

مقاله پژوهشی

## تاثیر میکروگراویتی بر رشد، فراساختار، میزان فنل کل، فلاونوئید و مهار رادیکال DPPH در دانه‌رست‌های گیاه بذرالبنج (*Hyoscyamus niger L.*)

رقیه پورحبیبیان امیری<sup>۱</sup>، علیرضا ایرانبخش<sup>۱\*</sup>، مصطفی عبادی<sup>۲</sup>، حلیمه حسن پور<sup>۳</sup>، آزاده حکمت<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>۲</sup> گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران

<sup>۳</sup> پژوهشگاه هوا فضا، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، تهران، ایران

\* نویسنده مسئول مکاتبات: iranbakhsh@iau.ac.ir

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۱

DOI: 10.30495/jdb.2022.1964486.1323

<https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.4.10.4>

### چکیده

میکروگراویتی به عنوان یکی از تنش‌های محیط فضا می‌تواند روی رشد اندام‌های گیاه، ساختار اندام‌های سلولی و متابولیت‌های سلول تاثیر بگذارد. در پژوهش حاضر تاثیر میکروگراویتی به مدت ۳، ۷ و ۱۰ روز بر میزان رشد هیپوکوتیل و ریشه‌چه، وزن تر و خشک، فراساختار سلول و اندامک‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی و هم‌چنین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نظیر فنل کل، فلاونوئید و مهار رادیکال DPPH در دانه‌رست گیاه بذرالبنج (*Hyoscyamus niger L.*) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد تنش میکروگراویتی موجب افزایش طول ریشه‌چه و هیپوکوتیل گردید در حالی که روی وزن تر و خشک نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداد. دانه‌های نشاسته در تیمار میکروگراویتی در تمام سلول پراکنده بودند. در حالی که در نمونه کنترل در جهت جاذبه روی دیواره سلول رسوب یافتند. تعداد میتوکندری و شکل آن در تیمارها متغیر بود. شبکه آندوپلاسمی در تیمار ۱۰ روز حجم‌تر و بلندتر از شاهد مشاهده شد. واکوئل تحت تاثیر میکروگراویتی حجیم‌تر شد. میزان فنل کل، فلاونوئید و فعالیت مهار رادیکال DPPH تحت تیمار میکروگراویتی نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد ( $P < 0.05$ ). بنظر می‌رسد تغییرات سلولی و متابولیسم ثانوی القا شده تحت میکروگراویتی در ارتباط با ایجاد تنش اکسیداتیو باشد.

**کلیدواژه‌ها:** میکروگراویتی، بذرالبنج، میکروسکپ الکترونی، اندامک‌ها.

### مقدمه

(گراویتروپسم) تعیین می‌گردد [۱]. جاذبه طول ریشه، ساقه، اندام‌های جانبی و ثانویه را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۲]. سازماندهی ساختار و عملکرد اندامک‌ها، متابولیسم سلولی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز تحت تاثیر جاذبه قرار می‌گیرند [۳].

گیاهان توانایی پاسخ به تغییرات محیطی را دارند. در بین فاکتورهای محیطی که رشد و نمو گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد جاذبه در سرتاسر تاریخچه‌ی حیات در زمین حضور داشته است. جهت رشد ریشه و ساقه در گیاهان براساس جهت جاذبه

سلول‌های گیاهی که حتی برای درک جاذبه اختصاصی نشده‌اند، نیز به جاذبه حساس هستند [۴].

تنش میکروگروایتی می‌تواند روی رشد و نمو موجودات زنده تأثیر بگذارد. در روی زمین، شتاب جاذبه ۱g بر موجودات زنده اعمال می‌شود و موجودات زنده در شرایط ۱g تکوین یافتند اما در فضا شتاب جاذبه صفر است. ناسا در بسیاری از کشورهای اروپایی بیش از نیم قرن تأثیر شرایط فضا از جمله میکروگروایتی، تشعشعات، ارتعاشات، میدان‌های مغناطیسی و سایر تنش‌ها را بر روی موجودات زنده بررسی می‌کنند و به دنبال توسعه‌ی دانش زیست‌شناسی، توسعه‌ی تکنولوژی و استفاده از این تحقیقات برای کاربردهای زمینی و حل مشکلات بشر در زمینه‌های زیستی از طریق تحقیقات فضایی می‌باشد. برای اعمال میکروگروایتی در فضا از تسهیلات پروازی نظیر کاوشگرها، سفینه‌های فضایی، ماهواره‌های زیستی و ایستگاه بین‌المللی فضایی استفاده می‌گردد [۵].

با توجه به اینکه تحقیقات فضایی هزینه بسیار بالای دارند، برای مطالعات زمینی از دستگاهی به نام کلینواست (Clinostat) برای اعمال میکروگروایتی استفاده می‌گردد. این دستگاه دارای انواع یک بعدی، دو بعدی و سه بعدی می‌باشد و با چرخش آرام نمونه، اثر جاذبه را خنثی می‌نماید. معمولاً برای تحقیقات گیاهی سرعت چرخش ۱-۳ دور بر دقیقه و در کار سلول‌های جانوری از ۳۰-۲۰ دور بر دقیقه استفاده می‌شود [۲].

گیاه بذرالبنج (*H. niger*) یک گیاه دارویی متعلق به خانواده سیب‌زمینی است. در سراسر اروپا، آسیا و شمال آمریکا پراکنش دارد [۶]. دارای خواص ضد التهابی، ضد درد و تب می‌باشد [۷، ۸]. متابولیت‌های ثانویه در این گیاه حاوی ترکیبات آلکالوئیدی و غیر آلکالوئیدی است. ترکیبات غیر آلکالوئیدی نظیر ویتانولوئیدها، فنل‌ها، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، گلیکوزیدها، گلیسریدها، لیگنان‌ها و کومارینولیکان‌ها می‌باشد [۶، ۹]. خواص دارویی گیاه بذرالبنج به دلیل حضور ترکیبات آلکالوئیدی و غیر آلکالوئیدی است [۶]. ترکیبات فنلی سیستم‌های دفاعی فعال برای مهار آنتی‌بیوتیک‌های سوپر اکسید، هیدروکسیل، رادیکال پراکسیل و اکسیژن منفرد هستند و در واکنش پراکسید آسکوربات با فنل موجب کاهش  $H_2O_2$  می‌گردند [۱۰]. علاوه بر آن به‌عنوان عامل شلاته‌کننده فلز، مانع تغییر یون‌های فلزی (به‌خصوص

آهن) در واکنش‌های تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن طی واکنش فنتون می‌شوند [۱۱]. رادیکال‌های فعال اکسیژن معمولاً متابولیسم‌های سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهند [۱۲]. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اولین سیستم دفاعی در مقابل تولید ROS هستند، اما با کمک سیستم‌های مهار دیگر نیز عمل این آنزیم‌ها کامل می‌گردد. مطالعات نشان داد با کم شدن فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، می‌تواند میزان متابولیت‌های ثانویه را القا کند. با افزایش تنش‌های زیستی بیان ژن‌های بیوستنز فلاونول‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد. با توجه به این‌که تنش‌ها منجر به تولید ROS می‌شوند؛ از طرفی این متابولیت‌های آنتی‌اکسیدانی، مهار ROS را انجام داده و هم‌چنین می‌توانند مانع تولید ROS شوند [۱۳]. فلاونوئیدها از جمله این متابولیت‌های ثانویه، نقش مهمی در حفاظت از گیاه در برابر رادیکال‌های فعال اکسیژن دارند زیرا قادر به مهار این رادیکال‌ها هستند [۱۴].

در ارتباط با تأثیر میکروگروایتی بر دانه‌رست بذرالبنج تاکنون تحقیق صورت نگرفته است. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر میکروگروایتی بر رشد و نمو گیاه می‌باشد. علاوه بر مطالعات فراساختاری با کمک میکروسکپ الکترونی، میزان ترکیبات فنل، فلاونوئید و فعالیت مهار رادیکال DPPH دانه‌رست‌های بذرالبنج نیز مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها:

### کشت گیاه بذرالبنج و اعمال تیمار میکروگروایتی

بذرهای گیاه بذرالبنج (*Hyoscyamus niger* L.) از مراغه (استان آذربایجان شرقی) در طبیعت جمع‌آوری شد. سپس در دمای  $4^{\circ}C$  نگهداری شد. جهت ضدعفونی ابتدا بذرها به مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم قرار داده شد. پس از شست‌وشو به مدت ۱-۲ دقیقه با اتانول ۷۰٪ ضدعفونی گردید. در پایان بذرها به مدت ۷ دقیقه در اسیدسولفوریک ۱۰٪ قرار داده شد و سپس چندین بار با آب مقطر استریل شست‌وشو شد. بذرها در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ [۱۵] کشت شده، در شرایط آزمایشگاهی به مدت ۳، ۷ و ۱۰ روز تحت تیمار میکروگروایتی قرار گرفت. سپس دانه‌رست‌ها جهت آنالیزهای سلولی و بیوشیمیایی برداشت شدند.

### مشخصات دستگاه کلینواست

بذرها در مرکز پتری دیش (به شعاع ۳ سانتی متر از مرکز) روی کلینواست دوبعدی قرار داده شد. دستگاه کلینواست از شرکت پایا کشت برای انجام آزمایش استفاده شد [۱۶]. دستگاه با سرعت چرخش ۲ rmp (ω)، در جهت عقربه‌های ساعت در ۹۰° به مدت ۱۰ روز گردش داشت. نیروی گریز از مرکز (g') با معادله  $g' = (2\pi/60)^2 r\omega^2$  محاسبه می‌شود. سرعت گریز از مرکز از صفر مرکز تا  $g = 10 \times 6/7$  در لبه‌ی حلقه‌ی بذر محاسبه شد [۱۷]. در هر با آزمایش سه پتری روی دستگاه کلینواست قرار داده شد و سه پتری دیگر به صورت عمودی به‌عنوان نمونه شاهد، تحت همان شرایط روی زمین  $g=1$  تحت شرایط دمایی  $25 \pm 2^\circ C$  و رطوبت ۵۷٪ گذاشته شد.

### بررسی شاخص‌های رشد

شاخص‌های رشد شامل طول ریشه‌چه، طول هیپوکوتیل، وزن تر و وزن خشک دانه‌رست اندازه‌گیری گردید.

### آماده‌سازی نمونه‌ها برای میکروسکپ الکترونی TEM

۱ سانتیمتر نوک ریشه‌چه داخل فیکساتیو قرار گرفت. فیکساتیو جهت میکروسکپ الکترونی شامل: ۰/۵ میلی‌لیتر گلوتارآلدنید ۳٪، ۲ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار (pH ۷) بود. ۲۴ ساعت پس از تثبیت نمونه‌ها، ۵ سی‌سی بافر فسفات به آن اضافه شد [۱۸]. پس از شست و شو با بافر فسفات و اسمیوم نمونه‌ها با اتانول (۳۰ تا ۱۰۰) آب‌گیری گردید. پس از قرار دادن در پروپیلن اکساید به عنوان حلال انتقالی با کمک رزین قالب‌گیری صورت گرفت. سپس نمونه‌ها برش‌گیری شده و با اورانیل استات (UA) و لید سترات (LC) رنگ آمیزی گردید [۱۹]. در پایان نمونه‌ها زیر میکروسکپ بررسی و عکسبرداری شد.

### سنجش محتوای فنلی گیاه بذربانج

اندازه‌گیری محتوای فنلی گیاه براساس روش فولین - سیوکالتیو و برحسب اسید گالیک انجام شد. بدین صورت که به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره گیاه، ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲ درصد، ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتیو

اضافه شد. پس از گذشت نیم ساعت جذب در طول موج ۷۲۰ نانومتر ثبت گردید. گالیک اسید به عنوان استاندارد برای رسم منحنی استاندارد به کار رفت. محتوی فنل کل عصاره‌ها براساس میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم وزن خشک گیاه گزارش شد [۲۰].

### سنجش محتوای فلاونوئیدی گیاه بذربانج

جهت اندازه‌گیری میزان فلاونوئید از روتین به عنوان ترکیب مرجع استفاده شد و در آن از روش رنگ سنجی آلومینیوم کلراید با روش استاندارد جهت اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل بهره گرفته شد. ابتدا محلولهای استاندارد با غلظتهای ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۰۷، ۰/۱، و ۰/۲ از محلول روتین در متانول تهیه و منحنی استاندارد مربوطه رسم گردید. سپس یک میلی‌لیتر از محلول عصاره متانولی با یک میلی‌لیتر محلول آلومینیوم کلراید ۱٪ و یک میلی‌لیتر سدیم استات یک مولار در لوله آزمایش مخلوط شد. پس از گذشت یک ساعت در تاریکی و در دمای اتاق در طول موج ۴۱۵ نانومتر جذب نمونه خوانده شد. غلظت فلاونوئیدها بر حسب میلی‌گرم روتین در گرم وزن خشک گزارش شد [۲۱].

### فعالیت مهار رادیکال DPPH

یکی از روش‌های متداول برای تعیین مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره، روش DPPH است که در این روش حجم‌های مختلف از عصاره (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرولیتر) از هر تیمار برداشته و با حجم‌های مختلف متانول و DPPH ترکیب شد (از عصاره متانولی و نیز آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد استفاده شد). پس از گذشت ۳۰ دقیقه در ۵۱۷ نانومتر جذب آن خوانده شد. در نهایت درصد مهار رادیکال DPPH در عصاره با فرمول زیر محاسبه گردید

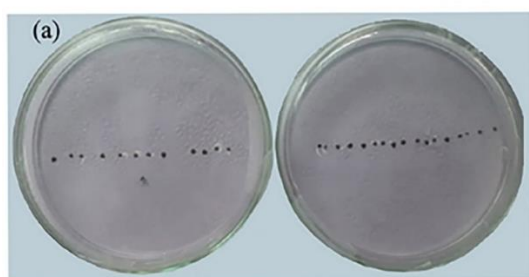
$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد} = (Ac - As) / Ac \times 100$$

در این رابطه Ac و As به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه هستند [۲۲]. میزان  $IC_{50}$  به عنوان ۵۰ درصد بازدارندگی DPPH تعیین شد [۲۳].

### آنالیز فراساختار تشریحی

### بررسی فراساختار تشریحی ریشه‌چه با استفاده از میکروسکپ الکترونی TEM

همانطوری که در شکل ملاحظه می‌شود در نمونه شاهد ۳ روز، دانه‌های نشاسته در جهت جاذبه، روی غشا سلول رسوب کرده‌اند اما در تیمار میکروگروایتی ۳ روز دانه‌های نشاسته درشت‌تر بوده و در کل سلول پراکنده بودند (شکل ۳d-۳a).



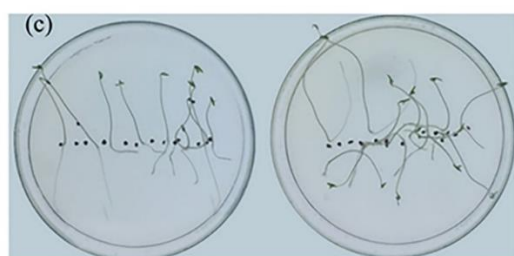
شاهد ۳ روز

تیمار میکروگروایتی ۳ روز



شاهد ۷ روز

تیمار میکروگروایتی ۷ روز



شاهد ۱۰ روز

تیمار میکروگروایتی ۱۰ روز

شکل ۲. رشد دانه‌رست‌های بذرالبنج تحت تیمار میکروگروایتی ۳، ۷ و ۱۰ روز در محیط کشت MS. (a) تیمار ۳ روز میکروگروایتی و شاهد، (b) تیمار ۷ روز میکروگروایتی و شاهد، (c) تیمار ۱۰ روز میکروگروایتی و شاهد

در بررسی سلول‌های ۷ روزه با میکروسکپ TEM تفاوت زیادی در شکل شبکه آندوپلاسمی بین شاهد و تیمار میکروگروایتی مشاهده نشد. تعداد میتوکندری در تیمار میکروگروایتی افزایش یافت. به طوریکه در سلول‌های شاهد تعداد میتوکندری میانگین ۶ عدد و اندازه هر میتوکندری به طور

پس از عکسبرداری از نمونه‌های برش TEM، سلول و اندامک‌ها دقیق بررسی و با نرم افزار دیجی‌مایزر اندازه‌گیری شد.

### بررسی آماری

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار Graphpad prism 9 انجام شد و با استفاده از آنالیز واریانس ANOVA و مقایسه میانگین‌ها با آزمون ONE-WAY ANOVA در سطح احتمال ۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نمودارها با استفاده از گراف پد رسم شدند.

### نتایج:

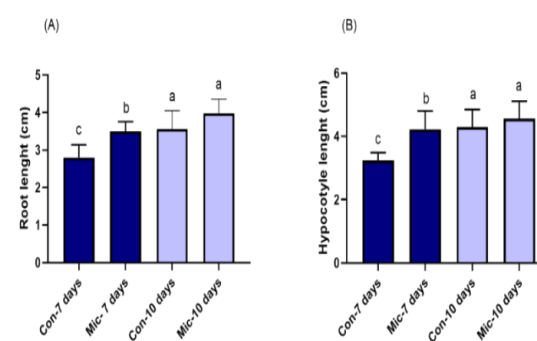
#### طول ریشه‌چه و هیپوکوتیل دانه‌رست‌ها:

تیمار میکروگروایتی در روز هفتم به طور معنی‌داری طول ریشه‌چه و هیپوکوتیل را افزایش داده است. اما در روز ۱۰ ام اختلاف معنی‌داری با شاهد مشاهده نشد ( $P < 0.05$ ) (شکل ۱).

همانطور که در شکل ۲ مشاهده شد در نمونه شاهد ریشه‌چه به سمت پایین و هیپوکوتیل به سمت بالا رشد یافتند. درحالی‌که در نمونه تیمار ریشه‌چه و هیپوکوتیل بدون هیچ‌نظمی در جهات مختلف رشد داشتند (شکل ۲).

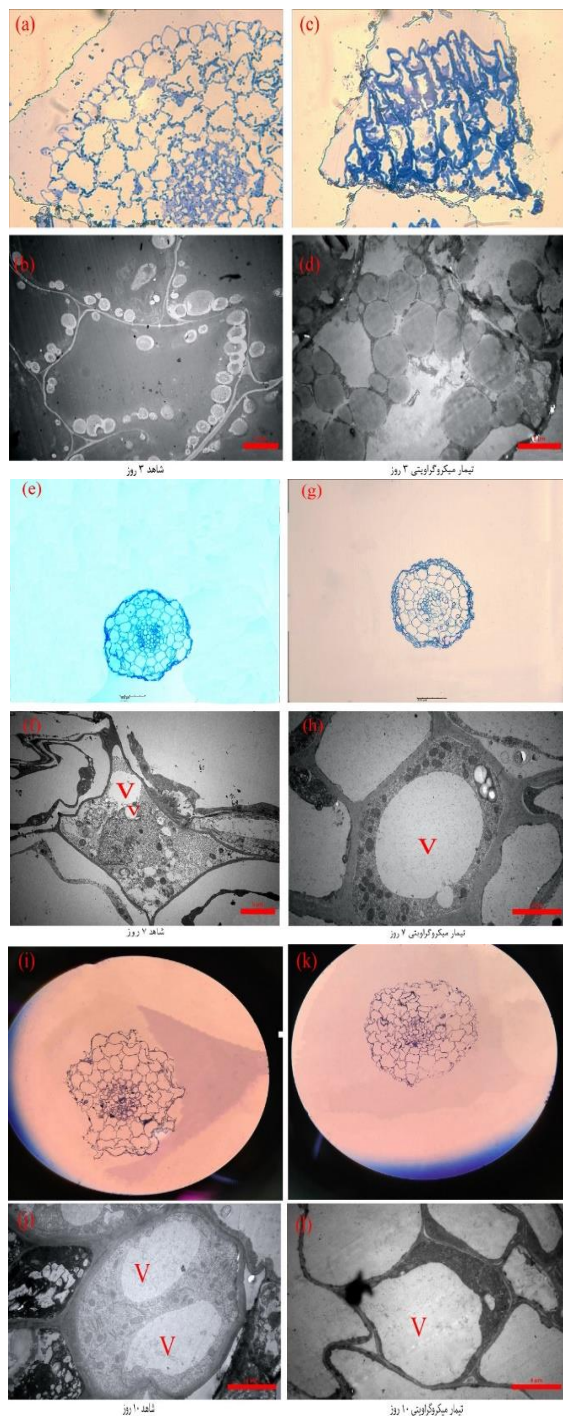
#### وزن تر و خشک دانه‌رست

در وزن تر و خشک اختلاف معنی‌داری بین شاهد و تیمار مشاهده نشد. ( $P < 0.05$ ).



شکل ۱. طول ریشه‌چه و هیپوکوتیل در تیمار ۷ و ۱۰ روز میکروگروایتی. (A) طول ریشه‌چه در تیمار ۳، ۷ و ۱۰ روز میکروگروایتی؛ (B) طول هیپوکوتیل در تیمار ۳، ۷ و ۱۰ روز میکروگروایتی؛ داده‌ها به صورت  $\text{mean} \pm \text{SD}$  در حداقل ۵ تکرار نشان داده شد ( $P \text{ value} < 0.05$ ).

بررسی تاثیر میکروگراویتی بر میزان مهار رادیکال DPPH نشان داد تیمار میکروگراویتی در روزهای ۳ و ۷ روز نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری با کنترل داشت اما نسبت به هم تفاوت معنی‌داری نداشتند. در روز ۱۰ ام نیز میزان مهار رادیکال DPPH نسبت به کنترل و تیمار ۳ و ۷ روز افزایش یافت ( $P < 0.05$ ) (شکل ۴c).



متوسط  $0.185$  میکرومتر اندازه‌گیری شد. اما تعداد میتوکندری به طور میانگین در تیمار میکروگراویتی ۲۱ عدد و میانگین اندازه هر میتوکندری  $0.642$  میکرومتر مشاهده شد (شکل ۳f و ۳h). اندازه هسته در شاهد حدودا  $6/889$  میکرومتر و در تیمار میکروگراویتی  $4/022$  میکرومتر مشاهده شد. اندازه هسته در تیمار ۷ روز کوچک‌تر شد. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود واکوئل‌ها در شاهد کوچک بوده و در تمام سلول پراکنده هستند اما در تیمار میکروگراویتی ۷ روز سلول حاوی یک واکوئل بزرگ مرکزی است (شکل ۳f و ۳h).

بررسی میکروسکوپی سلول‌های ۱۰ روز تحت میکروگراویتی و شاهد نشان داد که در نمونه شاهد شبکه آندوپلاسمی کوتاه و نازک است اما در سلول‌های تحت تیمار میکروگراویتی شبکه آندوپلاسمی قطور و بلندتر دیده شدند (شکل ۳p و ۳o). تعداد میتوکندری‌ها در شاهد ۱۰ روزه میانگین ۱۷ عدد و اندازه هر میتوکندری به طور میانگین  $0.591$  میکرومتر اندازه‌گیری شد در صورتی که در تیمار میکروگراویتی در حدود ۱۰ عدد میتوکندری و اندازه هر میتوکندری به متوسط  $0.67$  میکرومتر بود. در تیمار ۱۰ روز شکل و اندازه میتوکندری متفاوت مشاهده شد (شکل ۳j و ۳l). در نمونه تیمار چون واکوئل بزرگ‌تر هستند اندامک‌های سلولی از جمله شبکه آندوپلاسمی و میتوکندری به کناره‌های سلول رانده شدند (شکل ۳j و ۳l).

#### تعیین میزان فلاونوئید، فنل کل و DPPH از دانه‌رست‌ها

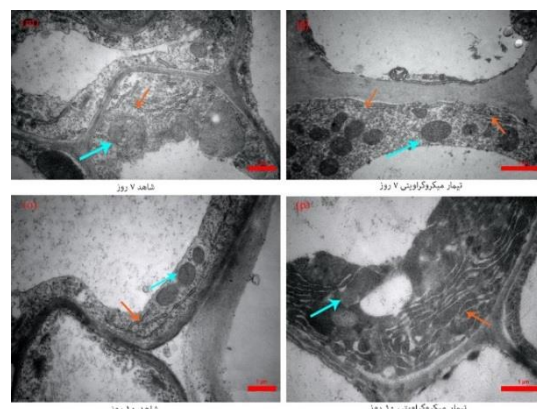
بررسی تاثیر میکروگراویتی بر میزان فلاونوئید در دانه‌رست‌های گیاه *H. niger* نشان داد میزان فلاونوئید در تیمار ۳، ۷ و ۱۰ روز نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری یافت. در روز ۷ ام بیشترین افزایش نسبت به شاهد مشاهده شد. بعد از ۱۰ روز میزان فلاونوئید نسبت به ۷ روز کاهش نشان داد. بین تیمار ۱۰ و ۳ روز تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ( $p < 0.05$ ) (شکل ۴a).

میزان فنل کل تحت تیمارهای میکروگراویتی (۳، ۷ و ۱۰ روز) نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری یافت. البته در تیمارهای ۳ و ۷ روز نسبت به هم تفاوت معنی‌داری در میزان فنل مشاهده نشد اما نسبت به شاهد افزایش نشان داد ( $p < 0.05$ ) (شکل ۴b).

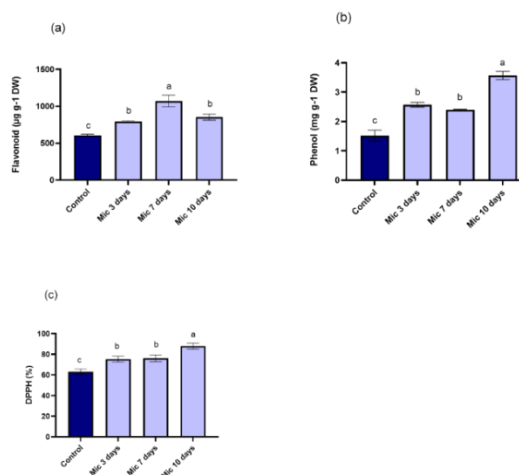
## بحث

آزمایشات در فضا نشان می‌دهد گیاهان در میکروگروایتی واقعی چرخه‌ی زندگی خود را کامل می‌کنند بدون اینکه آسیب جدی به زنده‌مانی گیاه وارد شود اما در شکل و اندام گیاه تغییر زیادی ایجاد می‌گردد [۲۴]. بررسی همه جانبه‌ی نمو ریشه آراییدوپسیس نشان داد ریشه‌های اولیه‌ی گیاه در کلینواست دو بعدی و سه بعدی رشد بیشتری نسبت به نمونه‌های شاهد داشتند [۲۵]. این نتایج توسط محققین دیگر نیز اثبات شده است [۲۶]. اگر چه در همه‌ی آزمایشات گزارش نشد. تغییر مشاهده شده در کل ریشه پدیده‌ی اتومورفوزنیز را نشان می‌دهد، که مسئول اندازه‌ها و شکل‌های جدیدی است که در گیاهان رشد یافته در فضا یا در میکروگروایتی شبیه‌سازی شده ظاهر می‌شود. که در این شرایط طول ریشه افزایش یافته و رشد عرضی در اندام‌ها متوقف می‌گردد [۲۷]. در این تحقیق تیمار میکروگروایتی در روز هفتم به طور معنی‌داری طول ریشه‌چه و هیپوکوتیل را افزایش داده است. جهت رشد ریشه در ریشه‌های آراییدوپسیس تالیانا تحت تیمار کلینواست دو بعدی انحراف قابل ملاحظه‌ای نسبت به شاهد ۱g یافت [۲۸]. در نتیجه گروایتروپسیس ریشه در جهت جاذبه و هیپوکوتیل بر خلاف جهت جاذبه رشد می‌یابد. درحالی‌که در تیمار میکروگروایتی به دلیل تغییر جهت جاذبه، آشفستگی در رشد هیپوکوتیل و ریشه‌چه ایجاد شد (شکل ۲).

در ریشه آراییدوپسیس، حجم هسته سلول‌های مرستمی تحت بی‌وزنی واقعی کوچکتر بود [۲۶]. و پیشنهاد شد که می‌تواند به دلیل سطح پایین سنتز ریبوزوم سلول تحت میکروگروایتی، سرعت بیشتر چرخه سلولی و کوتاه شدن فازها باشد [۲۹]. هم‌چنین سطح پروتئین‌های مهم پردازش tRNA، فیری شدن، مقدار همولوگ NOPA64 هسته‌ای و تراکم اجزای فیری نیز در سلول‌های مرستمی کاهش یافت. این تغییرات بیانگر کاهش فعالیت هسته است [۱]. این نتایج با داده‌های مشاهده شده از آزمایشات پرواز فضایی با آراییدوپسیس مطابقت دارد که در آن کاهش فعالیت هسته در ارتباط با تغییر سرعت تکثیر سلولی بود [۲۹]. در مطالعات حاضر اندازه‌گیری هسته با استفاده از نرم افزار دیجی‌مایزر نشان داد در تیمار ۷ روز اندازه هسته نسبت به شاهد کوچکتر شد که بررسی‌های قبلی را تایید می‌کند.



شکل ۳. فراساختار تشریحی دانه‌رست‌های بذرالبنج با استفاده از میکروسکپ TEM. تیمار ۳ روز و شاهد، (a-d). تیمار ۷ روز و شاهد، (e-h). تیمار ۱۰ روز و شاهد، (i-l). فلش نارنجی شبکه آندوپلاسمی و فلش آبی میتوکندری را در دو تیمار ۷ و ۱۰ روز نشان می‌دهد. (a) برش نیمه نازک شاهد ۳ روز، (b) شاهد ۳ روز زیر میکروسکپ الکترونی، (c) برش نیمه نازک تیمار میکروگروایتی ۳ روز، (d) تیمار میکروگروایتی ۳ روز زیر میکروسکپ الکترونی، (e) برش نیمه نازک شاهد ۷ روز، (f) سلول از آوند چوب نمونه شاهد ۷ روز زیر میکروسکپ الکترونی، (g) برش نیمه نازک تیمار میکروگروایتی ۷ روز، (h) سلول از آوند چوب نمونه تیمار میکروگروایتی ۷ روز زیر میکروسکپ الکترونی، (i) برش نیمه نازک شاهد ۱۰ روز، (j) سلول از آوند درم نمونه شاهد ۱۰ روز زیر میکروسکپ الکترونی، (k) برش نیمه نازک تیمار میکروگروایتی ۱۰ روز، (l) سلول از آوند درم نمونه تیمار میکروگروایتی ۱۰ روز زیر میکروسکپ الکترونی، (m) شاهد ۷ روز، (n) تیمار میکروگروایتی ۷ روز، (o) شاهد ۱۰ روز، (p) تیمار ۱۰ روز.



شکل ۴. میزان فلاونوئید (a)، فنل کل (b) و مهار رادیکال DPPH (c) تحت تأثیر تیمار میکروگروایتی در دانه‌رست‌های گیاه بذرالبنج. داده‌ها به صورت mean  $\pm$  SD در حداقل سه تکرار نشان داده شد ( $P$  value < 0.05).

زمانی که سلول‌های تنباکو در معرض کلینواستت قرار می‌گیرند میزان نارینجین، کاتشین و روتین در مقایسه با کنترل افزایش می‌یابد. بنابراین میکروگراویتی می‌تواند مهار رادیکال‌ها را افزایش دهد [۱۲]. نتایج ما در مورد اثر میکروگراویتی بر میزان فنل کل نشان داد که تحت تیمارهای میکروگراویتی ۳، ۷ و ۱۰ روز نسبت به شاهد میزان فنل کل افزایش یافت فلاونوئیدها نقش مهمی در حفاظت از گیاه در برابر رادیکال‌های فعال اکسیژن دارند زیرا قادر به مهار این رادیکال‌ها هستند [۱۴]. در این مطالعه تحت تیمار میکروگراویتی در ۳، ۷ و ۱۰ روز میزان فلاونوئید افزایش یافت. با افزایش رادیکال‌های فعال اکسیژن تحت تیمار میکروگراویتی میزان فلاونوئید افزایش یافته تا میزان اضافی ROS جاروب شود. بررسی تاثیر میکروگراویتی بر میزان مهار رادیکال DPPH نشان داد تیمار میکروگراویتی نسبت به کنترل موجب افزایش فعالیت مهار رادیکال DPPH شد ( $P < 0.05$ ). افزایش محتوای متابولیت‌های آنتی‌اکسیدانی می‌تواند در ارتباط با تاثیر تنش اکسیداتیو ایجاد شده تحت میکروگراویتی باشد [۳۶].

بررسی اثر میکروگراویتی بر فعالیت آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانوی نیاز به بررسی در آینده دارد.

#### منابع:

- [1] Baldwin KL, Strohm AK, Masson PH. Gravity Sensing and signal Transduction in Vascular Plant Primary Roots. *Am. J. Bot.*, 2013; 100(1): 126-142.
- [2] Millar K, Johnson C, Edelmann R, Kiss J. An Endogenous Growth Pattern of Roots is Revealed in Seedlings Grown in Microgravity. *Astrobiology*, 2011; 11(8): 787-797.
- [3] Claassen D, Spooner B. Impact of Altered Gravity on Aspects of Cell Biology. *Int. Rev. Cytol.*, 1994; 156: 301-373.
- [4] Kordyum EL, Chapman DK. Plants and Microgravity: Patterns of Microgravity Effects at the Cellular and Molecular Levels. *Cytology and Genetics*, 2017; 51(2):108-116.
- [5] Smith MS, China's Space Program: An Overview, Library of Congressional Research Service, 2005.
- [6] Begum AS. Bioactive Non-Alkaloidal Secondary Metabolites of Linn. Seeds: A

اثر کلینوروتیشن بر فراساختار میتوکندری در سلول‌های مرستمی و ناحیه طویل شدن سلول‌های ریشه اتبوله ۵ روزه نخود نشان داد که اندازه میتوکندری تحت میکروگراویتی نسبت به کنترل کاهش یافت و حجم ماتریکس و کریستا افزایش نشان داد [۳۱]. جمعیت میتوکندریایی در سلول‌های مرستم ریشه گیاهچه‌های ۳ روزه نخود پلی‌مورفیک است. شکل و اندازه میتوکندری خیلی متفاوت است. میتوکندری عمدتاً تخم مرغی یا گرد هستند گاهی اوقات به شکل کشیده و منشعب دیده می‌شوند. تغییرات اساسی در فراساختار میتوکندری در سلول‌های مرستمی ریشه تحت میکروگراویتی در مقایسه با شاهد دیده نشده است [۳۱]. در این تحقیق تنوع در شکل میتوکندری سلول‌های تحت میکروگراویتی ملاحظه شد. تعداد میتوکندری در تیمار ۷ روز نسبت به شاهد افزایش و اندازه آن کاهش نشان داد اما در تیمار ۱۰ روز تعداد کاهش و اندازه افزایش یافت. بررسی اثر میکروگراویتی شبیه‌سازی شده بر تشکیل شبکه آندوپلاسمی در راس ریشه آرابیدوپسیس نشان داد، اندازه اجسام شبکه آندوپلاسمی تحت میکروگراویتی افزایش می‌یابد. شکل شبکه آندوپلاسمی نیز تغییر یافت که تغییرات در ارتباط با مدت زمان اعمال میکروگراویتی بود [۳۲]. در این مطالعه شکل شبکه آندوپلاسمی در تیمار ۷ روز نسبت شاهد تغییر نکرد اما در تیمار ۱۰ روز نسبت به شاهد شبکه آندوپلاسمی حجیم‌تر و بلندتر مشاهده شد که تحقیقات گذشته را اثبات کرده است. مطالعات نشان داد تیمار میکروگراویتی موجب افزایش حجم واکوئل در سلول‌های مشخصی شده است [۳۳، ۳۴] در این تحقیق حجم واکوئل در تیمار ۷ و ۱۰ روز نسبت به شاهد افزایش نشان داد.

بررسی‌ها نشان داد افزایش متابولیسم‌ها تحت میکروگراویتی به دلیل افزایش ROS است در نتیجه میزان آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی در سلول افزایش می‌یابد. ترکیبات فنلی متابولیت‌های ثانویه هستند که به صورت طبیعی در گیاهان یافت می‌شوند. گروه‌های هیدروکسیل در این ترکیبات می‌توانند هیدروژن را به اکسیژن و نیترژن رادیکال منتقل کنند و به تولید واکنش زنجیره‌ای رادیکال پایان دهند [۳۵]. مطالعات سلیمانی و همکاران بر روی سلول‌های تنباکو نشان داد تحت تاثیر میکروگراویتی ترکیبات فنلی آنتی‌اکسیدانی نظیر نارینجین، روتین و کاتشین با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها بالا می‌رود.

- Review. Res. J. Seed Sci., 2010; 3(4): 210-217.
- [7] Begum S, et al. Study of Anti-Inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activities of Seeds of *Hyoscyamus Niger* and Isolation of a New Coumarinolignan. *Fitoterapia*, 2010; 81(3): 178-184.
- [8] Sengupa T, et al. Antiparkinsonian Effects of Aqueous Methanolic Extract of *Hyoscyamus Niger* seeds result from its Monoamine Oxidase Inhibitory and Hydroxyle Radical Scavenging Potency. *Neurochem. Res.*, 2011; 36(1): 177-186.
- [9] Bahmanzadegan JA, Sefidkon F, Sonboli A. Determination of *Hyoscyamus* and *Scopolamine* in Four *Hyoscyamus* species from Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research(IJPR)*, 2009; 8: 65-70.
- [10] Ducic T, Maksimovic V, Raditic K. Oxalate Oxidase and Non-Enzymatic Compounds of the Antioxidative System in Young Serbian Spruce Plants Exposed to Cadmium Stress. *Arch. Biol. Sci.*, 2008; 60(1): 67-76.
- [11] Aboul- Enein HY, et al. Effects of Phenolic Compounds on Reactive Oxygen Species. *Biomolecules*, 2007; 86(3): 222-230.
- [12] Soleimani M, Ghanati F, Hajebrahimi Z. The Role of Phenolic Compounds in Growth Improvement of Cultured Tobacco Cell After Exposure to 2-D Clinorotation. *Iran J. Plant Physiol.*, 2019; 9(4): 2921- 2929.
- [13] Agati G, Tattini M. Multiple Functional Roles of Flavonoids in Photoprotection. *New Phytol.*, 2010; 186(4): 786-793.
- [14] Das K, Roychoudhury A, Reactive Oxygen Species (ROS) and Response of Antioxidants as ROS-Scavengers During Environmental Stress in Plants. *Front. Environ. Sci.*, 2014; 2:53.
- [15] Classic Murashige T, Skoog F. A Revised Medium for Rapid growth and Bioassay with *Tobacco* Tissue Cultures. *Physiol. Plant*, 1962; 15:473-497.
- [16] Hassanpour H, Ghanbarzade M. Induction of Cell Division and Antioxidative Enzyme Activity of *Matricaria Chamomilla* L. Cell Line under Clino-Rotation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2021; p: 1-10.
- [17] Krauss H, Bostian C, Raab F, Teacher's Guide to Plant Experiments in Microgravity, New York: United Nation, 2013.
- [18] Jauneau A, Cabin-Flaman A, Morvan C, Pariot C, Ripoll C, Theillier M. Polysaccharide Distribution in the Cellular Junctions of Immature Fibre Cells of Flax Seedlings. *Histochem. J.*, 1994; 26(3): 226-232.
- [19] Summer MJ. Epoxy Resins for Light and Transmission Electron Microscopy, in *Plant Microtechniques and Protocols*, 2015; Springer. P: 83-101.
- [20] Conde E, Cadahia E, Garcia- Vallejo. HPLC Analysis of Flavonoids and Phenolic Acid and Aldehydes In *Eucalyptus* spp. *Chromatographia*. 1995; 41(11): 657-660.
- [21] Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *J. Food Drug Anal.*, 2002; 10(3).
- [22] Shimada K, Fujikava K, Nakamura Y, Nakamura T. Antioxidative Properties of Xanthan on the Autoxidation of Soybean Oil in Cyclodextrin Emulsion. *J. Agric. Food Chem.*, 1992; 40(6): 945-948.
- [23] Von Sonntag C, Free Radical Reactions of Carbohydrates as Studied by Radiation Techniques, in *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 1980, Elsevier, 7-77.
- [24] Link BM, Busse JS, Stankovic B. Seed-to-Seed growth and Development of *Arabidopsis* in Microgravity. *Astrobiology*, 2014. 14(10): 866-875.
- [25] Boucheron-Dubuisson E, et al. Functional Alterations of Root Meristematic Cell of *Arabidopsis Thaliana* Induced by A Simulated Microgravity. *Environment. J. Plant Physiol.*, 2016. 207: 30-41.
- [26] Matia I, et al. Plant Cell Proliferation and Growth are Altered by Microgravity Conditions in Spaceflight. *J. Plant Physiol.*, 2010. 167(3): 184- 193.
- [27] Hoson T. Plant Growth and Morphogenesis under Different Gravity Conditions. *Relevance to Plant Life in Space Life.*, 2014. 4(2): 205-216.
- [28] Pozhvanov GE, Sharova E, Medvedev S. Microgravity Modelling by Two-Axial



- Clinorotation Leads to Scattered Organisation of Cytoskeleton in Arabidopsis Seedlings. *Funct Plant Biol.*, 2021. 48(10): 1062-1073.
- [29] Medina FJ, Herranz R. Microgravity Environment Uncouples Cell Growth and Cell Proliferation in Root Meristematic Cell: the Mediator Role of Auxin Plant Signal. *Behave.*, 2010. 5(2): 176-179.
- [30] Sobol M, et al. Clinorotation Influences rDNA and NopA100 Location in Nucleoli. *Adv. Space Res.*, 2005. 36(7): 1254-1262.
- [31] Bryov V. Clinorotation Affects the Ultrastructure of Pea Root Mitochondria. *Microgravity Sci. Technol.*, 2011. 23(2): 215-219.
- [32] Romanchuk S. Ultrastructure of the Statocytes and Cell of the Distal Elongation Zone of Arabidopsis Thaliana under the Conditions of Clinorotation. *Cytol. Genet.*, 2010. 44(6): 329-333.
- [33] Kordyum EL. Effect of Altered Gravity on Plant Cell Processes: Results of Recent Space and Clinostatic Experiments. *Adv. Space Res.*, 1994. 14(8): 77-85.
- [34] Laurinavicius R, et al. In Vitro Plant Cell Growth in Microgravity and on Clinostat. *Adv. Space Res.*, 1994. 14(8):87-96.
- [35] Michalak A. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Pol. J. Environ. Stud.*, 2006. 15(4).
- [36] Halimeh H. Antioxidant Metabolism and Oxidative Damage in Anthemis Gilanica Cell Line under Fast Clinorotation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2022: 1-11.

## Effect of Microgravity on growth, Ultrastructure, phenol, flavonoid and DPPH radical in Seedlings inhibition of *Hyoscyamus niger* L.

Pourhabibian R.<sup>1</sup>, Iranbakhsh A.<sup>1\*</sup>, Ebadi M.<sup>2</sup>, Hassanpour H.<sup>3</sup>, Hekmat A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.

<sup>2</sup> Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Semnan, Iran.

<sup>3</sup> Aerospace Research Institute, Ministry of Science Research and Technology, Tehran, Iran.

\* (Corresponding author): iranbakhsh@iau.ac.ir

DOI: 10.30495/jdb.2022.1964486.1323

<https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.4.10.4>

Received: July.2022

Accepted: September 2022

### Abstract

Microgravity is one of the environmental stresses in space that effects on the structure of cellular organelles and metabolites in plant. In the present research, the effect of microgravity in times 3, 7 and 10 days on root and hypocotyl growth rate, fresh and dry weight, cell and organelles ultrastructure with Transmission Electron microscope (TEM) and some antioxidative capacity (phenol, flavonoid and inhibition of DPPH radicals) were investigated in henbane (*Hyoscyamus niger* L.) seedling. The results showed that microgravity led to increase root and hypocotyle length as compared to control. Amydons were spread throughout the cell in microgravity treatment, while in control samples, they were deposited on the cell wall in the direction of gravity. Mitochondria were variable in shape and number. The endoplasmic reticulum in 10-day treatment was more voluminous and longer than the control. Also, the vacuole was observed more voluminous as compared to control. Total phenol, flavonoid, and inhibition of DPPH radicals increased significantly ( $P < 0.05$ ). It seems, cellular changes and secondary metabolism induced under microgravity are related to oxidative stress.

**Keywords:** Microgravity, *Hyoscyamus niger*, TEM, organelles.