فصلنامه

زیست شناسی تکوینی

سال هفتم، شماره ۳، تابستان ۱۳۹۴

بهینه‌سازی کشت سلولی و افزایش تولید برخی متابولیت‌های ثانویه دارویی تحت تاثیر امواج فراصوت در کشت سلولی فندق (*Corylus avellana* L.)

معصومه صفری، فائزه قناتی *

گروه علوم گیاهی دانشگاه تربیت مدرس

E-mail: ghangia@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۵/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۹

چکیده

فراصوت می‌تواند اثرات گوناگونی برسیستم‌های زنده بر جای گذارد. از مهم‌ترین این اثرات افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه دارویی در سیستم‌های کشت سلولی می‌باشد. امروزه تاکسان ها به عنوان یک دسته از متابولیت‌های ثانویه مهم دارویی در درمان بسیاری از سرطان ها شناخته شده اند.این ترکیبات دارویی ابتدا از گیاه سرخدار استخراج گردیدند. در تحقیق اخیر کشت سلولی گیاه فندق در محیط بهینه LS به عنوان منبع مناسب تولید تاکسان ها معرفی می‌شود. همچنین در این تحقیق سلول‌های جداکشت فندق در معرض امواج با توان خروجی ۴ mW/ cm^2 با فرکانس ثابت kHz ۲۹/۴۴ در زمان‌های متفاوت ۴، ۸، ۲۰ و۴۰ دقیقه قرار گرفتند. بر اساس نتایج بدست آمده امواج فراصوت با انرژی پایین در زمان‌های کوتاه تابش، باعث افزایش زیتوده و تاکسان‌های مورد مطالعه (تاکسول، باکاتین و ۱۰- داستیل باکاتین III) گردید. با توجه به افزایش قابل توجه میزان تاکسان‌های درون سلولی می توان گفت که امواج فراصوت با القای مسیرهای بیوسنتزی آنها باعث افزایش سنتز این ترکیبات در سلول‌های فندق گردیده است. افزایش میزان فعالیت آنزیم فنیل آمونیالیاز (ژن مرتبط با بیوسنتز تاکسان ها) تحت تاثیر فراصوت موید این فرض می باشد.

کلیدواژه‌ها: امواج فراصوت، باکاتین III ، تاکسول ،۱۰- داستیل باکاتین III ، فندق، فنیل آمونیالیاز

مقدمه

فراصوت (Ultrasound) به عنوان یک محرک فیزیکی شناخته می‌شود که می‌تواند سیستم‌های زنده را تحت تاثیر قراردهد. این امواج می‌توانند باعث تغییر ساختارها و چرخه‌های مختلف متابولیسمی شوند. استفاده از امواج فراصوت با انرژی بالا می‌تواند اثرات مخربی ازجمله تخریب غشا های سلول و مولکول‌های مهم زیستی مانند آنزیم‌ها و مولکولDNA داشته باشد. در حالیکه امواج با شدت و انرژی پایین می‌تواند اثرات مفیدی در این سیستم‌ها بر جای گذارد[۳]. مطالعات نشان داده است که استفاده از امواج با توان‌های کمتر از ۱۰۰ mW/cm^2 می‌تواند باعث افزایش سرعت ترمیم استخوان آسیب دیده شود که با تحریک فرایند استخوان‌سازی این عمل اتفاق می‌افتد [٦]. همچنین در سیستم‌های کشت سلولی گیاهی نیز افزایش رشد کالوس و همچنین افزایش رشد سلول‌ها

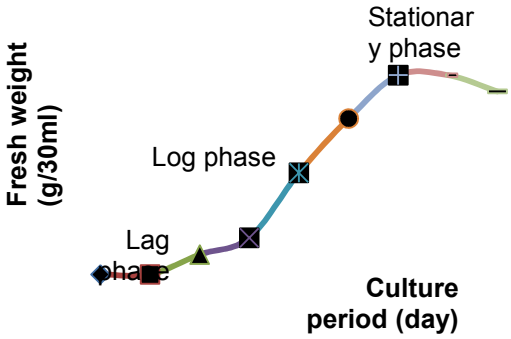
در سیستم کشت تعلیقی در برنج و هویج تحت تاثیر امواج فرا صوت با انرژی پایین گزارش شده است [۱و۱۰]. بر اساس این مطالعات می‌توان گفت اثرات امواج فراصوت بر سیستم‌های زنده از یک سو به نوع سلول و پاسخ آن به این محرک فیزیکی و از سوی دیگر به انرژی این امواج بستگی دارد. عقیده بر این است که اتفاقات هیدرودینامیک از قبیل جریانات گردابی و پدیده cavitation که بدنبال اثر فراصوت در محیط‌های مایع صورت می‌گیرد باعث باعث القای تغییرات در سلول‌ها می‌شود [۱۳] تاکسان ها به عنوان یک دسته از متابولیت‌های ثانویه مهم دارویی در درمان بسیاری از سرطان ها از جمله سرطان سینه و تخمدان شناخته شده‌اند [٤]. امروزه منبع اصلی تولید تاکسول گیاه سرخدار و به ویژه لاین‌های سلولی آن می‌باشد. با توجه به اینکه گیاه و همچنین لاین‌های سلولی گیاه سرخدار بسیار کند رشد می باشد، جایگزینی یک منبع جدید گیاهی با توان ایجاد لاین‌های سلولی با رشد بالا، و همچنین استفاده از ابزاری مناسب برای افزایش راندمان تولید سلول‌های جداکشت و متعاقبا تولید تاکسان‌ها می‌تواند بسیار ارزشمند باشد. تحقیقات اخیر نشان داده است که گیاه فندق و کشت سلولی آن نیز می‌تواند منبع جایگزین و مهمی برای تولید این ترکیبات می‌باشند [۱۲]. بنابر این بهینه سازی محیط کشت سلولی و افزایش رشد سلول‌ها و تولید تاکسان‌ها در کشت سلولی فندق از اهداف اصلی این تحقیق می‌باشد. بدین منظور انتخاب محیط‌کشت بهینه و تاثیر امواج فراصوت با توان‌های متفاوت و زمان‌های مختلف تابش، در محیط کشت تعلیقی بر برخی از پارامترهای فیزیولوژیک، مانند رشد سلول و تولید برخی تاکسان‌های مهم (تاکسول و باکاتین و داستیل باکاتین III) و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز PAL به عنوان یک آنزیم مهم در مسیرها ترارسانی پیام که منجر به تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و رو ش‌ها

انتخاب محیط بهینه برای رشد و نگهداری لاین سلولی موجود جهت انتخاب محیط بهینه، از لاین سلولی موجود که از بذرهای فندق رقم گرد اشکور در محیط MS با ترکیبات هورمونی (۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیترBA) بنیان گذاری شده بود استفاده گردید [۱۲]. این سلول‌ها سپس در چهار محیط با ترکیبات هورمونی متفاوت انتخاب گردید (جدول ۱). پس از نگهداری سلول‌ها در این محیط‌ها و چند بار واکشت آنها، وزن کالوس‌ها اندازه‌گیری شد و نتایج بدست آمده با هم مقایسه گردید. بر اساس نتایج بدست آمده، محیط LS به عنوان بهترین محیط انتخاب گردید. بعد از چند نسل واکشت در این محیط، کشت تعلیقی (با همان فرمول ولی فاقد آگار) بنیان‌گذاری شد. سلول ها در محیط کشت تعلیقی در دمای $^{\circ}C$ ۲۵ در تاریکی و بر روی شیکر با سرعت ۱۲۳ دور در دقیقه نگهداری شده و بعد از چندین واکشت، منحنی رشد سلول‌ها رسم گردید (شکل ۱). بر اساس منحنی رشد، سلول‌ها هر بار در روز هفتم (در اوایل فاز لگاریتمی رشد) واکشت گردیدند.

جدول ۱ محیط‌های کشت بکار گرفته شده با غلظت‌های متفاوت هورمونی

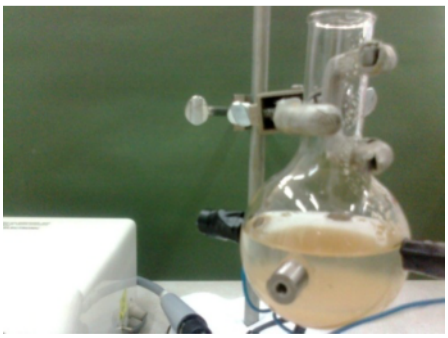
نام محیط	ترکیبات هورمونی
LS	IAA و NAA ۳ میلی‌گرم در لیتر+ Kinetin ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر
B5	BA و NAA ۰/۲۲ و ۱/۸٦ میلی گرم در لیتر
MS_1	2,4-D ۱ میلی‌گرم در لیتر و BA ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر
MS_2	BA ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر+ NAA ۳ میلی‌گرم در لیتر



شکل ۱- منحنی رشد سلول های فندق در محیط کشت تعلیقی

ویژگی‌ها و کالیبراسیون سیستم مولد امواج فراصوت

برای ایجاد امواج فراصوت در دامنه‌های کیلوهرتز پایین، از یک سیستم طراحی شده داخلی استفاده گردید. این دستگاه از دو ترنسدیوسر (ناقل) با خاصیت پیزوالکتریک با سطح مقطع ۱۲/۱mmو به طول ۲۰mm تشکیل شده است که به طرفین بالن شیشه‌ای با حجم ۱۰۰mL متصل شده است [۱]. نیروی لازم برای تولید امواج، توسط یک تثبیت کننده ولتاژ (جویا الکتریک، ایران) فراهم شد (شکل ۲). کالیبراسیون آکوستیک برای توان و شدت دستگاه اولتراسوند در محیط آبی فاقد گاز با استفاده از بالانس نیروی تابشی (Radiation force balance) (Shrewsbury Medical Co, Shropshire, UK,±10%) و روش هیدروفون در فضای مکعبی PA124, Precision Acoustics Ltd, Dorchester) Dorset, UK, calibration range: 10 kHz - 20 صورت (MHz, with a sensor diameter of 25 mm گرفت. لازم به ذکر است که تمام مقادیر شدت تجربی گزارش شده همان شدت بیشینه (I_{max}) می‌باشد. بر اساس نتایج کالیبراسیون، فرکانس واقعی دستگاه اولتراسوند ۲۹/٤٤ کیلوهرتز و کمترین و بیشترین شدت تولید شده توسط دستگاه، به ترتیب mW/cm^2 ٤ و ٤٥٥ بود.



شکل ۲- دستگاه مولد امواج فراصوت

تیمار سلول ها با امواج فراصوت

سلول‌های جداکشت فندق در معرض امواج با توان خروجی mW/cm^2 ٤ با فرکانس ثابت kHz ۲۲/٤٤ در زمان‌های متفاوت ۲۰،۸،٤ و ٤۰ دقیقه قرار گرفتند. سلول‌ها در روز هفتم بعد از واکشت یعنی در فاز لگاریتمی تیمار شدند و بلافاصله وارد محیط جدید گردیدند و ٦، ۱۲، ۲٤ ساعت و هفت روز بعد از تیمار، سلول‌ها جمع‌آوری شده، و ابتدا با ازت مایع منجمد، سپس در دمای $-80^{\circ}C$ جهت انجام آنالیزهای بیو شیمیایی نگهداری شدند.

آنالیزهای بیوشیمیایی

استخراج تاکسان‌های موجود در سلول و محیط کشت در روز هفتم بعد از تیمار سلول‌ها با امواج فرا صوت صورت گرفت. سلول‌ها به کمک فیلتر از محیط کشت جدا شده و به وسیله ازت مایع پودر شدند. در خصوص تاکسان‌های درون سلولی، ابتدا به سلول‌های کاملاً پودر شده، ۱۰mL متانول اضافه شد و به مدت ٤۰ دقیقه مخلوط حاصله در سونیکاتور قرار گرفت. سپس مخلوط حاصله فیلتر شده و عصاره متانولی تبخیر گردید. به بخش باقیمانده ۲mL آب دیونیزه و ۲mL دی کلرومتان اضافه شد و به شدت تکان داده شد. فاز دی کلرومتان که حاوی تاکسول می‌باشد از آب جدا شده و مورد تبخیر قرار گرفت. باقیمانده

حاصله در ۱۵۰µl متانول حل شد. سپس جهت انجام HPLC توسط فیلتر ۰/٤٥ میکرومتر فیلتر شد. برای اندازه‌گیری مقدار تاکسان‌های مورد نظر از HPLC (Knauer, Germany) استفاده شد. ستون مورد استفاده (C18, 25 Cm x 4.6 mm I.D., 5 µm)، فاز متحرک متانول و آب (v/v ٤٠:٦٠) هر یک حاوی ۰/۱ ٪ اسید استیک به صورت گرادیان با جریان (flow rate) ۱ mL در دقیقه و طول موج مورد استفاده ۲۲۷ نانومتر بود. شناسایی و اندازه گیری تاکسان‌ها به کمک مقایسه Retention time نمونه ها با استاندارد تاکسول و باکاتین و داستیل باکاتین III استاندارد (سیگما) صورت گرفت [۱۲]. به منظور بررسی فعالیت آنزیم PAL، ۲۰۰ میلی‌گرم سلول منجمد شده با ٦/٥ میلی‌لیتر بافر Tris-HCl (۵۰ میلی مولار، ۸/۸ pH) حاوی بتا- مرکاپتواتانول (۱۵ میلی مولار) درهاون روی یخ به مدت ۲ دقیقه ساییده شد. سپس نمونه ها پس از همگن سازی، سانتریفوژ (۱۵۰۰۰rpm به مدت ۳۰ دقیقه) شدند و بخش رو شناور برای سنجش فعالیت PAL مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت PAL بر اساس مقدار تولید اسید سینامیک اندازه گیری شد. غلظت پروتئین کل نمونه‌ها نیز به روش برادفورد تعیین گردید [۱۲].

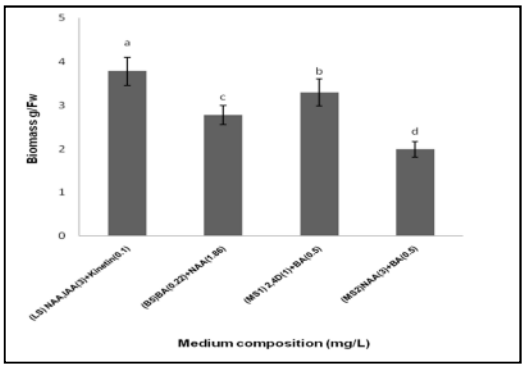
تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایشات با سه تکرار از حداقل ۳ نمونه مستقل انجام گرفت. مقایسه میانگین ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ١٦ آزمون LSD جهت تعیین معنی دار بودن تفاوت ها در سطح $P\leq 0.05$ انجام شد.

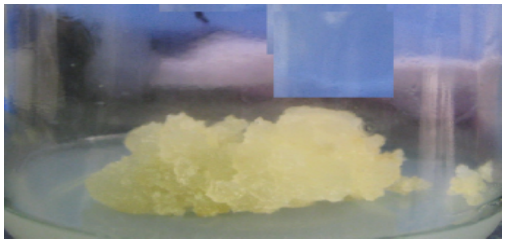
نتایج

رشد سلول‌های فندق در محیط‌های مختلف کشت

مقایسه رشد نسبی کالوس‌ها در چند محیط با غلظت و ترکیبات هورمونی متفاوت نشان داد که محیط LS با ترکیبات هورمونی درج شده در جدول ۱ از میان محیط‌های مورد آزمایش، مناسب ترین محیط می‌باشد. بطوریکه میزان رشد کالوس‌ها به شکل معنی داری در این محیط در مقایسه با سایر محیط‌های بکار گرفته شده افزایش یافت (شکل ۳). بر اساس این نتایج کالوس‌ها به محیط کشت LS فاقد هورمون 2,4-D انتقال یافته و پس از چند نسل واکشت متوالی کشت مایع از این کالوس‌ها پایه گذاری گردید.



(الف)



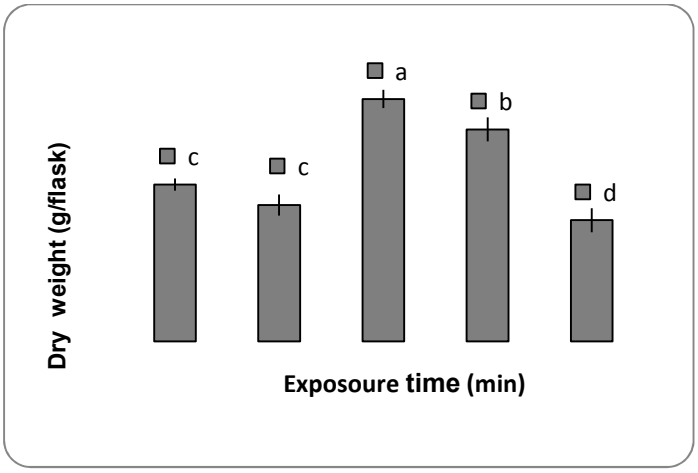
(ب)

شکل ۳- اثر غلظت و ترکیب هورمون‌های مختلف بر رشد کالوس‌های فندق (اعداد داخل پرانتز مقدار تنظیم کننده رشد بر حسب میلی گرم در لیتر می باشد). مقادیر نشان داده شده میانگین ۵ تکرار و حروف متفاوت نشان دهنده معنی دار بودن تفاوت‌ها در سطح $p\leq$ ۰/۰۵ است.

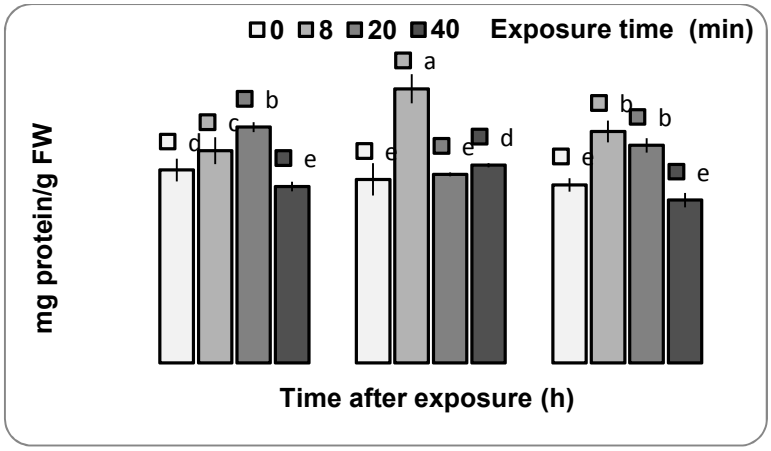
اثر امواج فراصوت بر رشد و محتوای پروتئین

بررسی تغییرات رشد سلولی (وزن خشک) نشان داد که تیمار سلول‌ها با امواج فراصوت با توان ٤ mW

تا زمان ۲۰ دقیقه نه تنها باعث کاهش رشد سلول‌ها نگردید بلکه در زمان‌های ۸ و ۲۰ دقیقه افزایش معنی‌دار رشد در مقایسه با شاهد مشاهده گردید. در این توان از امواج فراصوات، زمان تابش ٤٠ دقیقه به صورت معنی‌داری باعث کاهش رشد سلول‌ها گردید (شکل ٤). تغییرات میزان پروتئین کل به صورت وابسته به زمان در سلول‌ها تحت اثرامواج فراصوت، در شکل ٥ نشان داده شده است. ٦ ساعت بعد از اعمال تیمار در سلول‌هایی که ۸ و۲۰ دقیقه توسط امواج فراصوت تیمار شده بودند افزایش معنی‌دار میزان پروتئین کل در مقایسه با شاهد مشاهده شد در صورتیکه در سلول‌هایی که ٤٠ دقیقه تیمار شده بودند کاهش معنی‌دار پروتئین در مقایسه با شاهد مشاهده شد. همچنین ٢٤ ساعت بعد از اعمال تیمارافزایش معنی‌دار میزان پروتئین در ۸ دقیقه تابش مشاهده گردید. ٤٨ ساعت بعد از اعمال تیمار نیز افزایش معنی‌دار پروتئین در زمان‌های ۸ و۲۰ تابش در مقایسه با شاهد مشاهده گردید (شکل ٥).

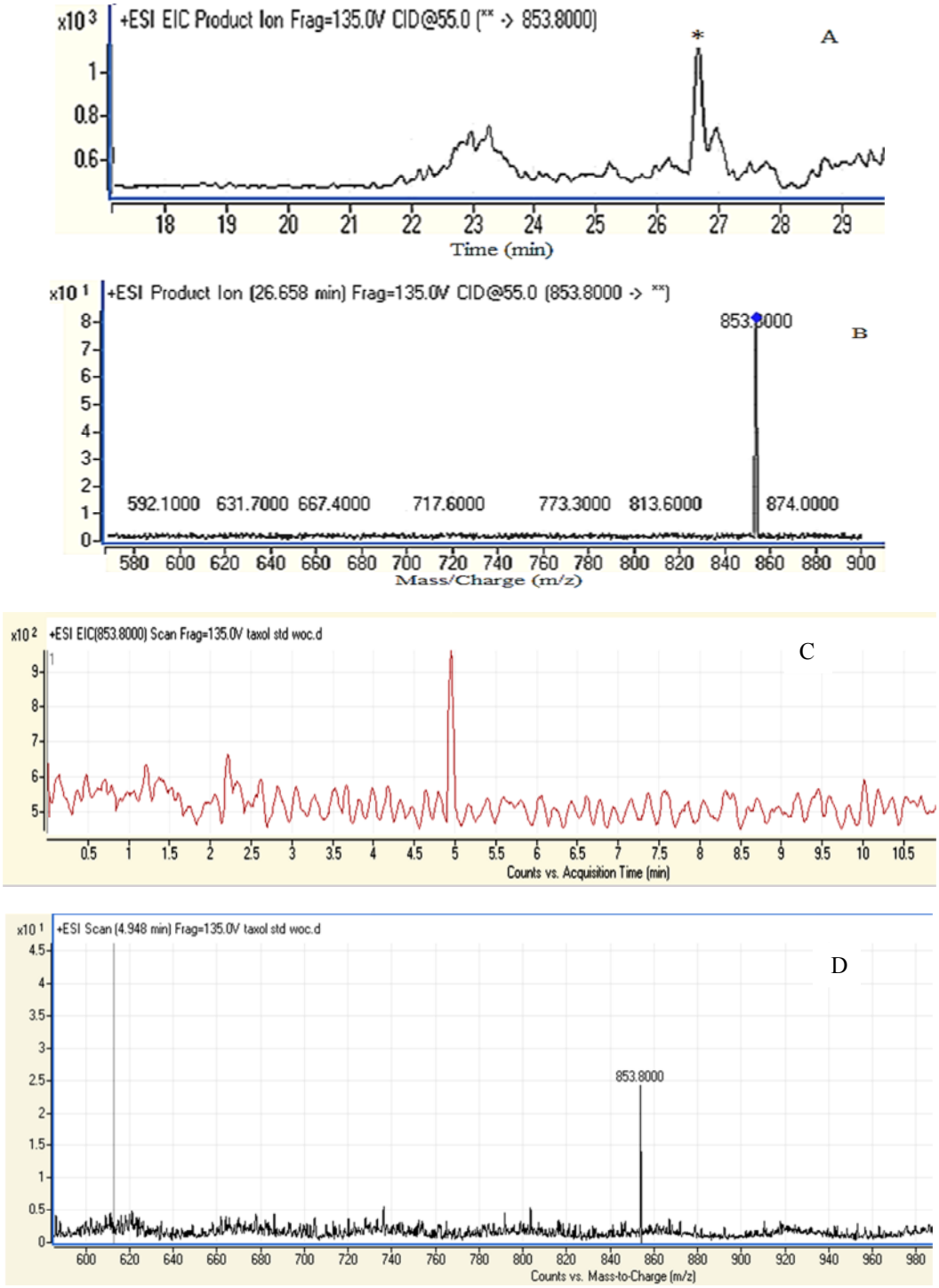


شکل ٤- تاثیر امواج فراصوت با توان mW ٤ در زمان‌های مختلف برمیزان رشد سلول‌های جداکشت فندق (*Corylus avellana* L.). مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و SD ± (انحراف معیار) می‌باشد. حروف متفاوت نشان دهنده معنی دار بودن تفاوت‌ها در سطح $p \leq ۰/۰۵$ است.



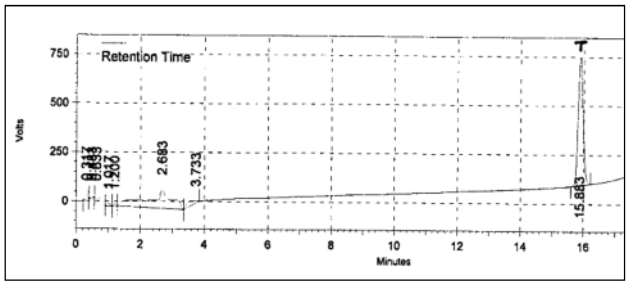
شکل ٥- تاثیر امواج فراصوت با توان mW ٤ در زمان های مختلف برمیزان پروتئین کل در سلول‌های جداکشت فندق (*Corylus avellana* L.). مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و SD ± (انحراف معیار) می‌باشد. حروف متفاوت نشان دهنده معنی دار بودن تفاوت‌ها در سطح $p \leq ۰/۰۵$ است.

میزان تولید تاکسان‌ها (تاکسول، داستیل باکاتین و باکاتین III) تحت تاثیر امواج فراصوت وجود سه تاکسان مهم (تاکسول، داستیل باکاتین DAB و باکاتین III) در سلول‌های جداکشت فندق به کمک ESI/MS مورد تایید قرار گرفت (شکل ٦).

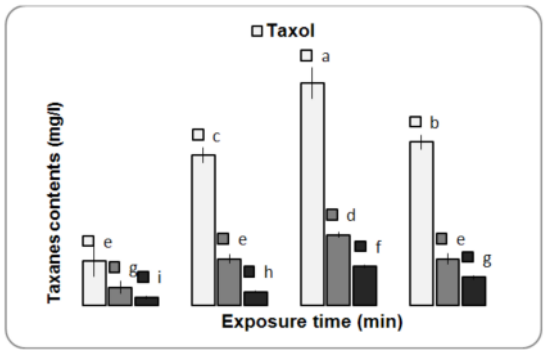


شکل ٦- آنالیز عصاره کشت سلولی فندق و همچنین استاندارد تاکسول توسط LC-MS. A و C: طیفهای جریان یونی به ترتیب عصاره سلولی و محلول استاندارد و B و D: طیفهای جرمی بدست آمده به روش ESI product ion+ مربوط به تاکسول موجود در نمونه و استاندارد. علامت ستاره پیک تاکسول را نشان می‌دهد.

مقادیر این تاکسان‌ها در سلول به وسیله HPLC و با استفاده از استانداردهای مربوطه اندازه گیری شد (شکل ۷ الف). بر اساس این نتایج مشاهده می شود که میزان تاکسول درون سلولی در مقایسه با سایر تاکسان‌ها بیشتر می‌باشد بطوریکه میزان آن در سلول‌های شاهد ۱/۵ برابر میزان داستیل باکاتینDAB و ۸ برابر میزان باکاتین III کل در این سلول‌ها بود. اندازه گیری میزان تاکسان‌های درون سلول‌های جداکشت فندق نشان داد که میزان تاکسان‌ها در همه سلول‌هایی که با دو توان ٤mW و با زمان‌های ٤ الی ٤٠ دقیقه توسط امواج فراصوت تیمار شده بودند در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری داشت. متناسب با افزایش زمان تابش، تجمع تاکسان‌ها به تدریج در درون سلول به صورت معنی‌داری افزایش یافت. بیشترین میزان تاکسول در سلول‌هایی اندازه‌گیری شد که به مدت ۲۰ دقیقه در معرض امواج فراصوت قرار گرفته بودند (۵ برابر میزان تاکسول در سلول‌های شاهد). میزان تغییرات ۱۰- داستیل باکاتین و باکاتین III در سلول‌های تیمار شده با امواج فراصوت وضعیتی همانند تغییرات تاکسول نشان داد بطوریکه با افزایش زمان تابش، میزان این پیش‌سازهای تاکسول افزایش یافت. بیشترین میزان تولید DAB و باکاتین III درون سلولی، در کشت‌های تیمار شده با فراصوت، با در زمان ۲۰ دقیقه (به ترتیب ٤/۸ و ۳/۸ برابر سلول‌های شاهد) (شکل ۷ ب).



الف



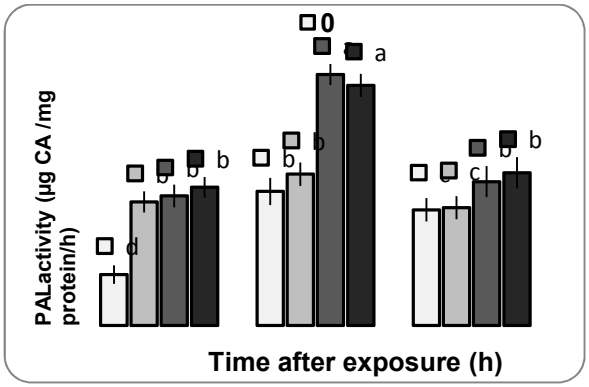
ب

شکل ۷- الف: کروماتوگرام های مربوط به HPLC عصاره سلولی فندق و استاندارد تاکسول. بالا) عصاره سلولی (زمان بازداری ۱۵/۸۳ دقیقه)، وسط) عصاره سلولی به اضافه استاندارد تاکسول (زمان بازداری ۱۵/۷۸ دقیقه) و پایین) استاندارد تاکسول (زمان بازداری ۱۵/۸۸ دقیقه). حرف T پیک تاکسول را نشان می‌دهد.

ب: تغییر درمیزان تاکسول، باکاتین III و داستیل باکاتین III (DABIII) تحت تاثیر امواج فراصوت در سلول‌های جداکشت فندق *Corylus avellana* L.). مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و SD ± (انحراف معیار) می‌باشد. حروف متفاوت نشان دهنده معنی دار بودن تفاوت‌ها در سطح ۰/۰۵ ≥ p است.

تاثیر امواج فراصوت بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL)

فعالیت آنزیم PAL در تمامی سلول‌هایی که تحت تاثیر امواج فراصوت قرار گرفته بودند ٦ الی ٤٨ ساعت بعد از تیمار به شکل معنی‌داری در مقایسه با شاهد افزایش یافت. بیشترین میزان فعالیت آنزیم ٢٤ ساعت بعد از اعمال تیمار در سلول‌هایی مشاهده می‌شود که به مدت ۲۰ دقیقه در معرض امواج فراصوت قرار گرفته بودند بطوریکه در مقایسه با سلول‌های شاهد ۳ برابر افزایش فعالیت این آنزیم دیده شد (شکل ۸).



شکل ۸- تغییر فعالیت فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) تحت تاثیر امواج فراصوت با توان ٤ mW و با سه زمان متفاوت تابش ،در طول زمان‌های مختلف بعد از تیمار سلول‌های جدا کشت فندق (*Corylus avellana* L.). مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و SD ± (انحراف معیار) می‌باشد. حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوت ها در سطح ۰/۰۵ ≥ p است.

بحث

تولید متابولیت‌های ثانویهٔ گیاهی با خاصیت دارویی از طریق کشت سلولی در شرایط آزمایشگاهی، مزایای زیادی در مقایسه با استخراج این ترکیبات از گیاهان، تحت شرایط طبیعی دارد. از جمله این مزایا عدم وابستگی به تغییرات جغرافیایی و عوامل محیطی و در عین حال سرعت بالا و هزینه‌های پایین در تولید ذیتوده و متابولیت‌های دارویی را می‌توان نام برد. از دیگر مزایای این سیستم‌ها می‌توان به امکان افزایش میزان زیتوده با استفاده از تغییر در محیط‌های کشت و همچنین افزایش توان تولید متابولیت‌های ثانویه توسط سلول‌ها با استفاده از محرک‌های زیستی و غیر زیستی اشاره کرد. نتایج بدست آمده از بهینه‌سازی محیط کشت سلول‌های فندق نشان داد که انتقال سلول‌ها به محیط کشت فاقد هورمون Diphenoxy acid (2,4-D) acetic نه تنها کاهش رشد را به دنبال نداشت بلکه می‌توان گفت بعد از چند نسل واکشت، رشد سلول‌ها در این محیط نسبت به محیطی که در آن پایه گذاری شده بودند بیشتر شده است. برخی مطالعات نشان می‌دهد که وجود هورمون 2,4-D در محیط‌کشت باعث افزایش سرعت رونویسی شده و ممکن است باعث تغییر ساختار کروماتین گردد. این عامل باعث بهم خوردن ثبات ماده ژنتیکی می‌شود [۱۱]. بنابراین حذف این هورمون می‌تواند در حفظ ذخیره ژنی لاین‌های ایجاد شده موثر باشد. بخشی از پاسخ‌های دفاعی گیاهان در کشت سلول های گیاهی به شکل تولید متابولیت‌های ثانویه است. این مسیرهای دفاعی را می‌توان از طریق الیسیتورها القا و فعال کرد. اثر مثبت الیسیتورها وابسته به عوامل مختلفی از جمله رشد، زنده مانی سلول‌ها، ساختارهای درون سلولی و همچنین چگونگی تاثیر آن‌ها بر مسیرهای سیگنالینگ می‌باشد. بنابراین درک مکانیسم اثر الیسیتورها و استفاده صحیح از آنها، بطوریکه در ضمن داشتن اثرات قابل توجه بر تولید متابولیت‌های ثانویه، کمترین اثر منفی را بر فاکتورهای حیاتی سلول داشته باشند، ضروری است. امواج فراصوت به عنوان یک الیسیتور فیزیکی معرفی می‌شوند که اثرات متنوعی بر سلول‌های زنده دارند. مطالعات قبلی در این زمینه

نشان داد که استفاده از امواج فراصوت در زمان‌های کوتاه نه تنها باعث کاهش رشد و درصد زنده مانی سلول‌ها نشده است بلکه تا حدی میزان زیتوده را نیز افزایش داده است. با توجه به اینکه ارتباط تنگاتنگی بین سنتز پروتئین و میزان رشد در متابولیسم اولیه وجود دارد در تحقیق اخیر میزان پروتئین کل سلول اندازه گیری شد و افزایش میزان پروتئین در زمان‌های ۸ و ۲۰ دقیقه تابش در مقایسه با کنترل تاییدی بر افزایش میزان زیتوده در سلول‌های جداکشت فندق می‌باشد. مطالعه بر روی گیاه آلوئه نشان داده است که امواج فراصوت با انرژی کم باعث افزایش فعالیت ATPase واکوئلی می‌شود. با فعال شدن H^+ ATP ase به داخل واکوئل پمپ شده و این امر باعث ایجاد شیب PH می‌شود و از این طریق انرژی لازم برای فعالیت پمپ‌های ثانویه فراهم می‌گردد. با افزایش فعالیت این پمپ‌ها، انتقال یون‌ها و متابولیت‌ها افزایش یافته که می تواند اثرات مثبتی بر رشد و متابولیت‌های اولیه داشته باشد.

البته کاهش میزان پروتئین در زمان۴۰ دقیقه تابش حاکی از آن است که استفاده از امواج فراصوت با انرژی بالا می تواند باعث تخریب غشا سلول و در نتیجه مرگ سلولی شود [۹]. فعالیت آنزیم PAL به صورت معنی داری در پاسخ به تیمار فراصوت نسبت به کشت‌های شاهد افزایش نشان داد. افزایش فعالیت این آنزیم در در سلول‌های جینسینگ و همچنین در سلول‌های سرخدار (*T. yunnanensis*) تحت تاثیر امواج فرا صوت گزارش شده است [١٤و١٦]. با توجه به اینکه PAL با راه‌اندازی سنتز فنیل پروپانوییدهای مختلف نقش مهمی در واکنش گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارد و همچنین نشان داده شده است که الیسیتورهای قارچی، عوامل بیماریزا و ایجاد زخم به عنوان یک محرک مکانیکی باعث القای فعالیت این آنزیم می‌شوند [۷]. بنابراین بنظر می‌رسد با توجه به نتایج بدست آمده تیمار اعمال شده بویژه فراصوت با افزایش فعالیت PAL منجر به تجمع ترکیبات فنلی و القای متابولیسم ثانویه از جمله تاکسان‌ها گردید. .همچنین زنجیره جانبی مولکول تاکسول، فنیل ایزوسرین، از مسیرفنیل پروپانوییدی به دست می‌آید. اندازه‌گیری میزان تاکسان‌ها در سلول‌های جداکشت فندق، افزایش این ترکیبات را در همه سلول‌هایی که تحت تاثیر امواج فراصوت قرار داشته اند نسبت به سلول‌های شاهد نشان می دهد. این نتایج مطابق با مطالعات قبلی در این زمینه می‌باشد که نشان داده است که تیمار کوتاه مدت سلول‌های گیاهی با امواج فراصوت با انرژی کم، بیوسنتز برخی متابولیت‌های ثانویه ارزشمند نظیر تاکسان‌ها و آلکالوئیدها افزایش داده است [۸ و۱۵]. البته این مطالعات بیشتر اشاره به افزایش تاکسول برون سلولی در اثر افزایش میزان نفوذپذیری غشا تحت تاثیر امواج فراصوت دارند. بر اساس نتایج به دست آمده از اندازه گیری میزان تاکسان‌های درون سلولی مشاهده می شود که امواج فراصوت با القای بیوسنتز تاکسان ها باعث افزایش تاکسان های درون سلولی شده است. با توجه به حفظ تمامیت غشا سلول‌ها در نتیجه تحریک مکانیسم‌های نامبرده در طی القا استرس فیزیکی امواج فراصوت و همچنین افزایش قابل توجه میزان تاکسان‌های درون سلولی می‌توان گفت که امواج فراصوت اثر قابل توجه ای بر بیوسنتز تاکسان‌ها داشته است و بیشتر از اینکه باعث افزایش خروج تاکسان‌ها به محیط کشت شود با القای مسیرهای بیوسنتزی آنها باعث افزایش سنتز این ترکیبات در سلول‌های فندق شده است. بنظر می‌رسد این محرک صرفاً فقط از

طریق اثرات فیزیکی روی سلول ها باعث افزایش تولید تاکسول نشده بلکه القای متابولیسم ثانویه و واکنش‌های دفاعی سلولی نیز مزید بر علت بوده است.

منابع

[1] Barber B. P. , R.A. Hiller, R. Lofstedt, S.J. Putterman, and K.R. Weninger (1997) Defining the unknowns of sonoluminescence. Physics Reports, 28: 165-143.

[2] Bochu W., A. Yoshikoshi, and A. Sakanishi (1998) Carrot cell growth response in a stimulated ultrasonic environment. Colloids Surfaces B: Biointerfaces 12: 89-95.

[3] Chen B., J. Huang, J. Wang, and L. Huang (2008) Ultrasound effects on the antioxidative defense systems of Porphyridium cruentum. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 16: 88-92.

[4] Christen A.A., D.M. Gibson, and J.Bland (1991) Production of taxol or taxol-like compounds in cell culture, US Patent 5019504.

[5] Dahajipour Heidarabadi, M., F.Ghanati , and T. Fujiwara (2011) Interaction between boron and aluminum and their effects on phenolic metabolism of Linum usitatissimum L. roots. Plant Physiology and Biochemistry, 49: 1377-1383.

[6] Ikeda K., T.Takayama, N.Suzuki, K.Shimada, K.Otsuka, and K.Ito (2006) Effects of low-intensity pulsed ultrasound on the differentiation of C2C12. cells Life Sciences, 79 :1936-1943.

[7] Lawton M.A., and C.J.Lamb (1987) Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding, and infection. Molecular and Cellular Biology, 7: 335-341.

[8] Lin L.D., and J.Y.Wu (2002) Enhancement of shikonin production in single- and two-phase suspension cultures of Lithospermum erythrorhizon cells using low-energy ultrasound. Biotechnology and Bioengineering, 78: 81-88.

[9] Liu Y., H.Takatsuki, A.Yoshikoshi, B.Wang, and A.Sakanishi (2003) Effects of ultrasound on the growth and vacuolar H_1-ATP ase activity of aloe arborescens callus cells. Colloids Surface B, 32b: 105-116.

[10] Liu Y., Yoshikoshi A.,Wang B., and Sakanish A. (2003) Influence of ultrasonic stimulation on the growth and proliferation of Oryza sativa Nipponbare callus cells. Colloid Surface B, 27:287-293.

[11] Phillips R.L., S.M. Kaepplert, and P. Olhoft (1994) Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91: 5222-5226.

[12] Rezaei A., F.Ghanati, M. Behmanesh, and M. Mokhtari dizaji (2011) Ultrasoud – potentiated salicylic acid-induced physiological effects and production of Taxol in hazel (Corylus Anellana L.) cell culture. Ultrasound in Medicine and Biology, 37: 1938-1947.

[13] Sundaram J., R.Berlyn, Mellein, and S. Mitragotri (2003) An experimental and theoretical analysis of ultrasound-Induced permeabilization of cell membranes. Biophysical Journal, 84: 3087-3101.

[14] Wang J.W., L.P.Zheng, J.Y.Wu, and R.X.Tan (2006) Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in Taxus yunnanensis cell suspension cultures. Nitric Oxide, 15: 351-358.

[15] Wu J., and X.Ge (2004) Oxidative burst, jasmonic acid biosynthesis, and taxol production induced by low-energy ultrasound in Taxus chinensis cell suspension cultures. Biotechnology and Bioengineering , 85: 714-721.

[16] Wu J., and L.Lin (2002) Elicitor-like effects of low-energy ultrasound on plant (Panax ginseng) cells: induction of plant defense responses and secondary etabolite production. Applied Microbiology and Biotechnology , 59: 51-57.