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

آیت ا... رضایی[1*]، فائزه قناتی[2]، مهرداد بهمنش[2]
[1] دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، صندوق پستی 18155/159
[2] دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، صندوق پستی 14155/154

چکیده

در این تحقیق رشد سلولی، برخی از پارامترهای فیزیولوژیک، تولید الکالوئید ضد سرطان تاکسول و بیان ژن در کشت سلولی فندق تحت اثر میدان مغناطیسی مورد بررسی قرار گرفت. سلولها در کشت تعلیقی توسط میدان مغناطیسی ایستا با شدت 30 میلی تسلا و در روزهای 11-8 بعد از واکشت، روزی 4 ساعت تیمار شدند. نتایج نشان داد ضمن اینکه میزان رشد و زنده مانی 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 توسط میدان مغناطیسی در مقایسه با شاهد افزایش یافت. تولید ترکیبات فنلی و تاکسول نیز در سلولهای تیمار شده نسبت به شاهد افزایش نشان داد. میدان مغناطیسی تاکسول درون سلولی را در مقایسه با تاکسول برون سلولی بیشتر افزایش داد و در کشتهای تیمار شده تولید تاکسول کل نسبت به کشتهای شاهد 2/9 برابر بود. بیان ژن 1- دئوکسی-D- زایلولوز -5- فسفات ردوکتوایزومراز نیز که در تولید پیش سازهای تاکسول و بیوسنتز آن دخالت دارد در سلولهای تیمار شده نسبت به شاهد افزایش یافت. بنظر میرسد میدان مغناطیسی با تحریک پاسخهای دفاعی سلول و القای بیان ژن دخیل در بیوسنتز تاکسول باعث افزایش تولید آن شده است.

واژه های کلیدی: کشت سلولی، فندق، تاکسول، میدان مغناطیسی، بیان ژن.

* نویسنده مسئول: دکتری تخصصی، فیزیولوژی گیاهی، Email: arezaei@shahed.ac.ir

مقدمه

از جمله متابولیتهای ثانویه با فعالیت بی نظیر ضد سرطانی، پاکلی تاکسل یا تاکسول است. تاکسول جزء موثرترین داروهای ضد سرطان شناخته شده در سالهای اخیر بوده که در سال ۱۹۷۱ کشف و در سال ۱۹۸۹ از طرف کمپانی بریستول مریسکوئیب با نام تجاری تاکسول معرفی گردید [1]. این ترکیب جزو متابولیتهای ثانویه بوده که در سلولهای گیاهان معدودی نظیر سرخدار (*Taxus*) و همچنین برخی از قارچها و باکتریهایی که سرخدار را آلوده می کنند تولید می شود. تحقیقات اخیر نشان داده اند که گیاه فندق و کشت سلولی آن نیز تاکسانها از جمله تاکسول تولید میکند که تقریبا با گیاه سرخدار برابری می کند [4،2].

ترکیبات مفید کشتهای سلول گیاهی غالباً متابولیت های ثانویه هستند که معمولاً به مقدار بسیار کم در سلولهای گیاهی تیمار نشده تجمع می یابند. تجمع متابولیتهای ثانویه در گیاهان بخشی از پاسخهای دفاعی در برابر حملات پاتوژنی میباشد که توسط الیسیتورها القا و فعال میشوند. بنابراین تیمار سلولهای گیاهی با الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی یکی از استراتژیهای سودمند برای افزایش تولید متابولیتهای ثانویه در کشت سلول گیاهی میباشد [5]. الیسیتورهایی که غالباً در مطالعات گذشته مورد استفاده قرار گرفته اند شامل کربوهیدراتهای قارچی، عصاره مخمر، متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک و کیتوزان میباشد.

اثرات میادین مغناطیسی روی رشد و متابولیسم گیاهان نظیر تغییر در حرکت دیاتوم ها، تغییر در جوانه زنی و رشد گیاهان، تغییرات سیتولوژیک همراه با تولید سریعتر رزین و تسریع پیری در برگهای کاج و تغییر در مسیر بیوسنتز ترکیبات فنلی و اسانس گزارش شده است. با این وجود اطلاعات اندکی در خصوص اثر میادین مغناطیسی روی کشت های تعلیقی سلول گیاهی در دسترس است. یک ارتباط بالقوه بین میدان مغناطیسی و اثرات آن روی موجودات زنده این است که میدان مغناطیسی باعث نوعی تنش اکسیداتیو می شود که فعالیت، غلظت و طول عمر رادیکالهای آزاد را افزایش میدهد [7-6]. تنش اکسیداتیو باعث تغییر در فعالیت آنزیم ها، بیان ژن و آزادسازی کلسیم از ذخیره گاههای درون سلولی میگردد. همچنین این تنش ساختار غشاء، رشد سلول و مرگ سلولی را تحت تاثیر قرار می دهد [8].

کشت سلول گیاهی ابزار مهمی در بیوتکنولوژی گیاهی است. یکی از کاربردهای آن تولید متابولیتهای گیاهی ارزشمند میباشد که به طریق سنتتیک امکان تولید آنها میسر نیست و یا از گونه های نادر در طبیعت و با رشد کند بدست می آید. استراتژیهای مختلفی نظیر انتخاب لاین سلولی، بهینه سازی محیط کشت، بهینه سازی فرایند کشت و بکارگیری تکنیکهای ویژه نظیر الیسیتور برای افزایش عملکرد سلولهای گیاهی پیشنهاد شده است. گزارشات نشان میدهد که در میان استراتژیهای مختلف بکار گرفته شده برای افزایش تولید متابولیتهای ثانویه در کشت سلول گیاهی، تیمار الیسیتور یکی از موثرترین آنها 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 در کشور مزیت هایی دارد و از طرفی مطالعات مشابهی روی آن صورت نگرفته است در این تحقیق سعی بر آنست تا پتانسیل اثر القایی میدان مغناطیسی در محیط کشت تعلیقی، ضمن اندازه گیری پارامترهای مختلف فیزیولوژیک، بر بیان ژن و عملکرد سلولهای فندق از نظر تولید تاکسول مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روشها

القای تولید کالوس و راه اندازی کشت سلولی

بذرهای فندق رقم گرد اشکور در شهریور ماه 1387 از درختان بالغ باغات منطقه اشکورات شهرستان رودسر (گیلان) جمع آوری و برای القا و تولید کالوس مورد استفاده قرار گرفتند. پوسته چوبی بذرها جدا شده و دانه پس از شستشو با مایع ظرف شویی و سه بار آبکشی با آب شیر، به مدت 20 دقیقه توسط هیپوکلریت سدیم تجاری (5/25 درصد) ضد عفونی گردیده و مجدداً 3 بار توسط آب استریل شستشو گردید. دانه به 4 بخش تقسیم شد و در محیط کشت MS، pH 5/5، آگار 0/8 درصد، سوکروز 30 گرم در لیتر و تنظیم کننده های رشد2،4- دی کلروفنوکسی استیک اسید و بنزیل آدنین به ترتیب با غلظت های 1 و 0/5 میلی گرم در لیتر کشت گردید و در تاریکی

نگهداری شد. بعد از گذشت حدوداً 10 روز کالوسها ظاهر شدند و هر 2 هفته واکشت گردیدند. برای تهیه کشت تعلیقی حدود 2 گرم کالوس نرم و سفید به 50 میلی لیتر محیط کشت MS با ترکیبات هورمونی فوق الذکر بدون آگار اضافه شد و با سرعت 120 دور در دقیقه در دمای 25 درجه سانتیگراد در تاریکی روی شیکر نگهداری شده و هر 2 هفته واکشت گردید.

تیمار سلولها با میدان مغناطیسی ایستا

از میدان مغناطیسی ایستا (30 میلی تسلا) برای تیمار سلولها در روز هشتم پس از واکشت به مدت 4 روز و روزی 4 ساعت بر اساس روش صاجب جمعی و همکاران [7] استفاده گردید.

اندازه گیری رشد سلولی و تعیین توان زیستی سلول ها

رشد سلولی با اندازه گیری افزایش در وزن تر سلولها تعیین شد. بدین منظور سلولها توسط نایلون مش (µ42M) از محیط کشت جدا شدند و برای تعیین وزن تر بلافاصله توزین شدند. برای تعیین توان زیستی از محلول اوانز بلو مطابق روش اسمیت و همکاران [9] استفاده شد.

اندازه گیری شاخص های بیوشیمیایی

مقدار آسیب به غشاء ها با اندازه گیری مقدار مالونیل دی آلدیید (MDA) به عنوان فراورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء بروش دو وس و همکاران [10] تعیین شد. مقدار تولید پراکسید هیدروژن بر اساس روش ولیکوف و همکاران [11] سنجیده شد. فعالیت القایی میدان مغناطیسی با اندازه گیری مقدار تولید ترکیبات فنلی مطابق روش رضایی و همکاران [4] در سلولها صورت گرفت. برای سنجش فعالیت پلی فنل اکسیداز (PPO) و پراکسیداز (PO) از روش دورننبورگ و کنور [12] استفاده گردید. فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) بر اساس مقدار تولید اسید سینامیک به روش اکوآ-آلجو و گمز-پرالتا [13] اندازه گیری شد.

استخراج و اندازه گیری تاکسول

برای استخرج تاکسول از سلولها و محیط کشت در روز چهاردهم نمونه برداری صورت گرفت (رضایی و همکاران 2011). 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 µm)، فاز متحرک متانول و آب (v/v 45/55) هر یک حاوی 0/1 ٪ اسید استیک به صورت گرادیان با فلوی 1 میلی لیتر در دقیقه و طول موج مورد استفاده 227 نانومتر بود [14]. شناسایی و اندازه گیری تاکسول به کمک مقایسه Retention time نمونه ها با استاندارد تاکسول (سیگما) صورت گرفت.

استخراج RNA و انجام RT-PCR

برای استخراج RNA از کیت RNaX Plus (سیناژن، ایران) مطابق دستورالعمل آن استفاده شد. پس از اطمینان از کیفیت RNA با استفاده از آنزیم Reverse transcriptase از آن cDNA سنتز شد. برای تست cDNA، از PCR به همراه پرایمر اکتین و 1 غلظت از cDNA استفاده شد. برای مقایسه اثر تیمارها روی بیان ژن ابتدا cDNA های مربوطه هم غلظت شدند. جهت تعیین بهترین دمای Annealing برای اکتین به عنوان ژن کنترل داخلی و ژن *DXR* (1- دئوکسی-D-زایلولوز -5- فسفات ردوکتوایزومراز) از PCR با گرادیان دمایی بین 50-60°C استفاده شد. سپس محصولات PCR مربوط به این ژنها بر روی ژل آگارز 1٪ الکتروفورز شد و بهترین دما برای اکتین و *DXR* به ترتیب 58 و 53 درجه سانتی گراد مشخص گردید. با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای ژن *DXR* و

همچنین پرایمرهای مورد استفاده برای اکتین در برنامهٔ PCR طراحی شده، یک باند اختصاصی برای هر یک در الکتروفورز ژل آگارز 1٪ مشاهده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای *DXR* و اکتین در جدول 1 نشان داده شده است. مخلوط واکنش برای مدت 4 دقیقه در دمای 94° C دناتوره شده و در طی 35 سیکل تکثیر شد، به طوری که هر سیکل شامل 1 دقیقه denaturation در 94°C، 35 ثانیه annealing و 60 ثانیه polymerization در دمای 72°C بود. برای تأیید درستی این قطعات، محصول PCR مربوط به *DXR* و اکتین تعییین توالی شدند.

جدول 1. 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'

آنالیز آماری

فاکتورهای فوق به صورت جداگانه و توام روی سلولها با 3 تکرار تیمار شده و تاثیر آنها روی پارامترهای ذکر شده توسط نرم افزار Excel و آزمون t-Test جهت تعیین معنی دار بودن تفاوت ها در سطح $P\leq 0.05$ انجام شد.

نتایج و بحث

رشد و زنده مانی سلولی

نتایج این تحقیق نشان داد که اثر میدان مغناطیسی روی رشد، زنده بودن سلولی در مقایسه با شاهد اختلاف معنی داری نداشت و عملاً هم تراز با آن بود (جدول 2). در خصوص اثرات میدان مغناطیسی روی کشتهای سلولی اطلاعات بسیار اندکی موجود میباشد. مطالعات متعدد نشان داده است که میدان های مغناطیسی می توانند بر طیف وسیعی از اعمال سلولی تاثیر بگذارند، اما مکانیسم دقیق این تداخل ها با سلولهای زنده هنوز نامشخص است [15]. شانگ و همکاران [16] در مطالعه ای کشتهای تعلیقی سرخدار چینی (*Taxus chinensis*) را در معرض میدان مغناطیسی ایستا قرار دادند آنها میزان رشد سلولی را تا حدودی بیشتر نسبت به سلولهای شاهد مشاهده نمودند. همچنین اثرات مثبت میدان مغناطیسی روی زمان و توان باززایی کشتها و وزن تر گیاهی گزارش شده است [17].

جدول 2. اثر میدان مغناطیسی ایستا (SMF, 30 mT) روی میزان رشد، زنده مانی، تولید پراکسید هیدروژن و مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در کشت سلولی فندق. مقادیر نشان داده شده میانگین 3 تکرار و SE ± (انحراف معیار) میباشد. علامت ستاره در داخل ستون اختلاف معنی دار در سطح $p\leq 0/05$ را بر اساس Student's t-test نشان میدهد.

	شاخص های مورد بررسی			
تیمار	رشد (g/L DW)	زنده مانی (٪)	پراکسید هیدروژن (µM/g FW)	پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی (µM MDA/g FW)
شاهد	12/46±0/41	95/13±3/22	0/47±0/11	3/41±0/42
میدان مغناطیسی	13/03±0/34	94/66±2/41	0/75±0/06*	8/22±0/61*

بررسی منابع نشان می دهد که میدان مغناطیسی احتمالاً تا حدودی اثرات مثبت بر رشد سلول دارد. این اثرات مفید میدان مغناطیسی ممکن است به علت افزایش در جذب یون ها به خصوص Ca^{2+} توسط سلول باشد. مطالعات زیادی در سال های اخیر نشان داده اند که

تیمار گیاهان توسط Ca^{2+} میتواند با جلوگیری از سنتز اکسید کننده 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 نماید. سلولهای گیاهی تحت تاثیر میدان مغناطیسی می توانند پاسخ های غیر قابل پیش بینی با توجه به عوامل متعددی از جمله گونه، شدت میدان مغناطیسی و مدت قرار گرفتن در معرض آن داشته باشند [18].

تولید پراکسید هیدروژن و مالونیل دی آلدیید (MDA)

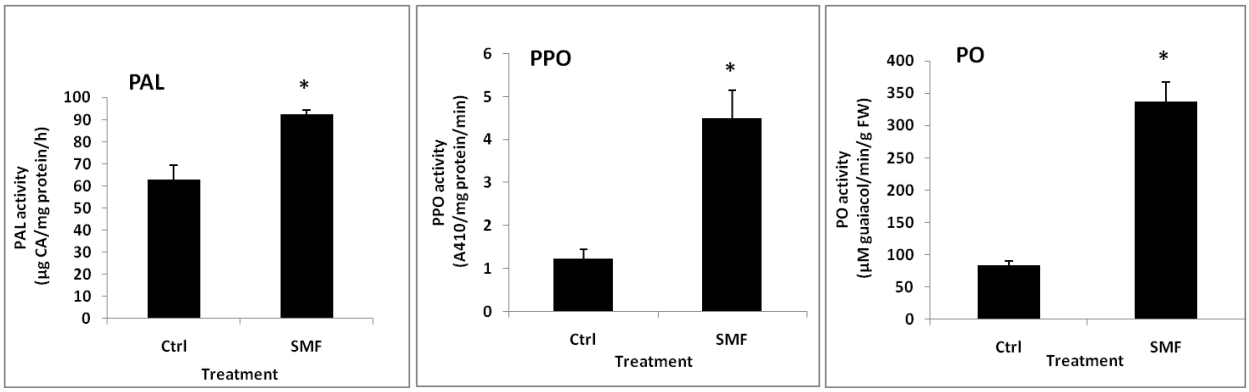
مقدار تولید H_2O_2 و میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی به طور معنی داری تحت تاثیر میدان مغناطیسی قرار گرفت (جدول 2). تیمار سلولها با میدان مغناطیسی با افزایش معنی دار تولید پیام رسانهایی نظیر H_2O_2 و شاخصهای تنش نظیر MDA، نسبت به سلولهای شاهد، باعث ایجاد شرایط تنش برای سلولها گردید. صاحب جمعی و همکاران [7] مشاهده کردند که مقدار پراکسیداسیون لیپیدها در سلولهای توتون در کشت تعلیقی توسط میدان مغناطیسی افزایش یافت. آنها همچنین تغییراتی را در فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانت در اثر میدان مغناطیسی نشان دادند و مشاهده کردند که میادین با شدتهای 10 و 30 میلی تسلا فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را افزایش داد و در عوض فعالیت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز را کاهش داد. افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی میتواند دلیلی بر تجمع H_2O_2 و دیگر ROS ها در سلولهای تیمار شده با میدان مغناطیسی باشد. یک ارتباط بالقوه بین میدان مغناطیسی و اثرات آن روی موجودات زنده این است که میدان مغناطیسی باعث نوعی تنش اکسیداتیو می شود که فعالیت، غلظت و طول عمر رادیکالهای آزاد را افزایش میدهد [7،6]. تنش اکسیداتیو باعث تغییر در فعالیت آنزیم ها، بیان ژن و آزادسازی کلسیم از ذخیره گاههای درون سلولی میگردد. همچنین این تنش ساختار غشاء، رشد سلول و مرگ سلولی را تحت تاثیر قرار می دهد [8]. در این تحقیق همراه با افزایش پراکسیداسیون لیپیدها، تولید و تجمع گونه فعال اکسیژن یعنی H_2O_2 نیز افزایش یافت که بنظر میرسد نوعی استرس اکسیداتیو ایجاد گردید.

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 1). تربی و همکاران [19] گزارش کردند که میادین مغناطیسی ضعیف با فرکانس فوق العاده پایین در گیاه توتون، فعالیت آنزیم PAL را افزایش داده و بدین ترتیب فرایند واکنش فوق حساسیت (HR) توتون نسبت به ویروس را تحت تاثیر قرار داد. PAL در گیاهان نشان داده شده است که شدیداً به تنش واکنش نشان میدهد. این آنزیم بیوسنتز ترانس سینامیک اسید را کاتالیز کرده که مسیر فنیل پروپانویید را آغاز و منجر به سنتز طیف وسیعی از ترکیبات فنلی میشود. ترکیبات فنلی چه در طی فرایندهای رشد و نمو و چه در پاسخ به تشعشعات UV، زخم و حمله پاتوژنها تجمع میابند [20]. همچنین شانگ و همکاران [16] در کشت تعلیقی سلولی سرخدار چینی (*T. chinensis* Var. *mairei*) تحت اثر میدان مغناطیسی ایستا، فعالیت PAL بیشتری را در مقایسه با کشتهای شاهد مشاهده کردند. در عین حال برخی از مطالعات کاهش فعالیت PAL را در تیمار با میدان مغناطیسی ایستا گزارش کرده اند [21].

فعالیت آنزیم PPO نیز در سلولها تحت تاثیر میدان مغناطیسی در مقایسه با شاهد افزایش معنی داری را نشان داد (شکل 1). پلی فنل اکسیداز اکسیداسیون O- دی فنل ها را به O- دی کینونها و همچنین هیدروکسیلاسیون مونوفنل ها را کاتالیز مینماید [22]. فعالیت این آنزیم در پاسخ به تنشهای زیستی و غیر زیستی افزایش میابد [23]. در حالیکه در این تحقیق افزایش فعالیت PPO تحت اثر میدان مغناطیسی مشاهده گردید، قناتی و همکاران [21] مشاهده کردند که قرار گرفتن گیاهان در معرض میدان مغناطیسی ایستا باعث کاهش فعالیت پلی فنل اکسیداز گردید، اما تیمار گیاهان با آهن به هنگام قرار گرفتن شان در معرض میدان مغناطیسی، افزایش فعالیت پلی فنل اکسیداز را بدنبال داشت. کورسویچ و همکاران [24] نیز در دانه رستهای جو نشان دادند که فعالیت پلی فنل اکسیداز تحت تاثیر میدان مغناطیسی ضعیف (10 میکروتسلا) کاهش تدریجی نشان داد و به سطح 50٪ بعد از 72 ساعت رسید. با توجه به اینکه محتوی ترکیبات

فنلی تحت اثر میدان مغناطیسی در کشتهای تیمار شده افزایش نشان داد و همچنین نوعی شرایط تنش برای سلولها ایجاد گردید احتمالاً آنزیم PPO القاء شده و افزایش فعالیت نشان داد.



شکل 1. اثر میدان مغناطیسی ایستا (SMF, 30 mT) روی فعالیت آنزیمهای فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)، پلی فنل اکسیداز (PPO) و پراکسیداز (PO) در کشت سلولی فندق. مقادیر نشان داده شده میانگین 3 تکرار و SE ± (انحراف معیار) میباشد. علامت ستاره اختلاف معنی دار در سطح $p\leq 0/05$ را بر اساس t-test Student's نشان میدهد.

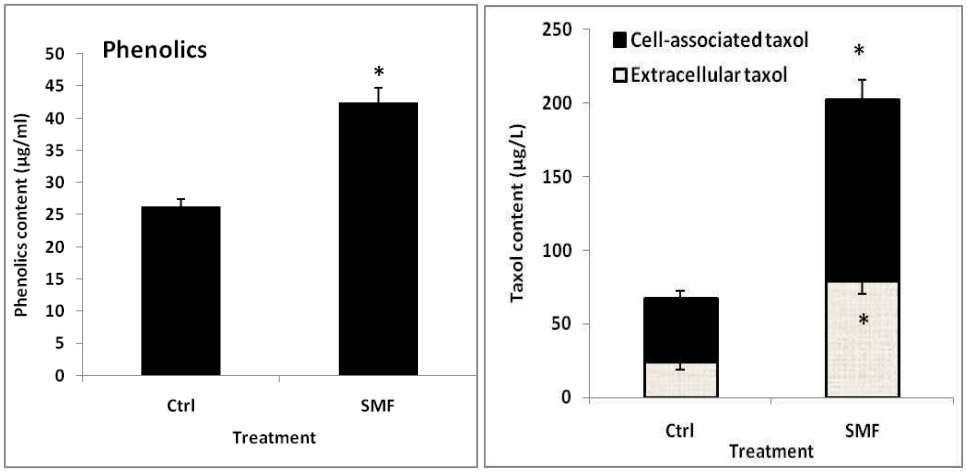
فعالیت آنزیم PO نیز در کشتهای سلولی تحت تاثیر میدان مغناطیسی نسبت به شاهد به صورت معنی داری افزایش نشان داد (شکل 1). مطالعات نشان داده است که PO در لیگنینی شدن، سوبریزه شدن، کاتابولیسم اکسین، دفاع در برابر پاتوژنها، تنش و پیری ایفای نقش میکند [25]. اتک و همکاران [260] در بررسی اثر میدان مغناطیسی روی سلولهای سویا مشاهده کردند که فعالیت پراکسیداز به صورت معنی داری در مقایسه با سلولهای شاهد افزایش یافت. عبدالمالکی و همکاران [27] اثر میدان مغناطیسی ایستا را روی سلولهای توتون در کشت تعلیقی بررسی کردند. آنها مشاهده نمودند که ضمن اینکه میدان مغناطیسی فعالیت PO را افزایش داد مرگ سلولی و میزان لیگنینی شدن دیواره ها را نیز افزایش داد. بنظر میرسد در تحقیق حاضر میدان مغناطیسی با راه اندازی استرس اکسیداتیو همانند الیسیتورها باعث القاء و افزایش فعالیت PO شده است. میدان مغناطیسی اثرات گسترده ای بر گیاهان دارد و بستگی به اندام و گونه گیاهی، شدت میدان، مدت زمان تیمار و دیگر عوامل محیطی این تاثیرات متفاوت است [28].

تولید متابولیتهای ثانویه: ترکیبات فنلی و تاکسول

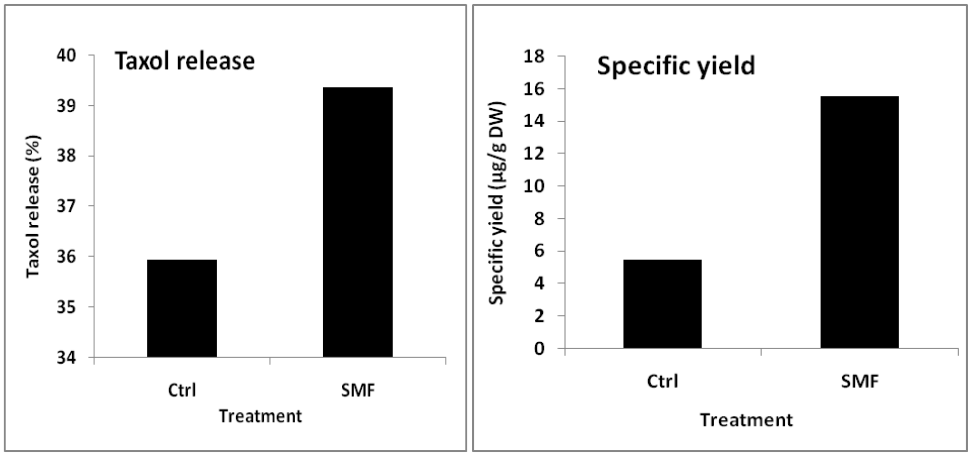
میدان مغناطیسی بطور معنی داری تولید ترکیبات فنلی را در مقایسه با کشتهای شاهد افزایش داد (شکل 2). در تایید نتایج بدست آمده در این تحقیق آخز و بهاری [29] نیز افزایش تولید ترکیبات فنلی را در کشتهای سلولی *Cassia fistula* تحت تاثیر میدان مغناطیسی گزارش کردند. ولی در عین حال قناتی و همکاران [21] نشان دادند که تولید ترکیبات فنلی در گیاهان ریحان تحت تاثیر میدان مغناطیسی کاهش یافت. لازم بذکر است که نتایج مربوط به فعالیت PAL تحت تاثیر میدان مغناطیسی نشان میدهد که افزایش فعالیت این آنزیم منجر به تولید ترکیبات فنلی در کشتهای تیمار شده گردیده است.

میدان مغناطیسی همچنین باعث افزایش تولید تاکسول برون سلولی، درون سلولی و تاکسول کل به صورت معنی دار نسبت به شاهد گردید (شکل 2). میدان مغناطیسی بیشتر باعث افزایش تاکسول درون سلولی شد. نسبت تولید تاکسول درون سلولی به برون سلولی در کشتهای قرار گرفته تحت تیمار میدان مغناطیسی 1/5 بود. در کشتهای تیمار شده با میدان مغناطیسی نسبت تولید تاکسول کل به کشتهای شاهد 2/9 برابر بود. میدان مغناطیسی همچنین باعث تسهیل بیشتر در خروج تاکسول از سلولها در کشتهای تیمار شده نسبت به شاهد گردید.

درصد آزادسازی یا رهش تاکسول تحت اثر میدان مغناطیسی 39/4 درصد بود. بازده و عملکرد ویژه سلولها در خصوص تولید تاکسول نیز تحت تاثیر میدان نسبت به شاهد به صورت معنی دار قرار گرفت. عملکرد ویژه به مقدار 15/6 میکروگرم بر گرم وزن خشک تحت تاثیر میدان بدست آمد که نسبت به کشتهای شاهد 2/9 برابر بود (شکل 3).



شکل 2. اثر میدان مغناطیسی ایستا (SMF, 30 mT) روی تولید ترکیبات فنلی (Phenolics) و تاکسول (درون سلولی (Cell-associated) و برون سلولی (Extracellular)) در کشت سلولی فندق. مقادیر نشان داده شده میانگین 3 تکرار و SE ± (انحراف معیار) میباشد. علامت ستاره اختلاف معنی دار در سطح 0/05 ≥p را بر اساس Student's t-test نشان میدهد.



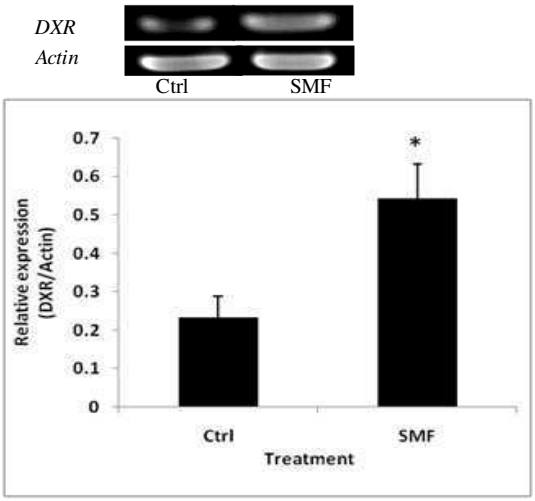
شکل 3. اثر میدان مغناطیسی ایستا (SMF, 30 mT) روی رهش تاکسول (Taxol release) و عملکرد ویژه (Specific yield) در کشت سلولی فندق.

ضمن اینکه مطالعات زیادی در خصوص اثر الیسیتورهای شیمیایی بویژه متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک روی تولید متابولیتهای ثانوی در کشت سلولهای انجام شده است، راجع به اثرات میدان مغناطیسی روی تولید آنها در کشت سلولی گیاهی اطلاعات بسیار کمی در دسترس است. شانگ و همکاران [16] اثرات میدان مغناطیسی ایستا (SMF) با شدت 3/5 میلی تسلا و میدان مغناطیسی متناوب (ACMF) با شدت 3/5 میلی تسلا و فرکانس 50 هرتز را روی رشد سلولها و مقدار تاکسول تولیدی در کشت تعلیقی سلولی سرخدار

چینی (*T. chinensis* Var. *mairei*) بررسی کردند. آنها مشاهده کردند که هر دو نوع میدان مغناطیسی مقدار تاکسول تولیدی را افزایش دادند. آنها همچنین مشاهده کردند که اثر SMF روی مقدار تاکسول نسبت به ACMF بیشتر بود و این میادین به ترتیب نسبت به شاهد باعث افزایش 1/4 و 1/2 برابر مقدار تاکسول گردیدند. همچنین قناتی و همکاران [21] نشان دادند که اثر میدان مغناطیسی روی گیاه ریحان باعث افزایش تولید اسانس بویژه تر کیب متیل چاویکول گردید. در تحقیق حاضر افزایش تولید گونه فعال اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و همچنین افزایش فعالیت PAL تحت اثر میدان مغناطیسی نشان داده شد. بنظر میرسد میدان مغناطیسی نیز مثل دیگر القاءکننده ها یا الیسیتورها با راه اندازی زنجیره انتقال پیام از طریق استرس اکسیداتیو ایجاد شده که همراه با تولید H_2O_2 میباشد، متابولیسم ثانویه را در سلولها القاء نموده و باعث افزایش تولید متابولیتهای ثانویه از جمله تاکسول و ترکیبات فنلی گردیده است.

بیان ژن *DXR*

تغییرات کمی بیان ژن *DXR* تحت اثر تیمار میدان مغناطیسی ایستا در سلولهای تیمار شده و شاهد در شکل 4 نشان داده شده است. همانطورکه مشاهده میشود تیمار میدان مغناطیسی به صورت معنی داری بیان ژن مورد بررسی را نسبت به شاهد افزایش داد. تغییر در بیان ژن *DXR*، دخیل در بیوسنتز ترپنوییدها در گیاهان تحت اثر الیسیتورها نشان داده شده است [30، 31]. در تحقیق حاضر نیز بیان *DXR* تحت تاثیر میدان در سلولهای فندق افزایش یافت و از طرفی در پایان دوره کشت نیز افزایش تجمع تاکسول تحت اثر این تیمار مشاهده گردید، بنابراین بنظر میرسد که ارتباط مستقیمی بین بیان *DXR* و تولید تاکسول در سلولهای فندق وجود دارد. با توجه به اینکه مطالعات نشان داده اند که در گیاه سرخدار مسیر اصلی برای تامین پیش سازهای بیوسنتز تاکسول، مسیر غیر موالونات یا متیل اریتریتول فسفات (MEP) میباشد بنظر میرسد که در کشتهای سلولی فندق نیز این مسیر که *DXR* نقش کلیدی در آن دارد نقش اساسی در بیوسنتز تاکسول داشته باشد.



شکل4. اثر میدان مغناطیسی ایستا (SMF, 30 mT) روی بیان ژن *DXR* در کشت سلولی فندق. (بالا) طرح الکتروفورزی محصول PCR ژن *DXR* و اکتین به عنوان کنترل داخلی، (پائین) اندازه گیری مقدار کمی بیان ژن *DXR* با استفاده از نرم افزار Image guage. (مقادیر نشان داده شده میانگین و SD ± (انحراف معیار) میباشد. علامت ستاره نشان دهنده معنی دار بودن تفاوتها در سطح $p \leq 0/05$ بر اساس Student's t-test است).

نتیجه گیری

افزایش استرس اکسیداتیو توسط میدان مورد بررسی نشان میدهد که در سلولها پاسخهای دفاعی القاء گردیده که منجر به افزایش تولید MDA و در نهایت تولید ترکیبات فنلی و تاکسول به عنوان یک ترکیب دفاعی گردیده است. افزایش تولید تاکسول توسط 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 کلیدی *DXR* مربوط به بیوسنتز مسیرهای ترپنوییدی میباشد. با توجه به افزایش بیان ژن *DXR* که در مسیر پلاستی بیوسنتز پیش سازهای ترپنوییدها ایفای نقش میکند و برای اولین بار در این تحقیق گزارش میگردد، بنظر میرسد در سلولهای فندق مسیر متیل اریتریتول فسفات (MEP) نقش مهمی را در بیوسنتز تاکسول بعهده دارد.

Stimulation of taxol production by magnetic field in cell culture of hazel (*Corylus avellana* L.)

Ayatollah Rezaei[1,*], Faezeh Ghanati[2], Mehrdad Behmanesh[2]
[1]Faculty of Agricultural Sciences, Shahed University, POB 18155-159, Tehran
[2]Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, POB14155-154, Tehran

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 8-11after 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 H_2O_2 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 Taxol in treated cells showed an increase compared to those of control cells. Magnetic field increased intracellular Taxol more than extracellur 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.

Keywords: Cell culture, Hazel, Taxol, Magnetic field, Gene expression.

* Corresponding author: PhD, Plant Physiology, Email: arezaei@shahed.ac.ir

References

[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, F Bestoso, 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 QM, Tokiwa M, Doi T, Nakahara T, ChangPW, 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* soxR. Int J Radiat Biol 2003;79:281–286.

[7] Sahebjamei 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 LM, Miller AB, Agnew DA, Greenberg ML, Li J, Villeneuve JP, 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 MAL, Palta JP, McCown BH. The measurement of isotonicity and maintenance of osmotic balance in plant protoplast manipulations. Plant Sci Lett 1984;33:249–258.

[10] De Vos CHR, Schat H, De Waal MAD, Vooijs R, Ernst WHO. 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 been 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 JE. 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.

[14] Yuan, YJ, Wei ZJ, Miao ZQ, Wu JC. Acting paths of elicitors on taxol biosynthesis pathway and their synergistic effect. Biochem Eng J 2002;10:77–83.

[15] Yano A, Ohashi Y, Hirasaki T, Fujiwara K. Effects of a 60 Hz magnetic field on photosynthetic CO_2 uptake and early growth of radish seedlings, Bioelectromagnetics 2004;25**:**572–581.

[16] Shang GM, Wu JC, Yuan YJ. 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 Hortic 1994;366:279–285.

[19] Trebbi G, Borghini F, Lazzarato L, Torrigiani P, Calzoni GL, 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 MH, Gruppen H, Barro C, Traore AS, van Berkel WJH, Voragen AGJ. 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 JM, Garcia PC, Rivero RM, 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 NV, Travkin MP. 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, Sahebjamei 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.
[29] Aukhez ST, Beharry GK. 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 MA, Walter MH, Ralph SG, Dabrowska P, Luck K, Uros EM, Boland W, Strack, Rodriguez-Concepcion M, Bohlmann J. Functional identification and differential expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in induced 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 acuminate*. Plant Physiol 2008;165:203–213.