

## القای پاسخ‌های دفاعی و تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی کتان سفید (*Linum album*) توسط امواج فراصوت

ارمغان عابدزاده نیشابوری<sup>۱</sup> و آیت‌اله رضایی<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup> دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران

<sup>۲</sup> گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

### چکیده

امواج فراصوت با انرژی پایین به عنوان یک ابزار فیزیکی برای تحریک سیستم‌های زنده در پزشکی و بیوتکنولوژی مورد توجه قرار دارد. در مطالعه حاضر، تأثیر امواج فراصوت بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک و تولید پودوفیلوتوکسین در کشت سلولی کتان سفید (*Linum album*) بررسی شد. امواج فراصوت با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز و توان ۵ وات بر سانتی‌متر مکعب، به کشت‌های سلولی در قالب آزمایش وابسته به زمان با ۳ تکرار تیمار شد و سلول‌ها در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار جمع‌آوری شدند. شاخص‌های مورد ارزیابی عبارت بودند از: رشد سلولی، پروتئین کل، مالون‌دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن، فنل‌ها، فلاونوئیدها، پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، فنیل‌آلانین آمونیلایز و پودوفیلوتوکسین. نتایج نشان داد که رشد سلول‌ها تحت تأثیر امواج فراصوت کاهش معنی‌داری نشان داد اما تغییر معنی‌داری در محتوای پروتئین سلول‌ها صورت نگرفت. مقدار پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و همچنین فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز و فنیل‌آلانین آمونیلایز در سلول‌ها نسبت به شاهد تحت اثر امواج فراصوت افزایش یافت. امواج فراصوت همچنین باعث افزایش تولید ترکیبات فنلی، محتوای فلاونوئیدی و پودوفیلوتوکسین در سلول‌های تیمار شده گردید. بیشترین مقدار پودوفیلوتوکسین در کشت‌های تیمار شده پس از ۷۲ ساعت با مقدار ۲۶۸/۹ میکروگرم بر گرم وزن خشک به دست آمد که ۲/۷ برابر کشت شاهد بود. به نظر می‌رسد امواج فراصوت با تحریک سلول‌ها و القای پاسخ‌های دفاعی و متابولیسم ثانویه باعث افزایش مقدار پودوفیلوتوکسین در سلول‌ها گردید.

**واژه‌های کلیدی:** امواج فراصوت، پودوفیلوتوکسین، کتان سفید، کشت سلولی

## مقدمه

ترکیبات مفید کشت‌های سلول گیاهی غالباً متابولیت‌های ثانویه هستند که معمولاً به مقدار بسیار اندک در سلول‌های گیاهی تیمار نشده تجمع می‌یابند. تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان بخشی از پاسخ‌های دفاعی است که توسط الیستورها القا و فعال می‌شوند. بنابراین تیمار سلول‌های گیاهی با الیستورهای زیستی و غیرزیستی یکی از راهکارهای سودمند برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول گیاهی است (Dornenburg and Knorr, 1995). الیستورهایی که غالباً در مطالعات گذشته مورد استفاده قرار گرفته‌اند شامل کربوهیدرات‌های قارچی، عصاره مخمر، متیل جاسمونات، سالیسیلیک اسید و کیتوزان بوده است (Dornenburg and Knorr, 1995).

مطالعات نشان داده است که امواج فراصوت (Ultrasound; US) با شدت زیاد برای ترکیبات زیستی مخرب بوده، غشای سلول‌ها را تخریب کرده، مولکول‌هایی زیستی نظیر آنزیم‌ها و DNA را غیرفعال می‌سازد (Frizzell, 1988). از سوی دیگر، نشان داده شده است که US با شدت و انرژی کم، طیفی از آثار زیستی غیرگشونده دارد که از اهمیت بالقوه‌ای در بیوتکنولوژی برخوردار است. یکی از گسترده‌ترین آثار غیرمخرب US بر سلول‌های زنده، افزایش در نفوذپذیری غشا است که جذب ترکیبات خارجی و دفع فرآورده‌های درون سلولی توسط سلول‌ها را افزایش می‌دهد. علاوه بر افزایش نفوذپذیری غشای سلولی، US به عنوان محرک واکنش‌های آنزیمی، تبدیلات زیستی توسط میکروب‌ها، بیوسنتز در سلول‌های جانوری و سلول‌ها و پروتوپلاست‌های گیاهی استفاده

شده است (Joersbo؛ Edmonds and Ross, 1988) (Wood *et al.*, 1997؛ and Brunstedt, 1992). پیرامون تأثیرات تحریک‌کنندگی US بر جوانه‌زنی بذرها و رشد گیاهچه‌ها و ریشه‌چه در گیاهان در گذشته مطالعات متعددی انجام شده است (Gordon, 1971). به تازگی، مطالعات پراکنده‌ای در مورد آثار زیستی US در کشت سلول‌های گیاهی انجام شده است اما در مورد اثر تحریک‌کنندگی US در سنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهی اطلاعات اندکی در دست است. افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های گیاهی توسط امواج US با انرژی کم، گزارش شده است (Wang *et al.*, 2006؛ Wu and Lin, 2002)؛ (Safari *et al.*, 2012). نشان داده شده است که افزایش در بیوسنتز متابولیت ثانویه بیشتر ناشی از القای فعالیت فیزیولوژیکی سلول‌ها توسط US است تا تأثیر انتقال جرم. این تأثیر ویژه US بر تولید متابولیت ثانویه در کشت‌های سلول گیاهی از اهمیت‌های بنیادی و کاربردی برخوردار است و US به عنوان یک شبه‌الیستور غیرزیستی در القای واکنش‌های دفاعی گیاه نظیر قهوه‌ای شدن آنزیمی، انفجار اکسیداتیو و ورود کلسیم از طریق غشا مورد توجه قرار گرفته است (Wu and Ge, 2004؛ Wu and Lin, 2002).

گیاه کتان سفید (*Linum album* Kotschy ex Boiss.) یکی از گونه‌های بومی ایران است و به دلیل داشتن متابولیت‌های ثانویه از جمله ترکیبات لیگنانی به ویژه پودوفیلوتوکسین، در زمره گیاهان دارویی مهم قرار می‌گیرد. پودوفیلوتوکسین در میان لیگنان‌ها به این علت که برای تولید سه ماده ضد سرطان مهم به نام‌های etoposide، teniposide و etoposide به کار می‌رود از

هفته واکشت گردید. برای دستیابی به لاین سلولی با رشد همگن، فرآیند واکشت چندین بار تکرار گردید.

**تیمار سلول‌ها با امواج US:** برای به کارگیری امواج US در دامنه‌های کیلوهرتز پایین، از یک سیستم حمام اولتراسونیک (FALC Instruments)، ساخت ایتالیا) با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز و پهنای باند ۳۲۰ هرتز به صورت پیوسته مطابق روش Rezaei و همکاران (۲۰۱۱) استفاده شد. برای ارزیابی اثر امواج US و دستیابی به بهترین زمان تابش، ابتدا آزمونی مقدماتی صورت گرفت. امواج US با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز و توان ۵ وات بر سانتی متر مربع به مدت زمان‌های ۲، ۴ و ۸ دقیقه در روز هفتم واکشت، به سلول‌ها در محیط کشت تعلیقی تیمار شد (فرکانس مورد نظر و دامنه مدت زمان تیمار شده با توجه به مطالعات قبلی انتخاب گردید و روز هفتم پس از واکشت که منطبق با اواسط فاز خطی رشد سلولی در کشت‌ها بود برای اعمال تیمار انتخاب شد). نتایج حاصل از آزمایش مقدماتی نشان داد که بهترین تیمار برای امواج US با توجه به میزان رشد، زنده‌مانی سلولی و تولید پودوفیلوتوکسین، مدت زمان ۲ دقیقه بود. بنابراین، در ادامه این مدت زمان تابش انتخاب گردید و در روز هفتم پس از واکشت به کشت‌های سلولی در قالب آزمایش وابسته به زمان با ۳ تکرار تیمار شد و سلول‌ها در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار جمع‌آوری شدند. سلول‌های جمع‌آوری شده توسط ازت مایع منجمد و تثبیت شدند، سپس در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند تا برای بررسی صفات مورد استفاده قرار گیرند. سطح آب درون حمام اولتراسونیک حدوداً یک سانتی متر بالاتر از سطح

اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در ارتباط با تأثیر عوامل فیزیکی از جمله US بر سلول‌های گیاه کتان سفید تاکنون مطالعه‌ای صورت نگرفته است، اگر چه تأثیر الیستورهای شیمیایی و زیستی بر تولید متابولیت‌های ثانویه و از جمله تولید پودوفیلوتوکسین در کشت‌های سلولی آن گزارش شده است (Furden et al., 2005؛ Esmaeilzadeh Bahabadi et al., 2008؛ Baldi et al., 2012). بنابراین، در پژوهش حاضر، سعی بر آن است تا با دست‌ورزی سلول‌های گیاه *Linum album* در محیط کشت تعلیقی توسط امواج US، رشد و مقدار تولید متابولیت‌های ثانویه و از جمله پودوفیلوتوکسین و همچنین سازوکارهای مربوط به آن بررسی شود.

## مواد و روش‌ها

**راه‌اندازی کشت سلولی:** برای تولید گیاهچه، بذره‌های کتان سفید جمع‌آوری شده از منطقه سوهانک تهران در محیط پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) کشت داده شدند. سپس، از ساقه‌چه گیاهک‌های حاصل به عنوان قطعات جداکشت استفاده شد. کالوس‌های به دست آمده در محیط کشت جامد MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر نفتالن استیک اسید و ۰/۴ میلی گرم در لیتر کینتین، برای راه‌اندازی کشت سلولی تعلیقی استفاده شد. برای راه‌اندازی کشت تعلیقی حدود ۲ گرم کالوس نرم و سفید به دست آمده از قطعات جداکشت ساقه، به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت MS با ترکیبات هورمونی (NAA ۲ میلی گرم در لیتر و کینتین ۰/۴ میلی گرم در لیتر) بدون آگار اضافه شد و با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در تاریکی روی شیکر نگهداری شد و هر ۲

سانتیگراد قرار داده شد. پس از سرد شدن نمونه‌ها، در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر جذب آنها اندازه‌گیری گردید. مقدار MDA توسط اسپکتروفتومتر به کمک ضریب خاموشی ۱۵۵ بر میلی‌مولار بر سانتی‌متر محاسبه گردید (De Vos *et al.*, 1991).

**تعیین مقدار پراکسید هیدروژن:** مقدار پراکسید هیدروژن بر اساس روش Velikova و همکاران (۲۰۰۰) سنجیده شد. بدین منظور، ۲۰۰ میلی‌گرم توده سلولی منجمد شده روی یخ با ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید ساییده شد. نمونه‌ها پس از همگن‌سازی، با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. به ۰/۵ میلی‌لیتر از بخش رویی، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم (۱۰ میلی‌مولار، با اسیدیته برابر با ۷) و یک میلی‌لیتر یدید پتاسیم یک مولار افزوده و جذب آن در طول موج ۳۹۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. با استفاده از منحنی استاندارد مقدار پراکسید هیدروژن محاسبه گردید.

**اندازه‌گیری ترکیبات فنلی:** برای اندازه‌گیری ترکیبات فنلی، ۲۰۰ میلی‌گرم سلول منجمد شده با ۳ میلی‌لیتر محلول اتانول اسیدی شامل اتانول: استیک اسید به نسبت ۱:۹۹ در هاون ساییده شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر اتیل استات به آن افزوده شد و پس از به هم زدن شدید، با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید (اتیل استات به علت غیرقطبی بودن و داشتن چگالی کمتر، از فاز اتانول و آب سلولی سبک‌تر است و با سانتریفیوژ جدا شد). فاز رویی که اتیل استات بود، جداسازی و تبخیر شد. سپس، باقیمانده در ۳ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد (v/v) حل گردید. مقدار

محیط کشت درون ارلن‌ها بود و دما نیز طی تیماردهی، ۲۵±۰/۵ درجه سانتیگراد ثابت نگه داشته شد.

**اندازه‌گیری رشد سلولی:** رشد سلولی با اندازه‌گیری افزایش در وزن تر سلول‌ها در ظروف کشت تعیین شد. بدین منظور، سلول‌ها توسط نایلون مش (۴۲ میکرومولار) به کمک پمپ خلأ از محیط کشت جدا و برای تعیین وزن تر بلافاصله توزین شدند.

**اندازه‌گیری مقدار پروتئین:** غلظت پروتئین نمونه‌ها با روش Bradford (۱۹۷۶) تعیین شد. برای تعیین غلظت پروتئین‌های نمونه‌ها، از هر عصاره پروتئینی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در لوله آزمایش ریخته و یک میلی‌لیتر محلول بردفورد به آن افزوده شد. محتویات لوله‌ها هم زده شد و پس از گذشت ۵ دقیقه، مقدار جذب آنها در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (مدل Lambda 650، شرکت PerkinElmer، آمریکا) سنجیده شد، سپس با استفاده از نمودار استاندارد آلومین سرم گاوی (۰ تا ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) غلظت پروتئین نمونه‌ها به دست آمد.

**تعیین سطح پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی:** مقدار آسیب به غشاها با اندازه‌گیری مقدار مالون‌دی‌آلدهید (MDA) به عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشا تعیین شد. بدین منظور، ۲۰۰ میلی‌گرم از سلول‌های منجمد شده با ۳ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید ۱۰ درصد ساییده شد. نمونه‌ها پس از همگن‌سازی، با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (مدل 3-30KS، شرکت Sigma، آلمان) شدند. به یک میلی‌لیتر از نمونه‌های صاف شده، یک میلی‌لیتر تیوباربتوریک اسید ۰/۲۵ درصد اضافه و به مدت نیم ساعت در دمای ۱۰۰ درجه

در یک میلی‌لیتر متانول حل شد. برای اندازه‌گیری مقدار پودوفیلوتوکسین از روش محاسبه سطح زیر منحنی کروماتوگراف استاندارد پودوفیلوتوکسین (سیگما) حاصل از HPLC (شرکت Knauer، آلمان) استفاده شد. ستون مورد استفاده از نوع C18-ODS3 با طول ۲۵۰ و قطر ۴/۶ میلی‌متر بود و جذب پودوفیلوتوکسین در طول موج ۲۹۰ نانومتر بررسی شد.

#### استخراج و اندازه‌گیری فعالیت پلی فنل

**اکسیداز (PPO):** برای سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز، ۲۰۰ میلی‌گرم توده سلولی منجمد شده در بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار (اسیدیته برابر با ۶/۸) در هاون روی یخ به مدت ۲ دقیقه ساییده و سپس نمونه‌ها پس از همگن‌سازی، با سرعت ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. برای سنجش فعالیت PPO از روش Dornenburg و Knorr (۱۹۹۷) استفاده شد. بدین ترتیب که مخلوطی شامل ۰/۵ میلی‌لیتر ۴-متیل کاتکول ۰/۰۲ مولار تازه تهیه شده، ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم (اسیدیته برابر با ۶/۸) و ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره حاوی آنزیم تهیه و جذب آن در طول یک دقیقه در طول موج ۴۲۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعالیت آنزیم به صورت افزایش جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین عصاره بیان گردید.

#### استخراج و اندازه‌گیری فعالیت گایاکول

**پراکسیداز (PO):** در حضور پراکسید هیدروژن، پراکسیداز، گایاکول را به تترایاکول که یک فرآورده نارنجی‌رنگ است، تبدیل می‌کند (ضریب خاموشی ۲۵/۲ بر میلی‌مولار بر سانتی‌متر). برای سنجش

کل ترکیبات فنلی با اندازه‌گیری جذب توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۸۰ نانومتر با استفاده از استاندارد سالیسیلیک اسید تعیین شد.

#### اندازه‌گیری فلاونوئید کل: به منظور سنجش

فلاونوئید کل، ۲۰۰ میلی‌گرم توده سلولی منجمد شده با ۳ میلی‌لیتر محلول متانول اسیدی شامل متانول: استیک اسید به نسبت ۱:۹۹ در هاون ساییده شد. ۱/۵ میلی‌لیتر از همگنای حاصل پس از سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه) با ۱/۵ میلی‌لیتر محلول ۲ درصد کلرید آلومینیوم ( $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ ) مخلوط و به شدت به هم زده شد. جذب آن پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد در طول موج ۳۶۷/۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد و مقدار فلاونوئید کل با استفاده از منحنی استاندارد فلاونوئید آپیژنین محاسبه گردید (Djeridane *et al.*, 2006).

#### استخراج و اندازه‌گیری مقدار

**پودوفیلوتوکسین:** برای استخراج و اندازه‌گیری مقدار پودوفیلوتوکسین از روش Esmailzadeh Bahabadi و همکاران (۲۰۱۱) استفاده شد. بدین ترتیب که به ۵۰ میلی‌گرم وزن خشک سلول، یک میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد افزوده و سپس کاملاً ساییده و همگن شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار گرفته و سانتریفیوژ شد. محلول حاصل به لوله جدید منتقل و بخش متانولی تبخیر شد. به عصاره آبی باقیمانده، یک میلی‌لیتر آب (جهت جداسازی ترکیبات قطبی) و یک میلی‌لیتر اتیل استات (جهت جداسازی ترکیبات غیرقطبی از جمله پودوفیلوتوکسین) افزوده شد و سانتریفیوژ گردید. سپس، فاز اتیل استات به لوله جدید منتقل و تبخیر شد. در پایان، رسوب خشک شده

شد. واکنش با افزودن ۰/۵ میلی لیتر کلریدریک اسید ۶ مولار متوقف شد و فرآورده آن به کمک اتیل استات استخراج شد. اتیل استات تبخیر و باقیمانده در ۳ میلی لیتر سود ۰/۵ مولار حل شد. غلظت سینامیک اسید با اندازه‌گیری مقدار جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر و به کمک استاندارد سینامیک اسید توسط اسپکتروفتومتر تعیین شد. یک واحد از فعالیت PAL برابر با یک میکرومول از سینامیک اسید تولید شده در دقیقه است.

**تحلیل آماری:** آزمایش‌ها با سه تکرار انجام و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام شد.

### نتایج و بحث

**رشد سلولی و محتوای پروتئین:** نتایج نشان داد که با گذشت زمان رشد سلول‌ها در کشت‌های شاهد افزایش یافت و پس از گذشت ۷۲ ساعت مقدار رشد به طور معنی‌داری نسبت به زمان‌های قبل افزایش نشان داد و به مقدار ۲۶۱ گرم در لیتر رسید. رشد سلول‌ها تحت تأثیر امواج US قرار گرفت و نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد. تغییرات مقدار پروتئین کل در هر دو نوع کشت سلولی با گذشت زمان معنی‌دار نبود. مقدار پروتئین اندازه‌گیری شده در کشت‌های تیمار شده در پایان دوره کشت نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۱).

### مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و تولید

**پراکسید هیدروژن:** تیمار با امواج US باعث افزایش معنی‌دار در پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در سلول‌های تیمار شده نسبت به کشت‌های شاهد گردید.

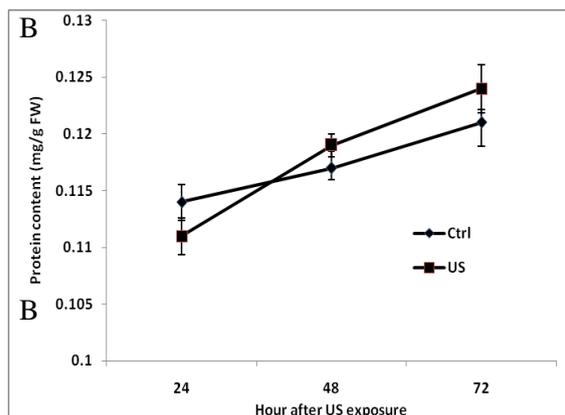
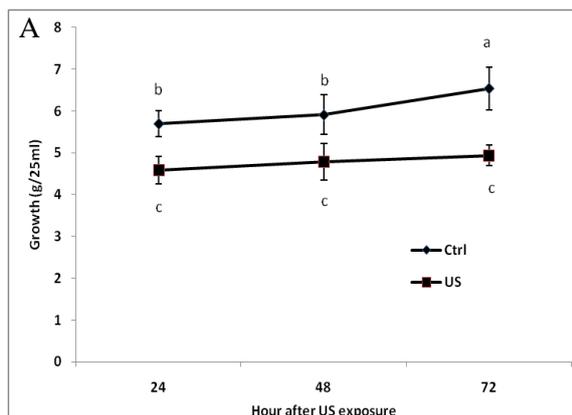
فعالیت PO نیز از روش Knorr و Dornenburg (۱۹۹۷) استفاده شد. برای استخراج پراکسیداز محلول، ۲۰۰ میلی گرم توده سلولی منجمد شده در بافر فسفات سدیم ۶۰ میلی مولار (اسیدیته برابر با ۶/۱) در هاون روی یخ به مدت ۲ دقیقه ساییده، سپس نمونه‌ها پس از همگن‌سازی، با سرعت ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات سدیم ۶۰ میلی مولار (اسیدیته برابر با ۶/۱)، گایاکول ۲۸ میلی مولار و پراکسید هیدروژن ۵ میلی مولار بود. جذب آن در طول یک دقیقه در طول موج ۴۲۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد و فعالیت آنزیم به صورت پراکسیداسیون یک میکرومول از گایاکول در دقیقه در گرم وزن تر نسبت به میلی گرم پروتئین عصاره بیان گردید.

### استخراج و اندازه‌گیری فعالیت فنیل آلانین

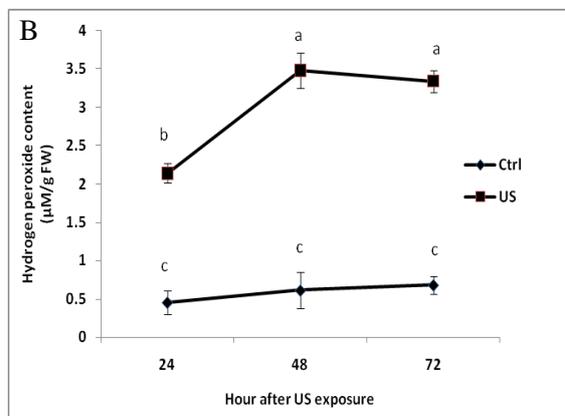
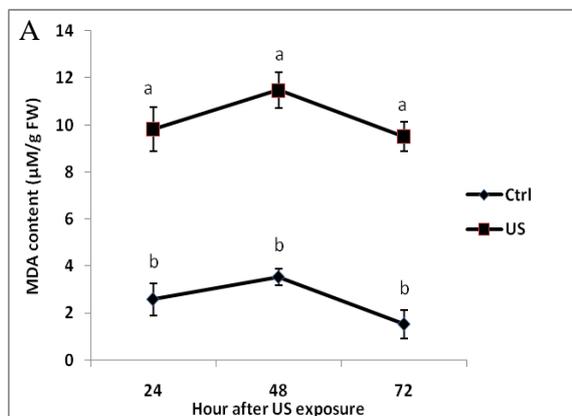
**آمونیاک‌لیاز (PAL):** برای استخراج PAL، ۲۰۰ میلی گرم سلول منجمد شده با ۶/۵ میلی لیتر بافر تریس-HCl (۵۰ میلی مولار، اسیدیته برابر با ۸/۸) حاوی بتا-مرکاپتواتانول (۱۵ میلی مولار) در هاون روی یخ به مدت ۲ دقیقه ساییده شد. سپس، نمونه‌ها پس از همگن‌سازی، سانتریفیوژ (۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه) شدند و مایع رویی برای سنجش فعالیت PAL مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت PAL بر اساس مقدار تولید سینامیک اسید با روش Ochoa-Alejo و Gmez-Peralta (۱۹۹۷) اندازه‌گیری شد. بدین صورت که مخلوط شامل یک میلی لیتر از بافر استخراج، ۰/۵ میلی لیتر از L-فنیل آلانین ۱۰ میلی مولار، ۰/۴ میلی لیتر از آب دیونیزه و ۰/۱ میلی لیتر از عصاره حاوی آنزیم در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت انکوبه

معنی‌داری در کشت‌های تیمار شده صورت گرفت. این تغییر تولید، در مقایسه با کشت‌های شاهد نیز افزایش معنی‌داری نشان داد. بیشترین مقدار آن در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار مشاهده شد (شکل ۲).

در هر دو کشت شاهد و تیمار شده، طی زمان آزمایش، تغییرات پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در سلول‌ها معنی‌دار نبود و ثابت ماند. تغییر در تولید پراکسید هیدروژن با گذشت زمان تحت تأثیر امواج US به طور



شکل ۱- A) اثر امواج US بر رشد و B) محتوای پروتئین سلول‌ها در کشت سلولی کتان سفید. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن، داده‌ها میانگین سه تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار است. حروف غیر یکسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح  $P \leq 0.05$  است.

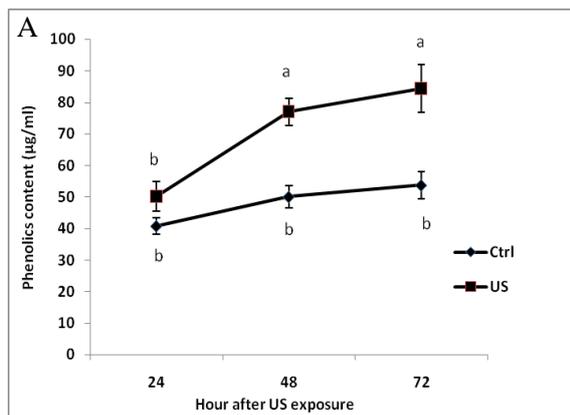


شکل ۲- A) اثر تیمار امواج US بر مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و B) تولید پراکسید هیدروژن در کشت سلولی کتان سفید. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن، داده‌ها میانگین سه تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار است. حروف غیر یکسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح  $P \leq 0.05$  است.

و بیشترین مقدار در زمان ۷۲ ساعت پس از انجام تیمار به دست آمد. تفاوت معنی‌داری بین کشت‌های تیمار شده و شاهد به ویژه پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت مشاهده شد. در کشت‌های شاهد با گذشت زمان، بر مقدار ترکیبات

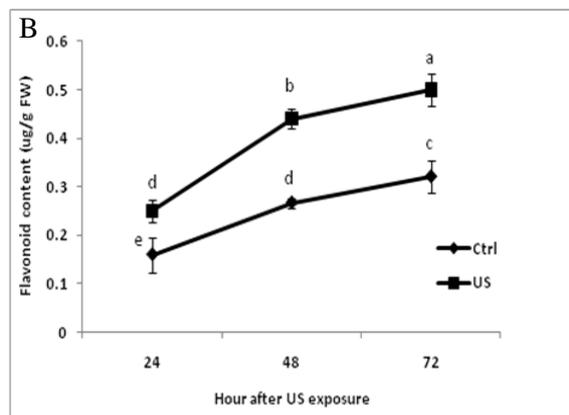
**تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی: تیمار امواج US باعث القای تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در کشت‌های سلولی گردید. به طوری که با گذشت زمان، به تدریج به طور معنی‌داری بر میزان تولید آنها اضافه شد**

ساعت در هر دو نوع کشت پس از انجام تیمار به دست آمد. در کشت‌های تیمار شده، تفاوت معنی‌داری بین کلیه زمان‌های نمونه‌برداری شده در این مورد مشاهده شد. اما در کشت‌های شاهد فقط پس از گذشت ۷۲ ساعت، افزایش تولید پودوفیلوتوکسین معنی‌دار بود (شکل ۴). در مجموع، بیشترین مقدار پودوفیلوتوکسین در کشت‌های تیمار شده پس از ۷۲ ساعت با مقدار ۲۶۸/۹ میکروگرم بر گرم وزن خشک به دست آمد که ۲/۷ برابر کشت شاهد طی همین مدت زمان بود.

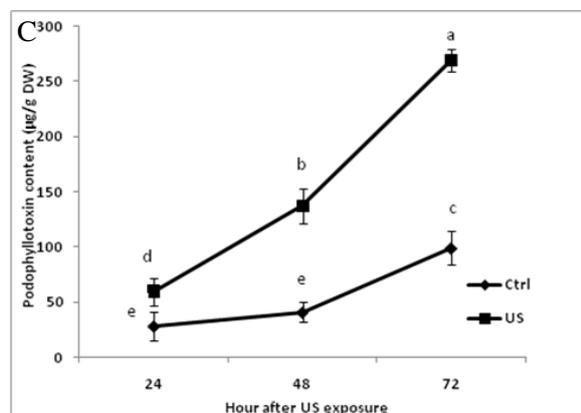


فنی تا حدودی افزوده شد اما تفاوت معنی‌داری بین زمان‌های نمونه‌برداری مشاهده نشد. اما در مورد ترکیبات فلاونوئیدی با گذشت زمان در کشت‌های شاهد افزایش معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۳).

**تولید پودوفیلوتوکسین:** شکل ۴ روند تغییر در تولید پودوفیلوتوکسین در طول زمان و تحت تأثیر امواج US در کشت‌های سلولی را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود با گذشت زمان به تدریج بر میزان تولید آن افزوده شد و بیشترین مقدار پس از ۷۲



شکل ۳- اثر تیمار امواج US بر (A) تولید ترکیبات فنی و (B) فلاونوئیدی در کشت سلولی کتان سفید. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن، داده‌ها میانگین سه تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار است. حروف غیر یکسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح  $P \leq 0.05$  است.

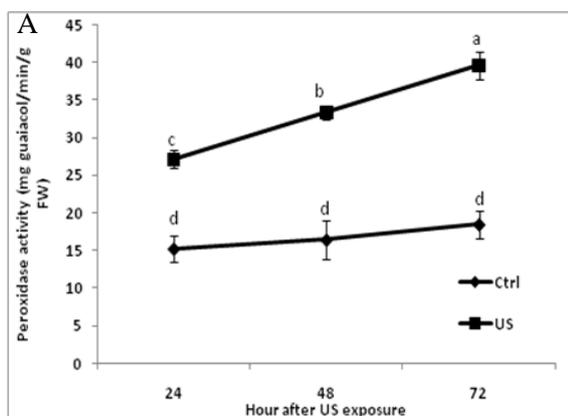


شکل ۴- اثر تیمار امواج US بر تولید پودوفیلوتوکسین در کشت سلولی کتان سفید. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن، داده‌ها میانگین سه تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار است. حروف غیر یکسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح  $P \leq 0.05$  است.

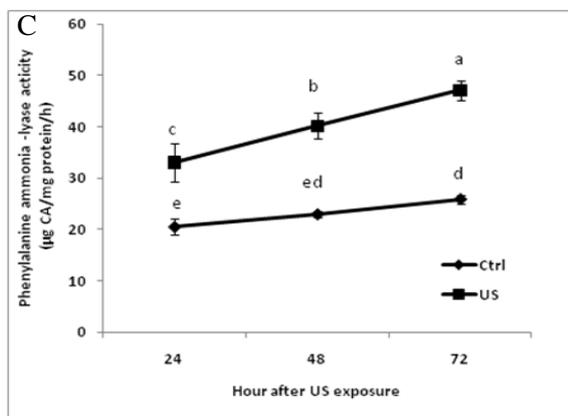
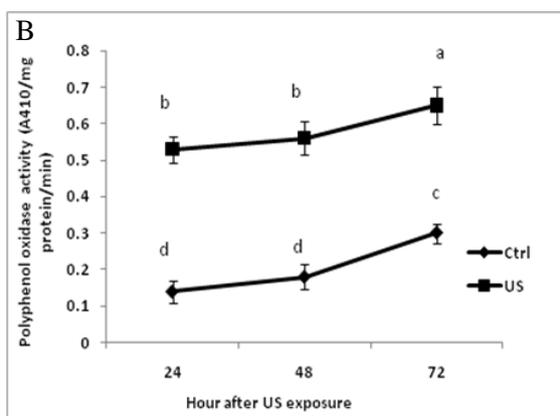
قرار گرفت و باعث القای فعالیت آنها در سلول‌ها شد. به طوری که با گذشت زمان به تدریج بر میزان فعالیت آنها

**فعالیت آنزیم‌های دفاعی:** همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود فعالیت آنزیم‌ها تحت تأثیر امواج US

نمونه‌برداری مشاهده نشد. اما بر فعالیت آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز و PAL در کشت‌های شاهد با گذشت زمان افزوده شد و تفاوت معنی‌داری بین زمان‌های نمونه‌برداری ۴۸ و ۷۲ ساعت مشاهده گردید. به طور کلی، روند تغییرات در فعالیت هر سه آنزیم بررسی شده در طول زمان شباهت زیادی با یکدیگر نشان داد.



به طور معنی‌دار افزوده شد و بیشترین فعالیت در زمان ۷۲ ساعت پس از انجام تیمار مشاهده گردید. از نظر فعالیت آنزیم‌های بررسی شده، تفاوت معنی‌داری بین کشت‌های تیمار شده و شاهد پس از گذشت زمان‌های مورد نظر مشاهده شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز، در کشت‌های شاهد با گذشت زمان تفاوت معنی‌داری بین زمان‌های



شکل ۵- اثر تیمار امواج US بر فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز (A)، پلی فنل اکسیداز (B) و فنیل آلانین آمونیا لیاز (C) در کشت سلولی کتان سفید. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن، داده‌ها میانگین سه تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار است. حروف غیر یکسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح  $P \leq 0.05$  است.

گردید. از سوی دیگر، تابش کوتاه مدت US، تأثیر معنی‌داری بر تولید زی‌توده در کشت سلولی سرخدار چینی (*T. chinensis*) نداشت (Wu and Lin, 2003). به کارگیری US در مورد کشت‌های تعلیقی سبب ایجاد وقایع هیدرودینامیک پراانرژی نظیر حفره‌زایی آکوستیک و جریان‌ات میکروسکوپی می‌شود که به آسیب‌های مکانیکی و تنش برشی (shear stress)

## بحث

گزارش شده است که افزایش مدت زمان تیمار سلول‌های برنج با امواج US، همراه با کاهش رشد و زنده‌مانی سلول‌ها است (Liu et al., 2003). Wang و همکاران (۲۰۰۶) نیز مشاهده نمودند که تابش امواج US به سلول‌های گیاه سرخدار (*Taxus yunnanensis*) به کاهش محسوس درصد زنده‌مانی سلول‌ها منجر

هیدروژن به عنوان یکی از گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) همزمان با کاهش رشد سلولی، که در پژوهش حاضر نیز مشاهده گردید، نشان می‌دهد که ممکن است نوعی اختلال یا تغییر فیزیکی در دیواره یا غشای پلاسمایی نظیر تخریب یا تغییر شکل در اثر برخورد امواج US به سطح سلول به وجود آمده باشد. از نخستین واکنش‌های سلول به تنش که طی چند دقیقه پس از القای تنش صورت می‌گیرد، تولید و آزادسازی ROSها نظیر رادیکال سوپر اکسید ( $O_2^{\cdot-}$ )، رادیکال هیدروکسیل ( $OH^{\cdot}$ ) و پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) است. ROSها از عوامل مهم در تنش اکسیداتیو هستند که به طور قابل توجهی رشد سلول و متابولیسم ثانویه را تحت تأثیر قرار می‌دهند. همچنین، ROSها اکسیدکننده‌های قوی هستند که می‌توانند آثار مخربی بر درشت‌مولکول‌های زیستی نظیر DNA، پروتئین‌ها و لیپیدهای غشا داشته باشند و از این طریق موجب تغییر ساختارهای سلول گردند (Banu et al., 2009).

در مورد آثار امواج US بر میزان فلاونوئید تولیدی اطلاعات ناچیزی وجود دارد، اما القای تولید ترکیبات فنلی در گیاهان تحت تیمار امواج فراصوت و شرایط نامساعد و تنش‌زا و همچنین تحت تأثیر الیستورها مشاهده شده است. در راستای نتایج پژوهش حاضر نشان داده شده است که US باعث افزایش تولید ترکیبات فنلی در بادام زمینی شد (Sales and Resurreccion, 2010). همچنین Wu و Lin (۲۰۰۲) نیز نشان دادند که US باعث افزایش تولید ترکیبات فنلی در کشت سلولی جینسینگ گردید. Rezaei و همکاران (۲۰۱۱) نیز افزایش تولید ترکیبات فنلی در سلول‌های فندق تحت اثر امواج US را نشان داده‌اند.

سلول‌ها و تأثیر بر رشد آنها منتهی می‌گردد (Wu and Lin, 2003). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که با گذشت زمان و تحت اثر امواج US، تغییر معنی‌داری در محتوای پروتئینی سلول‌های کتان سفید صورت نگرفت. در مورد تأثیر بیوسنتزی امواج US در سلول گزارش‌هایی وجود دارد. گرچه مشاهده شده است که امواج فراصوت با شدت پایین، بیوسنتز پروتئین‌ها را در سلول‌ها و پروتوپلاست‌های چغندر قند افزایش داد (Joersbo and Brunstedt, 1990). گزارش مشابهی نیز در مورد سلول‌های جانوری گزارش گردیده است (Edmonds and Ross, 1988).

اطلاعات چندانی در زمینه تأثیر US بر پراکسیداسیون لیپیدهای غشاهای سلول‌های گیاهی در دست نیست. در هماهنگی با نتایج به دست آمده، مشاهده شد که امواج US در کشت سلولی تعلیقی سرخدار چینی باعث القای پراکسیداسیون لیپیدها گردید (Wu and Ge, 2004). در مورد القای تولید پراکسید هیدروژن تحت تأثیر US، نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های Wang و همکاران (۲۰۰۶) هماهنگی نشان می‌دهد. آنها مشاهده کردند که تیمار سلول‌های سرخدار (*T. yunnanensis*) با US سبب افزایش تولید پراکسید هیدروژن گردید. Wu و Lin (۲۰۰۲) نیز نشان دادند که تولید پراکسید هیدروژن در سلول‌های جینسینگ در پاسخ به US افزایش یافت. افزون بر این، Rezaei و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که امواج US با شدت کم، باعث القای پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و افزایش تولید پراکسید هیدروژن در سلول‌های فندق شد. افزایش سطح MDA به عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و همچنین پراکسید

Rezaei et al., Komaraiah et al., 2005, Ge, 2004  
2011, Safari et al., 2012).

گزارش شده است که الیسیتورهای شیمیایی و زیستی سبب افزایش متابولیت‌های ثانویه و از جمله تولید پودوفیلوتوکسین در کشت‌های سلولی *Linum album* می‌شوند (Baldi et al., 2008؛ Furden et al., 2005). با توجه به این که امواج US با چنین الیسیتورهایی از نظر ماهیتی متفاوت هست، به نظر می‌رسد که امواج US نه فقط از طریق آثار فیزیکی بر سلول‌ها بلکه از طریق مسیرهای انتقال پیام موجب القای شاخص‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک مرتبط با دفاع و متابولیسم ثانویه شده و باعث افزایش تولید پودوفیلوتوکسین گردیده است. در پژوهش حاضر مشاهده شد که به کارگیری امواج US، باعث القای متابولیسم ثانویه و افزایش ماده مؤثره مهم پودوفیلوتوکسین شد و به بیان دیگر، آثاری شبیه سایر الیسیتورها توسط US بر سلول‌ها اعمال گردید.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که فعالیت آنزیم PAL به طور معنی داری در پاسخ به تیمار US افزایش یافت. نتایج Lin و Wu (۲۰۰۲) مبنی بر این که US فعالیت PAL را در سلول‌های جینسینگ افزایش می‌دهد نیز در راستای نتایج پژوهش حاضر است. همچنین Wang و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که فعالیت این آنزیم تحت تأثیر US در سلول‌های سرخدار (*T. yunnanensis*) افزایش یافت. آنزیم PAL با راه‌اندازی سنتز فنیل پروپانویدهای مختلف نقش مهمی در واکنش گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارد، همچنین نشان داده شده است که الیسیتورهای قارچی، عوامل بیماری‌زا و ایجاد زخم به عنوان یک

ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی از جمله ترکیبات دفاعی هستند که هر دو محصول مسیر بیوستتری فنیل پروپانوییدی هستند. مطالعات متعدد، ارتباط مثبت بین مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان داده‌اند (Cai et al., 2004). فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات اساساً به علت ویژگی احیاکنندگی آنها است که موجب می‌شود تا به عنوان عوامل احیا کننده، دهنده هیدروژن و خاموش کننده گونه‌های فعال اکسیژن نظیر  $H_2O_2$  عمل نمایند. القای تولید چنین ترکیباتی با توجه به افزایش میزان پراکسید هیدروژن و MDA در سلول‌ها در جهت محافظت از اجزای سلولی، اسیدهای چرب غیراشباع، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و نوکلئیک اسیدها است که توسط ROS‌ها مورد حمله قرار می‌گیرند، بنابراین پیشگیری از اختلالات متابولیک و سلولی منطقی به نظر می‌رسد (Martinez-Cayuela, 1995).

در پژوهش حاضر مشاهده شد که امواج US باعث افزایش معنی‌دار تولید پودوفیلوتوکسین در سلول‌ها نسبت به کشت‌های شاهد گردید. اگر چه در مورد تأثیر امواج US بر تولید پودوفیلوتوکسین در سلول‌های کتان سفید اطلاعاتی وجود ندارد اما نشان داده شده است که تیمار کوتاه مدت سلول‌های گیاهی با US با انرژی کم، بیوستتر متابولیت‌های ثانویه ارزشمند نظیر ساپونین‌های جینسنوزید را در سلول‌های *Panax ginseng*، شیکونین‌ها را در سلول‌های *Lithospermum erythrorhizon* آنتراکینون را در *Morinda citrifolia* تاکسول را در سلول‌های فندق و تاکسوئیدها را در سرخدار چینی (*T. chinensis*) افزایش داد (Wu and Lin, 2002؛ Wu and Lin, 2002).

نسبت به تنش‌هایی مانند تنش مکانیکی US، القا شده است. معمولاً چنین پاسخ‌های آنزیمی و متابولیسمی در سلول‌های گیاهی تحت تأثیر تنش‌ها یا الیستورهای زیستی و غیرزیستی در پی سایر واکنش‌های دفاعی سریع، نظیر انفجار اکسیداتیو رخ می‌دهد (Koch *et al.*, 1998). شایان ذکر است که PO نیز همانند ترکیبات فنلی برای جلوگیری از تنش‌های اکسیداتیو مخرب در سلول‌های به عنوان آنتی‌اکسیدان گیاهی ایفای نقش می‌کند (Cai *et al.*, 2004). به طور کلی، القای فعالیت آنزیم‌های PAL، PPO و PO توسط امواج US که در ارتباط با متابولیسم ترکیبات فنلی هستند نشان می‌دهد که این امواج شرایط تنشی را برای سلول‌ها القا کرده و موجب تقویت سازوکارهای دفاعی شده است.

با توجه به این که دست‌ورزی کشت‌های سلولی تحت اثر US بسیار راحت و کم هزینه است، بنابراین امکان استفاده از آن در صنعت می‌تواند کمک زیادی به بالا بردن کارآیی تولید متابولیت‌ها از جمله پودوفیلوتوکسین نماید.

### سپاسگزاری

نگارندگان از جناب آقای دکتر حمید مقبلی و سرکار خانم دکتر سکینه سعیدی‌سار به خاطر همکاری بی‌دریغ در امر مشاوره و تکمیل این اثر، سپاسگزاری می‌نمایند.

محرک مکانیکی باعث القای فعالیت این آنزیم می‌شوند (Lawton and Lamb, 1987). به نظر می‌رسد که با توجه به نتایج به دست آمده تیمارهای اعمال شده به ویژه US با افزایش فعالیت PAL به تجمع ترکیبات فنلی و القای متابولیسم ثانویه منجر گردید.

فعالیت PPO توسط US نیز به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت. PPO در سلول‌های گیاهی ترکیبات فنلی را اکسید کرده، آنها را به کینون‌ها تبدیل می‌کند. بنابراین، میزان واکنش به فعالیت PPO و میزان ترکیبات فنلی بستگی دارد. مشخص شده است که PPO و ترکیبات فنلی در سلول‌ها در بخش‌های مختلف نگهداری می‌شوند. ترکیبات فنلی در واکوئول‌ها و PPO به طور عمده به پلاست‌ها متصل است (Lee, 2000). اکسیداسیون فنل‌ها توسط PPO نیازمند تخریب یا نفوذپذیری بیشتر غشای تونوپلاست برای آزادسازی ترکیبات فنلی به سیتوسل است. بنابراین، به نظر می‌رسد افزایش فعالیت PPO در سلول‌ها تحت اثر تیمارها به ویژه US، به علت آسیب سلولی و افزایش نفوذپذیری غشاهای درون سلولی است.

فعالیت PO نیز همانند دو آنزیم دیگر، تحت اثر US نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشت. آنزیم PO نیز همانند PPO در اکسیداسیون ترکیبات فنلی و تبدیل فرآورده‌های اکسید شده به رنگیزه‌های قهوه‌ای یا سیاه ملانین دخالت دارد (Lee, 2000). افزایش فعالیت PO نیز نشان می‌دهد که پاسخ‌های دفاعی سلول‌های گیاهی

### منابع

- Baldi, A., Jain, A. and Bisaria V. C. (2008) Co-culture of arbuscular mycorrhiza-like fungi (*Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera*) with plant cells of *Linum album* for enhanced production of podophyllotoxin: a first report. *Biotechnology Letter* 30: 1671-1677.
- Banu, M. N. A., Hoque, A., Watanabe-Sugimoto, M., Matsuoka, K., Nakamura, Y., Shimoishi, Y. and

- Murata, Y. (2009) Proline and glycine betaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 166: 146-156.
- Bradford, M. A. (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. and Corke, H. (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences* 74: 2157-2184.
- De Vos, C. H. R., Schat, H., De Waal, M. A. D., Vooijs, R. and Ernst, W. H. O. (1991) Increased resistance to copper-induced damage of the root plasma membrane in copper tolerant *Silene cucubalus*. *Physiologiae Plantarum* 82: 523-528.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P. and Vidal, N. (2006) Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 97: 654-660.
- Dornenburg, H. and Knorr, D. (1995) Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 17: 674-684.
- Dornenburg, H. and Knorr, D. (1997) Evaluation of elicitor and high-pressure-induced enzymatic browning utilizing potato (*Solanum tuberosum*) suspension cultures as a model system for plant tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 4173-4177.
- Edmonds, P. D. and Ross, P. (1988) Protein synthesis by neuroblastoma cells is enhanced by exposure to burst-mode ultrasound cavitation. *Ultrasound in Medicine and Biology* 14: 219-223.
- Esmailzadeh Bahabadi, S., Sharifi, M., Behmanesh, M., Safaie, N., Murata, J., Araki, R., Yamagaki, T. and Satake, H. (2012) Time-course changes in fungal elicitor-induced lignan synthesis and expression of the relevant genes in cell cultures of *Linum album*. *Journal of Plant Physiology* 169: 487-491.
- Frizzell, L. A. (1988) Biological effects of acoustic cavitation. In: *Ultrasound, its chemical, physical and biological effects* (Ed. Suslick, K. S.) 287-303. VCH Publishers, Inc., Weinheim.
- Furden, B. V., Humburg, A. and Fuss, E. (2005) Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures. *Plant Cell Report* 24: 312-317.
- Gordon, A. G. (1971) Beneficial effects of ultrasound on plants, a review. *Ultrasonics* 9: 88-94.
- Joersbo, M. and Brunstedt, J. (1990) Protein synthesis stimulated in sugar beet cells and protoplasts. *Ultrasound in Medicine and Biology* 16: 719-724.
- Joersbo, M. and Brunstedt, J. (1992) Sonication: a new method for gene transfer to plants. *Physiologiae Plantarum* 85: 230-234.
- Koch, J. R., Scherzer, A. J., Eshita, S. M. and Davis, K. R. (1998) Ozone sensitivity in hybrid poplar is correlated with the lack of defense gene activation. *Plant Physiology* 118: 1243-1252.
- Komaraiah, P., Kishor, P. B. K., Carlsson, M., Magnusson, K. E. and Mandenius, C. F. (2005) Enhancement of anthraquinone accumulation in *Morinda citrifolia* suspension cultures. *Plant Science* 168: 1337-1344.
- Lawton, M. A. and Lamb, C. J. (1987) Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding and infection. *Molecular and Cellular Biology* 7(1): 335-341.
- Lee, C. Y. (2000) Enzymatic browning reaction. In: *Encyclopedia of food science and technology* (Ed. Francis, F. J.) 208-218. John Wiley & Sons Inc., New York.

- Lin, L. D. and Wu, J. Y. (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.
- Liu, Y. Y., Yoshikoshi, A., Wang, B. C. and Sakanishi, A. (2003) Influence of ultrasonic stimulation on the growth and proliferation of *Oryza sativa* Nipponbare callus cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 27: 287-293.
- Martinez-Cayuela, M. (1995) Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie* 77: 147-161.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and biassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Ochoa-Alejo, N. and Gomez-Peralta, J. E. (1993) Activity of enzymes involved in capsaicin biosynthesis in callus tissue and fruits of chili pepper (*Capsicum annum* L.). *Journal of Plant Physiology* 141: 147-152.
- Rezaei, A., Ghanati, F. and Behmanesh, M. (2011) Ultrasound potentiated salicylic acid-induced physiological effects and production of taxol in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cell culture. *Ultrasound in Medicine and Biology* 37: 1938-1947.
- Safari, M., Ghanati, F., Hajnorouzi, A., Rezaei, A., Abdolmaleki, P. and Mokhtari-Dizaji, M. (2012) Maintenance of membrane integrity and increase of taxanes production in hazel (*Corylus avellana* L.) cells induced by low-intensity ultrasound. *Biotechnology Letters* 34: 1137-1141.
- Sales, J. M. and Resurreccion, A. V. A. (2010) Phenolic profile, antioxidants and sensory acceptance of bioactive-enhanced peanuts using ultrasound and UV. *Food Chemistry* 122: 795-803.
- Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated been plants protective role of exogenous polyamines. *Plant Science* 151: 59-66.
- Wang, J. W., Zheng, L. P., Wu, J. Y. and Tan, R. X. (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.
- Wood, B. E., Aldrich, H. C. and Ingram, L. O. (1997) Ultrasound stimulation of ethanol production during the simultaneous saccharification and fermentation of mixed waste office paper. *Biotechnology Progress* 13: 232-237.
- Wu, J. and Ge, X. (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.
- Wu, J. and Lin, L. (2002) Ultrasound-induced stress responses of *Panax ginseng* cells: enzymatic browning and phenolics production. *Biotechnology Progress* 18: 862-866.
- Wu, J. and Lin, L. (2003) Enhancement of taxol production and release in *Taxus chinensis* cell cultures by ultrasound, methyl jasmonate and *in situ* solvent extraction. *Applied Microbiology and Biotechnology* 62: 151-155.

## Induction of defensive responses and production of secondary metabolites in *Linum album* cell culture by ultrasound

Armaghan Abedzadeh Neyshabouri<sup>1</sup> and Ayatollah Rezaei<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran

<sup>2</sup> Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran

### Abstract

Ultrasound (US) with low intensity is considered as a physical tool to stimulate living systems in medicine and biotechnology. This study aim to survey the US effects on some physiological parameters and podophyllotoxin production in *Linum album* cell culture. The cell cultures were treated with US waves with a frequency of 40 kHz and the power 5 Wcm<sup>-3</sup>, in a time dependent experiment with 3 replicates and the cells were collected at 24, 48 and 72 h after the treatment. Evaluated parameters were cell growth, contents of total protein, MDA, hydrogen peroxide, phenolics, flavonoids, activity of peroxidase, polyphenol oxidase, phenylalanine ammonia-lyase and podophyllotoxin. The results showed that cell growth was significantly decreased by the US, but there was no significant change in protein content. The amount of hydrogen peroxide, membrane lipid peroxidation and activity of peroxidase, polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia-lyase enzymes were increased in cells under the effect of US, compared to control. Also US increased the production of phenolic compounds, flavonoids and podophyllotoxin in treated cells. Maximum amount of podophyllotoxin was obtained in treated cultures after 72 hours which was the 268.9 µg/g DW (2.7 times that of the control). It seems that US by stimulating cells and induction of defensive responses and secondary metabolism increased the amount of podophyllotoxin in cells of *Linum album* plant.

**Key words:** Ultrasound, *Linum album*, Cell culture, Podophyllotoxin

---

\* Corresponding Author: arezaei@shahed.ac.ir