

Stimulation of Taxol Production by Magnetic Field in Cell Culture of Hazel (*Corylusavellana*L.)

A. Rezaei¹, F. Ghanati^{2*}, M. Behmanesh³

¹Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, Shahed University,
arezaei@shahed.ac.ir

²Associate Professor, Department of Plant Biology, Faculty of Biological Science, TarbiatModares University

³Associate Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, TarbiatModares University,
behmanesh@modares.ac.ir

Abstract

In this study cell growth, some physiological parameters, production of Taxol and gene expression in cell culture of hazel under effect of the magnetic field were investigated. Cells in suspension culture were treated by a 30 mT static magnetic field on days 8-11 after subculture and 4 hours each day. The results showed that while the growth rate and viability of cells weren't affected by the magnetic field but membrane lipid peroxidation rate and H₂O₂ production increased. Activity of phenylalanine ammonia lyase, polyphenol oxidase and peroxidase enzymes was increased by the magnetic field compared with control. Production of phenolic compounds and Taxolin treated cells showed an increase compared to those of control cells. Magnetic field increased intracellular Taxol more than extracellular Taxol, and in treated cultures total taxol production was 2.9-fold compared to control culture. Gene expression of 1- deoxy -D- xylulose -5 - phosphate reductoisomerase involved in producing Taxol precursors and in its biosynthesis was also increased in treated cells compared to control. It appears that magnetic field by stimulating cell defense responses and inducing gene expression involved in Taxol biosynthesis has resulted in improved its production.

Key words: Cell culture, Hazel, Taxol, Magnetic field, Gene expression.

*Corresponding author

Address: Dr. FaezehGhanati, Department of Plant Biology, Faculty of Biological Science, TarbiatModares University, POB14155-154, Tehran
Tel: +982182884406
Fax: +982182884717
E-mail: ghanagia@modares.ac.ir

القای تولید تاکسول توسط میدان مغناطیسی در کشت سلولی فندق (*Corylus avellana* L.)

آیت اله رضایی^۱، فائزه قناتی^{۲*}، مهرداد بهمنش^۳

^۱ استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران arezaei@shahed.ac.ir

^۲ دانشیار گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

^۳ دانشیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران behmanesh@modares.ac.ir

چکیده

در این تحقیق رشد سلولی، برخی پارامترهای فیزیولوژیک، تولید الکلونید ضد سرطان تاکسول و بیان ژن در کشت سلولی فندق تحت اثر میدان مغناطیسی بررسی شد. سلولها در کشت تعلیقی با میدان مغناطیسی ایستا با شدت ۳۰ میلی تسلا و در روزهای ۸-۱۱ بعد از واكشت، روزی ۴ ساعت تیمار شدند. نتایج نشان داد میزان رشد و زنده‌مانی سلولها تحت اثر میدان قرار نگرفت؛ اما تولید H_2O_2 و میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی افزایش یافت. فعالیت آنزیمهای فنیل آلانین آمونیا لیاز، پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز تحت اعمال میدان مغناطیسی در مقایسه با شاهد افزایش یافت. تولید ترکیبات فنلی و تاکسول نیز در سلولهای تیمار شده در مقایسه با شاهد افزایش یافت. میدان مغناطیسی تاکسول درون سلولی را در مقایسه با تاکسول برون سلولی بیشتر افزایش داد و در کشتهای تیمار شده تولید تاکسول کل در مقایسه با کشتهای شاهد ۲/۹ برابر بود. بیان ژن ۱-دئوکسی-D-زایلولوز -۵- فسفات ردوکتوایزومراز نیز- که در تولید پیش‌سازهای تاکسول و بیوسنتز آن دخالت دارد- در سلولهای تیمار شده در مقایسه با شاهد افزایش یافت. به نظر می‌رسد میدان مغناطیسی با تحریک پاسخهای دفاعی سلول و القای بیان ژن دخیل در بیوسنتز تاکسول باعث افزایش تولید آن شده است.

کلیدواژگان: کشت سلولی، فندق، تاکسول، میدان مغناطیسی، بیان ژن.

*عهده‌دار مکاتبات

نشانی: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم گیاهی، صندوق پستی: ۱۴۱۵۵/۱۵۴

تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۴۰۳، دورنگار: ۰۲۱-۸۲۸۸۴۷۱۷، پیام نگار: ghanagia@modares.ac.ir

۱- مقدمه

آزاد را افزایش می‌دهد [۷،۶]. تنش اکسیداتیو باعث تغییر در فعالیت آنزیم‌ها، بیان ژن و آزادسازی کلسیم از ذخیره‌گاه‌های درون سلولی می‌شود. همچنین این تنش ساختار غشا، رشد سلول و مرگ سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۸].

کشت سلول گیاهی ابزار مهمی در بیوتکنولوژی گیاهی است. یکی از کاربردهای آن تولید متابولیت‌های گیاهی ارزشمند است که امکان تولید آنها از طریق سنتتیک میسر نیست و یا از گونه‌های نادر در طبیعت و با رشد کند بدست می‌آیند. تدابیر مختلفی نظیر انتخاب لاین سلولی^۱، بهینه‌سازی محیط کشت، بهینه‌سازی فرایند کشت و بکارگیری روشهای ویژه‌ای نظیر الیسیتور برای افزایش عملکرد سلولهای گیاهی پیشنهاد شده است. گزارش‌ها نشان می‌دهند که در میان روشهای مختلف بکار گرفته شده برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول گیاهی، تیمار الیسیتور یکی از مؤثرترین آنها است. با توجه به اینکه گیاه فندق و کشت سلولی آن منبع جدید تاکسول معرفتی شده و از برخی جهات همچون فراوانی و سهولت دسترسی، کشت و کار وسیع در کشور مزیت‌هایی دارد و از طرفی مطالعات مشابهی در مورد آن انجام نشده است؛ در این تحقیق سعی شده اثر القایی میدان مغناطیسی در محیط کشت تعلیقی، ضمن اندازه‌گیری پارامترهای مختلف فیزیولوژیک، بر بیان ژن و عملکرد سلولهای فندق از نظر تولید تاکسول ارزیابی شود.

۲- مواد و روشها

۲-۱- القای تولید کالوس و راه اندازی کشت سلولی

بذرهای فندق رقم گرد اشکور در شهریور ماه ۱۳۸۷ از درختان بالغ باغات منطقه اشکورات شهرستان رودسر (گیلان) جمع‌آوری و برای القا و تولید کالوس^۲ مورد استفاده قرار گرفتند. پوسته چوبی بذرها جدا شده و دانه پس از شستشو با

از جمله متابولیت‌های ثانویه با فعالیت بی نظیر ضد سرطانی، پاکلی تاکسل^۱ یا تاکسول^۲ است. تاکسول از مؤثرترین داروهای ضدسرطان شناخته شده در سالهای اخیر بوده که در سال ۱۹۷۱ کشف و در سال ۱۹۸۹ با نام تجاری تاکسول معرفی شد [۱]. این ترکیب جزو متابولیت‌های ثانویه است که در سلولهای گیاهان معدودی نظیر سرخدار^۳ و همچنین برخی قارچها و باکتریهای تولید می‌شود که سرخدار را آلوده می‌کنند. تحقیقات اخیر نشان داده‌اند گیاه فندق و کشت سلولی آن نیز تاکسانها از جمله تاکسول را تولید می‌کند که تقریباً با گیاه سرخدار برابری می‌کند [۴،۲].

ترکیبات مفید کشتهای سلول گیاهی غالباً متابولیت‌های ثانویه هستند که معمولاً به مقدار بسیار کم در سلولهای گیاهی تیمار نشده تجمع می‌یابند. تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان بخشی از پاسخهای دفاعی در برابر حملات پاتوژنی است که الیسیتورها^۴ آنرا القا و فعال می‌کنند. بنابراین تیمار سلولهای گیاهی با الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی یکی از روشهای سودمند برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول گیاهی است [۵]. الیسیتورهایی که غالباً در مطالعات گذشته استفاده شده‌اند شامل کربوهیدراتهای قارچی، عصاره مخمر، متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک و کیتوزان هستند.

آثار میدان مغناطیسی بر رشد و متابولیسم گیاهان نظیر تغییر در حرکت دیاتوم^۵ ها، تغییر در جوانه‌زنی و رشد گیاهان، تغییرات سیتولوژیک همراه با تولید سریعتر رزین و تسریع پیری در برگهای کاج و تغییر مسیر بیوستنز ترکیبات فنلی^۶ و اسانس گزارش شده است. با وجود این، اطلاعات اندکی در خصوص اثر میدان مغناطیسی بر کشت‌های تعلیقی سلول گیاهی در دسترس است. یک ارتباط بالقوه میدان مغناطیسی و آثار آن بر موجودات زنده این است که میدان مغناطیسی باعث نوعی تنش اکسیداتیو می‌شود که فعالیت، غلظت و طول عمر رادیکالهای

^۱Paclitaxel
^۲Diatoms

^۳Taxol
^۴Phenolics

^۵Taxus
^۶Cell Line

^۷Elicitors
^۸Callus

رضایی و همکاران اندازه‌گیری شد [۴]. برای سنجش فعالیت پلی فنل اکسیداز^{۱۲} (PPO) و پراکسیداز^{۱۳} (PO) از روش دورنبرگر و کنور استفاده شد [۱۲]. فعالیت فنیل آلانین آمونیا یاز^{۱۴} (PAL) نیز بر اساس مقدار تولید اسید سینامیک اندازه‌گیری شد [۱۳].

۲-۵- استخراج و اندازه‌گیری تاکسول

به منظور استخراج تاکسول از سلولها و محیط کشت در روز چهاردهم نمونه برداری شد (رضایی و همکاران ۲۰۱۱). برای شناسایی و تعیین مقدار تاکسول از HPLC (Knauer, Germany) استفاده شد. ستون مورد استفاده (C18, 25 Cm x 4.6 mm I.D., 5 μ m)، فاز متحرک متانول و آب (v/v ۴۵/۵۵) هر یک حاوی ۰/۱٪ اسید استیک به صورت گرادیان با شدت جریان^{۱۵} ۱ میلی لیتر در دقیقه و طول موج مورد استفاده ۲۲۷ نانومتر بود [۱۴]. شناسایی و اندازه‌گیری تاکسول به کمک مقایسه زمان بازداری^{۱۶} نمونه‌ها با استاندارد تاکسول (سیگما)^{۱۷} انجام شد.

۲-۶- استخراج RNA و انجام RT-PCR

برای استخراج RNA از کیت RNAX Plus (سینازن، ایران) مطابق دستورالعمل آن استفاده شد. پس از اطمینان از کیفیت RNA، با کمک آنزیم Reverse transcriptase از آن cDNA سنتز شد. برای سنجش cDNA، از PCR با پرایمر اکتین و ۱ غلظت از cDNA استفاده شد. برای مقایسه اثر تیمارها بر بیان ژن، ابتدا cDNA های مربوط به آن هم غلظت شدند. به منظور تعیین بهترین دمای Annealing برای اکتین به عنوان ژن کنترل داخلی و ژن DXR (۱- دئوکسی-D-زایلوز-۵- فسفات ردوکتوایزومراز)^{۱۸} از PCR با گرادیان دمایی بین ۶۰-۵۰ استفاده شد. سپس محصولات PCR مربوط به این ژنها بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند و بهترین دمابرای اکتین و DXR به ترتیب ۵۸ و ۵۳ درجه سانتی‌گراد مشخص شد. با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای ژن DXR و همچنین پرایمرهای مورد استفاده برای اکتین در برنامه PCR طراحی شده، بانندی اختصاصی برای هر یک در الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ مشاهده

مایع ظرف‌شویی و سه بار آبکشی با آب شیر، به مدت ۲۰ دقیقه با هیپوکلریت سدیم تجاری (۵/۲۵ درصد) ضد عفونی و مجدداً ۳ بار با آب استریل شستشو شد. دانه به ۴ بخش تقسیم شد و در محیط کشت MS، pH ۵/۵، آگار ۰/۸ درصد، سوکروز ۳۰ گرم در لیتر و تنظیم‌کننده‌های رشد، ۲-دی کلروفونوکسی استیک اسید و بنزیل آدنین به ترتیب با غلظت های ۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر کشت شده؛ در تاریکی نگهداری شد. بعد از گذشت حدوداً ۱۰ روز کالوسها ظاهر و هر ۲ هفته واگشت شدند. برای تهیه کشت تعلیقی حدود ۲ گرم کالوس نرم و سفید به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت MS با ترکیبات هورمونی فوق‌الذکر بدون آگار اضافه شد و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در تاریکی روی شیکر نگهداری شده؛ هر ۲ هفته واگشت شد.

۲-۲- تیمار سلولها با میدان مغناطیسی ایستا

از میدان مغناطیسی ایستا^۹ (SMF) با شدت ۳۰ میلی تسلا برای تیمار سلولها در روز هشتم پس از واگشت به مدت ۴ روز و روزی ۴ ساعت بر اساس روش صاحب جمعی و همکاران [۷] استفاده شد.

۲-۳- اندازه‌گیری رشد سلولی و تعیین توان زیستی

سلولها

رشد سلولی با اندازه‌گیری افزایش در وزن تر سلولها تعیین شد. بدین منظور سلولها با نایلون مش (۴۲ μ M) از محیط کشت جدا شدند و برای تعیین وزن تر بلافاصله توزین شدند. برای تعیین توان زیستی^{۱۰} نیز از محلول اوانس بلو استفاده شد [۹].

۲-۴- اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی

مقدار آسید به غشا با اندازه‌گیری مقدار مالونیل دی آلدید^{۱۱} (MDA) به عنوان فراورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشا طبق روش دو وس و همکاران [۱۰] تعیین شد. مقدار تولید پراکسید هیدروژن بر اساس روش ولیکوف و همکاران سنجیده شد [۱۱]. مقدار تولید ترکیبات فنلی در سلولها مطابق روش

^۹Static Magnetic Field^{۱۳}Peroxidase^{۱۷}Sigma^{۱۰}Viability^{۱۴}Phenylalanine Ammonia Lyase^{۱۱}Malonyldehaldehyde^{۱۵}Flow Rate^{۱۲}Polyphenol Oxidase^{۱۶}Retention Time^{۱۸}1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase

سرخدار چینی^{۲۱} را در معرض میدان مغناطیسی ایستا قرار دادند. آنها میزان رشد سلولی را تا حدودی بیشتر در مقایسه با سلولهای شاهد مشاهده کردند. همچنین آثار مثبت میدان مغناطیسی بر زمان و توان باززایی کشتها و وزن تر گیاهی گزارش شده است [۱۷].

جدول (۲) - اثر میدان مغناطیسی ایستا (SMF, ۳۰mT) بر میزان رشد، زنده‌مانی، تولید پراکسید هیدروژن و مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در کشت سلولی فندق. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و \pm SE (انحراف معیار) هستند. علامت ستاره در داخل ستون اختلاف معنی‌دار در سطح $p \leq 0.05$ را بر اساس t-Test نشان می‌دهد.

شاخص‌های مورد بررسی				
تیمار	رشد (g/L DW)	زنده‌مانی (%)	پراکسید هیدروژن (μM/g FW)	پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی (μM MDA/g FW)
شاهد	۱۲/۴۶±۰/۴۱	۹۵/۱۳±۳/۲۲	۰/۴۷±۰/۱۱	۳/۴۱±۰/۴۲
میدان مغناطیسی	۱۳/۰۳±۰/۳۴	۹۴/۶۶±۲/۴۱	۰/۷۵±۰/۰۶*	۸/۲۲±۰/۶۱*

بررسی منابع نشان می‌دهد که میدان مغناطیسی احتمالاً تا حدودی آثار مثبت بر رشد سلول دارد. این آثار مفید میدان مغناطیسی ممکن است به علت افزایش جذب یون ها به خصوص Ca^{2+} توسط سلول باشد. مطالعات زیادی در سال‌های اخیر نشان داده اند که تیمار گیاهان با Ca^{2+} میتواند با جلوگیری از سنتز اکسیدکننده های فعال، محافظت از ساختمان غشای پلاسمایی، حفظ فتوسنتز طبیعی و همچنین تنظیم متابولیسم هورمونهای گیاهی و سایر مواد شیمیایی مهم به رشد آنها کمک کند. سلولهای گیاهی تحت تأثیر میدان مغناطیسی می‌توانند پاسخ‌های غیر قابل پیش‌بینی بر حسب عوامل متعددی از جمله گونه، شدت میدان مغناطیسی و مدت قرار گرفتن در معرض آن داشته باشند [۱۸].

شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای DXR و اکتین در جدول (۱) نشان داده شده است. مخلوط واکنش به مدت ۴ دقیقه در دمای $94^{\circ}C$ دناتور^{۱۹} شده و در طی ۳۵ دور^{۲۰} تکثیر شد، به طوری که هر دور شامل ۱ دقیقه دناتور شدن در $94^{\circ}C$ ، ۳۵ ثانیه *annealing* و ۶۰ ثانیه *polymerization* در دمای $72^{\circ}C$ بود. برای تأیید درستی این قطعات، محصول PCR مربوط به DXR و اکتین تعیین توالی شدند.

جدول (۱) - توالی پرایمرهای اکتین و DXR.

Gene	Sequence
ACT	Forward primer 5'-GCA GGG ATC CAC GAG ACC ACC-3'
	Reverse primer 5'- CCC ACC ACT GAG CAC AAT GTT CC-3'
DXR	Forward primer 5'- CCT TTC GTC CTT CCT CTT GC -3'
	Reverse primer 5'- ATG AAT CCT GTG TTT CGA CC -3'

۷-۲- تحلیل آماری

عوامل فوق به صورت جداگانه و توأم بر سلولها با ۳ تکرار تیمار شده و تأثیر آنها بر پارامترهای ذکر شده با نرم افزار Excel و آزمون t-Test به منظور تعیین معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح $P \leq 0.05$ انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۱-۳- رشد و زنده‌مانی سلولی

نتایج این تحقیق نشان داد که اثر میدان مغناطیسی بر رشد، زنده بودن سلولی در مقایسه با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت و عملاً هم‌تراز با آن بود [جدول (۲)]. در خصوص آثار میدان مغناطیسی بر کشتهای سلولی اطلاعات بسیار اندکی موجود است. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که میدان های مغناطیسی می‌توانند بر طیف وسیعی از اعمال سلولی تأثیر بگذارند؛ اما مکانیسم دقیق این تداخلها با سلولهای زنده هنوز نامشخص است [۱۵]. شانگ و همکاران [۱۶] در مطالعه‌ای کشتهای تعلیقی

¹⁹Denature

²⁰Cycle

²¹Taxuschinesis

۳-۲- تولید پراکسید هیدروژن و مالونیل دی آلدید (MDA)

مقدار تولید H_2O_2 و میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی به طور معنی داری تحت تأثیر میدان مغناطیسی قرار گرفت [جدول (۲)]. تیمار سلولها با میدان مغناطیسی با افزایش معنی دار تولید پیام‌رسانهایی نظیر H_2O_2 و شاخص‌های تنش نظیر MDA در مقایسه با سلولهای شاهد، باعث ایجاد تنش برای سلولها شد. صاحب جمعی و همکاران [۷] مشاهده کردند که مقدار پراکسیداسیون لیپیدها در سلولهای توتون در کشت تعلیقی با میدان مغناطیسی افزایش یافت. آنها همچنین تغییراتی را در فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانت در اثر میدان مغناطیسی نشان دادند و مشاهده کردند که میداین با شدتهای ۱۰ و ۳۰ میلی تسلا فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را افزایش و در عوض فعالیت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز را کاهش دادند. افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی میتواند دلیلی بر تجمع H_2O_2 و دیگر ROS ها در سلولهای تیمار شده با میدان مغناطیسی باشد. ارتباط بالقوه میدان مغناطیسی و آثار آن بر موجودات زنده این است که میدان مغناطیسی باعث نوعی تنش اکسیداتیو می‌شود به طوری که فعالیت، غلظت و طول عمر رادیکالهای آزاد را افزایش می‌دهد [۷،۶]. تنش اکسیداتیو باعث تغییر در فعالیت آنزیم‌ها، بیان ژن و آزادسازی کلسیم از ذخیره گاههای درون سلولی می‌شود. همچنین این تنش بر ساختار غشا، رشد سلول و مرگ سلولی مؤثر است [۸]. در این تحقیق با افزایش پراکسیداسیون لیپیدها، تولید و تجمع گونه فعال اکسیژن یعنی H_2O_2 نیز افزایش یافت که به نظر می‌رسد نوعی تنش اکسیداتیو ایجاد شده است.

۳-۳- فعالیت آنزیمها

میدان مغناطیسی ایستا فعالیت آنزیم PAL را در کشتهای تیمار شده در مقایسه با کشتهای شاهد به صورت معنی داری افزایش داد [شکل (۱)]. تریبی^{۲۲} و همکاران [۱۹] گزارش کردند که میداین مغناطیسی ضعیف با فرکانس فوق العاده کم در گیاه

توتون، فعالیت آنزیم PAL را افزایش داده؛ بدین ترتیب فرایند واکنش فوق حساسیت^{۲۳} (HR) توتون نسبت به ویروس را تحت تأثیر قرار داد. نشان داده شده است که PAL در گیاهان شدیداً به تنش واکنش نشان می‌دهد. این آنزیم بیوسنتز ترانس سینامیک اسید را کاتالیز، مسیر فنیل پروپانویید را آغاز کرده و منجر به سنتز طیف وسیعی از ترکیبات فنلی می‌شود. ترکیبات فنلی چه در طی فرایندهای رشد و چه در پاسخ به پرتوهای فرابنفش، زخم و حمله پاتوژنها، تجمع می‌یابند [۲۰]. همچنین فعالیت بیشتر PAL در کشت تعلیقی سلولی سرخدار چینی تحت اثر میدان مغناطیسی ایستا نشان داده شده است [۱۶]. در عین حال برخی مطالعات کاهش فعالیت PAL را در تیمار با میدان مغناطیسی ایستا گزارش کرده‌اند [۲۱].

فعالیت آنزیم PPO نیز در سلولها تحت تأثیر میدان مغناطیسی افزایش معنی داری را در مقایسه با شاهد نشان داد [شکل (۱)]. پلی فنل اکسیداز اکسیداسیون، O- دی فنل‌ها را به O- دی کینونها تبدیل و همچنین هیدروکسیلاسیون مونوفنل‌ها را کاتالیز می‌کند [۲۲]. فعالیت این آنزیم در پاسخ به تنشهای زیستی و غیر زیستی افزایش می‌یابد [۲۳]. با اینکه در این تحقیق افزایش فعالیت PPO تحت اثر میدان مغناطیسی مشاهده شد، قناتی و همکاران [۲۱] مشاهده کرده‌اند که قرار گرفتن گیاهان در معرض میدان مغناطیسی ایستا باعث کاهش فعالیت پلی فنل اکسیداز شده است؛ اما تیمار گیاهان با آهن هنگام قرار گرفتن آنها در معرض میدان مغناطیسی، سبب افزایش فعالیت پلی فنل اکسیداز شده است؛ کورسویچ^{۲۴} و همکاران [۲۴] نیز در دانه رسته‌های جو نشان دادند که فعالیت پلی فنل اکسیداز تحت تأثیر میدان مغناطیسی ضعیف (۱۰ میکروتسلا) کاهش تدریجی نشان داد و بعد از ۷۲ ساعت به سطح ۵۰٪ رسید. با توجه به اینکه محتوای ترکیبات فنلی تحت اثر میدان مغناطیسی در کشتهای تیمار شده افزایش یافت و همچنین شرایط تنش برای سلولها ایجاد شد، احتمالاً آنزیم PPO القا شده؛ فعالیت افزایش یافته است.

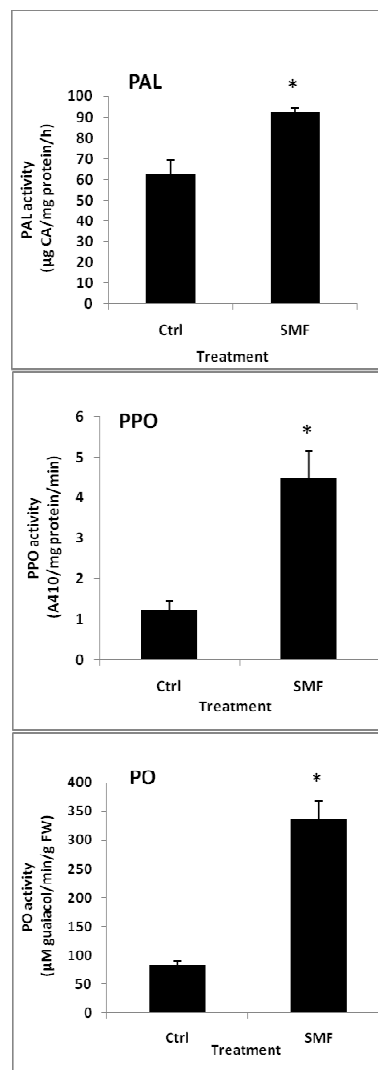
سلولهای شاهد افزایش یافت. عبدالمالکی و همکاران [۲۷] اثر میدان مغناطیسی ایستا را بر سلولهای توتون در کشت تعلیقی بررسی کردند. آنها مشاهده کردند ضمن اینکه میدان مغناطیسی فعالیت *PO* را افزایش داد، مرگ سلولی و میزان لیگنینی شدن دیواره‌ها را نیز افزایش داد. به نظر می‌رسد در تحقیق حاضر میدان مغناطیسی با راه‌اندازی استرس اکسیداتیو همانند الیستورها باعث القا و افزایش فعالیت *PO* شده است. میدان مغناطیسی آثار گسترده‌ای بر گیاهان دارد و این تاثیرات بر حسب اندام و گونه گیاهی، شدت میدان، مدت زمان تیمار و دیگر عوامل محیطی متفاوت است [۲۸].

۳-۴- تولید متابولیت‌های ثانویه: ترکیبات فنلی و

تاکسول

میدان مغناطیسی بطور معنی‌داری تولید ترکیبات فنلی را در مقایسه با کشتهای شاهد افزایش داد [شکل (۲)]. در تأیید نتایج بدست آمده در این تحقیق آخز و بهاری [۲۹] نیز افزایش تولید ترکیبات فنلی را در کشتهای سلولی *Cassia fistula* تحت تأثیر میدان مغناطیسی گزارش کرده‌اند. ولی در عین حال قناتی و همکاران [۲۱] نشان داده‌اند تولید ترکیبات فنلی در گیاهان ریحان تحت تأثیر میدان مغناطیسی کاهش می‌یابد. لازم است ذکر شود که نتایج مربوط به فعالیت *PAL* تحت تأثیر میدان مغناطیسی نشان می‌دهد که افزایش فعالیت این آنزیم منجر به تولید ترکیبات فنلی در کشتهای تیمار شده، می‌شود.

میدان مغناطیسی همچنین باعث افزایش تولید تاکسول برون سلولی، درون سلولی و تاکسول کل به صورت معنی‌دار در مقایسه با شاهد شد [شکل (۲)]. میدان مغناطیسی باعث افزایش بیشتری در تاکسول درون سلولی شد. نسبت تولید تاکسول درون سلولی به برون سلولی در کشتهای قرار گرفته تحت تیمار میدان مغناطیسی برابر ۱/۵ بود. بعلاوه در کشتهای تیمار شده با میدان مغناطیسی نسبت تولید تاکسول کل به کشتهای شاهد برابر



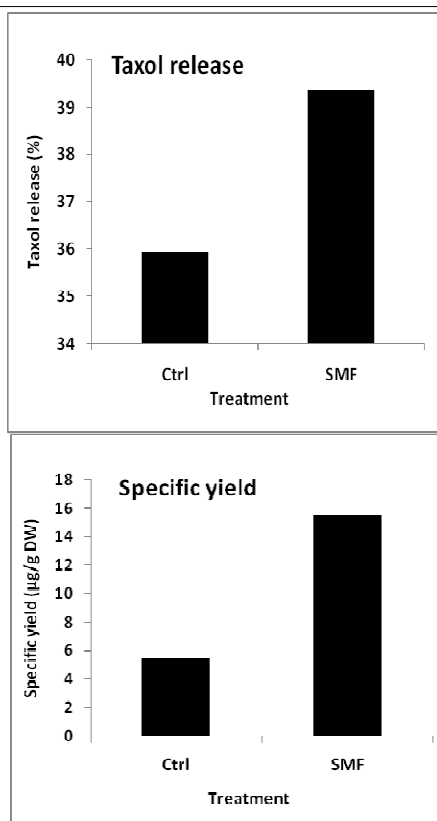
شکل (۱)- اثر میدان مغناطیسی ایستا (SMF, ۳۰mT) بر فعالیت آنزیمهای فنیل آلانین آمونیلایز (PAL)، پلی فنل اکسیداز (PPO) و پراکسیداز (PO) در کشت سلولی فندق. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و \pm SE (انحراف معیار) است. علامت ستاره اختلاف معنی‌دار در سطح $p \leq 0.05$ را بر اساس t-Test نشان می‌دهد.

فعالیت آنزیم *PO* نیز در کشتهای سلولی تحت تأثیر میدان مغناطیسی در مقایسه با شاهد به صورت معنی‌داری افزایش یافت [شکل (۱)]. مطالعات نشان داده‌اند که *PO* در چوبی شدن^{۲۵}، چوب‌پنبه‌ای شدن^{۲۶}، کاتابولیسم اکسین، دفاع در برابر پاتوژنها، تنش و پیری مؤثر است [۲۵]. اتک^{۲۷} و همکاران [۲۶] در بررسی اثر میدان مغناطیسی بر سلولهای سویا مشاهده کردند که فعالیت پراکسیداز به صورت معنی‌داری در مقایسه با

²⁵Lignification

²⁶Suberification

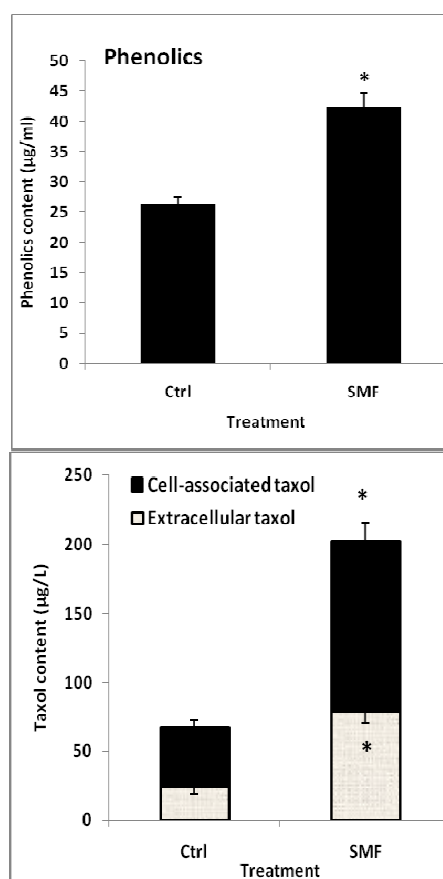
²⁷Atak



شکل (۳) - اثر میدان مغناطیسی ایستا (SMF, ۳۰mT) بر رهش تاکسول و عملکرد ویژه در کشت سلولی فندق.

ضمن اینکه مطالعات زیادی در خصوص اثر الیستورهای شیمیایی بویژه متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک بر تولید متابولیت‌های ثانوی در کشت سلولهای انجام شده است؛ در مورد آثار میدان مغناطیسی بر تولید آنها در کشت سلولی گیاهی اطلاعات بسیار کمی در دسترس است. شانگ و همکاران [۱۶] آثار میدان مغناطیسی ایستا (SMF) را با شدت ۳/۵ میلی تسلا و میدان مغناطیسی متناوب را با شدت ۳/۵ میلی تسلا و فرکانس ۵۰ هرتز بر رشد سلولها و مقدار تاکسول تولیدی در کشت تعلیقی سلولی سرخدار چینی بررسی کردند. آنها مشاهده کردند که هر دو نوع میدان مغناطیسی مقدار تاکسول تولیدی را افزایش می‌دهند. همچنین مشاهده کردند که اثر SMF بر مقدار تاکسول در مقایسه با اثر میدان متناوب بیشتر بود و این میدادین به ترتیب در مقایسه با شاهد باعث افزایش ۱/۴ و ۱/۲ برابر مقدار تاکسول می‌شوند. همچنین قناتی و همکاران [۲۱] نشان دادند که اعمال میدان مغناطیسی بر گیاه ریحان باعث افزایش تولید اسانس

۲/۹ بود. میدان مغناطیسی همچنین باعث تسهیل بیشتر خروج تاکسول از سلولها در کشتهای تیمار شده در مقایسه با شاهد شد. درصد آزادسازی یا رهش تاکسول^{۲۸} تحت اثر میدان مغناطیسی ۳۹/۴ درصد بود. بازده و عملکرد ویژه^{۲۹} سلولها در خصوص تولید تاکسول نیز در مقایسه با شاهد به صورت معنی‌دار تحت تأثیر میدان قرار گرفت. عملکرد ویژه به مقدار ۱۵/۶ میکروگرم بر گرم وزن خشک تحت تأثیر میدان بدست آمد که در مقایسه با کشتهای شاهد ۲/۹ برابر بود [شکل (۳)].

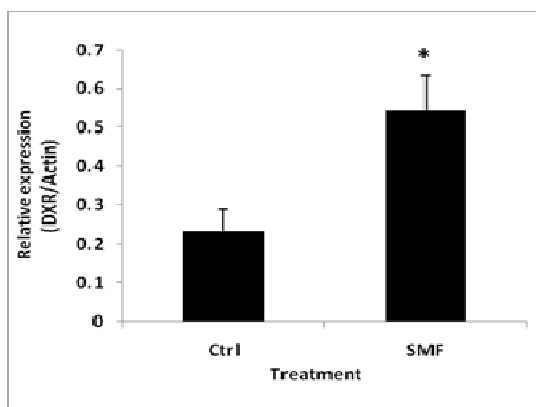
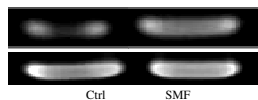


شکل (۲) - اثر میدان مغناطیسی ایستا (SMF, ۳۰mT) بر تولید ترکیبات فنلی (Phenolics) و تاکسول (درون سلولی ۲۵ و برون سلولی ۲۶ در کشت سلولی فندق. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و \pm SE (انحراف معیار) است. علامت ستاره اختلاف معنی‌دار را در سطح $p \leq 0.05$ بر اساس t-Test نشان می‌دهد.

²⁸Taxol Release

²⁹Specific Yield

به عنوان ترکیبی دفاعی شده است. افزایش تولید تاکسول با اعمال میدان احتمالاً در اثر القای پارامترهای مختلف پاسخهای دفاعی نظیر انفجار اکسیداتیو (تولید H_2O_2)، پراکسیداسیون لیپیدها و افزایش فعالیت *PAL* و همچنین افزایش بیان ژن اصلی *DXR* مربوط به بیوستز مسیره‌های ترپنوییدی است. با توجه به افزایش بیان ژن *DXR* - که در مسیر پلاستی بیوستز پیش‌سازهای ترپنوییدها مؤثر است و برای اولین بار در این تحقیق گزارش شد- به نظر می‌رسد در سلولهای فندق مسیر متیل اریتریتول فسفات (*MEP*) نقش مهمی را در بیوستز تاکسول بعهدہ دارد.



شکل (۴)- اثر میدان مغناطیسی ایستا (*SMF*, $30mT$) روی بیان ژن *DXR* در کشت سلولی فندق. بالا: طرح الکتروفورز محصول *PCR* ژن *DXR* و اکتین به عنوان کنترل داخلی، پایین: اندازه‌گیری مقدار کمی بیان ژن *DXR* با استفاده از نرم‌افزار *Image guage* (مقادیر نشان داده شده میانگین و $\pm SD$) (انحراف معیار) است. علامت ستاره نشان‌دهنده معنی دار بودن تفاوتها در سطح $p \leq 0.05$ بر اساس

t-test Student's (است).

بویژه ترکیب متیل چاویکول می‌شود. در تحقیق حاضر افزایش تولید گونه فعال اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و همچنین افزایش فعالیت *PAL* تحت اثر میدان مغناطیسی نشان داده شد. به نظر می‌رسد میدان مغناطیسی نیز همچون دیگر القاکننده‌ها یا الیستورها با راه‌اندازی زنجیره انتقال پیام از طریق استرس اکسیداتیو ایجاد شده- که همراه با تولید H_2O_2 است- متابولیسم ثانویه را در سلولها القا کرده و باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله تاکسول و ترکیبات فنلی شده است.

۳-۵- بیان ژن *DXR*

تغییرات کمی بیان ژن *DXR* تحت اثر تیمار میدان مغناطیسی ایستا در سلولهای تیمار شده و شاهد در شکل (۴) نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود تیمار میدان مغناطیسی به صورت معنی داری بیان ژن مورد بررسی را در مقایسه با شاهد افزایش داد. تغییر در بیان ژن *DXR*، دخیل در بیوستز ترپنوییدها در گیاهان تحت اثر الیستورها نشان داده شده است [۳۰، ۳۱]. در تحقیق حاضر نیز بیان *DXR* تحت تأثیر میدان در سلولهای فندق افزایش یافت و از طرفی در پایان دوره کشت نیز افزایش تجمع تاکسول تحت اثر این تیمار مشاهده شد؛ بنابراین به نظر می‌رسد ارتباط مستقیمی بین بیان *DXR* و تولید تاکسول در سلولهای فندق وجود دارد. با توجه به اینکه مطالعات نشان داده‌اند در گیاه سرخدار مسیر اصلی برای تأمین پیش‌سازهای بیوستز تاکسول، مسیر غیر مولونات یا متیل اریتریتول فسفات (*MEP*) است که به نظر می‌رسد در کشتهای سلولی فندق نیز این مسیر- که *DXR* نقش اصلی در آن دارد- نقش اساسی در بیوستز تاکسول داشته باشد.

۴- نتیجه‌گیری

افزایش استرس اکسیداتیو با میدان مورد بررسی، نشان می‌دهد در سلولها پاسخهای دفاعی القا شده به طوری که منجر به افزایش تولید *MDA* و در نهایت تولید ترکیبات فنلی و تاکسول

- [14] Yuan Y.J., Wei Z.J., Miao Z.Q., Wu J.C., Acting paths of elicitors on taxol biosynthesis pathway and their synergistic effect; *BiochemEng J*, 2002; 10: 77-83.
- [15] Yano A., Ohashi Y., Hirasaki T., Fujiwara K., Effects of a 60 Hz magnetic field on photosynthetic CO₂ uptake and early growth of radish seedlings; *Bioelectromagnetics*, 2004; 25: 572-581.
- [16] Shang G.M., Wu J.C., Yuan Y.J., Improved cell growth and taxol production of suspension-cultured *Taxus chinensis* var. *mairei* in alternating and direct current magnetic fields; *Biotechnol Lett*, 2004; 26: 875-878.
- [17] Yaycili O., Alikamanoglu S., The effect of magnetic field on *Paulownia* tissue cultures; *Plant Cell Tiss Org*, 2005; 83: 109-114.
- [18] Danilov V., Bas T., Eltez M., Rizakulyeva A., Artificial magnetic field effects on yield and quality of tomatoes; *Acta Hort*, 1994; 366: 279-285.
- [19] Trebbi G., Borghini F., Lazzarato L., Torrigiani P., Calzoni G.L., Betti L., Extremely low frequency weak magnetic fields enhance resistance of NN tobacco plants to tobacco mosaic virus and elicit stress-related biochemical activities; *Bioelectromagnetics*, 2007; 28: 214-223.
- [20] Dicko M.H., Gruppen H., Barro C., Traore A.S., van Berkel W.J.H., Voragen A.G.J., Impact of phenolic compounds and related enzymes in sorghum varieties for resistance and susceptibility to biotic and abiotic stresses; *J Chem Ecol*, 2005; 31: 2671-2688.
- [21] Ghanati F., Abdolmaleki P., Vaezzadeh M., Rajabbeigi E., Yazdani M., Application of magnetic field and iron in order to change medicinal products of *Ocimum basilicum*; *Environmentalist*, 2007; 27: 429-434.
- [22] Shoderhall I., Properties of carrot polyphenol oxidase; *Phytochemistry*, 1995; 39: 33-38.
- [23] Ruiz J.M., Garcia P.C., Rivero R.M., Romero L., Response of phenolic metabolism to the application to the carbendazim plus boron in tobacco leaves; *Physiol Plant*, 1999; 106: 151-157.
- [24] Kursevich N.V., Travkin M.P., Effects of magnetic fields with different intensities on some enzymes' activities in barley seedlings. In: *Effects of Natural and Weak Artificial Magnetic Fields on Biological Objects*; Belgorod Teacher's Training College Publishing Co.; Belgorod: Russia; 1973. p. 102-4.
- [25] Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H., A large family of class III plant peroxidases; *Plant Cell Physiol*, 2001; 42: 462-468.
- [26] Atak C., Emiroglu O., Alikamanoglu S., Rzakoulive A., Stimulation of regeneration by magnetic field in soybean (*Glycine max* L. Merrill) tissue cultures; *J Cell Mol Biol*, 2003; 2: 113-119.
- [27] Abdolmaleki P., Ghanati F., Sahebamei H., Sarvestani A., Peroxidase activity, lignification and promotion of cell death in tobacco cells exposed to static magnetic field; *Environmentalist*, 2007; 27: 435-440.
- [28] Kato R., Kamada H., Asashama M., Effect of high and very low magnetic field on the growth of hairy roots of *Daucus carotta* and *Atropa belladonna*; *Cell Physiol*, 1989; 30: 605-608.
- [1] Tabata H., Paclitaxel production by plant-cell-culture technology; *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2004; 87:1-23.
- [2] Bestoso F., Ottaggio L., Armirotti A., Balbi A., Damonte G., Degan P., Mazzei M., Cavalli F., Ledda B., Miele M., In vitro cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce Taxol and taxanes; *BMC Biotechnol*, 2006; doi:10.1186/1472-6750-6-45.
- [3] Ottaggio L., Bestoso F., Armirotti A., Balbi A., Damonte G., Mazzei M., Sancandi M., Miele M., Taxanes from shells and leaves of *Corylus avellana*; *J Nat Prod*, 2008; 7: 58-60.
- [4] Rezaei A., Ghanati F., Behmanesh M., Ultrasound potentiated salicylic acid-induced physiological effects and production of taxol in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cell culture; *Ultrasound Med Biol*, 2011; doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2011.06.013.
- [5] Dornenburg H., Knorr D., Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures; *Enzyme Microbial Technol*, 1995; 17: 674-684.
- [6] Zhang Q.M., Tokiwa M., Doi T., Nakahara T., Chang P.W., Nakamura N., Hori M., Miyakoshi J., Yonei S., Strong static magnetic field and the induction of mutations through elevated production of reactive oxygen species in *Escherichia coli* SOX-R; *Int J Radiat Biol*, 2003; 79:281-286.
- [7] Sahebamei H., Abdolmaleki P., Ghanati F., Effects of magnetic field on the antioxidant enzyme activities of suspension-cultured tobacco cells; *Bioelectromagnetics*, 2007; 28: 42-47.
- [8] Green L.M., Miller A.B., Agnew D.A., Greenberg M.L., Li J., Villeneuve J.P., Tibshirani R., Childhood leukemia and personal monitoring of residential exposures to electric and magnetic fields in Ontario; *Cancer Cause Control*, 1999; 10: 233-243.
- [9] Smith M.A.L., Palta J.P., McCown B.H., The measurement of isotonicity and maintenance of osmotic balance in plant protoplast manipulations; *Plant Sci Lett*, 1984; 33: 249-258.
- [10] De Vos C.H.R., Schat H., De Waal M.A.D., Vooijs R., Ernst W.H.O., Increased resistance to copper-induced damage of the root plasma membrane in copper tolerant *Silene cucubalus*; *Physiol Plant*, 1991; 82: 523-528.
- [11] Velikova V., Yordanov I., Edreva A., Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants protective role of exogenous polyamines; *Plant Sci*, 2000; 151: 59-66.
- [12] Dornenburg H., Knorr D., Evaluation of elicitor- and high-pressure-induced enzymatic browning utilizing potato (*Solanum tuberosum*) suspension cultures as a model system for plant tissues; *Agri Food Chem*, 1997; 45: 4173-4177.
- [13] Ochoa-Alejo N., Gomez-Peralta J.E., Activity of enzymes involved in capsaicin biosynthesis in callus tissue and fruits of chili pepper (*Capsicum annuum* L.); *J Plant Physiol*, 1993; 141: 147-152.

- terpenoid resin formation of Norway spruce (*Picea abies*); *Plant Mol Biol*, 2007; 65: 243–257.
- [31] Yao H., Gong Y., Zuo K., Ling H., Qiu C., Zhang F., Wang Y., Pi Y., Liu X., Sun X., Tang K., Molecular cloning, expression profiling and functional analysis of a DXR gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Camptotheca acuminata*; *Plant Physiol.* 2008; 165: 203–213.
- [29] Aukhez S.T., Beharry G.K., Effects of magnetic field on growth and polyphenolic production in callus cultures of *Cassia fistula*; *Sci Technol Res J*, 2001; 8: 13–27.
- [30] Phillips M.A., Walter M.H., Ralph S.G., Dabrowska P., Luck K., Uros E.M., Boland W., Strack, Rodriguez-Concepcion M., Bohlmann J., Functional identification and differential expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in induced