a* که کدکننده پروتئین کلروفیل هست باشد. از طرف دیگر، به خاطر کاهش بیشتر در رشد گیاه از دز ۱۰۰ گری پرتو، تجمع رنگیزه‌ها می‌تواند نتیجه افزایش غلظت در واحد سطح برگ باشد (Amirikhah et al., 2019).

پرتوهای یونیزه‌کننده سبب تشکیل گروه‌های اکسیژن فعال

گردید (Kim et al., 2012; Wang et al., 2017). به نظر می‌رسد که این یک مکانیسم کلی جهت فائق آمده بر تنش و حفاظت سلول‌ها در برابر رادیکال‌های آزاد باشد. با این حال، نتایج نشان داد که در گیاهان تیمار شده هر دو ژنوتیپ با دزهای بالا پرتو گاما فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌ویژه SOD و CAT کاهش شدیدی یافت که چنین الگوی تغییر نشان‌دهنده عدم تعادل شدید در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در این گیاهان بود. چنین نتیجه‌ای ممکن است بیان‌کننده این باشد که تجمع سطوح بالای رادیکال‌های آزاد سبب صدمه به مولکول‌های زیستی مثل لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA و همچنین کاهش زنده‌مانی و رشد در گیاهان تیمار شده با دزهای ۱۰۰ تا ۴۰۰ گری گردیده است. به‌هرحال، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تحت تأثیر فاکتورهای مختلفی از جمله گونه گیاهی، نوع پرتو یون‌ساز، دز به‌کاررفته، مدت زمان پس از قرار گرفتن در معرض اشعه و غیره قرار می‌گیرد (Gudkov et al., 2019).

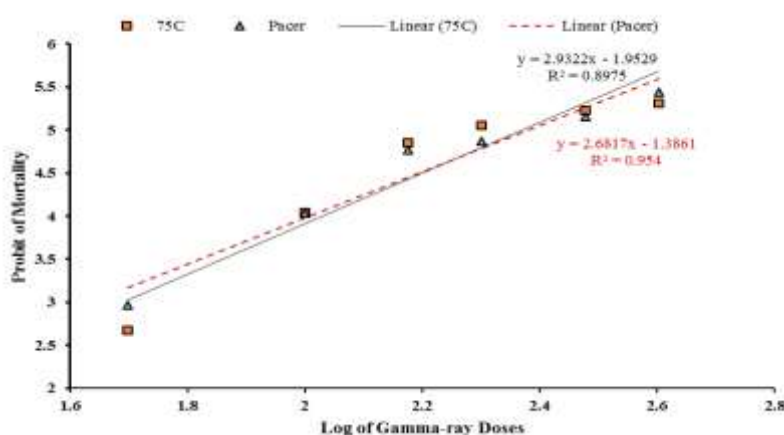
یکی از مراحل مهم در به‌نژادی از طریق جهش، انتخاب دز مناسب جهش‌زا است؛ بنابراین، به‌منظور موفقیت در یک برنامه به‌نژادی به کمک جهش باید ابتدا دز مناسب مشخص شود. در بررسی‌های به‌نژادی با موتاسیون، کاربرد دز پرتو وابسته به گونه گیاهی است (باقری و همکاران، ۱۳۹۶) و مستلزم تعیین دز مناسب با بررسی پارامترهای گوناگون برای هر وارته گیاهی است. دز مناسب دزی است که سبب ایجاد جهش مؤثر در بافت هدف می‌شود و معمولاً دزهای LD₅₀ (۵۰٪ مرگ‌ومیر) و GR50 (۵۰٪ کاهش رشد) بدین منظور بکار می‌روند. به‌طورکلی، با افزایش میزان دز پرتو، آسیب‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی بیشتری در نسل اول مشاهده می‌شود، که از میان آن‌ها کاهش طول گیاه و درصد زنده‌مانی گیاهچه به‌خاطر ضریب بالای رگرسیون خطی با دزهای مختلف پرتو گاما شاخص‌های بسیار مناسبی برای بیان اثر پرتو است (رزمی و همکاران، ۱۳۹۸؛ باقری و همکاران، ۱۳۹۶). نتایج حاصل از رگرسیون خطی نشان داد که صفات ارتفاع گیاهچه و درصد بقاء دارای رگرسیون معنی‌داری با دز پرتو هستند و نشان‌دهنده مناسب‌بودن این صفات برای تعیین دز

sinensis هم‌خوانی دارد. از آنجای که تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژنی یکی از مهم‌ترین فرآیندها پس از پرتودهی در موجودات زنده است، نتایج این آزمایش نشان داد که به‌خاطر کاهش شدید رشد گیاه حتی در دزهای متوسط (۱۰۰ تا ۲۰۰ گری)، تجمع پرولین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان در گیاهان پرتودهی‌شده نتوانست تنش اکسیداتیو را تعدیل کند. بعلاوه، در برخی از گیاهان به‌ویژه گیاهان چمنی، تجمع پرولین به‌عنوان یک نشانه از وجود تنش در گیاه است و مقدار بالای پرولین نشان‌دهنده وجود تنش بیشتر در گیاه است (Torres et al., 2012).

در این بررسی بسته به میزان دز پرتو، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پاسخ‌های متفاوتی به تیمار پرتودهی نشان دادند. اگرچه آنزیم SOD نقش کلیدی در حفاظت سلولی در برابر رادیکال اکسیژن دارد، ولی فعالیت این آنزیم در گیاهان پرتودهی‌شده در مقایسه با گیاهان شاهد کاهش یافت. این نتایج با نتایج مشاهده‌شده توسط Fan و همکاران (۲۰۱۴) در گیاه *Zizania latifolia* هم‌خوانی دارد. به‌هرحال، فعالیت SOD در برخی از بررسی‌های دیگر با تیمار پرتو گاما افزایش نشان داد (Beyaz et al., 2016; Wang et al., 2017). آنزیم SOD رادیکال‌های سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن کاتالیز می‌کند که تجمع پراکسید هیدروژن به‌عنوان بازدارنده فعالیت این آنزیم عمل می‌کند (Kim et al., 2012)؛ بنابراین، کارایی این آنزیم وابستگی شدیدی به نقش دیگر ترکیبات سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی به‌ویژه آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیدازها در حذف پراکسید هیدروژن دارد (Amirikhah et al., 2019; Beyaz et al., 2016; حسن‌پور و نیکنام، ۱۳۹۳). در این بررسی، فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان پرتو دیده با دزهای بالا (۱۰۰-۴۰۰ گری) کاهش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد نشان داد. به‌هرحال، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در دزهای ۱۰۰ و ۱۵۰ گری تمایل به افزایش داشتند که بین دو ژنوتیپ مورد بررسی متفاوت بود. کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز و افزایش در فعالیت آنزیم‌های پراکسید در گیاهان تحت تنش‌های اکسیداتیو همچنین در بررسی‌های گذشته گزارش

جدول ۴- رابطه رگرسیونی صفات درصد بقاء و ارتفاع گیاه با پرتو گاما به عنوان متغیر مستقل

LD ₅₀ /GR ₅₀ (Gy)	مقدار P	ضریب تبیین (R ²)	معادله	صفت	ژنوتیپ
۲۵۸/۱	۰/۰۰۸	۰/۷۴	Y=86.01-0.154*Dose	درصد بقاء	75C
۲۵۵/۶	۰/۰۲۴	۰/۶۰	Y=11.30-0.021*Dose	ارتفاع گیاه	
۲۶۱/۷	۰/۰۰۲	۰/۸۵	Y=91.44-0.166*Dose	درصد بقاء	Pacer
۲۹۰/۲	۰/۰۰۳	۰/۸۳	Y=14.723-0.026*Dose	ارتفاع گیاه	

شکل ۷- تجزیه پروبیت مرگومیر ژنوتیپ‌های چمانواش بلند تیمار شده با دزهای مختلف پرتو گاما جهت تعیین دز عامل کاهش دهنده ۵۰ درصد بقاء (LD₅₀).

این گونه در جهت دستیابی به موتانت‌های مطلوب از لحاظ ویژگی‌های چمنی و تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که دزهای بالای پرتو (۱۰۰ تا ۴۰۰ گری) سبب کاهش زنده‌مانی و رشد در ژنوتیپ‌های چمانواش بلند گردید. همچنین دزهای بالای پرتو گاما (بالتر از ۵۰ گری) سبب افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاءهای سلولی و نامتعادل شدن سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی در گیاهان پرتودیده گردید که در نتیجه آن زنده‌مانی و رشد گیاه کاهش یافت. واکنش ژنوتیپ‌های مختلف در پاسخ به پرتو گاما تا حدودی متفاوت بود به طوری که ژنوتیپ Pacer از تحمل بیشتری به دزهای پرتو به‌ویژه دزهای متوسط (۱۰۰ تا ۲۰۰ گری) نسبت به ژنوتیپ

مناسب پرتوگاما در گیاه چمانواش بلند هستند (جدول ۴). در هر دو ژنوتیپ مورد بررسی، صفت درصد بقاء نسبت به صفت ارتفاع بوته از رابطه رگرسیون با ضریب تبیین بالاتری با دزهای پرتو گاما برخوردار بود. با این حال، میزان خطی بودن رابطه جهت تعیین دز مناسب پایین است (جدول ۴). لذا در این بررسی از تجزیه پروبیت جهت تعیین دقیق دز مناسب برای هر ژنوتیپ استفاده گردید. در این روش، از برازش مدل خطی درصد مرگومیر گیاهچه با دز پرتو گاما استفاده گردید و معادلات خطی برای درصد مرگومیر در هر ژنوتیپ مورد بررسی، تعیین گردید و نتایج نشان داد که دز مناسب (LD₅₀) براساس تجزیه پروبیت مرگومیر گیاهچه در شرایط گلخانه برای ژنوتیپ 75C، ۲۱۲ گری؛ و برای ژنوتیپ Pacer دز ۲۲۳ گری تعیین گردید (شکل ۷). به‌طور کلی، می‌توان بیان کرد که برای چمانواش بلند محدوده دزهای ۲۰۰ تا ۲۵۰ گری می‌تواند به‌عنوان دز مناسب پرتو گاما در برنامه به‌نژادی از طریق جهش

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (شماره طرح ۹۷۰۲۵۵۲۳) انجام گرفته است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌شود.

75C برخوردار بود. با توجه به نتایج حاصل از تجزیه رگرسیونی و پروبیت دزهای پرتو گاما با درصد مرگومیر گیاه، به‌طور کلی می‌توان بیان کرد که برای چمانواش بلند محدوده دزهای ۲۰۰ تا ۲۵۰ گری می‌تواند به‌عنوان دز مناسب پرتو گاما در برنامه به‌نژادی از طریق جهش این‌گونه مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

- اعتمادی، ن. (۱۳۸۴) بررسی تنوع ژنتیکی تحمل به خشکی و خصوصیات ظاهری جمعیت‌های گیاه چمنی مرغ. رساله‌ی دکتری، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران.
- امیری‌خواه، ر.، اعتمادی، ن.، فرهمند، ش. و نیکبخت، ع. (۱۳۹۳) اثر ترینگزاپک‌اتیل بر کیفیت و ویژگی‌های فیزیولوژیک چمن لولیم دائمی (*Lolium perenne* L.) در شرایط شوری. علوم باغبانی ایران ۴۵: ۳۳-۲۳.
- باقری، ل.، امیری‌خواه، ر.، نوری، م. و مظفری، ک. (۱۳۹۶) اثر پرتو گاما بر میزان رشد و تعیین دز مناسب به‌منظور افزایش تنوع ژنتیکی در ارقام بومی برنج. پژوهش‌نامه اصلاح گیاهان زراعی ۹: ۱۳۸-۱۳۰.
- رزمی، ه.، امیری‌فهلپانی، ر.، کاوسی، ب. و معصومی اصل، ا. (۱۳۹۸) القا جهش و ایجاد تنوع در توت‌فرنگی رقم کردستان با پرتودهی گاما و تعیین دز مناسب پرتودهی. علوم و فنون کشت‌های گلخانه‌ای ۱۰: ۴۰-۲۵.
- روح‌الهی، ا.، کافی، م.، خوش‌خلق‌سیما، ن. و لیاقت، ع. (۱۳۹۴) ارزیابی تحمل به خشکی و کیفیت ظاهری در برخی از توده‌های فستوکای بلند جمع‌آوری‌شده از نقاط مختلف ایران. علوم باغبانی ایران ۴۶: ۳۶۵-۳۵۷.
- حسن‌پور، ح. و نیکنام، و. (۱۳۹۳) بررسی اثر تنش خشکی بر رشد و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاه پونه معطر (*Mentha pulegium* L.) در مرحله گلدهی. مجله فرآیند و کارکردهای گیاهی ۳: ۳۴-۲۵.
- مصطفایی، ر.، اعتمادی، ن. و عرب، م. (۱۳۹۴) ارزیابی مقاومت به خشکی در دو گونه چمن بومی ایران. مجله فرآیند و کارکردهای گیاهی ۳: ۴۰-۳۱.
- نعمت‌الهی، ف.، تهرانی‌فر، ع.، نعمتی، ح.، کاظمی، ف. و گزانچیان، غ. (۱۳۹۷) پیش‌تیمار بذر به‌عنوان راهکاری برای بهبود سبز شدن چمن فتان بلند (*Festuca arundinacea* Schreb.) بومی گز برخوار در شرایط تنش خشکی. نشریه علوم و فناوری بذر ایران ۲: ۳۰۱-۲۸۹.
- Aebi, H. E. (1983) Catalase. In: Methods of Enzymatic Analysis. (ed. Aebi, H. E.) Pp. 673-684. Verlag Chemie, Weinheim.
- Amirikhah, R., Etemadi, N., Sabzalian, M. R., Nikbakht, A. and Eskandari, A. (2019) Physiological consequences of gamma ray irradiation in tall fescue with elimination potential of *Epichloe* fungal endophyte. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 182: 109412.
- Amirikhah, R., Etemadi, N., Sabzalian, M. R., Nikbakht, A. and Eskandari, A. (2021) Gamma radiation negatively impacted seed germination, seedling growth and antioxidant enzymes activities in tall fescue infected with *Epichloe* endophyte. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 216: 112169.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Beyaz, R., Sancak, C., Yildiz, C. Kusvuran, S. and Yildiz, M., (2016) Physiological responses of the M1 sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop) plants to gamma radiation. *Applied Radiation and Isotopes* 118: 73-79.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Cakir, M., Mutlu, S. S. and Djapo, H. (2017) Gamma-ray irradiation improves turfgrass characteristics of st. augustinegrass. *Crop Science* 57: 587-594.

- Celik, O., Atak, C. and Suludere, Z. (2014) Response of soybean plants to gamma radiation: Biochemical analyses and expression patterns of trichome development. *Plants Omics Journal* 7: 382-391.
- El-Beltagi, H. S., Mohamed, H. I., Mohammed, A. H. M. A., Zaki, L. M. and Mogazy, A. M. (2013) Physiological and biochemical effects of γ -irradiation on cowpea plants (*Vigna sinensis*) under salt stress. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca - Agris* 41: 104-114.
- Fan, J., Shi, M., Huang, J. Z., Xu, J., Wang, Z. D. and Guo, D. P. (2014) Regulation of photosynthetic performance and antioxidant capacity by ^{60}Co γ -irradiation in *Zizania latifolia* plants. *Journal of Environmental Radioactivity* 129: 33-42.
- Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutase: Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59: 309-314.
- Gudkov, S. V., Grinberg, M. A., Sukhov, V. and Vodeneev, V. (2019) Effect of ionizing radiation on physiological and molecular processes in plants. *Journal of Environmental Radioactivity* 202: 8-24.
- Hanafy, R. B. and Akladios, S. A. (2018) Physiological and molecular studies on the effect of gamma radiation in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) plants. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 16: 683-692.
- Hassanpour, H., Niknam, V. and Haddadi, B. S. (2017) High-frequency vibration improve callus growth via antioxidant enzymes induction in *Hyoscyamus kurdicus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 128: 231-241.
- IAEA. (2021) Joint FAO/IAEA Mutation Varieties Database. [http:// www.mvd.iaea.org](http://www.mvd.iaea.org).
- Jan, S., Parween, T., Hameed, R. and Siddiqi, T. (2013) Effects of presowing gamma irradiation on the photosynthetic pigments, sugar content and carbon gain of *Cullen corylifolium* (L.) Medik. *Chilean Journal of Agricultural Research* 73: 345-349.
- Kebeish, R., Deef, H. E. and El-Bialy, N. (2015) Effects of gamma radiation on growth, oxidative stress, antioxidant system, and alliin producing gene transcripts in *Allium sativum*. *International Journal of Research Studies in Biosciences* 3: 161-174.
- Kim, S. H., Kim, Y. S., Lee, H. J., Jo, Y. D., Kim, J. B. and Kang, S. Y. (2019) Biological effects of three types of ionizing radiation on creeping bentgrass. *International Journal of Radiation Biology* 95: 1295-1300.
- Kim, S. H., Song, M., Lee, K. J., Hwang, S. G., Jang, C. S., Kim, J. B., Kim, S. H., Ha, B. K., Kang, S. Y. and Kim, D. S. (2012) Genome-wide transcriptome profiling of ROS scavenging and signal transduction pathways in rice (*Oryza sativa* L.) in response to different types of ionizing radiation. *Molecular Biology Reports* 39: 11231-11248.
- Lee, H. J., Kim, Y. S., Jo, Y. D., Ha, B. K., Kim, D. S., Kim, J. B., Kang, S. Y. and Kim, S. H. (2016) Oxidative stress and DNA damage induced by gamma irradiation in Korean lawngrass (*Zoysia japonica* Steud.). *European Journal of Horticultural Science* 81: 303-309.
- Li, R., Bruneau, A. and Qu, R. (2010) Morphological mutants of St Augustinegrass induced by gamma ray irradiation. *Plant Breeding* 129: 412-416.
- Li, W., Katin-Grazzini, L., Krishnan, S., Thammina, C., El-Tanbouly, R., Yer, H., Merewitz, E., Guillard, K., Inguagiato, J., McAvoy, R. J. and Liu, Z. (2016) A novel two-step method for screening shade tolerant mutant plants via dwarfism. *Frontiers in Plant Science* 7: 1-12.
- Lichtenthaler, H. K. and Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Pp. F4.2.1-F4.2.6. John Wiley and Sons, Inc.
- Ling, A. P. K., Chia, J. Y., Hussein, S. and Harun, A. R. (2008) Physiological responses of *Citrus sinensis* to Gamma Irradiation. *World Applied Sciences Journal* 51: 12-19.
- Marcu, D., Damian, G., Cosma, C. and Cristea, V. (2013) Gamma radiation effects on seed germination, growth and pigment content, and ESR study of induced free radicals in maize (*Zea mays*). *Journal of Biological Physics* 39: 625-634.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant Cell Physiology* 22: 867-880.
- Norfadzrin, F., Ahmed, O. H., Shaharudin, S. and Abdul Rahman, D. (2007) A Preliminary study on gamma radiosensitivity of tomato (*Lycopersicon esculentum*) and okra (*Abelmoschus esculentus*). *International Journal of Agricultural Research* 2: 620-625.
- Putter, J. (1974) Peroxidases. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. (ed. Bergmeyer, H. U.) Pp. 685-690. Academic Press.
- Qi, W., Zhang, L., Wang, L., Xu, H., Jin, Q. and Jiao, Z. (2015) Pretreatment with low-dose gamma irradiation enhances tolerance to the stress of cadmium and lead in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 115: 243-249.
- Sengupta, M., Chakraborty, A. and SenRaychaudhuri, S. (2013) Ionizing radiation induced changes in phenotype, photosynthetic pigments and free polyaminelevels in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Applied Radiation and Isotopes* 75: 44-49.

- Sever Mutlu, S., Djapo, H., Ozmen, S., Selim, C. and Tuncel, N. (2015) Gamma-ray irradiation induces useful morphological variation in bermudagrass. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 43: 515-520.
- Stajner, D., Popovic, B. M. and Taski, K. (2009) Effects of γ -irradiation on antioxidant activity in soybean seeds. *Central European Journal of Biology* 4: 381-386.
- Torres, M. S., White Jr, J. F., Zhang, X., Hinton, D. M. and Bacon, C. W. (2012) Endophyte-mediated adjustments in host morphology and physiology and effects on host fitness traits in grasses. *Fungal Ecology* 5: 322-330.
- Wang, X., Ma, R., Cui, D., Cao, Q., Shan, Z. and Jiao, Z. (2017) Physio-biochemical and molecular mechanism underlying the enhanced heavy metal tolerance in highland barley seedlings pre-treated with low-dose gamma irradiation. *Scientific Reports* 7: 14233.
- Yasmin, K., Arulbalachandran, D., Soundarya, V. and Vanmathi, S. (2019) Effects of gamma radiation (γ) on biochemical and antioxidant properties in black gram (*Vigna mungo* L. Hepper). *International Journal of Radiation Biology* 95: 1135-1143.

Morpho-physiological effects of gamma radiation on Tall fescue (*Festuca arundinacea* Scrb.)

Rahim Amirikhah¹, Nematollah Etemadi^{1*}, Mohammad R. Sabzalian², and Ali Nikbakht¹

¹Department of Horticulture, College of Agriculture, Isfahan University of Technology Isfahan, Iran

²Department of Plant Production and Genetics, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

(Received: 18/05/2021, Accepted: 04/10/2021)

Abstract

Gamma radiation is being used to induce mutation in diverse plant species. The present study investigated the growth and physiological responses of two tall fescue genotypes, 75C (native genotype) and Pacer (foreign genotype) to gamma radiation, as well as program for determination of the proper dose of gamma radiation for the mutation breeding of this species. Seeds of two genotypes of tall fescue were subjected to different doses, including 50, 100, 150, 200, 300 and 400 Gray (Gy) of gamma ray from a ⁶⁰Co (Cobalt-60) source. Irradiated and non-irradiated seeds were sown in pots and then grown under controlled conditions in the greenhouse. Growth and physiological aspects associated with plant tolerance to oxidative stress were examined. The results revealed that the low dose (50 Gy) of gamma radiation stimulated seedling growth of both genotypes. However, high doses (100-400 Gy) significantly reduced seedling survival and plant height, and enhanced days to seedling emergence. Furthermore, high doses of radiation reduced activities of antioxidant enzymes (especially catalase and superoxide dismutase), and increased the contents of proline and malondialdehyde (MDA) in the seedlings of both genotype as compared with non-irradiated plants. Biplot analysis indicated that positive correlations existed between the growth and survival of plant with antioxidant enzyme activities and negative correlations were observed between the plant growth and proline plus MDA contents. The native genotype (75C) was more sensitive to gamma-ray as compared with Pacer genotype. According to the probit analysis, the 50% lethal dose (LD₅₀) for 75C and Pacer genotypes were 212 and 223 Gy of gamma radiation, respectively. Based on the results of the present study, gamma rays stress negatively affected survival, morphological traits, and antioxidant enzymes activities in tall fescue and dosages ranging from 200 to 250 Gy is recommended as the appropriate dose of irradiation for mutation breeding programs in tall fescue.

Keywords: Gamma radiation, Tall fescue, Antioxidant enzymes, the 50% lethal dose (LD₅₀)