

بررسی اثر اشعه گاما بر تغییرات الگوی پروتئینی و تنوعات سوماکلونال در درمنه کوهی

شبنم جلیلی^۱ M.Sc.، علی اکبر احسانپور^{۱*} Ph.D.، غلامرضا اصغری^۲ Ph.D.، محمد رضا عبدی^۳ Ph.D.

۱- دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، اصفهان، ایران

۲- دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، گروه فارماکولوژی، اصفهان، ایران

۳- دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه فیزیک، اصفهان، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: ehsanpou@sci.ui.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۴/۳۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۲۴

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی اثر تابش گاما بر تغییرات احتمالی ژنتیکی و الگوی پروتئینی کالوس و درمنه کوهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه جوانه‌های جانبی به همراه نوساقه گیاه پس از دو هفته رشد در محیط کشت MS در معرض سه دوز ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ گری پرتو گاما قرار داده شد و پس از چهار هفته رشد در شرایط درون شیشه، الگوی الکتروفورزی پروتئین‌ها با روش SDS-PAGE و تنوع سوماکلونال با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: در بررسی و مقایسه باندهای حاصل از DNA تکثیر شده محصول PCR در گیاهان پس از کشت بافت، پرایمر OPA20 و در کالوس درمنه کوهی پرایمرهای FPK105 و (GATA)4 تفاوت و حتی عدم وجود برخی از باندها را نشان داد و در دیگر پرایمرها تفاوتی ملاحظه نشد. افزایش تراکم باند در دوز ۵۰ گری و کاهش تراکم در دوز ۲۰۰ گری در الگوی الکتروفورزی پروتئینی گیاه مشاهده شد.

نتیجه گیری: احتمالاً در اثر آسیب‌های وارد شده توسط رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن فعال توسط اشعه گاما سبب ایجاد تغییراتی در سطح ژنوم و میزان بیان ژن‌ها گردیده است.

واژگان کلیدی: درمنه کوهی، اشعه گاما، ISSR-PCR، RAPD-PCR، SDS-PAGE

مقدمه

درمنه کوهی (*Artemisia aucheri Boiss.*) یکی از گونه‌های جنس درمنه است. درمنه کوهی بوته‌ای چند ساله و آروماتیک از خانواده Asteraceae و طایفه Anthemedeae بوده و به‌عنوان گیاه غالب در استپ‌های خشک و نیمه خشک مطرح می‌باشد و از مهم‌ترین گونه‌های علوفه‌ای ایران در فصل پائیز می‌باشد (۱). اهمیت جنس درمنه در حال حاضر به‌واسطه ترکیبات مهم دارویی و اثرات درمانی قابل توجه، در حال افزایش است. ترکیبات جنس درمنه به‌عنوان داروی ضد مالاریا، ضد باکتری، ضد قارچ، آنتی‌اکسیدانت و سایتوتوکسیک مورد مصرف می‌باشد (۲-۵). اشعه گاما یکی از مهم‌ترین موثرات‌زاهای فیزیکی با پرتوهای برقاطیسی با طول موج کوتاهتر از اشعه X است و لذا دارای انرژی و قدرت نفوذ بالا و توانایی ایجاد انواع جهش‌ها را در مولکول‌های مهم زیستی دارا می‌باشد. پرتوهای گاما قادرند در محیطی که از درون آن می‌گذرند یونش و برانگیختگی را توأم انجام دهند و بیشتر اثرات زیستی این پرتوها معمولاً در نتیجه یونش است. پرتوهای گاما هنگامی به‌وجود می‌آیند که هسته اتم ناپایداری، به‌منظور دستیابی به‌حالت پایدار، معمولاً مقداری انرژی آزاد می‌نماید (۶). تنوعات ایجاد شده در بین گیاهان کشت بافت به‌علت عوامل ژنتیکی و یا اپی‌ژنتیک می‌باشند. مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی در اثر بیان ژن خاصی در مرحله S چرخه سلولی در شرایط آزمایشگاهی کشت بافت به‌وجود آمده است که در تقسیم میتوز به ارث می‌رسند ولی در تولید مثل جنسی و تقسیم میوز منتقل نمی‌شوند. در واقع این نوع تنوعات سوماتیکی یک راه جایگزین برای ایجاد تنوع و توسعه استخر ژنی است (۷). تنوعات سوماتیکی ژنتیکی تغییراتی است که در هسته سلول انجام می‌گیرد و از تغییرات اپی‌ژنتیکی به‌وسیله توانایی انتقال آن‌ها پس از لقاح یا تولید مثل جنسی قابل تمایزند. در اغلب گزارشات تغییرات ژنتیکی، فراوانی نسبتاً کمتری را نسبت به تغییرات اپی‌ژنتیکی از قبیل تغییر در الگوی متیلاسیون DNA نشان می‌دهد که به‌طور مستقیم در تغییر در فنوتیپ درگیر است (۸). فراوانی تنوعات سوماتیکی معمولاً به‌مراتب بیشتر از تغییرات مورد انتظار در طبیعت است. اکثراً بر این باورند که بین زمان کشت و ایجاد تنوعات سوماتیکی رابطه وجود دارد و تغییرات سوماکلونال با سن کشت تجمع می‌یابد. فراوانی وقوع تنوع سوماتیکی را می‌توان به‌کار بردن مواد فیزیکی و شیمیایی جهش‌زا همچون اشعه گاما افزایش داد (۸). تغییرات و

نوآرایی‌های ساختاری DNA در اثر آسیب‌های وارد شده توسط رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (SOR) توسط اشعه گاما در سطح ژنوم و بیان ژن‌ها بر روی موز با کمک مارکر RAPD توسط Wendt و همکارانش (۹) نیز مشاهده شد. از طرف دیگر به‌نظر می‌رسد تحریک تقسیم سلولی و احتمال وقوع جهش با افزودن هورمون‌های گیاهی 2-4-D و NAA و کینتین با غلظت نهایی ۲ میلی‌گرم بر لیتر به محیط کشت درمنه کوهی می‌تواند سبب تغییرات ژنتیکی و تنوعات سوماتیکی شود. تحقیقات نشان داده که غلظت بالای سیتوکینین در محیط کشت و تکرار دفعات واکشت، تنوعات سوماتیکی و احتمال وقوع جهش را افزایش می‌دهد (۱۰). بر اثر تابش، انواع مختلفی از آسیب‌ها در مولکول DNA به‌وجود می‌آید که هر کدام از آسیب‌ها به‌مقدار و شدت تابش، نوع بافت، سلول و نیز سن سلول بستگی دارد. حدود ۷۵ درصد از رادیکال‌های OH به‌وجود آمده سبب تغییر یا از بین رفتن DNA می‌شوند (۱۱). از آنجا که ترتیب قرار گرفتن و ترکیب بازهای موجود در روی یک مولکول DNA مشخص‌کننده‌ی رمز ژنتیکی است که مولکول حمل می‌کند، لذا هر گونه دگرگونی در ترتیب قرار گرفتن بازها می‌تواند منجر به بروز تغییر در ترکیب ژنتیکی، یا ایجاد جهش شود. در تحقیق صورت گرفته توسط Constantin و Love (۱۲) با تابش اشعه گاما بر بذر گیاه *Vigna sinensis* مقدار پروتئین کاهش یافت. همچنین Pollard بیان کرد که تابش اشعه گاما سبب توقف رونویسی DNA می‌شود و همین امر منجر به کاهش سنتز پروتئین می‌گردد (۱۳). بر اثر تابش پرتو گاما بر *Citrus sinensis* دیده شد است که تغییرات الگوی پروتئینی در دوزهای مختلف گاما متفاوت می‌باشد که این مساله مرتبط است با شدت دوز تابش، برای مثال دوز ۵۰ گری شامل بیشترین تراکم باند و بیشترین مقدار پروتئین بود در حالی که در دوز ۱۰ گری محتوای پروتئین کاهش یافته بود (۱۴). از طرف دیگر پروتئین‌ها ممکن است در اثر تابش تغییرات ساختمانی پیدا کنند و در نتیجه اعمال آن‌ها نیز تغییر کند. گروه آمینی حساس‌ترین قسمت آمینواسید نسبت به تابش است. تغییرات ویژه‌ای که در زنجیرهای جانبی به‌وجود می‌آید بستگی به ترکیب شیمیایی آن‌ها دارد. عدم کارایی پروتئین پس از تابش معمولاً نتیجه‌ی تغییر در یک زنجیر جانبی مهم، یا شکسته شدن پیوندهای هیدروژنی یا دی‌سولفاید می‌باشد، که مسئول نگهداری و برقراری ساختمان نوع دوم و سوم پروتئین هستند. یک چنین شکستگی می‌تواند منجر به باز شدن ناقص زنجیر

آنالیزهای PCR: جهت بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان و کالوس درمنه کوهی در هر سه دوز ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ گری ابتدا DNA با استفاده از CTAB استخراج شد (۱۹)، و سپس تنوعات سوماکلونال هر یک از نمونه‌ها با استفاده از پرایمرهای RAPD که شامل OPA06، OPA20، OPA18، FPK105 و OPA06، OPA20، OPA18، FPK105 و نیز پرایمرهای ISSR که شامل (CAA)5، (AC)8CG و (GACA)4، (GATA)4، (AC)8TA می‌باشد، مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا ۰/۵ گرم از بافت گیاه با استفاده از دانه‌های کوچک شیشه‌ای (Glass bead) در لوله سانتریفیوژ یک میلی‌لیتری خرد گردید. سپس به هر یک از تیوپ‌ها ۲۵۰ میکرو لیتر بافر استخراج افزوده شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرو لیتر انجام گردید و شامل مواد زیر بود: Taq DNA polymerase ۰/۲ میکرو لیتر، dNTP (۲۰ میلی مولار) ۲ میکرو لیتر، PCR Buffer (10x) ۲ میکرو لیتر، DNA ۳ میکرو لیتر، پرایمر (۱۰ پیکومول در لیتر) ۱/۵ میکرو لیتر و $MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار) ۰/۸ میکرو لیتر شرایط انجام PCR در جدول ۱ آورده شده است.

پیچیده‌ی پپتیدی شود و بی نظمی در ساختمان داخلی پروتئین به وجود بیورد (۱۵). هدف از این مطالعه استفاده از تابش پرتوهای گاما به منظور بررسی تنوعات سوماکلونال و الگوی الکتروفورزی گیاه و کالوس درمنه کوهی است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از گیاهان درمنه کوهی که قبلاً در شرایط کشت بافت در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشگاه اصفهان تهیه شده بود استفاده گردید. جوانه‌ی گیاهان بر روی محیط کشت MS (۱۶) کشت داده شد. برای بررسی تابش اشعه گاما بر جوانه‌های جانبی گیاه و کالوس با توجه به شرایط و امکانات و همچنین با توجه به استفاده‌ی محدوده‌ی گسترده‌ای از میزان تابش پرتوهای گاما به گیاهان مختلف توسط پژوهشگران، دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ گری جهت تابش انتخاب گردید. نمونه‌های مورد نظر به منظور تابش گاما به گروه انرژی هسته‌ای دانشگاه اصفهان منتقل شد و تحت تابش پرتو گاما با راکتور با منبع کبالت ۶۰ قرار گرفت. بر روی کالوس و گیاهان پرتو دیده پس از چهار هفته رشد آزمایشات ISSR-PCR (۱۷) و RAPD-PCR (۱۸) و SDS-PAGE انجام شد.

جدول ۱: شرایط انجام PCR

مدت زمان	دما (درجه سانتی گراد)	واکنش
۴ دقیقه	۹۴	واسرشت اولیه
۱ دقیقه	۹۴	واسرشت های بعدی
۴۰ ثانیه	۳۵	اتصال پرایمر
۴ ثانیه	۷۲	طویل شدن
-	-	تعداد سیکل ۳۵ عدد

بارگذاری شد. از آنجا که لازم بود تا مقدار معین و یکسان از نظر غلظت از همه نمونه‌ها در چاهک‌های ژل ریخته شود، در ابتدا سنجش کمی پروتئین‌های استخراج شده طبق برادفورد (۲۲)، انجام گرفت و یکسان سازی و استاندارد سازی نمونه‌ها صورت گرفت (عصاره پروتئینی + بافر نمونه). سپس از مخلوط حاصل از عصاره پروتئینی و بافر نمونه (۴۰ میکرو لیتر) در چاهک‌ها ریخته شد و تانک الکتروفورز با بافر تانک (pH=۸/۳) پر گردید و سپس به منبع تغذیه متصل و تحت میدان الکتریکی با ولتاژ ۱۰۰ ولت و شدت جریان ۴۰ میلی‌آمپر به مدت ۳ تا ۴ ساعت، الکتروفورز

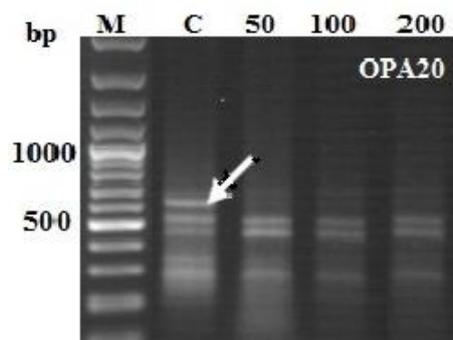
مراحل SDS-PAGE: به منظور استخراج پروتئین‌ها از بافر استخراج پروتئین استفاده گردید (۲۰) و معرف برادفورد جهت اندازه‌گیری مقدار پروتئین استفاده شد. ژل الکتروفورز به صورت ژل عمودی با شرایط داتوره کننده غیر پیوسته تهیه گردید که در این سیستم ژل استفاده شده به صورت دو قسمتی (ژل پایینی یا ژل جدا کننده با غلظت آکریلامید بیشتر و ژل بالایی یا ژل متراکم کننده با غلظت آکریلامید کمتر) می‌باشد (۲۱). عصاره پروتئینی کالوس و جداکشت‌های بخش هوایی درمنه کوهی در هر سه دوز ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ گری بر روی ژل الکتروفورز

دیده ملاحظه نشد همچنین باند دیگری با اندازه مولکولی ۳۵۰ جفت باز در شاهد و دوز ۵۰ گری اشعه گاما دیده شد که در دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ گری حضور نداشت. با توجه به شکل ۲ و نتایج حاصل از پرایمر FPK105 در کالوس، سه باند در محدوده ۵۰۰ تا ۱۱۰۰ جفت باز در دوز ۵۰ و ۱۰۰ گری مشاهده شد و در پرایمر 4(GATA) یک باند کاملاً مشخص در محدوده ۸۰۰ جفت باز در تمامی نمونه‌ها و همچنین باندهایی در محدوده ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز در شاهد و دوز ۵۰ گری دیده شد. و دیگر پرایمرها از نظر حضور و عدم حضور باند در بین شاهد و نمونه‌های تابش دیده تفاوتی نداشت. در مجموع این سه پرایمر توانست تا حدود زیادی تغییرات اعمال شده در ژنوم را نشان دهد.

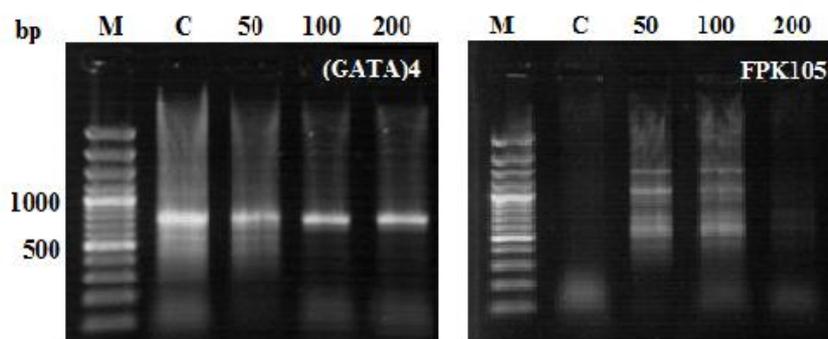
انجام گرفت. سپس ژل داخل محلول رنگ کوماسی بلو با غلظت حدود ۰/۱ درصد و بعد از آن در محلول رنگ بر قرار گرفت. پس از این مراحل بررسی تغییرات الگوی پروتئین بر روی ژل به دست آمد.

نتایج

به منظور بررسی تنوعات سوماتیکی احتمالی در بین گیاهان و کالوس تابش دیده و مقایسه آن با نمونه شاهد، RAPD-PCR و ISSR-PCR بر روی هر یک از نمونه‌ها انجام شد. در مقایسه نتایج حاصل از باندهای DNA تکثیر شده در گیاه درمنه کوهی با توجه به پرایمر OPA20 در شکل ۱، در گیاه شاهد باندی با اندازه مولکولی ۶۰۰ جفت باز حضور داشت که در نمونه‌های پرتو



شکل ۱: نتایج آنالیزهای RAPD-PCR در درمنه کوهی. M: مارکر، C: نمونه شاهد، ۵۰ گری: گیاهان تابش دیده در دوز ۵۰ اشعه گاما، ۱۰۰ گری: گیاهان تابش دیده در دوز ۱۰۰ اشعه گاما، ۲۰۰ گری: گیاهان اشعه دیده در دوز ۲۰۰ اشعه گاما

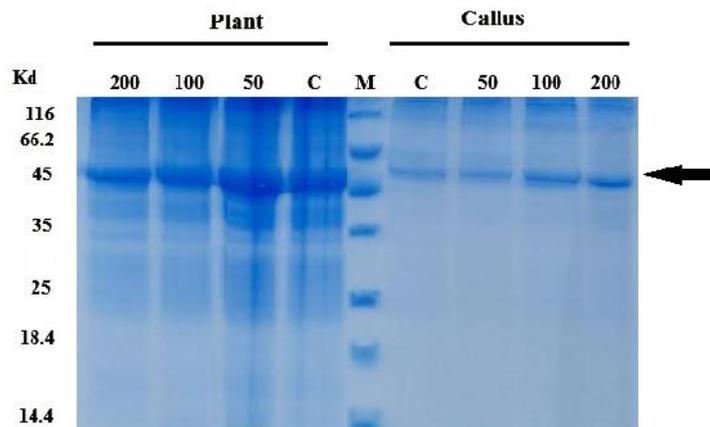


شکل ۲: نتایج آنالیزهای RAPD-PCR و ISSR-PCR در کالوس درمنه کوهی. M: مارکر، C: نمونه شاهد، ۵۰ گری: گیاهان تابش دیده در دوز ۵۰ اشعه گاما، ۱۰۰ گری: گیاهان تابش دیده در دوز ۱۰۰ اشعه گاما، ۲۰۰ گری: گیاهان اشعه دیده در دوز ۲۰۰ اشعه گاما

الکتروفورز پروتئین

کمتر پروتئین را دارا بودند. همچنین با توجه به شکل ۳ تفاوتی میان باندهای ظاهر شده در کالوس اشعه دیده و نمونه شاهد دیده نمی‌شود. علاوه بر این تعدادی باند پروتئینی در نمونه‌های گیاهی تحت تابش در محدوده بین ۳۵ تا ۴۵ کیلو دالتون مشاهده شد که این باندها در نمونه‌های کالوس وجود نداشت. بدیهی است این تغییرات مشاهده شده مربوط به اختلاف نوع بافت مورد آزمایش می‌باشد.

با توجه به شکل ۳ نتایج حاصل از آنالیز الگوی پروتئینی گیاه و کالوس نشان داد تابش پرتو گاما بر الگوی الکتروفورزی پروتئین اثر گذار بوده است. در الگوی پروتئینی گیاه و کالوس یک باند پروتئینی شاخص در محدوده باندهای ۴۵ تا ۶۶/۲ کیلو دالتون مشاهده گردید که در بین باندهای پروتئینی گیاه به‌طور مشخصی دوز ۵۰ تراکم بیشتر پروتئین و دوز ۲۰۰ تراکم بسیار



شکل ۳: الگوی الکتروفورزی (SDS-PAGE) پروتئین‌های گیاهان و کالوس درمنه کوهی در نمونه شاهد و تیمارهای اشعه دیده. M: مارکر، C: نمونه شاهد، ۵۰ گری: نمونه تابش دیده در دوز ۵۰/اشعه گاما، ۱۰۰ گری: نمونه تابش دیده در دوز ۱۰۰/اشعه گاما، ۲۰۰ گری: نمونه تابش دیده در دوز ۲۰۰/اشعه گاما

با آنالیز مجموع نتایج آن‌ها وجود تغییرات ژنتیکی بررسی شد. در مشاهدات به‌دست آمده از مقایسه نتایج حاصل از پرایمرها، در پرایمر FPK105 سه باند با اندازه مولکولی ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۱۰۰ جفت باز در دوز ۵۰ و ۱۰۰ گری حضور داشت ولیکن در دوز ۲۰۰ گری و نمونه شاهد نبود که در واقع این تغییرات گویای تنوع سوماتیکی در کالوس می‌باشد. از طرفی در پرایمر (GATA)4 در کالوس یک باند کاملاً واضح در محدوده‌ی ۸۰۰ جفت باز در شاهد و تمامی نمونه‌های تابش دیده وجود داشت، همچنین تعدادی باند در محدوده‌ی ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز در نمونه شاهد و دوز ۵۰ گری می‌باشد که در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ گری دیده نشد. زمانی که گیاه در معرض شرایط تنش‌زای محیطی قرار می‌گیرد طیف وسیعی از پاسخ‌ها را در سطح مولکولی، سلولی و در سراسر گیاه ایجاد می‌کند. این پاسخ‌ها گاهی با القا تغییرات در ترادف ژن‌ها و یا در میزان بیان برخی ژن‌ها در گیاه همراه است. این تغییرات و نوآرایی‌های ساختاری DNA ممکن است در اثر آسیب‌های وارد شده توسط رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن فعال توسط اشعه گاما در

بحث

به‌نظر می‌رسد که اشعه گاما می‌تواند باعث تغییر در ترادف و یا بیان برخی ژن‌ها به‌صورت تصادفی و ایجاد تنوعات ژنتیکی جدید و در نتیجه ایجاد گیاهی با پتانسیل بسیار بالای تولید متابولیت‌های ثانویه باشد (۲۳). بنابراین بررسی تنوعات سوماتیکی در گیاه درمنه کوهی امری کاملاً ضروری به‌نظر می‌رسد. در گیاهان در ۵ پرایمر ISSR تفاوتی در باندهای گیاهان پرتو دیده و شاهد مشاهده نشد. با توجه به شکل ۱ در یکی از ۵ پرایمر RAPD، پرایمر OPA20، باندی با اندازه مولکولی ۶۰۰ جفت باز در شاهد دیده شد که در دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ گری وجود نداشت همچنین حضور باند دیگری با اندازه مولکولی ۳۵۰ جفت باز در شاهد و دوز ۵۰ گری اشعه گاما که در دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ گری دیده نشد و دیگر پرایمرهای RAPD تفاوتی را در باندهای حاصل از DNA تکثیر شده محصول PCR نشان ندادند. در کالوس همانند گیاهان درمنه کوهی ۵ پرایمر RAPD و ۵ پرایمر ISSR استفاده شد و سپس

یا بر روی آنزیم‌ها و سایر فاکتورهای رونویسی اثر گذاشته و موجب کاهش و عدم سنتز پروتئین گردد (۱۵). اختلال در پردازش RNA حاصل از رونویسی ژن‌ها در اثر پرتو ممکن است عامل دیگری برای کاهش پروتئین باشد و یا احتمالاً افزایش فعالیت آنزیم پروتئولیز سبب تجزیه پروتئین شده است، به خصوص پروتئین‌های بزرگتر که دچار شکستگی‌هایی در اثر پرتو می‌گردند (۱۵). در مجموع نشانه‌ها و دلایل بسیاری وجود دارد مبنی بر اثر اشعه گاما بر پروتئین که می‌تواند اثر مستقیم یا غیر مستقیم ایجاد شده توسط رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط اشعه گاما باشد که یا سبب سرکوب سنتز و یا افزایش سنتز پروتئین شده و یا هیچ‌گونه اثری بر پروتئین گیاه نداشته است همانند پروتئین کالوس درمنه کوهی که تابش اشعه گاما اثری بر الگوی پروتئینی و تراکم پروتئین‌ها نداشته است و هیچ اختلافی مابین هر یک از نمونه‌ها مشاهده نشد.

نتیجه گیری

اشعه گاما می‌تواند باعث القا تغییراتی از نوع تغییر در توالی نوکلئوتیدها و یا بیان برخی از ژن‌های ژنوم گیاه و در نتیجه تغییرات فیزیولوژیکی در گیاه شود که فراوانی این تغییرات به مقدار زیادی به شدت و مدت تابش و تعداد رادیکال‌های آزاد تولید شده در سلول‌های تابش دیده بستگی دارد. بنابراین در مطالعه حاضر با توجه به خاصیت موتاژنی اشعه گاما، تنوعات سوماکلونال و تغییراتی که در الگوی پروتئینی گیاه و کالوس درمنه کوهی صورت گرفت می‌تواند تاثیر اشعه گاما را در محدوده‌ای که استفاده شده است نشان دهد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان به واسطه حمایت از این پژوهش تشکر می‌نمایند.

منابع

1. Mozafarian, V.A. The culture of the Iranian plant name. Iran: Contemporary Culture Company; 2004; 2th Ed.
2. Iranshahi M, Emami SA, Mahmoud-Soltani M. Detection of sesquiterpen lactons in Ten *Artemisia* species Population of Khorasan provinces. Iranian Journal of Basic Medical Science. 2007; 10(3): 183-188.

سطح ژنوم و بیان ژن‌ها باشد (۲۳). در مورد نتایج به دست آمده در این تحقیق نیز این احتمال وجود دارد که این اختلافات در باندهای DNA تکثیر شده محصول PCR در کالوس و گیاهان سبب ایجاد تنوعات سوماتیکی احتمالی و همچنین تاثیر اشعه گاما باشد.

در ضمن بررسی الگوی الکتروفورزی پروتئین گیاهان و کالوس درمنه کوهی باید به این نکته اشاره داشت که اشعه گاما می‌تواند باعث تنش اکسیداتیو و اثرات بیومولکولی از جمله تغییرات ساختاری، اکسیداسیون، تجزیه پیوندهای کووالانسی و تشکیل رادیکال‌های آزاد شود. رادیکال هیدروکسیل و سوپر اکسید آنیون تولید شده توسط اشعه گاما سبب تغییراتی در پروتئین سلول‌های گیاهی می‌شود که شامل: قطعه قطعه شدن، تشکیل پیوند عرضی، تراکم و انباشتگی و در نهایت اکسیداسیون پروتئین‌ها که به وسیله رادیکال‌های اکسیژن به وجود آمده توسط پرتوکافت آب صورت می‌گیرد (۱۴). افزایش تراکم باند در دوز ۵۰ گری گیاه نتیجه‌ی عمل کرد تابش یونیزه کننده گاما می‌باشد. Humera بیان کرد (۲۴) واکنش‌های تنش‌زا سبب تغییر متابولیسم پروتئین‌ها در گیاهان می‌شوند، تحت این شرایط تعدادی پروتئین ساخته شده و در بافت‌های گیاهی ذخیره می‌شود. طبق تحقیقات انجام شده در زمینه‌ی تابش پرتوهای گاما بر سلول‌های زیستی یکی از مهم‌ترین عمل‌کردهای گیاهان در پاسخ به استرس ایجاد شده توسط اشعه گاما توسعه و گسترش سیستم‌های دفاعی است که به نظر می‌رسد در سلول‌ها و سیستم دفاعی گیاه تحت مطالعه چنین اتفاقی صورت گرفته باشد (۲۵) که از این طریق می‌تواند سبب تغییر در الگوی بیان ژن و در نهایت سبب تغییراتی در مسیرهای بیوسنتزی و دفاعی و در پی آن تغییرات کمی و کیفی در محتوای پروتئینی شود چرا که شاید این پروتئین‌ها دارای نقش مهمی در مسیرهای سیگنالینگ و دفاع آنتی اکسیدانسی که برای عمل‌کرد مناسب، رشد و بقا گیاه در برابر اشعه گاما لازم است می‌باشند (۱۴). همچنین افزایش رونویسی موجب افزایش سنتز پروتئین می‌گردد، از این رو پرتو با اثر بر روی آنزیم‌های مورد نیاز در رونویسی DNA بر روی سنتز پروتئین اثر گذار است. کاهش تراکم باند پروتئینی در دوز ۲۰۰ گری گیاه درمنه کوهی می‌تواند به چند دلیل باشد از جمله کاهش رونویسی ژن و به دنبال آن کاهش سنتز پروتئین رخ داده است. حتی ممکن است پرتو با ایجاد تغییراتی در مولکول DNA موجب گردد که این مولکول نتواند به‌عنوان الگو برای تشکیل RNA عمل کند، و

3. Cakir A, Kijic H, Kodalis S, Mavi A, et al. Screening of chemical composition and anti fungal and antioxidant activities of the essential oils from tree Turkis *Artemisia* species. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 2005; 53(24): 1408-1416.
4. Zheng GQ. Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia annua*. *Planta Medicine*. 1994; 60: 54-57.
5. Tan RV, Zheng WF, Tang HQ. Biologically active substance from genus *Artemisia*. *Planta Medicine*. 1998; 64: 295-302.
6. Wiley J, Sons A. Turner, atoms, radiation, and radiation protection. *International Journal of Radiation*. 1995; 9, 46-87.
7. Li R, Bruneau AH, Qu R. Tissue culture-induced morphological somaclonal variation in [*Stenotaphrum secundatum* (Walt.) kuntze]. *Plant Breeding*. 2010; 129(1): 96-99.
8. Miguel C, Marum L. An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany*. 2011; 62(11): 1-13.
9. Wendt SN, Peters JS, Oliveira AC, Bobrowski VL, et al. Plant regeneration and molecular characterization of potato cultivar Macaca, obtained from gamma irradiation explants. *Journal New Seeds*. 2001; 3(2): 17-37.
10. Gaffar RM, Saker MM. Monitoring of cultivars identity and genetic stability in Strawberry varieties grown in Egypt. *World Journal of Agriculture Sciences*. 2006; 2(1): 29-36.
11. Ptacek O, Stavreva DA, Kim J K, Gichner T. Induction and repair of DNA damage as measured by the Comet assay and the yield of somatic mutation in gamma-irradiated tobacco seedlings. *Mutation Research*. 2001; 491(1-2): 17-23.
12. Constantin, MJ Love JE. Seedling responses of *vigna sinensis L. savi* to gamma and neutron seed irradiation. *Radiation Botany*. 1967; 7(4): 497-506.
13. Pollard E. Ionizing radiation: effect of genetic transcription. *Science*. 1964; 145(4): 710-711.
14. Pick King Ling A, Yichi J, Hussein S, Harum AR. Physiological responses of *Citrus sinensis* to gamma irradiation. *World Applied Sciences Journal*. 2008; 5(1): 12-19.
15. International Atomic Energy Agency (IAEA). *Radiation Biology: A Handbook for Teachers and Students*. Vienna, Austria. 2010; IAEA. Pp166.
16. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assay with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962; 15(3): 473-497.
17. Zietchiewicz E, Rafalsky A, Labud D. Genome fingerprinting by inter simple sequence repeat (ISSR). Anchored polymerase chain reaction amplification. *Genome*. 1994; 20: 176-183.
18. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, et al. DNA polymorphisms simplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 1990; 18(22): 6531-6535.
19. Ehsanpour AA, Twell D. Analysis of SFL1 and SFL2 promotor region in *Arabidopsis thaliana* using gateway cloning system. *Journal of Science*. 2005; 16(4): 303-309.
20. Amini F, Ehsanpour AA, Hoang QT, Shin JSH. Protein changes in Tomato under *in vitro* salt stress. *Russian Journal Of Plant Physiology*. 2007; 54(4): 464-471.
21. Hames B.D. One dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Gel electrophoresis of protein*. (eds) Hames, B. D. and Rickwood, D.) 2nd ED. New York: Oxford University Press; 1990; PP: 382.
22. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72(2): 248-254.
23. Sherif F, Khattab S, Ghoname E, Salem N, et al. Effect of gamma irradiation on enhancement of some economic traits and molecular changes in *Hibiscus Sabdariffa L.* *Life Science Journal*. 2011; 8(3): 220-229.
24. Humera A. Biochemical and molecular markers of somaclonal variants and induced mutants of potato (*Solanum tuberosum L.*). Thesis (PhD). University of the Punjab Lahore, Pakista; 2006.
25. Maity J, Chakraborty S, Kar S, Panja S, et al. Effect of gamma radiation on edible seed protein, amino acids and genomic DNA during sterilization. *Food Chemistry*. 2009; 114: 1237-1244.

Effect of Gamma Radiation on pattern of protein and somaclonal variation in plant and callus of *Artemisia aucheri* Boiss

Jalili Sh, M.Sc.¹, Ehsanpour AA, Ph.D.^{1*}, Asghary Gh, Ph.D.², Abdi MR, Ph.D.³

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
2. Department of Pharmaceutical Science, Isfahan University of Medicine, Isfahan, Iran.
3. Department of Physics, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

* Email corresponding author: ehsanpou@sci.ui.ac.ir

Received: 13 Apr. 2014

Accepted: 22 Jul. 2014

Abstract

Aim: The aim of this study was the evaluation of possible genetic and protein pattern changes of callus and of *Artemisia* plant.

Material and Methods: In this study, 2 weeks old shoot buds and shoots grown in MS medium were exposed to gamma radiation with 50,100 and 200 Gy. Then five RAPD_PCR primers, five ISSR-PCR primers for evaluation of somaclonal variation and SDS-PAGE for electrophoresis pattern of proteins in callus of *Artemisia* plants were studied.

Results: Results showed that the evaluation of DNA bands amplified in the callus and plant samples treated with gamma ray compared to the untreated samples using OPA20 in plant and FPK105 and (GATA)4 in callus in PCR products was obvious but no difference was observed using other primers. In electrophoresis of protein of plant increasing of protein bands due to application of 50 and 200 Gy were observed.

Conclusion: Due to the possible effects by free radicals and reactive oxygen species produced by gamma radiation caused changes in genetic and gene expression.

Keywords: *Artemisia aucheri* Boiss, Gamma Rays, ISSR-PCR, RAPD-PCR, SDS-PAGE