دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

تأثیر اتیل متان سولفونات (EMS) بر برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی و مقدار استویوزید و ربادیوزید A در نمونه‌های باززایی شده از کالوس‌های گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

مهیار گرامی[۱]، حسین عباسپور[۲]، ولی اله قاسمی عمران[۳] و همت اله پیردشتی[۴]

۱- دانش‌آموخته دکتری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان و عضو هیات علمی موسسه آموزش عالی سنا ساری
۲- دانشیار، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان (نویسنده مسوول: abbaspour75@yahoo.com)
۳ و ۴- استادیار پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان و دانشیار گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۲۱

چکیده

به‌منظور بررسی اثرات ماده جهش‌زای اتیل متان سولفونات (EMS) بر برخی خصوصیات بیوشیمیایی در گیاهان باززایی شده از کالوس در گیاه استویا، دو آزمایش با سه تکرار اجرا گردید. در آزمایش اول، که به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا شد، ریزنمونه‌های برگی جهت تمایززدایی و کالوس‌زایی به محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشدی تیدیازرون منتقل شدند. توده‌های کالوسی با غلظت‌های مختلف EMS (۰/۱ درصد، ۰/۲ درصد و ۰/۵ درصد) در زمان‌های (۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه) تیماردهی و روی محیط کشت MS واکشت شدند. نتایج آزمایش اول نشان داد که برخی از خصوصیات کالوس‌های باززایی شده تحت تأثیر غلظت‌های مختلف اتیل متان سولفونات و زمان‌های متفاوت در معرض قرارگیری و اثرات متقابل این دو فاکتور، قرار گرفتند. به‌طوری‌که با افزایش غلظت و مدت زمان در معرض قرارگیری، میزان و شاخص‌های باززایی توده‌های کالوسی به صورت مستقیمی کاهش یافت. در آزمایش دوم که به صورت طرح کاملا تصادفی اجرا شد، هر گیاه باززایی شده از کالوس‌های تحت تیمار اتیل متان سولفونات، به‌عنوان یک رویداد جهش درنظر گرفته شده و جمعیت کلونی با سن مشابه از هر گیاهچه منحصر به فرد تهیه و بعد از دو ماه، خصوصیات فیتوشیمیایی و مقدارگلیکوزیدهای قندی (استویوزید و ربادیوزید A) گیاهان اندازه‌گیری شد. نتایج آنالیز نشان داد که عامل جهش‌زای اتیل متان سولفونات اثر کاملاً معنی‌داری بر صفات فیتوشیمیایی و گلیکوزیدهای قندی استویوزید و ربادیوزیدA در سطح یک درصد داشت. در میان موتانت‌های مطالعه شده موتانت‌های M_6، M_{10}، M_{11}، M_{18} و M_{19} دارای صفات فیتوشیمیایی مطلوب‌تری نسبت به سایر نمونه‌ها بودند، همچنین موتانت M8 بیشترین درصد تغییرات مقدار استویوزید و ربادیوزید A را به ترتیب با ۸۷/۳ و ۵۸/۳ درصد افزایش نسبت به نمونه شاهد داشت.

واژه‌های کلیدی: جهش، کالوس، EMS، استویوزید، ربادیوزید A و گیاه استویا

مقدمه

با توجه به اهمیت گیاهان دارویی به‌عنوان منبع دارویی در جهان و نیز تغییر نگرش در خصوص استفاده از این گیاهان در درمان بیماری‌ها، ضرورت دارد پژوهش‌های جامعی صورت گیرد (۲۰). یکی از راه‌های توسعه‌یافته برای این منظور، تکنیک کشت بافت و سلول است. کشت بافت گیاهی در زمینه گیاهان دارویی کاربردهای متعددی از جمله تکثیر انبوه و سریع گیاهان دارویی به‌منظور یکنواختی محتوای ژنتیکی، حفظ گونه‌های گیاهی در حال انقراض و تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای از طریق کشت سوسپانسیون سلولی و کشت اندام را دارد (۲۴). جهش ابزاری جهت مطالعه ماهیت و کارکرد ژن‌ها محسوب می‌شود. در شرایط درون شیشه‌ای جهش با افزایش دامنه ژنتیکی، زمینه را برای اصلاح محصولات فراهم می‌آورد (۱). موفقیت برنامه‌های جهش‌زایی در شرایط درون شیشه‌ای بستگی به ایجاد و کاربرد روش‌های قابل تجدید باززایی در گیاهان بستگی دارد که در این شرایط، بهینه‌سازی تیمارهای جهش‌زا و غربالگری کارآمد جمعیت‌های جهش‌یافته، برای دست‌یابی به تغییرات مطلوب صورت می‌گیرد (۱۲). عامل جهش‌زا می‌تواند بر خصوصیات سیتولوژیکی، بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی بافت‌ها و سلول‌های گیاهی اثرگذار باشد. استفاده از عوامل جهش‌زا به‌عنوان یک روش جدید و سریع جهت بهبود پارامترهای کیفی و کمی در بسیاری از گیاهان استفاده می‌شود. کاربرد این عوامل در محیط‌های کشت درون شیشه‌ای می‌تواند در ایجاد تنوع واریته‌ها برای ایجاد صفات کیفی و کمی مطلوب، مناسب باشد. استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) گیاهی از خانواده *Asteraceae* و چند ساله است، که در مناطق نیمه‌گرمسیری و در عرض‌های جغرافیایی بالا با روزهای بلند رشد می‌کند (۱۹). جنس استویا دارای بیش از ۲۰۰ گونه است که گونه *Stevia rebaudiana* B. در میان همه گونه‌ها دارای اسانس شیرین‌تری است. استویا یک گیاه دارویی مهم است که از لحاظ صنعتی به‌عنوان شیرین‌کننده طبیعی محسوب می‌شود. بذرهای این گیاه به سختی جوانه می‌زنند و بسیاری از این بذرها غالباً پوک و عقیم می‌باشند و قابلیت کشت ندارند. علاوه بر آن با توجه به رشد اولیه کم و کند، گیاهچه‌های این گیاه قادر به رقابت با علف‌های هرز نیستند و از طرفی تکثیر از ساقه نیز نیازمند نیروی کار بالا و زمان

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-19]
[DOI: 10.29252/jcb.9.23.177]

زیادی می‌باشد (۲۱). به همین دلیل در اکثر موارد از کشت بافت برای تکثیر آن استفاده می‌شود. این گیاه در بافت برگی دارای گلیکوزیدهای ترپنی با خواص شیرین‌سازی می‌باشد. دو گلیکوزید اصلی آن شامل استویوزید و ربادیوزید A می‌باشد که هر کدام به ترتیب ۲۵۰ تا ۳۰۰ بار و ۳۵۰ تا ۴۵۰ بار شیرین‌تر از ساکارز هستند. این ترکیبات می‌توانند مانع رشد باکتری‌ها شوند و به‌عنوان داروی دیابت نیز در تنظیم قند خون نقش دارند (۲۳). تحقیقات مختلفی در خصوص استفاده از عوامل جهش‌زای شیمیایی و فیزیکی بر باززایی کالوس‌های گیاهان مختلف انجام شده است. در پژوهشی اثر غلظت‌های مختلف ماده جهش‌زای اتیل متان سولفونات[1] (۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ درصد) در زمان‌های مختلف (۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۲۴۰ دقیقه) بر نمونه‌های برگی گیاه بنفشه آفریقایی در محیط درون شیشه بررسی شد. نتایج نشان داد که درصد بقاء و تشکیل اندام‌های هوایی گیاهان در غلظت ۰/۶ درصد EMS در مدت زمان ۱۲۰ و۲۴۰ دقیقه، صفر بود. بیشترین درصد باززایی و تشکیل اندام‌های هوایی نمونه‌هایی که در معرض EMS قرار گرفته‌اند، مربوط به تیمار ۰/۲ درصد EMS شد (۸). همچنین در یک تحقیق اثرات دوزهای مختلف اشعه گاما (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ گری) بر روی کالوس‌های باززایی شده از ریز نمونه‌های برگی گیاه استویا بررسی شد. نتایج نشان داد که استویوزید در کالوس‌های که در معرض اشعه گاما با دوز ۱۵ گری قرار گرفتند، دارای بیشترین مقدار، نسبت به نمونه شاهد بودند ولی در سطوح دیگر اشعه گاما مقدار استویوزید نسبت به نمونه شاهد روند کاهشی را نشان داد (۱۳). در تحقیق سوک و همکاران (۲۲) کاربرد عامل جهش‌زای اشعه گاما، باعث افزایش ۸ درصدی ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی در گیاه *Raphanus sativus* L. شد. کوستا و همکاران (۶) تأثیرات اشعه گاما بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی پوست بادام زمینی را بررسی کردند. نمونه‌ها در معرض اشعه گاما با دوزهای ۵، ۷/۵ و ۱۰ گری قرار گرفتند. نتایج نشان داد که اشعه گاما باعث تغییراتی در میزان ترکیبات فنولیکی، فلاونوئیدی، میزان تانن و فعالیت آنتی‌اکسیدانتی گردید. نمونه‌ها بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانتی در دوز ۵ گری اشعه گاما مشاهده شد. افزایش تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی با استفاده از جهش‌زاهای مختلف، اصلاح و بهبود خصوصیات مطلوب را در گیاهان تسهیل می‌نماید. کارآیی ماده جهش‌زای EMS در ایجاد جهش‌های مطلوب در گیاهان مختلف اثبات شده است (۱). در گیاه استویا تاکنون تحقیقی در خصوص گیاهان باززایی شده از کالوس‌های تحت تیمار ماده جهش‌زای EMS صورت نگرفته است. لذا این تحقیق با هدف اعمال جهش در شرایط درون شیشه‌ای با استفاده از تیمارهای مختلف EMS در زمان‌های مختلف انجام شد. همچنین برخی از خصوصیات بیوشیمیایی و میزان تغییرات گلیکوزیدهای قندی (استویوزید و ربادیوزید A) در گیاهان باززایی شده از کالوس‌های تحت تیمار قرار گرفته اندازه‌گیری شد تا در صورت ظهور خصوصیات مطلوب مورد نظر، اقدام به تکثیر و بهره‌برداری از گیاهان جهش‌یافته مطلوب گردد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۹۵-۱۳۹۳ در پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در قالب دو آزمایش انجام شد.

آزمایش اول: اعمال جهش در شرایط درون شیشه‌ای

به‌منظور تولید گیاهچه‌های استریل ابتدا قطعات گره‌ای گیاهان رشدیافته استویا جداسازی شدند. پس از شستشو با آب جاری به مدت نیم ساعت، ریزنمونه‌های قطعات گره‌ای در معرض الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه قرار گرفتند. سپس به وسیله آب مقطر دو بار استریل آبشویی شدند. در مرحله بعد توسط محلول هیپوکلریت سدیم دو درصد (حجم به حجم) بهمراه یک قطره توین ۲۰، به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی سطحی انجام شد و در نهایت سه مرتبه با آب مقطر دوبار استریل شستشه شدند. سپس ریزنمونه‌های استریل در محیط پایه MS بدون هورمون حاوی سه درصد ساکارز، ۰/۸ درصد آگار و pH=۵/۸ کشت و ظروف کشت با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در اتاقک رشد نگهداری شدند. بدین ترتیب تعدادی گیاه به‌عنوان مواد اولیه برای جدا کردن ریزنمونه‌ها بدست آمد.

القای کالوس

جهت القای کالوس، ریزنمونه‌های برگی جدا شده از گیاهچه‌های یک ماهه رشد یافته در شرایط درون شیشه بر روی محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشدی تیدیازورون[1] قرار گرفتند. پس از ۶ هفته کالوس شکل گرفت و واکشت ریز نمونه‌ها به محیط مشابه هر سه هفته، یکبار انجام شد. سپس کالوس‌ها به منظور اعمال تیمار با ماده جهش‌زای EMS به قطعات کوچک در ابعاد پنج میلی‌متر مربع برش داده شدند.

اعمال تیمار اتیل متان سولفونات

در ابتدا با استفاده از آب مقطر استریل محلول ذخیره یک درصد (وزن به حجم) از EMS تهیه و این محلول ذخیره جهت آماده‌سازی محلول EMS با غلظت‌های مختلف (۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد به ترتیب E_1، E_2 و E_3) استفاده شد. محلول‌های EMS مختلف قبل از استفاده با کمک روش فیلتراسیون (عبور از غشاهای ۰/۲ میکرومتر) استریل شدند. سپس ریزنمونه‌های کالوس که به مدت یک هفته در محیط MS فاقد تنظیم‌کننده رشد بودند، در محلول EMS با غلظت‌های ذکر شده در مدت زمان‌های مختلف (۳۰، ۶۰ و۱۲۰ دقیقه به ترتیب T_1، T_2 و T_3) و با چرخش ثابت ۱۵۰ دور در دقیقه غوطه‌ور شدند. در پایان ریزنمونه‌های کالوس تیمار شده سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شده و پس از خشک شدن روی کاغذ صافی استریل، روی محیط کشت MS فاقد تنظیم کننده رشد کشت شدند. سپس جهت باززایی در شرایط دمایی و نوری مشابه با قبل قرار گرفتند. ساقه‌های باززایی شده از کالوس در نمونه‌های شاهد و تیمار شده، در محیط کشت MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA

1- Ethyl Methane Sulfonate

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.177]

ریشه‌دار شدند. گیاهچه‌های تولیدی با استفاده از کشت قطعات گره‌ای و واکشت در محیط MS تکثیر شدند. آزمایش القاء جهش با استفاده از EMS به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتورها شامل تیمار جهش‌زای EMS با غلظت‌های مختلف (۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد به ترتیب E_1، E_2 و E_3) و مدت زمان‌های در معرض قرارگیری ریزنمونه‌ها (۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه به ترتیب T_1، T_2 و T_3) بود. در این آزمایش هر تیمار شامل سه تکرار و هر تکرار شامل هفت ریزنمونه بود.

آزمایش دوم

بررسی برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی و مقدار استویوزید و ربادیوزید A در گیاهان باززایی شده از کالوس‌های تحت تیمار EMS

پس از رشد گیاهچه‌ها در محیط درون شیشه‌ای، ریشه گیاهچه‌های تولیدی با آب مقطر شستشو و سپس به درون ظروف درب‌دار پلاستیکی شفاف حاوی پیت‌ماس و پرلیت (به نسبت ۵۰ : ۵۰) قرار داده شدند تا رطوبت گیاهچه‌ها حفظ شود. ظروف کشت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی که توسط نور سفید فلوروسنت تأمین شد، نگهداری شدند. آبیاری نمونه‌ها هر هفته یکبار بنا بر نیاز آبی گیاه انجام شد. از محلول هوگلند جهت تأمین نیاز تغذیه‌ای گیاهان بعد از دو هفته از استقرار گیاهان در شرایط سازگاری استفاده شد.

در این مرحله هر گیاه باززایی شده از کالوس‌های در معرض تیمار، به‌عنوان یک رویداد جهش درنظر گرفته شدند و جمعیت کلونی با سن مشابه از هر گیاهچه منحصر به فرد تهیه شد. در هر تیمار گیاهچه‌های باززایی‌شده که دارای فرم رشدی مناسب بودند انتخاب و به هر گیاهچه منفرد باززایی شده از کالوس کد منحصر به فردی تعلق گرفت. همزمان گیاهان باززایی شده از کالوس‌های شاهد بدون تیمار نیز بررسی شدند. از هر کد منحصر به فرد، کلونی با استفاده از کشت گره طی کشت متوالی، تهیه و گیاهچه‌های متعلق به هر کلونی پس از سازگاری، از نظر صفات پراکسیداسیون غشاء، قند محلول، آب اکسیژنه، فلاونوئید و آنتوسیانین، گلیکوزیدهای قندی استویوزید و ربادیوزیدA مورد ارزیابی شدند. این آزمایش با سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ تجزیه و تحلیل شدند و مقایسه میانگین تیمارها بر طبق آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اختلاف یک درصد با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C نسخه ۱/۴۲ انجام شد.

اندازه‌گیری صفات و پارامترهای موردنظر

تعیین پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء

برای سنجش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، غلظت مالون‌دی‌آلدهید به‌عنوان محصول پراکسیده شدن اسیدهای چرب غشا به روش هیت و پاکر (۱۰) اندازه‌گیری شد. در ابتدا ۰/۵ گرم از بافت تازه برگی با نیتروژن مایع در هاون چینی آسیاب و به آن پنج میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید (TCA) یک درصد اضافه شد. عصاره به دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ rpm در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و سپس، به یک میلی‌لیتر از محلول رویی، پنج میلی‌لیتر محلول ۲۰ درصد TCA حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک‌اسید (TBA[1]) اضافه شد. مخلوط حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و بلافاصله در یخ، سرد شد. سپس نمونه‌ها مجدداً در ۱۰۰۰۰ rpm به‌مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. ماده قرمز رنگ مالون‌دی‌آلدهید تیوباربیوتریک‌اسید (MDA-TBA) تولید شده در طول موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و جذب سایر رنگیزه‌های اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر انجام و غلظت مالون‌دی‌آلدهید بر حسب نانومول بر گرم بافت تازه محاسبه شد.

سنجش میزان آب اکسیژنه

برای اندازه‌گیری میزان آب اکسیژنه، از روش ولیکووا (۲۶) استفاده شد. برای این منظور، ۰/۵ میلی‌گرم بافت برگی را با ۵ میلی‌لیتر TCA ۰/۱ درصد در حمام یخ ساییده شد تا هموژن شوند. همگن حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰rpm سانتریفوژ شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول را برداشته و ۰/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار با pH=7 و ۱ میلی‌لیتر یدور پتاسیم یک مولار به آن اضافه شد. در نهایت، جذب نمونه در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد و سپس با استفاده از منحنی استاندارد مقدار آب اکسیژنه در نمونه محاسبه شد.

اندازه‌گیری میزان قند محلول

جهت سنجش میزان قند محلول، ۰/۱ گرم بافت تازه را با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ در هاون چینی خرد و ۱۵ دقیقه در بن ماری قرار داده شد. بعد از آن، عصاره الکلی حاوی قند محلول را جدا و قسمت پایینی عصاره همراه با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ دوباره برای تکرار عصاره گیری به بن‌ماری منتقل گردید. عمل استخراج با اتانول ۴ بار تکرار شد. بعد از استخراج به‌منظور تبخیر الکل، عصاره بدست آمده در دمای ۷۰ درجه قرار داده شد. برای حذف کلروفیل عصاره حاصل به نسبت ۱ به ۵ با کلروفرم مخلوط شد و بعد از ورتکس به مدت ۵ دقیقه به حال سکون رها شد. فاز بالایی عصاره بدست آمده به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۱۰۰۰۰rpm سانتریفوژ شد. قسمت شفاف بالایی جدا و برای اندازه گیری قند محلول استفاده گردید. اندازه‌گیری قند با اندازه‌گیری بوسیله انترون بر طبق روش مک ردی و همکاران (۱۷) انجام شد. سه میلی لیتر محلول آنترون به ۲۰۰ میکرولیتر عصاره اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری قرار داده شد و پس از سرد شدن نمونه‌ها میزان جذب آنها در طول موج۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. جهت تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر معرف آنترون، ابتدا ۷۶ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد با ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق گردید. بعد از سرد شدن ۱۵۰ میلی‌گرم آنترون در آن حل و در ظرف کهربایی نگهداری شد.

سنجش مقدار فلاونوئیدهای کل

از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم برای تعیین میزان فلاونوئیدها استفاده شد (۵). هر کدام از عصاره‌های متانولی گیاهی (۰/۵ میلی‌لیتر از $g.\ ml^{-1}$ ۱:۱۰) به صورت جداگانه با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم

1- Thio Marboturic Acid

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.177]

(٪۱۰ متانولی)، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم (۱ مولار) و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب شدند. سپس محلول‌ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند و جذب هر ترکیب واکنشی در طول موج ۴۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد با محلول‌های کوئرستین (Quercetin, Sigma Chemical Co.) متانولی در غلظت‌های ۲۵۰ تا۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه و منحنی با نرم‌افزار Excel ۲۰۰۷ رسم شد. سپس معادله خط y=bx+a بدست آمد. جذب‌های قرائت شده از نمونه ها به جای y قرار داده و x یا همان غلظت محاسبه شد.

سنجش آنتوسیانین کل

برای سنجش میزان آنتوسیانین کل مقدار ۰/۰۲ گرم از بافت خشک گیاهی با ۴ میلی‌لیتر متانول اسیدی در یک هاون چینی ساییده و محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد. سپس، محلول به مدت ۱۰ دقیقه و در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. در فاز رویی میزان جذب در طول موج‌های ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد. از محلول اسید کلریدریک ۱٪ متانول به‌عنوان شاهد استفاده گردید. میزان آنتوسیانین برای هر عصاره با استفاده از رابطه‌ی زیر محاسبه شد (۱۸).

$$A = A_{۵۳۰} - (۰/۲۵ \times A_{۶۵۷})$$

A: جذب محلول (اعداد اندیس نشانگر طول موج‌هایی است که جذب در آنها اندازه‌گیری شده است).

عصاره‌گیری برای استویوزید و ربادیوزید A

برای این منظور ۱۰۰ میلی‌گرم برگ خشک در ۱۰ میلی‌لیتر متانول خالص به مدت ۱۵ دقیقه مخلوط گردید. سپس متانول در مبرد تحت دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تبخیر و به‌منظور چربی‌زدایی ۲۰ میلی‌لیتر n–هگزان اضافه گردید و بعد از تبخیر حلال، مقدار ۵ میلی‌لیتر محلول (شامل استونیتریل و آب (۸۰:۲۰)) اضافه و سپس فیلتر گردید تا به دستگاه HPLC تزریق گردد (۱۶).

ارزیابی توسط HPLC

۱۰ میکرولیتر عصاره استخراجی به ستون کروماتوگرافی با مشخصات Cosmosil 5 NH2–MS به طول ۱۵ سانتیمتر، قطر ۴/۶ میلیمتر و قطر ذرات ۵ میکرومتر متصل به دستگاه HPLC مدل unicam-crystal-200 تزریق گردید. فاز متحرک شامل محلول آب مقطر و استونیتریل با شرایط ایزوکراتیک بود که با نسبت ۲۰ درصد از آب و ۸۰٪ استونیتریل با سرعت یک میلی‌لیتر بر دقیقه توسط پمپ از ستون عبور کرد. از شناساگر از نوع Diode Array detector و در طول موج ۲۱۰ نانومتر استفاده شد. فشار پمپ در ۸۰۰ psi تنظیم گردید و مقدار هر ماده بر اساس مقایسه زمان بازداری پیک خروجی آن با پیک استاندارد مقایسه و سطح زیر منحنی آنها تعیین شد (۱۶).

نتایج و بحث

آزمایش اول

نتایج حاصل از اعمال جهش در شرایط درون شیشه نشان داد که اثر غلظت (EMS) و زمان در معرض قرارگیری کالوس‌ها بر برخی از صفات باززایی (درصد بازایی، تعداد ساقه‌های تولیدی و تعداد روزهای باززایی) در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). با افزایش غلظت EMS و زمان، مقدار باززایی کالوس‌ها کاهش یافت. به گونه‌ای که تمامی کالوس‌هایی که در معرض غلظت‌های مختلف EMS در مدت زمان ۱۲۰ دقیقه قرار گرفته داشتند، تیره شده و از بین رفتند. همچنین درصد باززایی ساقه کالوس‌های تحت تیمار EMS، به شدت تحت تأثیر زمان قرار گرفت. در این تحقیق بالاترین میزان باززایی در تیمار شاهد مشاهده شد. سپس بیشترین باززایی مربوط به مدت زمان ۳۰ دقیقه بود و افزایش زمان تا ۱۲۰ دقیقه سبب ممانعت از باززایی گردید. در تیمار ۰/۲ و ۰/۵ درصد EMS تنها مدت زمان ۳۰ دقیقه منجر به باززایی از ساقه شد. همچنین غلظت‌های مختلف EMS بر مدت زمان ظهور ساقه‌ها از کالوس‌ها نیز تاثیرگذار بود. به طوری که افزایش غلظت و همچنین طول دوره در معرض قرارگیری EMS، سبب افزایش مدت زمان لازم برای ظهور ساقه گردید. سریعترین زمان ظهور ساقه‌ها مربوط به غلظت ۰/۱ درصد در مدت زمان ۳۰ دقیقه و طولانی‌ترین زمان ظهور مربوط به غلظت ۰/۵ درصد در مدت زمان ۱۲۰ دقیقه بود (جدول ۲). میزان نفوذ ماده جهش‌زا به بافت‌های رویشی یکی از موضوعات مهم در زمینه جهش‌زایی است که می‌تواند باعث افزایش اثر ماده جهش‌زا گردد. ایجاد جهش در محیط کشت درون شیشه می‌تواند به میزان زیادی نفوذ ماده جهش‌زا را به بافت افزایش داده و موجب بهره‌وری و بهبود محصولات گردد (۲۵). مطالعات برخی از محققین نشان داد که میزان جهش ایجاد شده توسط EMS، به غلظت و زمان در معرض قرارگیری نمونه‌ها بستگی دارد (۱۵). غلظت بالای ماده جهش‌زا EMS می‌تواند برای برخی از نمونه‌ها کشنده باشد به گونه‌ای که در بررسی که توسط زو و همکاران (۲۸) انجام شد، مشخص گردید که غلظت بالای EMS (بیش از ۰/۹ درصد) باعث کاهش اثرات مطلوب جهش در گیاه سویا (*Glycine max* L.) می‌شود. اثر غلظت‌های مختلف EMS (۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ درصد) در زمان‌های مختلف (۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و۲۴۰ دقیقه) بر نمونه های برگی گیاه بنفشه آفریقایی در محیط کشت MS نشان داد که درصد بقاء و تشکیل اندام‌های هوایی گیاهان در غلظت ۰/۶ درصد EMS در مدت زمان ۱۲۰ و۲۴۰ دقیقه، صفر می‌باشد. بیشترین درصد باززایی و تشکیل اندام‌های هوایی در نمونه‌های مربوط به تیمار ۰/۲ درصد EMS بود (۸).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.177]

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر غلظت (EMS) و زمان در معرض قرارگیری کالوس‌ها بر برخی از صفات باززایی
Table 1. Variance analysis of the effects of EMS concentration and exposure duration on some traits of the regenerated calli

منبع تغییرات	درجه آزادی	درصد باززایی	تعداد ساقه‌های تولیدی	تعداد روزهای باززایی
غلظت	۲	۴۰/۹۹**	۵/۴۷**	۶/۵۱**
زمان	۱	۴۷/۷۲**	۳/۴۴**	۷۱/۹۳**
غلظت× زمان	۲	۴/۴۳**	۰/۶۱**	۲۴/۶۳**
خطا	۱۴	۰/۴۹	۰/۰۸	۰/۰۴
ضریب تغییرات		۱۵/۱۴	۱۴/۰۷	۴/۶۲

**: اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد

جدول ۲- مقایسه میانگین برخی از صفات کالوس‌های باززایی شده تحت تیمار EMS
Table 2. Means comparison of the some traits related to regeneration from calli treated with EMS

تیمار	درصد باززایی	تعداد ساقه‌های تولیدی	تعداد روزهای باززایی
E_0T_0	۹۰^{a}	۱۸^{a}	۱۶^{ab}
E_1T_1	۶۶/۶۷^{a}	۹^{ab}	۳۰/۳۳^{ab}
E_1T_2	۲۶/۶۷^{abc}	۶^{bc}	۳۶/۶۷^{ab}
E_2T_1	۳۳/۳۳^{ab}	۵^{bc}	۴۳^{a}
E_2T_2	۰^{c}	۰^{c}	۰^{b}
E_3T_1	۶/۶۷^{bc}	۱^{c}	۵۵/۶۷^{a}
E_3T_2	۰^{c}	۰^{a}	۰^{b}

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند اختلاف آماری معنی‌داری ندارند

نتایج آزمایش دوم

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ماده جهش‌زای EMS بر روی برخی از خصوصیات فیتوشیمیایی (پراکسیداسیون لیپید، قند محلول، آب اکسیژنه، فلاونوئید و آنتوسیانین) و گلیکوزیدهای قندی نمونه‌ها در سطح ۱ درصد معنی‌دار است (جدول ۳).

مقایسه میانگین (جدول ۴) صفت پراکسیداسیون غشاء نشان داد که در میان نمونه‌های مطالعه شده، ۵ موتانت دارای مقادیر پراکسیداسیون غشای بیشتری نسبت به نمونه شاهد بودند که بیشترین مقدار، مربوط به موتانت M_9 با مقدار ۱۷ میکرومول برگرم و کمترین مقادیر این صفت مربوط به موتانت‌های M_2، M_4 و M_{10} به ترتیب با ۹/۴۹، ۹/۹۸ و ۱۰ میکرومول برگرم نسبت به شاهد (۱۲/۷۷ میکرومول بر گرم) بود. همچنین دامنه درصد تغییرات موتانت‌ها برای این صفت ۵۸/۹۲ درصد می‌باشد.

جدول ۳- تجزیه واریانس برخی از صفات فیتوشیمیایی در نمونه‌های تیمار شده با EMS در قالب طرح کاملا تصادفی
Table 3. Variance analysis of the some phytochemical traits in seedlings regenerated from EMS treated calli in a completely randomized design

منبع تغییرات	درجه آزادی	پراکسیداسیون غشاء(میکرومول برگرم)	قند محلول (میلی گرم بر گرم بافت تر)	آب اکسیژنه (میکرومول بر گرم بافت تر)	فلاونوئید (میلی‌گرم کوئرستین در گرم)	آنتوسیانین (میکرومول بر گرم وزن تر برگ)	استویوزید (میلی‌گرم بر گرم بافت خشک)	ربادیوزید A (میلی‌گرم بر گرم بافت خشک)
تیمار	۱۸	۱۰/۷۳**	۰/۰۰۰۱**	۰/۰۰۳۳**	۲۱۳/۳۴**	۰/۰۱۴**	۳۴۶/۷۲**	۸۵/۵۴**
خطا	۳۸	۰/۷۴	۰/۰۰۰۰۰۰۷	۰/۰۰۰۰۳	۱/۵۳	۰/۰۰۰۳	۱/۷۰	۰/۳۸۶
ضریب تغییرات		۷/۱۸	۲/۴۸	۴/۱۵	۲/۴۴	۳/۴۹	۳/۶۴	۳/۶۱

**: اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.177]

جدول ۴- مقایسه میانگین برخی از خصوصیات فیتوشیمیایی در نمونه‌های تیمار شده با EMS

Table 4. Means comparison of the some phytochemical traits in seedlings regenerated from EMS treated calli

تیمار	کد	پراکسیداسیون لیپید	درصد تغییرات	قند محلول	درصد تغییرات	آب اکسیژنه	درصد تغییرات	فلاونوئید	درصد تغییرات	آنتوسیانین	درصد تغییرات
E_0T_0	شاهد	۱۲/۷^{bcde}	–	۰/۰۲۷^{vj}	–	۰/۱۵۹^{q}	–	۴۵/۱۳^{g}	–	۰/۰۶۷^{m}	–
E_1T_1	M_2	۹/۴۹$^{\kappa}$	–۲۵/۶	۰/۰۲۴$^{\kappa}$	–۹/۴۵	۰/۱۷۴^{c}	+۹/۴۳	۴۳/۶۶^{g}	–۳/۲۶	۰/۱۸۱^{e}	+۱۷۰
E_1T_1	M_3	۱۲/۲^{aerg}	–۳/۵۲	۰/۰۳۴^{rg}	–۲۳/۶	۰/۲۱۵^{a}	+۳۵/۲	۴۴/۳۳^{g}	–۱/۷۷	۰/۰۸۷^{l}	+۲۹/۸
E_1T_1	M_4	۹/۹۸$^{J\kappa}$	–۲۱/۸	۰/۰۳۹^{c}	+۴۳/۶	۰/۱۰۸^{l}	–۳۲	۴۰/۸۰^{n}	–۹/۵۹	۰/۱۹۲^{q}	+۱۸۶
E_1T_1	M_5	۱۱/۶$^{ergn\imath}$	–۸/۷۷	۰/۰۳۸^{c}	+۴۰/۷	۰/۱۸۲^{bc}	+۱۴/۴	۶۲/۴۰^{a}	+۳۸/۲	۰/۲۶۸^{b}	+۳۰۰
E_1T_1	M_6	۱۰/۸$^{n\imath\kappa}$	–۱۵/۲	۰/۰۳۰$^{\imath}$	+۹/۴۵	۰/۱۰۸^{l}	–۳۲	۵۲/۵d^{e}	+۱۶/۴	۰/۱۳۶^{n}	+۱۰۲
E_1T_1	M_7	۱۴/۱^{b}	+۱۰/۸	۰/۰۳۲^{h}	+۱۷/۸	۰/۱۲۳^{m}	–۲۲/۶	۴۸/۸۶^{t}	+۸/۲۷	۰/۱۱۲$^{J\kappa}$	+۶۷/۱
E_1T_1	M_8	۱۲/۴^{cdef}	–۲/۲۷	۰/۰۳۶^{ae}	+۳۲/۳	۰/۱۸۴^{p}	+۱۵/۷	۶۲/۰۶^{a}	+۳۷/۵	۰/۱۱۱$^{J\kappa}$	+۶۵/۶
E_1T_1	M_9	۱۷^{a}	+۳۳/۲	۰/۰۳۶^{d}	+۳۳/۸	۰/۱۴۳^{ef}	–۱۰	۴۰/۹۳^{m}	–۹/۳۱	۰/۱۲۶^{l}	+۸۸
E_2T_2	M_{10}	۱۰$^{J\kappa}$	–۲۱/۵	۰/۰۳۸^{c}	+۴۰	۰/۱۴۲^{ef}	–۱۰/۶	۵۹/۶۰^{b}	+۳۲	۰/۱۵۴^{g}	+۱۳۲
E_2T_2	M_{11}	۱۱/۳$^{rgn\imath}$	–۱۱/۳	۰/۰۳۳^{gn}	+۱۸/۹	۰/۱۲۶^{gn}	–۲۰/۷	۵۴/۰۶^{a}	+۱۹/۷	۰/۱۱۸$^{\imath j}$	+۷۶/۱
E_2T_2	M_{12}	۱۲/۱^{ergn}	–۴/۸۶	۰/۰۳۸^{c}	+۴۰	۰/۱۴۷^{e}	–۷/۵۵	۳۴/۴^{i}	–۲۳/۷	۰/۱۹۳^{q}	+۱۸۸
E_2T_2	M_{13}	۱۳/۹^{b}	+۹/۴۸	۰/۰۴۴^{b}	+۶۰	۰/۱۱۱$^{\imath}$	–۳۰/۱	۵۶/۸۶^{c}	+۲۵/۹	۰/۳۱۷^{a}	+۳۷۳
E_2T_2	M_{14}	۱۰/۳$^{\imath j\kappa}$	–۱۹/۱	۰/۰۲۵$^{\kappa}$	–۵/۸۲	۰/۱۷۸^{bc}	+۱۱/۹	۵۲/۶$^{\cup e}$	+۱۶/۶	۰/۲۵۱^{c}	+۲۷۴
E_2T_2	M_{15}	۱۰/۹$^{gn\imath j}$	–۱۴	۰/۰۴۹^{a}	+۸۰/۷	۰/۱۷۶^{bc}	+۱۰/۶	۵۱/۸۰^{e}	+۱۴/۷	۰/۱۳۸^{n}	+۱۰۵
E_1T_1	M_{16}	۱۳/۶^{bcd}	+۶/۸۹	۰/۰۲۳^{l}	–۱۶/۳	۰/۱۲۶^{gh}	–۲۰/۷	۴۰/۴۶^{h}	–۱۰/۳	۰/۲۶۴^{b}	+۲۹۴
E_1T_1	M_{17}	۱۳/۸^{bc}	+۸/۱۴	۰/۰۳۰$^{\imath}$	+۹/۴۵	۰/۱۸۲^{bc}	+۱۴/۴	۵۷/۳۳^{c}	+۲۷	۰/۱۷۱f	+۱۵۵
E_1T_1	M_{18}	۱۱f$^{ghi\jmath}$	–۱۳/۳	۰/۰۳۵^{ef}	+۲۸	۰/۱۳۴^{rg}	–۱۵/۷	۵۱/۰۶^{e}	+۱۳/۱	۰/۱۰۷^{k}	+۵۹/۷
E_2T_1	M_{19}	۱۰/۳$^{\imath j\kappa}$	–۱۹/۱	۰/۰۳۱^{n}	+۱۴/۹	۰/۰۹۳^{j}	–۴۱/۵	۶۲/۷۳^{a}	۳۹	۰/۱۰۶$^{\kappa}$	+۵۸/۲

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند اختلاف آماری معنی‌داری ندارند. +، – نشان دهنده درصد افزایش یا کاهش نسبت به شاهد است

مقایسه میانگین صفت قند محلول حاکی از آن بود که فقط ۳ موتانت (M_{16}، M_2 و M_{14}) مقدار قند محلول‌شان کمتر از نمونه شاهد بودند و بقیه موتانت‌ها مقدار قند محلول بیشتری نسبت به شاهد داشتند. میان موتانت‌های بررسی شده، ۷ موتانت دارای مقدار آب اکسیژنه بیشتری نسبت به نمونه‌های شاهد بودند که بیشترین درصد تغییرات مربوط به موتانت M_3 با ۳۵/۲۲+ درصد کمترین درصد تغییرات این صفت نسبت به شاهد مربوط به موتانت M_{19} (۴۱/۵۱– درصد) بود. از نظر مقدار فلاونوئید در میان نمونه‌های مطالعه شده، بیشترین میزان به موتانت‌های M_{19}، M_5، M_8 و M_{10} به ترتیب با مقادیر ۶۲/۷۳، ۶۲/۴۰، ۶۲/۰۶ و ۵۹/۶۰ میلی‌گرم کوئرستین در گرم نسبت به نمونه شاهد (۴۵/۱۳ میلی‌گرم کوئرستین در گرم) اختصاص داشت و کمترین مقدار فلاونوئید مربوط به موتانت‌های M_{12}، M_{16}، M_4 و M_9 بود. در ضمن دامنه درصد تغییرات این صفت در میان موتانت‌ها ۶۲/۷۸ درصد بود. مقایسه میانگین صفت مقدار آنتوسیانین نشان داد که تمامی موتانت‌های بررسی شده دارای مقدار آنتوسیانین بیشتری نسبت به شاهد بودند (جدول ۴).

نتایج این تحقیق با نتایج آزمایشات سایر محقین در مورد بررسی اثرات ماده جهش‌زای اشعه گاما بر روی گیاهان رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) و لیمو (*Citrus limon* L.) که توسط ال- بلتاجی و همکاران (۷) و برزویی (۴) انجام شده است، مطابقت دارد. ال- بلتاجی و همکاران (۷) اثر دوزهای مختلف اشعه گاما (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ گری) را بر کالوس‌زایی گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد با افزایش سطوح دوزهای اشعه گاما، میزان قند محلول و مقدار فلاونوئید کل، مقدار پراکسیداسیون غشاء (MDA) و مقدار آب اکسیژنه (H_2O_2) کالوس‌ها افزایش یافت که این افزایش در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. همچنین در پژوهشی دیگر گزارش شد که استفاده از دوزهای مختلف اشعه گاما باعث افزایش مقدار فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه بادام می‌شود (۹). در یک تحقیق اثرات اشعه گاما با دوزهای (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ گری) بر روی برخی از خصوصیات بیوشیمیایی دو ژنوتیپ گندم (*Triticum aestivum* L.) با نام‌های روشن و موتانت T-65-58-8 در شرایط گلخانه بررسی شد، نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش دوزهای گاما در هر دو ژنوتیپ میزان پراکسیداسیون غشاء (MDA) افزایش می‌یابد. با افزایش دوز پرتو گاما، ژنوتیپ موتانت از اکسیدشدن چربی‌ها و به دنبال آن از کاهش پایداری غشاء سلول جلوگیری کرد. در این تحقیق میزان پروتئین‌های محلول در دو ژنوتیپ مطالعه شده بسته به دوز پرتوتاپی تغییر کرد. دوزهای مختلف اشعه گاما تاثیر معنی‌داری بر میزان قندهای محلول نمونه موتانت نداشت. این پژوهش نشان داد که واکنش گیاه در پاسخ به برخی از دوزهای پرتوگاما تغییراتی را در مسیرهای متابولیک و سنتز مولکول‌های زیستی موجود در سلول‌های گیاهی به همراه دارد که منجر به افزایش تحمل گیاه به انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌گردد (۴).

آنالیز تجزیه واریانس نشان داد که اثر غلظت EMS بر مقادیرگلیکوزیدهای قندی (استویوزید و ربادیوزید A) در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۵). مقایسه میانگین میزان استویوزید نشان داد که از میان موتانت‌های مطالعه شده، ۱۳ موتانت میزان قند استویوزید بیشتری نسبت به نمونه شاهد داشتند که بیشترین مقدار این قند به موتانت‌های M_8، M_{18} و M_4 (به ترتیب ۵۵/۶۰، ۵۳/۲۷ و ۴۷/۹۴ میلی‌گرم بر گرم بافت خشک) با درصد تغییرات ۸۷/۳۳+، ۵۳/۲۷+ و ۶۱/۵۲+ اختصاص داشت. کمترین مقدار استویوزید نسبت به شاهد (۲۹/۶۸ میلی‌گرم بر گرم بافت خشک) مربوط به موتانت‌های M_9، M_{11} و M_7 با مقادیر ۱۹/۳۴، ۲۲/۲۴ و

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.177]

۲۴/۱۸ میلی‌گرم بر گرم بافت خشک بود. مقایسه میانگین میزان قند ربادیوزید A (جدول ۶) نشان داد که ۶ موتانت دارای قند بیشتری نسبت به شاهد بودند. موتانت‌های M_8 ، M_{15} و M_{12} با مقادیر ۳۱، ۲۴/۹ و ۲۴ میلی‌گرم بر گرم بافت خشک نسبت به شاهد (۱۹/۵۹ میلی‌گرم بر گرم بافت خشک) بیشترین میزان را نشان دادند. کمترین میزان این صفت نسبت به شاهد مربوط به موتانت‌های M_9، M_{11} و M_7 با مقادیر ۹/۷۸، ۱۱/۱۸ و ۱۲ میلی‌گرم بر گرم بافت خشک بود. مقدار استویوزید و ربادیوزیدA بر مبنای محاسبه سطح زیر منحنی تعیین گردید (جدول ۶ و نمودار ۱). نتایج این تحقیق نشان داد که گیاهان باززایی شده از کالوس‌هایی که در معرض غلظت ۰/۱ درصد EMS در مدت زمان ۳۰ دقیقه قرار گرفته‌اند (کد M8)، بیشترین مقادیر استویوزید و ربادیوزید A را در میان موتانت‌های مطالعه شده به خود اختصاص دادند(جدول ۶). علاوه بر آن، این موتانت مقادیر قند محلول، فلاونوئید و آنتوسیانین بیشتری را نسبت به نمونه شاهد نشان داد. مقدار پراکسیداسیون لیپیدی این موتانت (M8) نسبت به نمونه شاهد کمتر بود که نشان‌دهنده پایداری بیشتر غشاء سیتوپلاسمی این موتانت نسبت به نمونه شاهد می‌باشد. این موضوع نشان می‌دهد که عامل جهش‌زای EMS بر خصوصیات بیوشیمیایی و مقادیر استویوزید و ربادیوزید A در این موتانت موثر بوده است و واکنش‌ها را به سمتی هدایت کرده که منجر به افزایش مقادیر قندی گردد. با توجه به اهمیت دارویی گیاه استویا به دلیل وجود گلیکوزیدهای قندی، افزایش مقادیر استویوزید و ربادیوزید A در گیاه استویا می‌تواند بعنوان یک شاخص مهم و اساسی در بازار پسندی و یا مقبولیت این گیاه مدنظر قرار گیرد.

جدول ۵- تجزیه واریانس مقادیرگلیکوزیدهای قندی(استویوزید و ربادیوزیدA) نمونه‌های در معرض قرار گرفته EMS

Table 5. Variance analysis of glycoside sugar contents (stevioside and ribodioside) of samples treated by EMS

منبع تغییرات	درجه آزادی	استویوزید (میلی‌گرم بر گرم بافت خشک)	ربادیوزید A (میلی‌گرم بر گرم بافت خشک)
تیمار	۱۸	۳۴۶/۷۲**	۸۵/۵۴**
خطا	۳۸	۱/۷۰	۰/۳۸۶
ضریب تغییرات		۳/۶۴	۳/۶۱

**: اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد

جدول ۶- مقایسه میانگین گلیکوزیدهای قندی (استویوزید و ربادیوزید A) در نمونه‌های تیمار شده با EMS در قالب طرح کاملا تصادفی

Table 6. Mean comparison of glycoside sugar content (stevioside and rebaudioside A) in samples treated by EMS in a completely randomized design

تیمار	کد	استویوزید (میلی‌گرم بر گرم بافت خشک)	درصد تغییر	ربادیوزیدA (میلی‌گرم بر گرم بافت خشک)	درصد تغییر
E_0T_0	شاهد	۲۹/۶^{gh}	–	۱۹/۵^{ef}	–
E_1T_1	M_2	۳۷/۴^{e}	+۲۶/۲	۱۵/۸^{j}	−۱۸/۸
E_1T_1	M_3	۴۱/۲^{a}	+۳۸/۸	۲۰/۳^{de}	+۳/۷۸
E_1T_1	M_4	۴۷/۹^{c}	+۶۱/۵	۲۱/۵^{d}	+۹/۸۵
E_1T_1	M_5	۳۰/۸^{g}	+۳/۸۷	۱۶/۳^{ij}	−۱۶/۷
E_1T_1	M_6	۲۸^{hi}	−۵/۵۶	۱۷/۲^{hij}	−۱۲/۲
E_1T_1	M_7	۲۴/۱^{j}	−۱۸/۵	۱۲^{lm}	−۳۸/۷
E_1T_1	M_8	۵۵/۶^{a}	+۸۷/۳	۳۱^{a}	+۵۸/۳
E_1T_1	M_9	۱۹/۳^{k}	−۳۴/۸	۹/۷۸^{n}	−۵۰
E_1T_2	M_{10}	۳۵/۱^{f}	+۱۸/۳	۱۴/۱^{k}	−۲۷/۶
E_1T_2	M_{11}	۲۲/۲^{j}	−۲۵	۱۱/۱^{mn}	−۴۲/۹
E_1T_2	M_{12}	۴۳/۲^{a}	+۴۵/۶	۲۴^{bc}	+۲۲/۹
E_1T_2	M_{13}	۲۶/۶^{i}	−۱۰/۱	۱۴/۱^{k}	−۲۷/۹
E_1T_2	M_{14}	۳۰/۲^{g}	+۱/۸۹	۱۷/۷^{gh}	−۹/۳۹
E_1T_2	M_{15}	۵۲/۶^{b}	+۷۷/۴	۲۴/۹^{b}	+۲۷/۴
E_2T_1	M_{16}	۳۶/۹^{ef}	+۲۴/۵	۱۸/۵^{fgh}	−۵/۵۶
E_2T_1	M_{17}	۲۹/۸^{gh}	+۰/۵۷	۱۳/۱^{kl}	−۳۲/۹
E_2T_1	M_{18}	۵۳/۲^{b}	+۷۹/۴	۲۳/۱^{c}	+۱۸
E_2T_1	M_{19}	۳۶/۲^{ef}	+۲۲/۲	۱۹^{efg}	−۲/۷۶

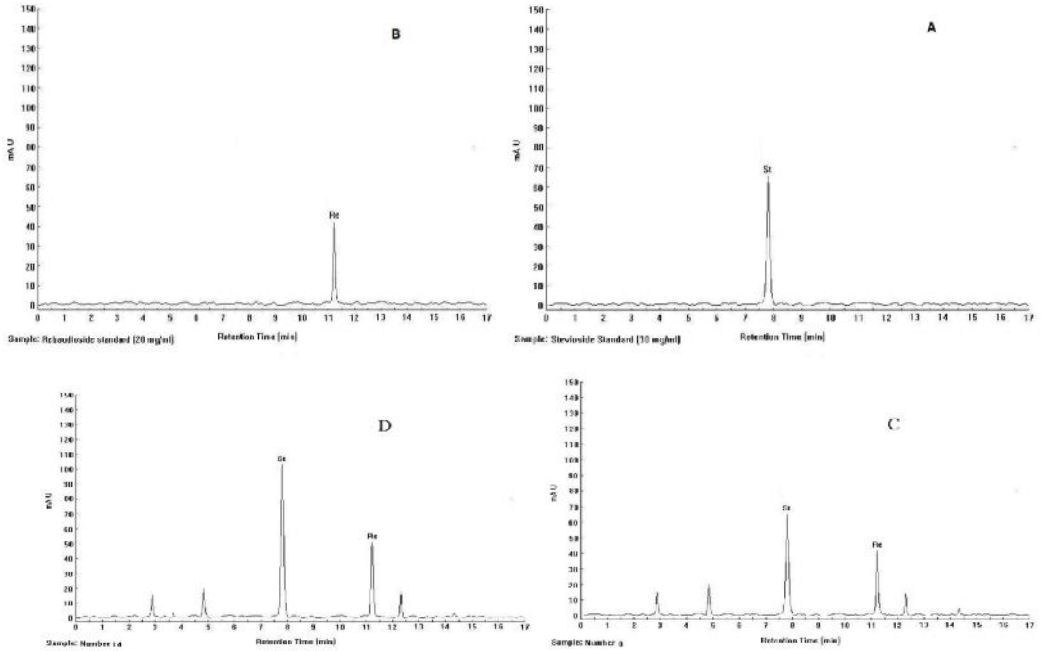
در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند اختلاف آماری معنی‌داری ندارند. +، – نشان دهنده درصد افزایش یا کاهش نسبت به شاهد است

نتایج این پژوهش با تحقیقات احمد خان و همکاران (۲) مطابقت داشت. آنها با استفاده از غلظت‌های مختلف EMS (۰/۴، ۰/۸، ۱/۲، ۱/۶ و ۲ درصد) بر نمونه‌های برگی گیاه استویا در مدت زمان ۱۵ ثانیه، دریافتند که گیاهان باززایی شده از نمونه‌های برگی تیمار شده با EMS با غلظت ۰/۴ درصد، دارای بیشترین مقدار استویوزید و ربادیوزید A بودند. خلیل و همکاران (۱۳) اثر اشعه گاما با دوزهای (۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ گری) بر مقدار قندهای استویول گیاه استویا را بررسی کردند. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار استویوزید و ربادیوزید A به نمونه‌های تیمار شده با عامل جهش‌زا اختصاص داشت. همچنین در مطالعه‌ای که به‌منظور بررسی اثرات ماده جهش‌زای اشعه گاما با دوزهای پایین (صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ گری) بر روی متابولیت‌های ثانویه در کالوس‌های گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.)

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.177]

انجام شد، میزان متابولیت‌های ثانویه با افزایش دوزهای پایین اشعه گاما افزایش یافت. دوزهای مختلف اشعه گاما با تاثیر بر روی مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانتی منجر به القای ROS شدند و در نهایت باعث تجمع متابولیت‌های ثانویه در کالوس گیاه رزماری شد (۷). در بررسی انجام شده توسط محققان، از دوزهای مختلف ماده جهش‌زای اشعه گاما با غلظت‌های (صفر، ۷۵۰، ۱۵۰۰، ۲۲۵۰ گری) جهت القاء تغییرات ژنتیکی به‌منظور افزایش مقدار قند استویوزید استفاده شده است. نتایج این تحقیقات نشان داد مقدار استویوزید در نمونه‌هایی که حاصل از تکثیر ریزازدیادی بودند نسبت به نمونه‌های اصلی، افزایش معنی‌داری را داشت. ولی با افزایش دوزهای اشعه گاما مقدار استویوزید در نمونه‌های تیمار شده با اشعه، کاهش یافت. (۳). نتایج بررسی هیلالی و هانان (۱۱) نشان داد که دوزهای مختلف اشعه گاما (صفر، ۵، ۱۰ و ۲۰ گری) باعث کاهش مقدار آب اکسیژنه و پراکسیداسیون لیپیدی غشاء و افزایش مقادیر قند محلول و فنل نسبت به نمونه شاهد می‌شود (۱۱).



نمودار ۱- کروماتوگرام HPLC از استویوزید و ربادیوزید A از محلول استاندارد (نمودارA و B)، عصاره نمونه شاهد (نمودار C) و عصاره موتانت M8 (نمودار D)

Figure 1. HPLC chromatogram of stevioside and rebaudioside A from standard solution (Diagram A and B), Extract of control sample (Diagram C) and M8 mutant extract (Diagram D)

عامل جهش‌زای EMS باعث ایجاد تغییراتی در خصوصیات بیوشیمیایی گیاهان باززایی شده از کالوس‌های تیمار شده گردید و منجر به افزایش مقدار گلیکوزیدهای استویوزید و ربادیوزید A در برخی از نمونه‌ها شد. نتایج نشان داد که موتانت‌های M_6، M_{10}، M_{11}، M_{18} و M_{19} بهترین پاسخ را به صفات بیوشیمیایی (پراکسیداسیون لیپید، قند محلول، آب اکسیژنه، فلاونویید و آنتوسیانین) نشان دادند به گونه‌ای که موتانت M_6 دارای مقدار قند محلول، فلاونویید و آنتوسیانین بیشتری نسبت به نمونه شاهد بود. مقدار پراکسیداسیون لیپید و آب اکسیژنه مربوط به این موتانت با درصد تغییرات ۱۵/۲- و ۳۲- نسبت به نمونه شاهد بیشترین کاهش را نشان داد. بیشترین مقادیر قندهای استویوزید و ربادیوزید A به موتانت‌های M_8، M_{15} و M_{18} اختصاص داشت. طوری که موتانت M_8 با درصد تغییرات به ترتیب ۵۵/۶+ و ۵۸/۳+ بیشترین مقدار قندهای استویوزید و ربادیوزید A را دارا بود. پیشنهاد می‌گردد پاسخ‌های مختلف ریزنمونه‌های برگی و گره‌ای و میانگره‌ای به عامل جهش‌زای اتیل متان سولفونات در شرایط درون شیشه مطالعه شود و خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی کالوس‌ها مورد ارزیابی قرار گیرد. همچنین از عوامل جهش‌زای فیزیکی و شیمیایی مختلف به منظور اعمال جهش استفاده شود.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.177]

منابع

1. Adamu, A.K. and H. Aliyu. 2007. Morphological effects of sodium azide on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). Science World Journal, 2: 9-12.
2. Ahmad Khan, S., L. Rahman, R. Verma and K. Shanker. 2016. Physical and chemical mutagenesis in Stevia rebaudiana: variant generation with higher UGT expression and glycosidic profile but with low photosynthetic capabilities. Acta Physiol Plant, 38: 4 pp.
3. Ali, A.A., A.A. Aboshosha, M.K. Kassem, I. Eman and A.N. EL-Banna. 2015. Salinity Tolerance and Stevioside Improvement of in Vitro Selected *Stevia* (*Stevia rebaudiana* B.) Mutants. International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology, 2: 2-11.
4. Borzouei, A., M. Kafi, R. Sayahi, E. Rabiei and P. Sayad. 2013. Biochemical response of two wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) to gamma radiation. Pakistan Journal Botany, 45: 473-477.
5. Chang, C., M. Yang, H. Wen and J. Chern. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal Food Drug Analaysis, 10: 178-182.
6. Costa de Camargo, A., T.M. Ferreira de Souza Vieira, M.A.B. Regitano-D Arce, M.A. Calori-Domingues and S.G. Canniatti-Brazaca. 2012. Gamma radiation effects on peanut skin antioxidants. International Journal of Molecular Sciences, 13: 3073-3084.
7. El-beltagi, H.S., O.K. Ahmed and W. EL-desouky. 2011. Effect of low doses gamma irradiation on oxidative stress and secondary metabolites production of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) callus culture. Radiation Physics and Chemistry Journal, 80: 968-976.
8. Fang, J.Y. 2011. In Vitro Mutation Induction of Saintpaulia Using Ethyl Methanesulfonate. Hort Science, 46: 981-984.
9. Harrison, K. and L.M. Were. 2007. Effect of gamma irradiation on total phenolic content yield and antioxidant capacity of Almond skin extracts. Food Chemistry, 102: 932-937.
10. Heath, R.L. and L. Packer. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast, kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives in Biochemistry and Biophysic, 125: 189-198.
11. Helaly, M.N.M. and A.M.R. Hanan El-hosieny. 2011. Effectiveness of gamma irradiated protoplasts on improving salt tolerance of Lemon (Citrus limon L.). American Journal of plant physiology, 6: 190-208.
12. Jain, S.M. 2006. Mutation-assisted breeding in ornamental plant improvement. Acta Horticulturae, 714: 85-98.
13. Khalil, S.A., N. Ahmad and R. Zamir. 2015. Gamma radiation induced variation in growth characteristics and production of bioactive compounds during callogenesis in *Stevia rebaudiana* Bert.). New Negatives in Plant Science, 1: 1-5
14. Khalil, S.A., R. Zamir and N. Ahmad. 2014. Effect of different propagation techniques and gama irradiation on major steviol glycoside's content in stevia rebaudiana. The Journal of Animal & Plant Sciences, 24: 1743-1751.
15. Lee, S.Y., J.I. Cheong and T.S. Kim. 2003. Production of doubled haploids through another culture of M1 rice plants derived from mutagenized fertilized egg cells. Plant Cell Reports, 22: 218-223.
16. Mamta, P.R., P. Vijaylata, G. Arvind, S. Bikram, K.B. Ravinder and T. Rupinder. 2010. Stimulatory effect of phosphate-solubilizing bacteria on plant growth, stevioside and rebaudioside-A contents of *stevia rebaudiana* Bertoni. Applied Soil Ecology, 46: 222-229.
17. McCready, R.M., J. Guggolz, V. Silviera and H.S. Owens. 1950. Determination of starch and amylase in vegetables. Analytical chemistry, 22: 1156-1158.
18. Mita, S., N. Murano, M. Akaike and K. Nakamura. 1997. Mutants of Arabidopsis thaliana with pleiotropic effects on the expression of the gene for beta-amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. Plant Journal, 11: 841-851.
19. Mondaca, L., A. Galve, L. Bravo and K. Hen. 2012 .Stevia rebaudiana Bertoni source of a high-potency natural Swetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food chemistry, 132: 1121-1132.
20. Mulabagal, V. and H.S. Tsay. 2004. Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International Journal of Applied Science and Engineering, 2: 29-48.
21. Sivaram, L. and U. Mukundan. 2003. In vitro Culture study on stevia rebaudiana. In Vitro Cellular and Development Biology of plant, 39: 520-523.
22. Suk, J.E., L.H. Hwa, K.J. Sung and S. Young. 2005. Effects of low dose γ-ray irradiation on antioxidant activity of seeds and seedling growth in *Raphanus sativus* L. Korean Journal of Horticultural Science & Technology, 23: 245-249.
23. Taware, A.S., D.S. Mukadam, A.M. Chavan and S.D. Tawar. 2010. Comparative studies of *in vitro* and *in vivo* grown plants and callus of *Stevia rebaudiana*(Bertoni). International Journal Integrative Biology, 9: 10-15.
24. Tripathi, L. and J.N. Tripathi. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2: 243-253.
25. Van harten, A.M. 1998. Mutation breeding: Theory and practical applications. Cambridge University Press, London, U.K. 22 pp.
26. Velikova, V., I. Yordannw and A. Edreva. 2000. Oxidative stressand some oxidant system in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamine Plant Science, 115: 59-66.
27. Zhu, B., A. Gu, X. Deng, Y. Geng and Z. Lu. 1995. Effects of caffeine or EDTA post-treatment on EMS mutagenesis in soybean. Mutation Research, 334: 157-159.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.177]

Effects of Ethyl Methane Sulfonate on Some Phytochemical Traits, Stevioside and Rebaudiosid a Contents of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Plants Regenerated from Calli

Mahyar Gerami[1], Hosein Abbaspour[2], Valiollah Ghasemi Omran[3] and Hematollah Pirdashti[4]

1- Graduated Ph.D. Student, Faculty of Sana Institute of Higher Education, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan
2- Associate Professor, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan (Corresponding authors: Abbaspour75@yahoo.com)
3 and 4- Assistant Professor Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan and Associate Professor Department of Agronomy, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari
Received: June 13, 2016 Accepted: September 11, 2016

Abstract

In order to evaluate ethyl methane sulfonat (EMS) mutagenic substance on some of the phytochemical traits of stevia plants regenerated from calluses, two separate experiments were conducted with three replications. At the first experiment a factorial arrangement based on completely randomized design was used. leaf explants were transferred to MS culture media containing the growth regulator thidiazuron (TDZ) at 0.1 mg/L, and callus masses were exposed to various concentrations of EMS (0.1, 0.2 and 0.5%) for different periods (30, 60, and 120 minutes). Then, callus masses were subcultured in MS culture media. Based on the findings of the first experiment, the effects of the various concentrations of EMS, different exposure durations and the interaction effects of these factors were significant on the traits of regenerated calluses. The number of produced stems declined when EMS concentrations and exposure durations were increased. In the second experiment, completely randomized design, each plant regenerated from calli which treated with EMS was considered as a mutational event and a colony population with members of similar age was prepared for each unique plant. In each treatment, the regenerated plants with suitable growth forms were selected, and each individual seedling regenerated from callus was assigned a unique code. After two months, some phytochemical traits and the amount of glycoside sugars (stevioside and rebaudioside A) were measured. Results of ANOVA showed that EMS had significant effects on phytochemical traits and the amount of glycoside sugars at the 1% level. Among the studied mutant samples, the M_6, M_{10}, $M_{11,}$ M_{18} and M_{19} showed the most changes of most traits as compared to the control sample. Also, M_8 mutant had the maximum steviosid and rebaudiosid A contents (+87.3 and +58.3% more than control, respectively).

Keywords: Callus, EMS, Mutant, Rebaudiosid, Steviosid, Stevia plant

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.177]