زیست‌شناسی گیاهی، سال سوم، شماره هفتم، بهار ۱۳۹۰، صفحه ۵۵ - ۷۲
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۹/۱۳
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۹/۱۲/۰۸
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۰/۰۲/۱۴

# افزایش تولید و آزادسازی تاکسول توسط متیل جاسمونات، امواج فراصوت و دی بوتیل فتالات در کشت سلولی فندق (*Corylus avellana* L.)

آیت‌اله رضایی، فائزه قناتی[۱*] و مهرداد بهمنش[۲]
[۱] گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[۲] گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

## چکیده

این تحقیق، برای بررسی تأثیر متیل جاسمونات، امواج فراصوت و استخراج در جا (*In situ*) به صورت انفرادی و همزمان بر رشد، برخی از شاخص‌های فیزیولوژیک و تولید تاکسول در کشت سلولی فندق صورت گرفت. کشت سلولی از قطعات جداکشت دانه فندق روی محیط کشت جامد MS که دارای ۴،۲- دی کلروفنوکسی استیک اسید و بنزیل آدنین به ترتیب با غلظت‌های ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بود، به دست آمد. متیل جاسمونات با غلظت ۱۰۰ µM، امواج فراصوت با شدت ۴۰ کیلو هرتز و از حلال آلی دی بوتیل فتالات با غلظت ۱۰ درصد (v/v) جهت استخراج در جا استفاده شد. نتایج نشان داد که رشد سلولی و زنده‌مانی سلول‌ها تحت اثر تیمارها نسبت به شاهد کاهش یافت. مقدار پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در سلول‌ها نسبت به شاهد تحت اثر تیمارها افزایش یافت. فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز تحت اثر تیمارها نسبت به شاهد افزایش یافت. کلیه تیمارها باعث افزایش تولید تاکسول شده، مقدار تاکسول برون سلولی نسبت به تاکسول درون سلولی بیشتر تحت تأثیر قرار گرفت. همچنین، کلیه تیمارها باعث افزایش آزادسازی تاکسول و عملکرد ویژه نسبت به شاهد گردیدند. بیشترین تولید تاکسول، درصد آزادسازی و عملکرد ویژه تحت اثر کاربرد همزمان دی بوتیل فتالات و فراصوت به ترتیب به مقدار ۳۲۸۹/۲۲ µg/L، ۹۸/۳۹ درصد و ۲۶۴/۳۱ میکروگرم بر گرم وزن خشک به دست آمد. دی بوتیل فتالات به صورت قابل توجهی باعث تقویت اثر دیگر عوامل، به ویژه در خصوص تولید تاکسول برون سلولی و تاکسول کل، آزادسازی تاکسول و عملکرد ویژه گردید.

**واژه‌های کلیدی**: فندق، کشت سلولی، تاکسول، استخراج در جا، متیل جاسمونات، امواج فراصوت

## مقدمه

تاکسول یک آلکالوئید دی ترپنوئید است که برای استفاده در درمان سرطان‌های سینه، تخمدان و ریه و همچنین سارکومای کاپوزی وابسته به ایدز (AIDS-related Kaposi's sarcoma) تأیید شده، به همراه دیگر ترکیبات وابسته نظیر سفالومانین و باکاتین III در

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: ghangia@modares.ac.ir، شماره تماس: ۰۲۱۸۲۸۸۴۴۰۳

سلول‌های گیاهان معدودی نظیر سرخدار (*Taxus* spp.) و همچنین برخی از قارچ‌ها و باکتری‌هایی که سرخدار را آلوده می‌کنند، تولید می‌شود (Bestoso *et al*., 2006). تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که گیاه فندق و کشت سلولی آن نیز ترکیبات دتاکسان از جمله تاکسول تولید می‌کند (Bestoso *et al*., 2006; Hoffman and Shahidi, 2009; Rezaei *et al*., 2010).

تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان، بخشی از پاسخ‌های دفاعی در برابر حملات پاتوژنی است که توسط محرک‌ها القا و فعال می‌شوند. محرک‌هایی که غالباً در مطالعات مورد استفاده می‌شوند، شامل کربوهیدرات‌های قارچی، عصاره مخمر، متیل جاسمونات (Methyl Jasmonate, MJ)، سالیسیلیک‌اسید و کیتوزان هستند. مطالعات نشان می‌دهند که مسیرهای انتقال پیام متعددی در القای تجمع متابولیت‌های ثانویه بر اثر محرک‌ها دخالت دارند و در میان آنها جاسمونیک‌اسید و مشتقات آن نظیر MJ به عنوان سیگنال‌های حدواسط مشخص شده‌اند و سنتز سریع آنها چه در گیاه کامل و چه در کشت‌های سلولی تأیید شده است که ضمن القای واکنش‌های دفاعی به افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه منجر می‌گردد (Zhao *et al*., 2005).

امواج فراصوت (Ultrasound, US) با شدت زیاد برای ترکیبات زیستی مخرب بوده، غشای سلول‌ها را تخریب می‌کند و مولکول‌های زیستی نظیر آنزیم‌ها و DNA را غیر فعال می‌سازد (Ferizzell, 1988). از طرف دیگر، نشان داده شده است که US با شدت و انرژی کم، طیفی از تأثیرات زیستی غیر کُشنده داشته که از اهمیت بالقوه‌ای در بیوتکنولوژی برخوردار است. یکی از گسترده‌ترین آثار غیر مخرب US روی سلول‌های زنده، افزایش نفوذپذیری غشاست 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 و بیوسنتز در سلول‌ها و پروتوپلاست‌های گیاهی استفاده شده است (Joersbo and Brunstedt, 1992). اخیراً مطالعات پراکنده‌ای برروی تأثیرات زیستی US در کشت سلول گیاهی صورت گرفته، ولی در خصوص آثار تحریک‌کننده US بر سنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهی بسیار کم کار شده است.

تجمع فرآورده‌ها در درون سلول یا در محیط‌کشت ممکن است سبب مهار بیوسنتز آنها به صورت بازخوردی شده، و یا به تخریب و تبدیل فرآورده منجر شود. بدین جهت برداشت سریع فرآورده‌ها از سلول‌ها و محیط‌کشت، به کمک ماده جاذب جامد یا یک حلال آلی از طریق تشکیل یک سیستم کشت دو فازی، می‌تواند تولید فرآورده را افزایش دهد (Wang *et al*., 2001). در کشت دو فازی از یک سیستم جداکننده برای هدایت فرآورده خارج سلولی به یک فاز ثانوی معمولاً غیر قطبی استفاده می‌شود. این نوع کشت نه تنها تخلیص متابولیت ثانویه را به صورت برداشت در جا (*In situ*) تسهیل می‌کند، بلکه تولید را نیز افزایش می‌دهد.

امروزه کشت سلول گیاهی به عنوان یکی از منابع جایگزین و تجدیدپذیر برای تولید متابولیت‌های ثانویه شناخته شده است. استراتژی‌های مختلفی شامل انتخاب لاین سلولی، بهینه‌سازی محیط‌کشت و تکنیک‌های ویژه، نظیر محرک و کشت دو فازی برای استخراج در جا در خصوص متابولیت‌های ثانویه و افزایش تولید آنها پیشنهاد شده است. با توجه به اینکه گیاه فندق و کشت سلولی آن به عنوان منبع جدید تاکسول معرفی شده، و از برخی جهات از قبیل فراوانی و سهولت دسترسی، کشت و کار وسیع و

القا و نگهداری راحت‌تر کالوس مزیت‌هایی دارد و از طرفی، نشان داده شده است که غالباً یک رابطه هم‌افزایی بین محرک‌های مختلف در تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه یا کشت‌های سلولی وجود دارد (Zhao *et al.*, 2005)، بنابراین، در این تحقیق سعی شده است تا با استفاده از محرک‌های فیزیکی و شیمیایی در محیط کشت دو فازی، ضمن اندازه‌گیری شاخص‌های مختلف فیزیولوژیک، عملکرد سلول‌های فندق در محیط کشت تعلیقی از نظر تولید تاکسول نیز ارزیابی گردد.

## مواد و روش‌ها

### القای تولید کالوس و راه‌اندازی کشت سلولی

بذرهای تازه فندق رقم گرد اشکور که بومی ایران بوده و در منطقه اشکورات (شهرستان رودسر، گیلان) به فراوانی کشت گردیده است، در شهریور ماه جمع‌آوری و برای القا و تولید کالوس استفاده شد. پوسته چوبی بذرها جدا و دانه پس از شستشو با مایع ظرف‌شویی و سه بار آبکشی با آب شیر، به مدت ۲۰ دقیقه توسط هیپوکلریت سدیم تجاری (با ۵/۲۵ درصد کلر فعال) ضد عفونی گردید و مجدداً سه بار توسط آب استریل شستشو شد؛ بدین ترتیب که لپه‌ها به دو بخش تقسیم شدند و در محیط MS، اسیدیته ۵/۵، آگار ۰/۸ درصد، سوکروز ۳۰ گرم در لیتر و تنظیم‌کننده‌های رشد 4,2- دی کلروفنوکسی استیک اسید و بنزیل آدنین به ترتیب با غلظت‌های یک و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کشت گردیدند و در تاریکی نگهداری شدند (شایان ذکر است که مقدار و نسبت تنظیم‌کننده‌های رشد پس از بهینه‌سازی محیط کشت برای القا و رشد کالوس به دست آمد). پس از گذشت ۱۰ تا ۱۴روز کالوس‌ها ظاهر شدند و هر دو هفته یک بار واکشت گردیدند. برای تهیه کشت تعلیقی دو گرم کالوس نرم، سفید، همسان و همسن (پس از چندین ماه واکشت) به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS با ترکیبات هورمونی ذکر شده در بالا بدون آگار اضافه شد و بر روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در تاریکی نگهداری و هر دو هفته یک بار واکشت گردید.

### تیمار سلول‌ها با متیل جاسمونات، دی بوتیل فتالات و امواج فراصوت

غلظت‌های مناسب متیل جاسمونات و دی بوتیل فتالات (Dibutyl phthalate, DBP) و توان امواج فراصوت و نیز زمان اعمال هر تیمار با توجه به منابع موجود و پس از انجام آزمون‌های مقدماتی بر اساس بیشترین مقدار تولید تاکسول انتخاب گردید. محلول استوک متیل جاسمونات (Sigma) با غلظت ۰/۱ مولار در اتانول ۷۰٪ تهیه و توسط فیلتر ۰/۲ میکرومتر استریل شد. سپس با حجم مشخص در روز هشتم پس از واکشت به محیط کشت تعلیقی اضافه شد؛ به طوری که غلظت نهایی ۱۰۰ میکرومولار از آن به دست آمد. کشت‌های شاهد توسط حجم مشابهی از اتانول ۷۰٪ تیمار شدند. دی بوتیل فتالات (Merck) نیز پس از استریل نمودن توسط اتوکلاو در روز دهم پس از واکشت، با غلظت ۱۰٪ به محیط کشت فاقد یا واجد MJ با غلظت فوق الذکر اضافه شد. امواج US (فرکانس ۴۰ کیلو هرتز با توان ۱۰۰ درصد) توسط حمام اولتراسونیک دیجیتال (Falc، ایتالیا)، به مدت زمان سه دقیقه و دو بار (روز دهم و دوازدهم پس از واکشت) به صورت جداگانه و ترکیب با MJ یا DBP بر سلول‌ها در محیط کشت تعلیقی تابانده شده، آثار آن ارزیابی شد. دما در طول تیمار ۲۵ درجه سانتیگراد ثابت نگه داشته شد. در روز چهاردهم پس از واکشت، سلول‌ها

برداشت شدند و واکنش آنها در ارتباط با تولید تاکسول و دیگر شاخص‌های فیزیولوژیک پس از برداشت آنها ارزیابی شد.

**اندازه‌گیری رشد سلولی و تعیین توان زیستی سلول‌ها**

رشد سلولی با اندازه‌گیری افزایش در وزن خشک سلول‌ها تعیین شد. بدین منظور، سلول‌ها از محیط کشت جدا شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای $^{oC}$۳۵ خشک و سپس توزین گردیدند. برای تعیین توان زیستی، یک قطره از کشت‌های تعلیقی حاوی سلول بر روی لام قرار داده شد و یک قطره از محلول آبی ۰/۱ درصد اوانس بلو (Evans Blue) به آن اضافه گردید. پس از گذشت چهار دقیقه سلول‌ها با آب مقطر شستشو داده شده، در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. با شمارش سلول‌هایی که کاملاً به رنگ آبی در آمده بودند (سلول‌های مرده) و سلول‌هایی که فقط دیواره آنها رنگ آبی به خود گرفته بود (سلول‌های زنده) درصد توان زیستی سلول‌ها تعیین گردید (Schützendübel *et al*., 2001).

**آنالیزهای بیوشیمیایی**

به منظور ارزیابی میزان تأثیر تیمارهای به کار رفته بر غشای سلول‌ها، مقدار مالون دی آلدیید (MDA) به عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشا به روش DeVos و همکاران (۱۹۹۱) سنجیده شد. بدین منظور ۲۰۰ میلی گرم از سلول‌های منجمد شده با سه میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید ۱۰٪ ساییده شد. نمونه‌ها پس از همگن‌سازی، سانتریفوژ (۱۲۰۰۰ rpm، ۱۵ دقیقه) شدند. به یک میلی‌لیتر از نمونه‌های صاف شده، یک میلی‌لیتر تیو باربیتوریک اسید ۰/۲۵٪ اضافه شد و به مدت نیم ساعت در دمای $^{°C}$۱۰۰ قرار داده شدند. پس از سرد شدن نمونه‌ها، در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر جذب آنها اندازه‌گیری شد. مقدار MDA به کمک ضریب خاموشی /mM/cm ۱۵۵محاسبه گردید. مقدار پراکسید هیدروژن بر اساس روش (Velikova *et al*., 2000) سنجیده شد. بدین منظور ۲۰۰ میلی‌گرم توده سلولی منجمد شده با ۵ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید برروی یخ ساییده شد. نمونه‌ها پس از همگن‌سازی، سانتریفوژ (۱۲۰۰۰ rpm، ۱۵ دقیقه) شدند. به ۰/۵ میلی‌لیتر از بخش شناور رویی، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم (۱۰ میلی‌مولار، pH=۷) و یک میلی‌لیتر یدید پتاسیم اضافه شد و جذب آن در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. با استفاده از منحنی استاندارد مقدار پراکسید هیدروژن محاسبه گردید. مقدار پروتئین بر اساس روش برادفورد (Bradford, 1976) سنجیده شد.

از آنجا که تحریک سلول‌های گیاهی با محرک‌های فیزیکی نظیر US، یا شیمیایی نظیر MJ به طور معمول سبب به راه افتادن مسیرها ترارسانی پیام می‌شود و این مسیرها نیز به نوبه خود ممکن است به تولید ترکیبات فنلی و سایر متابولیت‌های ثانوی منتهی شود، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز(PAL) به عنوان یک آنزیم کلیدی در این مسیر ارزیابی شد. فعالیت این آنزیم بر اساس مقدار تولید سینامیک اسید (CA) اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، ۲۰۰ میلی‌گرم سلول منجمد شده با ۶/۵ میلی‌لیتر بافر تریس-HCl (۵۰ میلی‌مولار، pH=۸/۸) حاوی بتا-مرکاپتواتانول (۱۵ میلی‌مولار) در هاون بر روی یخ به مدت ۲ دقیقه ساییده شد. سپس نمونه‌ها پس از همگن‌سازی، سانتریفوژ شدند (۱۵۰۰۰ rpm، ۳۰ دقیقه) و بخش شناور رویی برای سنجش فعالیت PAL استفاده شد. مخلوط واکنش شامل یک میلی‌لیتر از بافر استخراج، ۰/۵ میلی‌لیتر از L-فنیل آلانین ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۴ میلی‌لیتر از آب

دیونیزه و ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره حاوی آنزیم به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. واکنش با افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر HCl ۶ مولار متوقف شد و فرآورده آن به کمک اتیل استات استخراج شد. اتیل استات تبخیر شد و باقیمانده در ۳ میلی‌لیتر سود ۰/۰۵ مولار حل گردید. غلظت سینامیک اسید با اندازه‌گیری مقدار جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر و به کمک استاندارد سینامیک اسید تعیین شد. یک واحد از فعالیت PAL برابر با یک میکرو گرم از سینامیک اسید تولید شده در ساعت در نظر گرفته شد (Ochoa-Alejo and Gomez-Peralta, 1993).

## استخراج و اندازه‌گیری تاکسول

برای استخراج تاکسول درون سلولی یا پیوسته به سلول، سلول‌های خشک شده (۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد در آون تهویه‌دار) کاملاً پودر شدند، متانول به آن اضافه شد و به مدت ۴۰ دقیقه مخلوط حاصله در سونیکاتور قرار گرفت. سپس مخلوط فیلتر شده و عصاره متانولی تبخیر گردید. به بخش باقیمانده به نسبت یک به یک دی کلرومتان و آب اضافه شد و به شدت تکان داده شد. فاز دی کلرومتان که حاوی تاکسول است، از آب جدا و تبخیر شد. در مورد تاکسول برون سلولی یا موجود در محیط‌کشت، به محیط‌کشت صاف شده و فاقد سلول به نسبت یک به یک دی کلرومتان اضافه شد و شدیداً تکان داده شد. فاز دی کلرومتان جدا و تبخیر شد. باقیمانده‌های حاصله در ۲۵۰ میکرولیتر متانول حل شد. سپس برای انجام HPLC توسط فیلتر ۰/۴۵ میکرون فیلتر شد. برای شناسایی و تعیین مقدار تاکسول از HPLC (Knauer, Germany) به کمک استاندارد تاکسول (Sigma) استفاده شد. ستون مورد استفاده عبارت بود از: فرمول ماده درونی و نوع ستون Perfectsil Target ODS-3 (5µm) به ابعاد 4.6 mm×250 (مدل MZ-Analysentechnik, Mainz, Germany)، فاز متحرک متانول و آب (v/v:۴۵/۵۵) هر یک حاوی ۰/۱ ٪ استیک اسید به صورت گرادیان زمانی با جریان فاز مایع یک میلی‌لیتر در دقیقه و طول موج مورد استفاده ۲۲۷ نانومتر بود (Yuan *et al.*, 2002; Bestoso *et al.*, 2006). طول زمان انجام HPLC ۲۵ دقیقه و حجم تزریق به دستگاه ۲۰ میکرو لیتر بود. مقدار آزادسازی تاکسول از تقسیم تاکسول برون سلولی بر تاکسول کل برحسب درصد به دست آمد و عملکرد ویژه به صورت مقدار تاکسول تولید شده به ازای یک گرم ماده خشک محاسبه گردید.

## آنالیز آماری

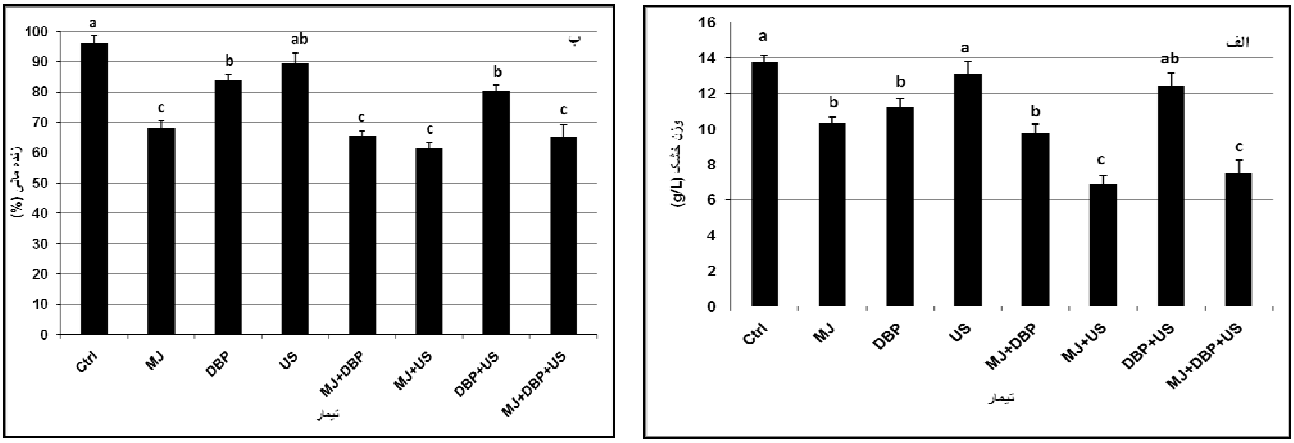
تیمارهای مورد بررسی به صورت جداگانه و ترکیبی روی سلول‌ها در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با سه تکرار صورت گرفت و تأثیر آنها روی شاخص‌های ذکر شده توسط نرم‌افزار Excel مورد بحث و بررسی قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون Student's t-test در سطح P≤0/05 صورت گرفت.

## نتایج

### اثر متیل جاسمونات، دی بوتیل فتالات و فراصوت بر رشد و توان زیستی سلول‌ها

اثر تیمارهای MJ، DBP و US به صورت انفرادی و ترکیبی روی رشد و زنده‌مانی سلول‌های فندق در شکل ۱- الف و ب نشان داده شده است. همان طور که ملاحظه می‌شود، کلیه تیمارها باعث کاهش رشد و زنده‌مانی سلول‌ها در محیط‌کشت تعلیقی شدند. در حالت تیمار انفرادی بیشترین کاهش معنی‌دار در رشد و زنده‌مانی تحت تأثیر محرک MJ مشاهده گردید که به ترتیب ۱۰/۳۳ گرم

در لیتر و ۶۸/۱ درصد بود و کمترین اثر مربوط به تیمار US بود که نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد. DBP نیز به صورت معنی‌داری باعث کاهش این صفات نسبت به شاهد گردید. به کارگیری MJ همراه با سایر عوامل موجب تشدید اثر آنها روی کاهش رشد و زنده‌مانی گردید و این اثر منفی، به ویژه به همراه تیمار US نسبت به بقیه مشهودتر بود، به طوری که کمترین مقدار رشد در تیمارهای ترکیبی MJ و US و تیمار شامل هر سه عامل مشاهده گردید که به ترتیب ۶/۸ و ۷/۵ گرم در لیتر بود. تیمار DBP نیز در حضور US باعث کاهش معنی‌دار فقط در زنده‌مانی سلولی نسبت به شاهد گردید، اما صفت رشد را اگر چه کاهش داد، ولی این اثر معنی‌دار نبود. در حالت به کارگیری تیمارهای فوق الذکر به صورت همزمان، MJ آثار منفی تیمار ترکیبی DBP و US را روی صفات مذکور به صورت معنی‌داری تقویت نمود و باعث کاهش معنی‌دار در مقدار رشد تا ۷/۵ گرم در لیتر و زنده‌مانی تا ۶۵/۱۷ درصد گردید. با مقایسه شکل‌ها روند تغییرات مشاهده شده در رشد و زنده‌مانی سلولی مشابه به نظر می‌رسد.

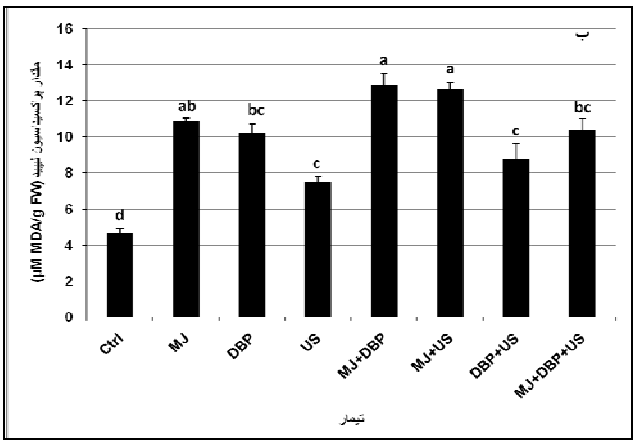


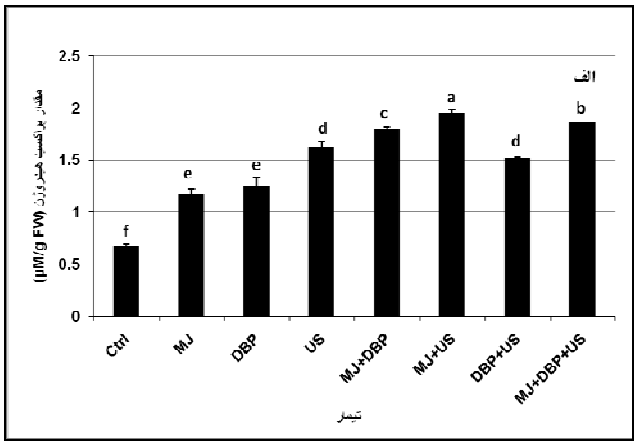

شکل ۱- اثر تیمارهای متیل جاسمونات (MJ)، دی بوتیل فتالات (DBP) و فراصوت (US) به صورت انفرادی و ترکیبی بر روی الف) وزن خشک و ب) زنده‌مانی در کشت سلولی فندق. داده‌ها میانگین ۳ تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار است. حروف غیر یکسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P\leq 0/05$ است.

## اثر متیل جاسمونات، دی بوتیل فتالات و فراصوت بر مقدار پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدها

همان طور که شکل ۲- الف نشان می‌دهد، کلیه تیمارها باعث افزایش معنی‌دار مقدار پراکسید هیدروژن در سلول‌ها در مقایسه با شاهد گردیدند. در حالت تیمار انفرادی، US نسبت به بقیه مؤثرتر عمل کرد و باعث بیشترین میزان تولید پراکسید هیدروژن شد. در حالت تیمار ترکیبی، MJ باعث تقویت اثر DBP و US شد و US نیز اثر DBP را افزایش داد. بیشترین افزایش در مقدار پراکسید هیدروژن تحت تیمار ترکیبی MJ و US مشاهده گردید و در این خصوص تیمار همزمان هر سه عامل در مرتبه بعدی قرار داشت. تیمار همزمان هر سه عامل باعث تولید بیشتر پراکسید هیدروژن نسبت به اثر آنها به صورت جداگانه گردید.

مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی که به عنوان شاخصی از تنش است نیز تحت تأثیر کلیه تیمارها نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد (شکل ۲- ب). بیشترین مقدار این شاخص در حالت تیمار انفرادی، تحت تأثیر MJ و DBP مشاهده شد و کمترین آن مربوط به US بود. در حالت تیمار ترکیبی حضور MJ در کنار دو عامل دیگر باعث تولید بیشترین MDA گردید.

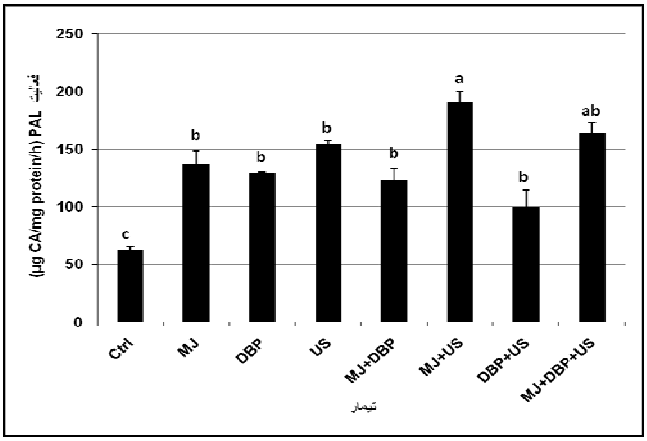



شکل ۲- اثر تیمارهای متیل جاسمونات (MJ)، دی بوتیل فتالات (DBP) و فراصوت (US) به صورت انفرادی و ترکیبی بر روی الف) مقدار پراکسید هیدروژن؛ ب) مقدار پراکسیداسیون لیپید در کشت سلولی فندق. داده‌ها میانگین ۳ تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار است. حروف غیر یکسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $p\leq 0/05$ است.

## اثر متیل جاسمونات، دی بوتیل فتالات و فراصوت بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)

فعالیت آنزیم PAL به صورت معنی‌داری در پاسخ به کلیه تیمارها نسبت به شاهد افزایش نشان داد (شکل ۳). تیمار US در حالت انفرادی بیشترین افزایش را در فعالیت آنزیم PAL سبب گردید و نسبت به بقیه تیمارها به استثنای تیمار هم زمان هر سه عامل، این تفاوت معنی‌دار بود. کاربرد ترکیبی MJ و US در حالت تیمار ترکیبی باعث بیشترین فعالیت به صورت معنی‌دار گردید و نسبت به تیمار جداگانه آنها بیشتر بود. کمترین فعالیت آنزیم PAL تحت کاربرد ترکیبی DBP و US در مقایسه با دیگر تیمارها مشاهده گردید، اما نسبت به آنها معنی‌دار نبود. تیمار همزمان هر سه عامل باعث افزایش بیشتر در فعالیت PAL نسبت به تیمار جداگانه آنها گردید؛ اگر چه معنی‌دار نبود.




شکل ۳- اثر تیمارهای متیل جاسمونات (MJ)، دی بوتیل فتالات (DBP) و فراصوت (US) به صورت انفرادی و ترکیبی بر روی فعالیت آنزیم PAL در کشت سلولی فندق. سینامیک اسید (CA). داده‌ها میانگین ۳ تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار است. حروف غیر یکسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P\leq 0/05$ است.

## اثر متیل جاسمونات، دی بوتیل فتالات و فراصوت بر تولید و آزادسازی تاکسول

کلیه تیمارها باعث افزایش معنی‌دار تولید تاکسول برون سلولی و تاکسول کل نسبت به شاهد گردیدند (جدول ۱). در خصوص تاکسول درون سلولی نیز کلیه تیمارها به استثنای تیمار ترکیبی MJ و DBP باعث افزایش آن شدند. در میان تیمارهای اعمال شده به صورت انفرادی تأثیر DBP روی تاکسول برون سلولی نسبت به بقیه به صورت قابل توجهی بیشتر بود. تیمارهای DBP، MJ و US به ترتیب باعث افزایش تولید تاکسول برون سلولی به مقدار ۱۸۴، ۶/۷ و ۶ برابر نسبت به شاهد گردیدند. در بین تیمارهای ترکیبی بیشترین مقدار تاکسول برون سلولی تحت اثر کاربرد همزمان DBP و US مشاهده گردید که باعث افزایش ۲۴۹/۴ برابری تولید تاکسول برون سلولی نسبت به شاهد گردید. DBP اثر MJ و US را در این خصوص تقویت نمود، اما به همراه US بسیار مؤثرتر نسبت به وقتی که به همراه MJ اعمال شد، عمل کرد. تیمار همزمان MJ و US نیز نسبت به تیمار جداگانه آنها قوی‌تر اثر کرد. نکته قابل توجه در ارتباط با تولید تاکسول برون سلولی اثر حلال آلی DBP بود که چه به صورت تنها و چه به همراه دیگر عوامل، موجب القای تولید این نوع تاکسول به مقدار قابل توجهی گردید. اثر تیمارها به صورت جداگانه نیز باعث افزایش تاکسول درون سلولی نسبت به شاهد گردید، اما در مقایسه با تاکسول برون سلولی کمتر بود (جدول ۱). تاکسول درون سلولی تحت تأثیر تیمارهای DBP، MJ و US به ترتیب ۱/۸، ۲/۲ و ۱/۴ برابر نسبت به شاهد افزایش یافت. اثر ترکیب MJ و دیگر عوامل روی تولید تاکسول درون سلولی چندان در مقایسه با تاکسول برون سلولی نسبت به شاهد موفق نبود و حتی تیمار همزمان MJ و DBP باعث کاهش تاکسول درون سلولی نسبت به شاهد گردید. در این حالت، بیشترین تاکسول درون سلولی تحت اثر کاربرد همزمان MJ و US مشاهده گردید. با توجه به نتایج به دست آمده، به نظر می‌رسد عامل‌های DBP و US چه به تنهایی و چه همراه با MJ به علت نفوذپذیری بیشتر غشای سلولی، باعث هدایت بیشتر تاکسول تولیدی به سمت خارج سلول شده، تاکسول برون سلولی را بسیار افزایش دادند. در مقام مقایسه، تاکسول درون سلولی افزایش کمتری داشت. بررسی اثر تیمارها برروی تاکسول کل نشان می‌دهد که در حالت تیمار انفرادی DBP نسبت به بقیه بسیار بیشتر تأثیر گذاشته، باعث افزایش تولید تاکسول به مقدار ۴۱ برابر نسبت به شاهد گردید. تیمارهای MJ و US نیز به ترتیب باعث افزایش ۳/۲ و ۲/۴ برابری تولید تاکسول کل نسبت به شاهد گردیدند. در بین تیمارهای ترکیبی، کاربرد ترکیبی DBP و US نسبت به بقیه تأثیر قابل توجه‌تری داشت و سبب افزایش ۵۴/۶ برابری تاکسول کل نسبت به شاهد گردید. کمترین تأثیر مربوط به تیمار همزمان MJ و US بود. با توجه به نتایج به دست آمده حضور حلال آلی DBP در کنار سایر تیمارها باعث تقویت اثر آنها به صورت قابل توجهی، به ویژه در خصوص تاکسول برون سلولی و تاکسول کل گردید (جدول ۱).

درصد آزادسازی تاکسول از سلول‌ها و ورود آن به محیط‌کشت تحت اثر تیمارها در جدول ۱ نشان داده شده است. همان طورکه ملاحظه می‌شود، کلیه تیمارها نسبت به شاهد باعث افزایش آزادسازی تاکسول گردیدند. در حالت تیمار انفرادی DBP بیشترین آزادسازی را به مقدار ۹۶/۵۷ درصد باعث گردید. تیمار US نسبت به MJ در این

خصوص مؤثرتر عمل کرد و به نظر می‌رسد MJ بیشتر تولید تاکسول درون سلولی را القا نمود و به همین خاطر کمترین درصد آزادسازی را سبب گردید. در حالت تیمار ترکیبی DBP اثر دیگر عوامل را به مقدار قابل توجهی تقویت نمود و بیشترین درصد آزادسازی تحت اثر کاربرد ترکیبی این ماده و US به مقدار ۹۸/۳۹ درصد مشاهده گردید. کمترین درصد آزادسازی در حالت تیمار ترکیبی تحت اثر کاربرد ترکیبی MJ و US مشاهده شد که نسبت به شاهد ۳ برابر بود. عملکرد ویژه سلول‌ها در تولید تاکسول نیز تحت تأثیر تیمارها قرار گرفت (جدول ۱). در بین تیمارها به صورت انفرادی DBP نسبت به بقیه تأثیر قابل توجه تری داشت و باعث افزایش عملکرد ویژه به مقدار ۵۰/۴ برابر نسبت به شاهد گردید. MJ و US در مقام بعدی قرار داشتند که به ترتیب عملکرد ویژه را ۴/۲۵ و ۲/۵ برابر نسبت به شاهد افزایش دادند. در حالت تیمار ترکیبی DBP اثر MJ و US را تقویت نمود، به طوری که بیشترین عملکرد ویژه به مقدار ۲۶۴/۳۱ µg/g cell تحت اثر تیمار ترکیبی DBP و US مشاهده گردید. MJ هم اثر US را در این خصوص تقویت نمود. انتظار می‌رفت که کاربرد هر سه عامل با هم تأثیر بیشتری نسبت به یکایک آنها یا دیگر حالات روی تولید تاکسول، آزادسازی آن و عملکرد ویژه داشته باشد، اما چنین نشد. از یک سو ممکن است کاربرد ترکیبی MJ و DBP ضمن کاهش زیاد رشد سلول‌ها سبب کاهش هرچه بیشتر ظرفیت بیوسنتزی آنها نیز شده باشد. از سوی دیگر، احتمال بر همکنش این مواد با یکدیگر در تیمار ترکیبی نیز وجود دارد. برای مثال، ممکن است که MJ به سبب حلالیت زیاد در DBP، به اندازه کافی در اختیار سلول‌ها قرار نگرفته باشد و عدم مشاهده اثرات هم‌افزایی MJ و DBP در کاربرد ترکیبی این دو نیز به همین سبب باشد.

جدول ۱- اثر تیمارهای متیل جاسمونات (MJ)، دی بوتیل فتالات (DBP) و فراصوت (US) به صورت انفرادی و ترکیبی روی تولید تاکسول، آزادسازی تاکسول و عملکرد ویژه سلول‌ها در کشت سلولی فندق. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیاراست. در هر ستون حروف غیر یکسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P\leq 0/05$ است.

| تیمار | تاکسول (µg/L) | | | آزادسازی تاکسول (٪) | عملکرد ویژه (µg/g cell) |
|---|---|---|---|---|---|
| | برون سلولی | درون سلولی | کل | | |
| شاهد | ۱۲/۹۷±۱/۸۸ h | ۴۷/۲۲±۰/۱۴ d | ۶۰/۱۹±۲/۰۲ f | ۲۱/۵۵ | ۴/۳۷ |
| MJ | ۸۷/۳۱±۵/۳۱ fg | ۱۰۴/۴۰±۰/۲۸ a | ۱۹۱/۷۱±۵/۵۹ d | ۴۵/۵۴ | ۱۸/۵۵ |
| DBP | ۲۳۸۵/۵±۳۴/۷۴ b | ۸۴/۶۰±۲/۸۶ b | ۲۴۷۰/۱۰±۳۷/۶۰ b | ۹۶/۵۷ | ۲۲۰/۱۱ |
| US | ۷۶/۸۴±۱۴/۹۵ g | ۶۵/۲۸±۰/۲۱ c | ۱۴۲/۱۲±۱۵/۱۶ e | ۵۴/۰۶ | ۱۰/۴ |
| MJ+DBP | ۷۶۰/۳۴±۲۵/۱۴ d | ۴۳/۸۶±۱/۴۸ d | ۸۰۴/۲۰±۲۶/۶۲ c | ۹۴/۵۴ | ۸۲/۲۵ |
| MJ+US | ۱۳۰/۵۲±۶/۴۳ e | ۷۰/۰۲±۰/۵۸ c | ۲۰۰/۵۵±۷/۰۱ d | ۶۵/۰۸ | ۲۹/۱۱ |
| DBP+US | ۳۲۳۶/۴۷±۶۷/۹۱ a | ۵۲/۷۵±۰/۹۴ d | ۳۲۸۹/۲۲±۶۸/۸۵ a | ۹۸/۳۹ | ۲۶۴/۳۱ |
| MJ+DBP+US | ۷۶۸/۹۷±۲۴/۲۸ cd | ۵۱/۰۴±۰/۹۲ d | ۸۲۰/۰۱±۲۵/۲۰ c | ۹۳/۷۷ | ۱۰۸/۵۳ |

## بحث

### اثر متیل جاسمونات، دی بوتیل فتالات و فراصوت بر رشد و توان زیستی سلول‌ها

برخلاف آنچه از نام متابولیت‌های ثانویه استنباط می‌شود، همه این ترکیبات که بیشتر آنها کاربرد دارویی نیز دارند، فرآورده نهایی متابولیسم نیتروژن نیستند و تولید آنها مستلزم تمایز سلولی نیست (Hagimori *et al.*, 1982; Ibrahim Aly *et al.*, 2010). به همین سبب، در دهه ۸۰ از کشت سلولی گیاهان متعددی همچون *Coptis japonica*، *Berberis willsoniae* و *Lithospermum erythrorhyzon* به فراوانی برای تولید این ترکیبات استفاده شده است (Sauerwein *et al.*, 1992). اخیراً استفاده از محرک‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی برای تحریک هرچه بیشتر کشت‌های سلولی به تولید این ترکیبات به عنوان یک ابزار در بیوتکنولوژی مطرح گردیده است (Dornenburg and Knorr, 1995).

اثرات مهارکنندگی MJ بر رشد و بسیاری از فعالیت‌های متابولیکی در گیاهان نشان داده شده است. برای مثال، نشان داده شده است که جاسمونیک اسید در غلظت ۱۰۰ میکرومولار رشد سلولی، تقسیم میتوز و همانندسازی DNA را در کالوس توتون مهار کرده، و سلول‌ها را در مرحله G1 متوقف می‌سازد (Swiatek *et al.*, 2004). مهار رشد و کاهش زنده‌مانی در نتیجه زوال تمامیت سلولی و تخریب غشاهای سلولی و همچنین تجزیه پلی ساکاریدهای دیواره سلولی توسط جاسمونات‌ها در بسیاری از گیاهان گزارش شده است (Miyamoto *et al.*, 1997). متیل جاسمونات ممکن است متابولیسم اولیه را مهار و متابولیسم ثانویه را القا نماید. با توجه به رابطه معکوس بین رشد یا تولید زی توده و تجمع متابولیت‌های ثانویه، مهار رشد سلولی توسط تیمار MJ ممکن است سنتز متابولیت‌های ثانویه را القا نماید. با توجه به نتایج به دست آمده مهار رشد سلول‌ها توسط MJ، منجر به تولید بیشتر تاکسول گردید.

حلال آلی DBP نیز باعث کاهش رشد و زنده‌مانی نسبت به شاهد گردید که نشان‌دهنده آثار سمّی آن بر روی سلول‌هاست. این مشاهده با نتایج به دست آمده توسط Yuan و همکاران (۲۰۰۱) مطابقت دارد. آنها گزارش دادند که حلال‌های آلی به کار گرفته شده برای استخراج تاکسول رشد سلولی را در سرخدار چینی کاهش می‌دهد. علاوه بر این، محققان دیگر نیز مشاهده کردند که DBP رشد سلول‌های سرخدار چینی را در کشت تعلیقی کاهش می‌دهد. آثار مضر حلال‌های آلی بر سلول‌های سرخدار (*T. cuspidata*) توسط Xu و همکاران (۲۰۰۵) نشان داده شده است. آنها مشاهده کردند که DBP در غلظت‌های بالا نفوذپذیری غشای سلولی را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد. بنابراین، تصور می‌شود که با توجه به ماهیت غیر قطبی DBP امکان نفوذ آن در غشاها و حل نمودن اجزای آن وجود دارد و DBP ضمن ایجاد اختلال در عملکرد طبیعی غشاهای سلولی، ساختار آنها را تحت تأثیر قرار داده، به کاهش رشد و زنده‌مانی منجر می‌گردد. تیمار US نیز تا حدودی باعث کاهش شاخص‌های مورد نظر اما با شدت کمتر گردید. به کارگیری US در کشت‌های تعلیقی سبب ایجاد وقایع هیدرودینامیک پر انرژی، نظیر حفره‌زایی آکوستیک و جریان‌های میکروسکوپی میشود که باعث آسیب‌های مکانیکی و تنش برشی (shear stress) به سلول‌ها می‌شود (Wu and Lin, 2008). بنابراین، احتمال وجود تنش‌های مکانیکی در اثر US وجود دارد که رشد و زنده‌مانی سلول‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. برهم‌کنش عوامل باعث تقویت اثر آنها روی صفات مورد بررسی گردید. با توجه به اینکه هر یک از آنها در حالت انفرادی

به صورت نوعی تنش سلول‌ها را از نظر رشد و زنده‌مانی تحت تأثیر قرار دادند، به نظر می‌رسد در حالت ترکیبی اثر آنها تجمع پیدا کرده، یا اثر همدیگر را تقویت کرده‌اند و بنابراین، به کاهش صفات مورد بررسی در این بخش به صورت مؤثرتر منجر گردیدند.

## اثر متیل جاسمونات، دی بوتیل فتالات و فراصوت بر مقدار پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدها

گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species, ROS) از جمله پراکسید هیدروژن، از عوامل مهم در تنش اکسیداتیو بوده که به طور قابل توجهی رشد سلول و متابولیسم ثانویه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. گزارش شده است که MJ باعث تولید پراکسید هیدروژن در سلول‌های سرخدار در کشت تعلیقی می‌شود (Wang and Wu, 2005). همچنین، همانند این آزمایش نشان داده شده است که مشتقات فتالات نظیر دی اتیل هگزیل فتالات باعث تولید ROS در گرانولوسیت‌های انسانی می‌شود (Palleschi *et al.*, 2009). در خصوص القای تولید پراکسید هیدروژن تحت تأثیر US نتایج ما با یافته‌های Wang و همکاران (۲۰۰۶) هماهنگی نشان می‌دهد. آنها مشاهده کردند که تیمار سلول‌های سرخدار (*T. yunnanensis*) با US باعث افزایش تولید پراکسید هیدروژن می‌گردد. همچنین Wu و Lin (۲۰۰۸) نشان دادند که تولید پراکسید هیدروژن در سلول‌های جینسینگ در پاسخ به US افزایش می‌یابد. از آنجا که نوعی اختلال یا تغییر فیزیکی در دیواره یا غشای پلاسمایی نظیر تخریب، شکاف یا تغییر شکل ممکن است بر اثر برخورد امواج US به سطح سلول به وجود آید، امکان یک تحریک یا سیگنال مکانیکی مطرح بوده که توضیح می‌دهد چرا US واکنش‌های دفاعی را در سلول‌های فندق القا می‌نماید. نشان داده شده است که بین ROS به ویژه پراکسید هیدروژن و مرگ سلولی در گیاهان ارتباط نزدیکی وجود دارد و علاوه بر این ROS از اکسیدکننده‌های قوی بوده که می‌تواند آثار مخربی روی ماکرومولکول‌های زیستی نظیر DNA و پروتئین‌ها داشته باشد (Gao *et al.*, 2008). با توجه به اینکه کلیه تیمارها باعث القای تولید پراکسید هیدروژن گردیدند، تصور می‌شود که از این طریق زنده‌مانی و رشد را کاهش داده‌اند (شکل ۱- الف و ب).

پراکسیدهای لیپیدی غشایی از اجزای غشای سلول‌های در حال مرگ یا مرده به وجود می‌آیند. Hung و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که تیمار برگ‌های برنج با MJ باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدها یا تولید MDA می‌گردد. در خصوص تأثیر حلال‌های آلی از جمله DBP و همچنین US روی پراکسیداسیون لیپیدهای غشاهای سلول‌های گیاهی اطلاعات زیادی در دست نیست.Xu و همکاران (۲۰۰۵) مشاهده کردند که با افزایش غلظت حلال‌های آلی اولئیک اسید و DBP در محیط سلول‌های سرخدار (*T. cuspidata*) مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و به دنبال آن نفوذپذیری غشای سلولی افزایش می‌یابد. Wu و Ge (۲۰۰۴) نیز مشاهده کردند که US با انرژی کم، در کشت سلولی تعلیقی سرخدار چینی (*T. chinensis*) باعث القای پراکسیداسیون لیپیدها گردید. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، یافته‌های ما با موارد مذکور هماهنگی نشان می‌دهد. در حالت تیمار ترکیبی بیشترین مقدار MDA تولیدی مربوط به تیمار ترکیبی MJ و DBP بود. MJ تأثیر DBP و US را افزایش داد و مقدار مشاهده شده بیش از اثر آنها به صورت جداگانه بود. DBP نیز اثر US را افزایش داد. در این خصوص نیز مانند حالت رشد نوعی هم‌افزایی مشاهده شد، به ویژه که این حالت بین MJ و بقیه کاملاً

مشهود بود. روند مشاهده شده در تولید MDA تحت اثر تیمارها با روند تغییرات رشد و زنده‌مانی مشابه هم بود و تصور می‌شود که ارتباط نزدیکی بین افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش رشد و زنده‌مانی وجود داشته باشد.

## اثر متیل جاسمونات، دی بوتیل فتالات و فراصوت بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)

گزارش شده است که MJ باعث افزایش فعالیت PAL در میوه‌های گواوا (Guara)گردیده، و از این طریق برخی از واکنش‌های دفاعی را القا می‌نماید (Gonzalez-Aguilar *et al.*, 2004) Wu و Lin (۲۰۰۸) نیز در خصوص تیمار US مشاهده کردند که فعالیت PAL را در سلول‌های جینسینگ افزایش داد. همچنین Wang و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که فعالیت این آنزیم تحت تأثیر US در سلول‌های سرخدار (*T. yunnanensis*) نیز افزایش می‌یابد. همانند این آزمایش، به کارگیری حلالDBP نیز باعث افزایش فعالیت PAL در سرخدار چینی گردید (Wu and Lin, 2004; Wu and Ge, 2004). این اثر ممکن است در ارتباط با سمّیت DBP برای غشای پلاسمایی القای واکنش سلولی و به دنبال آن متابولیسم ثانویه باشد. فعال‌سازی PAL واکنش مشترک سلول‌های گیاهی به تنش‌های زیستی و غیر زیستی است. نشان داده شده است که محرک‌های قارچی، عوامل بیماریزا و ایجاد زخم به عنوان یک محرک مکانیکی باعث القای فعالیت این آنزیم شده که نقش کلیدی در نخستین مرحله مسیر فنیل پروپانویيدی داشته و مسؤول سنتز فنیل پروپانویيدهای مختلف است (Lawton and Lamb, 1987). با توجه به نتایج به دست آمده تیمارهای اعمال شده باعث افزایش فعالیت PAL گردیدند که به تجمع ترکیبات فنلی (داده‌ها نشان داده نشده‌اند) و همچنین تاکسول منجر گردید (جدول ۱). شایان ذکر است که زنجیره جانبی مولکول تاکسول، فنیل ایزوسرین، از مسیر فنیل پروپانویيدی به دست می‌آید.

## اثر متیل جاسمونات، دی بوتیل فتالات و فراصوت بر تولید و آزادسازی تاکسول

امروزه به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سلولی برای بهره‌برداری تجاری، تلاش‌ها بر روی ارزیابی فعالیت‌های بیوسنتزی سلول‌های کشت شده متمرکز شده است. بدین منظور، روش‌های مختلفی شامل بهینه‌سازی شرایط کشت، انتخاب لاین‌های سلولی با عملکرد بالا، بهینه‌سازی محیط‌های رشد و تولید، القای مسیرهای متابولیت‌های ثانویه توسط محرک‌ها و ترکیبات پیش‌ساز، استفاده از سیستم کشت دو فازی و تکنیک‌های تثبیت‌سازی سلولی بررسی شده‌اند.

در تحقیق حاضر نشان داده شد که عوامل مورد بررسی می‌توانند به عنوان محرک در کشت سلولی فندق عمل نموده، و متابولیسم ثانویه را با القای تولید تاکسول تغییر دهند. بنابراین، به نظر می‌رسد تجمع تاکسول در سلول‌های فندق، پاسخی زیستی به این محرک‌ها باشد. گزارش شده است که MJ و جاسمونیک اسید یکی از مؤثرترین محرک‌های شیمیایی برای تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان مختلف و از جمله تاکسول در کشت سلول گیاهی سرخدار بوده، و نقش مهمی را در فرایند انتقال پیام که ژن‌های دفاعی را در گیاهان تنظیم می‌کند، ایفا می‌کنند (Ketchum *et al.*, 2003). تولید تاکسان‌ها، از جمله تاکسول در کشت‌های تعلیقی فندق تحت اثر محرک‌های متیل جاسمونات و کیتوزان پس از ۶ روز افزایش نشان داد (Bestoso *et al.*, 2006). این محققان نشان دادند که تأثیر متیل جاسمونات همراه با کیتوزان

نسبت به متیل جاسمونات در افزایش تولید تاکسان‌ها بیشتر بود.

در روش استخراج در جا، به طور کلی یک فاز ثانویه غیر قطبی به محیط کشت، برای جذب فرآورده‌های خارج سلولی اضافه می‌شود. برخی محققان اثر حلال‌های آلی مختلف، نظیر پارافین مایع، اسید آلی، الکل و استر را بر رشد سلول و تولید تاکسول در کشت تعلیقی سرخدار (*T. cuspidata*) گزارش کردند (Wang *et al.*, 2001). آنها نشان دادند که وقتی که حلال‌های آلی بعد از فاز لگاریتمی رشد سلولی اضافه شوند، تولید تاکسول می‌تواند به بیشترین سطح خود برسد. گزارش شده است که در طول مدت کشت، تجمع تاکسول در سلول‌ها باعث مهار بازخوردی و تخریب آن می‌گردد. بنابراین، برداشت در جای تاکسول ضمن ایجاد سهولت در فرآیند استخراج، به افزایش پایداری این مولکول و افزایش تولید آن منجر می‌گردد (Zhang and Xu, 2001). در این تحقیق نیز مشاهده گردید که افزودن حلال آلی جهت استخراج در جا پس از فاز لگاریتمی آثار شگرفی بر تولید تاکسول دارد و به نظر می‌رسد که DBP از یک طرف ضمن جذب تاکسول از سلول‌ها و تخلیه مسیر بیوسنتزی، با افزایش ثبات ساختاری تاکسول از طرف دیگر، به افزایش تولید این ترکیب منجر شده است. همچنین نتایج به دست آمده در این تحقیق با مطالعات قبلی که نشان داده‌اند تیمار کوتاه مدت سلول‌های گیاهی با US با انرژی کم، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه ارزشمند، نظیر ساپونین‌ها و تاکسوییدها را افزایش می‌دهد، هماهنگی دارد (Wu and Ge, 2004; Wu and Lin, 2008). با توجه به تغییرات صورت گرفته در شاخص‌های اندازه‌گیری شده، به نظر می‌رسد US اساساً از طریق تأثیر محرک مانند واکنش‌های دفاعی سلول‌ها را برانگیخته و به افزایش تولید تاکسول منجر گردیده است؛ ضمن اینکه نباید تأثیرات فیزیکی آن، نظیر افزایش نفوذپذیری غشای سلولی را دور از نظر نگه داشت.

نتایج این تحقیق نشان داد که DBP و US اثر MJ و همچنین DBP اثر US را روی تولید تاکسول تقویت کرد. گزارش‌های اندکی وجود دارد که نشان می‌دهد استفاده مخلوطی از محرک‌ها غالباً به افزایش بیشتر تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سلولی گیاهی منجر می‌گردد و یا به عبارتی دیگر اثر یکدیگر را روی تولید متابولیت افزایش می‌دهند. Zhang و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که به کارگیری ترکیبی محرک‌های زیستی و غیر زیستی در کشت تعلیقی سرخدار چینی تولید تاکسول را در حدود ۴۰ برابر نسبت به شاهد افزایش داد. Yuan و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که محرک‌های مختلف، نظیر نیترات نقره، آراشیدونیک اسید و MJ از طریق مسیرهای مختلف تولید تاکسول را در کشت سلولی سرخدار چینی تحت تأثیر قرار می‌دهند. آنها همچنین نشان دادند که مخلوط‌های محرک‌های مختلف با مسیرهای عمل متفاوت، به اثر هم‌افزایی در تولید تاکسول منجر می‌شوند. با توجه به این مطلب و با در نظر گرفتن اینکه MJ و دیگر تیمارهای به کار گرفته شده در این تحقیق نظیر US از لحاظ ماهیت محرک‌های متفاوتی هستند، امکان دارد که از طریق مسیرهای انتقال پیام متفاوت همگرا شده، واکنش‌های دفاعی مشابهی را در سلول‌های فندق القا نمایند. نکته جالب توجه در این تحقیق آثار محرک مانند US و DBP روی سلول‌هاست. در خصوص محرک بودن MJ شک و تردیدی وجود ندارد و با توجه به اینکه US و DBP نیز سبب القای شاخص‌های فیزیولوژیک متعددی گردیدند که سلول‌ها در پاسخ به محرک‌هایی نظیر MJ بروز

می‌دهند، به نظر می‌رسد این محرک‌ها صرفاً فقط از طریق آثار فیزیکی یا شیمیایی روی سلول‌ها باعث افزایش تولید تاکسول نشده‌اند، بلکه القای واکنش‌های دفاعی سلولی نیز مزید بر علت بوده است.

مقدار تولید تاکسول توسط برگ و پوسته قهوه‌ای میوه گیاه فندق در حدود ۰/۷۴ و ۱/۹ میکروگرم در گرم وزن خشک به ترتیب ذکر شده است (Hoffman and Shahidi, 2009). در این تحقیق نشان داده شد که تولید ویژه تاکسول در کشت شاهد ۴/۳۷ میکروگرم در گرم وزن خشک و در کشت‌های تیمار شده بسته به نوع تیمار، مقادیر تولیدی بسیار بیشتر بوده، برای مثال در تیمار ترکیبی DBP و US به ۲۶۴/۳۱ میکروگرم در گرم وزن خشک رسید. بنابراین، کشت سلولی گیاه فندق نسبت به گیاه کامل، گزینه بهتری برای تولید تاکسول بوده، ضمن اینکه انجام هر گونه تیمار و دست‌ورزی را برای بالا بردن کارآیی تولید در آزمایش‌های و تولید نیمه صنعتی و صنعتی امکان‌پذیر می‌سازد.

## جمع‌بندی

به کارگیری همزمان دو تکنیک استفاده از محرک مکانیکی نظیر US و استخراج در جا، بیشترین تأثیر را بر عملکرد سلول‌ها در خصوص تولید تاکسول و آزادسازی آن داشته، و با توجه به اینکه تهیه و به کارگیری این دو تکنیک در دست‌ورزی‌های بیوتکنولوژیک تولید تاکسول، بسیار راحت و ارزان است، امکان استفاده از آنها کمک شایانی به بالا بردن کارآیی تولید تاکسول می‌نماید که یکی از مسائل بزرگ در مسیر تولید این متابولیت مهم ضد سرطان از طریق کشت سلولی است.

## منابع


Bestoso, F., Ottaggio, L., Armirotti, A., Balbi, A., Damonte, G., Degan, P., Mazzei, M., Cavalli, F., Ledda, B. and Miele, M. (2006) In vitro cell cultures obtained from different explants of Corylus avellana produce taxol and taxanes. BMC Biotechnology 6-45.

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

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.

Dornenburg, H. and Knorr, K. (1995) Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. Enzyme and Microbial Technology 17: 674-684.

Frizzel, L. A. (1988) Biological effects of acoustic cavitation. In: Ultrasound, its chemical, physical, biological effects (ed. Suslick, K.) 287-303. VCH Publishers, Weinheim.

Gao, C. J., Xing, D., Li, L. L. and Zhang, L. R. (2008) Implication of reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction in the early stages of plant programmed cell death induced by ultraviolet-C overexposure. Planta 227: 755-767.

Gonzalez-Aguilar, G. A., Tiznado-Hernandez, M. E., Zavaleta-Gatica, R. and Martınez-Tellez M. A. (2004) Methyl jasmonate treatments reduce chilling injury and activate the defense response of guava fruits. Biochemical and Biophysical Research Communications 313: 694-701.

Hagimori, M., Matsumoto, T. and Obi, Y. (1982) Studies on the production of digitalis cardenolides by plant tissue culture. II. Effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by undifferentiated cells and shoot-fortning cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. Plant Physiology 69: 653-656.

Hoffman, A. and Shahidi, F. (2009) Paclitaxel and other taxanes in hazelnut. Journal of Functional Foods 1: 33-37.

Hung, K. T., Hsu, Y. T. and Kao, C. H. (2006) Hydrogen peroxide is involved in methyl jasmonate-induced senescence of rice leaves. Physiology Plantarum 127:293-303.

Ibrahim Aly, U., El-Shabrawi, H. M. and Hanafy, M. (2010) Impact of culture conditions on alkaloid production from undifferentiated cell suspension cultures of Egyptian Henbane. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 4: 4717-4725.

Joersbo, M. and Brunstedt, J. (1992) Sonication: a new method for gene transfer to plants. Physiologiae Plantarum 85: 230-234.

Ketchum, R. E. B., Rithner, C. D., Qiu, D., Kim, Y. S., Williams, R. M. and Croteau, R. B. (2003) *Taxus* metabolomics: methyl jasmonate preferentially induces production of taxoids oxygenated at C-13 in *Taxus* x *media* cell cultures. Phytochemistry 62: 901-909.

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: 335-341.

Miyamoto, K., Oka, M. and Ueda, J. (1997) Update in the possible mode of action of jasmonates: Focus on the metabolism of cell wall polysaccharides in relation to growth and development. Physiologiae Plantarum 100: 631-638.

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 annuum* L.). Journal of Plant Physiology 141: 147-152.

Palleschi, S., Rossi, B., Diana, L. and Silvestroni, L. (2009) Di (2-ethylhexyl) phthalate stimulates $Ca^{2+}$ entry, chemotaxis and ROS production in human granulocytes. Toxicology Letters 187: 52-57.

Rezaei, A., Ghanati, F. and Behmanesh, M. (2010) Static magnetic field improved salicylic acid effect on taxol production in suspension-cultured hazel (*Corylus avellana*) cells. 6th International Workshop on Biological Effects of Electromagnetic Fields. Bodrum, Turkey.

Sauerwein, M., Yoshimatsu, K. and Shimomura, K. (1992) Approaches in the production of secondary metabolites by plant tissue cultures. Plant Tissue Cultures Letters 9: 1-9.

Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D. L. and Polle, A. (2001) Cadmium-Induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. Plant Physiology 127: 887-898.

Swiatek, A., van Dongen, W., Esmans, E. L. and Van Onckelen, H. A. (2004) Metabolic fate of jasmonates in tobacco Bright Yellow-2 cells. Plant Physiology 135:161-172.

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, C. G., Wu, J. Y. and Mei, X. G. (2001) Enhanced taxol production and release in *Taxus chinensis* cell suspension cultures with selected organic solvents and sucrose feeding. Biotechnology Progress 17:89-94.

Wang, J. W. and Wu, J. Y. (2005) Nitric oxide is involved in methyl jasmonate induced defense responses and secondary metabolism activities of *Taxus* cells. Plant Cell Physiology 46: 923-930.

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.

Wu, J. and Lin, L. (2008) Ultrasound-induced stress responses of *Panax ginseng* cells: enzymatic browning and phenolics production. Biotechnology Progress 18: 862-866.

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.

Xu, Q. M., Cheng, J. S., Ge, Z. Q. and Yuan, Y. J. (2005) Abnormal mitosis versus apoptosis of *Taxus cuspidata* induced by oleic acid in two liquid-phase suspension cultures. Enzyme and Microbial Technology 37:76-81.

Yuan, Y. J., Wei, Z. J., Miao, Z. Q. and Wu, J. C. (2002) Acting paths of elicitors on taxol biosynthesis pathway and their synergistic effect. Biochemical Engineering Journal 10: 77-83.

Yuan, Y. J., Wei, Z. J., Wu, Z. L. and Wu, J. C. (2001) Improved Taxol production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* by *in situ* extraction combined with precursor feeding and additional carbon source introduction in an airlift loop reactor. Biotechnology Letters 23: 1659-1662.

Zhang, C. H. and Xu, H. B. (2001) Improved paclitaxel production by *in situ* extraction and elicitation in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. Biotechnology Letters 23: 189-193.

Zhang, C. H., Mei, X. G., Liu, L. and Yu, L. J. (2000) Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. Biotechnology Letters 22: 1561-1564.

Zhao, J., Davis, L. C. and Verpoorte, R. (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnoloy Advances 23: 283-333.

# Increased taxol production and release by methyl jasmonate, ultrasound, and dibutyl phthalate in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cell culture

**Ayatollah Rezaei, Faezeh Ghanati *[1] and Mehrdad Behmanesh [2]**

1 Department of Plant Science, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2 Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

## Abstract

Effects of methyl jasmonate, low energy ultrasound, and dibutyl phthalate on the growth, certain physiological parameters, and taxol production in suspension-cultured hazelnut cell were investigated. The calli were obtained from seed cotyledons as explants on solid MS media supplemented with 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and benzyladenine at concentrations of 1 and 0.5 mg/L respectively. Methyl jasmonate with concentration of 100 µM, ultrasound waves with 40 kHz intensity, and dibutyl phthalate as an organic solvent with 10% concentration for *in situ* extraction were used. The time of all applications and the intensity of ultrasound and the concentration of methyl jasmonate were determined based on preliminary studies. According to the results, the cell growth and viability were decreased by treatments, compared to those of the control cells. All treatments increased hydrogen peroxide content, lipid peroxidation rate, and phenylalanine ammonia lyase activity, compared to the control. Taxol production was improved by all treatments and extracellular taxol was more affected than the intracellular one. In addition, in all treatments release of taxol and its specific yield was higher than those of the control cells. The most taxol production (3289.22 µg/L), taxol release percentage (98.39%) and specific yield of taxol (264.31 µg/g) were observed when dibutyl phthalate and ultrasound were applied together. Dibutyl phthalate significantly augmented the effect of other factors especially in respect to extracellular and total taxol production, taxol release and specific yield.

**Key words:** *Corylus avellana*, Cell culture, Taxol, *In situ* extraction, Methyl jasmonate, Ultrasound waves

* Correspong Author: ghangia@modares.ac.ir