DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2017.109712

دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۳، شماره ۱، صفحه ۸۹-۷۳ (۱۳۹۶)

تقویت تولید تاکسول در کشت سوسپانسیون سلولی فندق (*Corylus avellana* L.) از طریق ترکیب محرک و پیش‌ماده

رقیه حضرتی جهان[۱]، ناصر زارع[۲*]، سارا دژستان[۳] و پریسا شیخ‌زاده مصدق[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

پست الکترونیک: zarenasser@yahoo.com

۳- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۴ تاریخ اصلاح نهایی: تیر ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۵

چکیده

کشف تولید تاکسان‌ها در فندق (*Corylus avellana* L.) و کشت‌های سلولی آن علایق و امیدهای زیادی را برای مطالعه و کاربرد کشت سوسپانسیون سلولی فندق به‌عنوان یک راهکار زیست‌فناوری برای تولید تاکسول و سایر تاکسان‌ها ایجاد کرده است. در این تحقیق، تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (سطوح مختلف 2,4-D و NAA در ترکیب با Kin و BAP) بر رشد کشت‌های سلولی فندق و تأثیر ترکیب محرک (متیل جاسمونات ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار، کیتوسان ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر و امواج فراصوت ۱ و ۲ دقیقه) و پیش‌ماده (آمینوبنزوئیک اسید ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر و فنیل‌آلانین ۱ و ۲ میلی‌مولار) بر تولید تاکسول در کشت سوسپانسیون سلولی بررسی شد. نتایج نشان داد که تیمارهای تنظیم‌کننده رشدی، رشد سلول فندق را در کشت سوسپانسیون به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار داد. رشد سلول‌ها در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین (BAP) و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر آسکوربیک اسید در مقایسه با سایر تیمارها به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. بین تیمارهای محرک نیز از نظر رشد و زنده‌مانی سلولی، EC و pH محیط کشت و تولید تاکسول اختلاف معنی‌داری وجود داشت. به‌طور کلی، اعمال تیمارهای محرک در مقایسه با تیمار شاهد (بدون محرک)، موجب کاهش تکثیر و رشد سلولی شده ولی میزان تاکسول را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. بیشترین مقدار تاکسول (۱۵/۲۷ میلی‌گرم در لیتر) در تیمار دو دقیقه امواج فراصوت و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر آمینوبنزوئیک اسید در ریزنمونه بذر بدست آمد که ۱۳۲/۷۸ برابر بیشتر از مقدار تاکسول در تیمار شاهد بود.

واژه‌های کلیدی: امواج فراصوت، پاکلی‌تاکسل، تاکسان‌ها، کشت درون‌شیشه‌ای، متابولیت ثانویه.

مقدمه

متابولیت‌های ثانویه گیاهی مواد آلی شیمیایی پیچیده‌ای می‌باشند که در گیاه تولید شده و در رشد و نمو و فعالیت‌های حیاتی آن نقشی ندارند (Kumar & Gupta, 2008). برای هر متابولیت ثانویه گیاهی، هزینه و قابلیت تولید از مهمترین عوامل در رسیدن به سطح تجاری تولید

می‌باشد. تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت سوسپانسیون سلولی به‌دلیل ارزش اقتصادی بالای این ترکیب‌ها به‌صورت گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد (Sato *et al*., 2001). برخی از متابولیت‌های ثانویه ازجمله تاکسول (Taxol) از ارزش اقتصادی بالایی برخوردارند. تاکسول یک آلکالوئید دی‌ترپنوئیدی است که به گروهی از دی‌ترپن‌ها به نام تاکسان (Taxan) تعلق داشته و دارای خاصیت ضدسرطانی است (Frense, 2007). تولید انبوه و سریع این ماده پیچیده در مقیاس زیاد از طریق روش‌های شیمیایی عمدتاً مشکل و یا غیرممکن می‌باشد (Holton *et al*., 1995). ساده‌ترین روش دستیابی به تاکسول، استخراج آن از منابع گیاهی مثل درختان چند صد ساله سرخدار است ولی این استخراج منجر به نابودی این منابع طبیعی می‌گردد، زیرا عملکرد تولید تاکسول بسیار پایین بوده و این درخت از رشد بسیار کندی برخوردار است (Itokawa, 2003). تولید این متابولیت در مقادیر کم در بخش‌های مختلف گیاه فندق (Itokawa, 2003) و همچنین کالوس و کشت سلولی آن (Bestoso *et al*., 2006؛ Rezaei *et al*., 2011؛ Rahpeyma *et al*., 2015) گزارش شده است. اهمیت اصلی تولید تاکسان‌ها از طریق فندق نسبت به سرخدار این است که فندق به‌طور گسترده‌تری در دسترس است، بسیار سریع‌تر در طبیعت رشد می‌کند و کشت آن در شرایط آزمایشگاهی آسان‌تر از سرخدار است. علاوه‌بر این، تولید مستقیم کالوس از دانه‌های خرد شده فندق، زمان کشت و احتمال آلودگی را به حداقل می‌رساند (Bestoso *et al*., 2006).

از راهکارهای مختلفی می‌توان برای تقویت تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سلول گیاهی استفاده کرد که ازجمله آنها می‌توان به بهینه‌سازی ترکیب محیط کشت و شرایط کشت، گزینش سلول‌های پرعملکرد از نظر متابولیت ثانویه مورد نظر، تغذیه سلول‌ها با پیش‌ماده و تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه با استفاده از محرک اشاره کرد.

جاسمونیک اسید و مشتقات آن مانند متیل جاسمونات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی هستند که در پاسخ دفاعی فیزیکی و شیمیایی مانند تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه دخالت دارند (Fritz *et al*., 2010). کیتوسان یک پلی‌ساکارید مشتق شده از کیتین است که شامل گلوکز آمین و ان-استیل‌گلوکز آمین می‌باشد که هر دو جزو قسمت‌های تشکیل‌دهنده سلولز و کیتین هستند. گزارش شده که الیگومرهای کیتوسان و کیتین، فعالیت فنیل‌آلانین آمونیولیاز (PAL) و تیروزین آمونیولیاز (TAL) را افزایش می‌دهد (Kim *et al*., 2009). امواج فراصوت (Ultrasound) با انرژی پایین به‌عنوان یک فناوری غیرحرارتی، محرکی فیزیکی و منبع انرژی ایمن است که دارای اثرات بیولوژیکی متعددی روی سلول‌های گیاهی بوده و نشان داده شده که می‌تواند در تحریک سنتز متابولیت‌های ثانویه نقش ایفا کند (DiCosmo & Misawa, 1985).

تلاش برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی از طریق کاربرد پیش‌ماده در بسیاری از موارد مؤثر بوده است. محققانی همانند Lansing و همکاران (۱۹۹۱) و Zamir و همکاران (۱۹۹۲) نخستین کسانی بودند که در آزمایش‌های تغذیه با موالونات، میزان بالایی از پاکلی‌تاکسل (Paclitaxel) را در کشت سلولی سرخدار گزارش کردند.

علاوه‌براین راهکار استفاده ترکیبی از تحریک سلولی و تغذیه سلولی با پیش‌ماده راهکار مؤثر دیگری است که نسبت به کاربرد راهکارهای فوق به‌تنهایی تأثیر بیشتری دارد. معمولاً برای تقویت تجمع تاکسوئید از رهیافت‌های ترکیبی استفاده می‌شود که هدف از این رهیافت‌ها طولانی کردن دوره زمانی است که کشت سلولی قادر است ترکیب‌های تاکسوئیدی تولید کند (Rahpeyma *et al*., 2015). با توجه به تحقیقات انجام شده که حضور تاکسول را در گیاه فندق تأیید کرده و همچنین نبود مطالعه‌ای در مورد میزان این متابولیت در کشت‌های سلولی حاصل از درختان منطقه فندقلو، این تحقیق به‌منظور ارزیابی تأثیر عوامل مؤثر بر رشد سلول‌های گیاه فندق در کشت

سوسپانسیون و تأثیر مواد محرک و پیش‌ماده بر تولید تاکسول در شرایط درون شیشه‌ای انجام شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این پژوهش، برگ‌های جوان (در اواسط بهار) و بذرهای تازه فندق (در اواسط تابستان) از جنگل فندقلو (رویشگاه جنگلی فندقلو مستقر روی تپه‌ای به‌نام آرپاتپه در فاصله ۲۵ کیلومتری شهرستان اردبیل و ۱۰ کیلومتری جنوب شهر نمین در خط‌الرأس گردنه حیران جنب روستای فندقلو قرار گرفته است) جمع‌آوری و به‌عنوان منبعی برای تهیه ریزنمونه استفاده شد.

القاء کالوس و استقرار کشت سوسپانسیون سلولی

نمونه‌های گیاهی (برگ و بذر) پنج دقیقه با مایع ظرفشویی شستشو شده و به‌مدت ۲۰ دقیقه آبشویی گردید، پس از یک دقیقه غوطه‌ورسازی در الکل ۹۶٪ با هیپوکلریت سدیم (برگ: ۲/۵٪ و بذر: ۵٪) به‌مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شده و ۳ بار با آب اتوکلاو شده شستشو شد. برگ‌های ضدعفونی شده به قطعات ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متری برش داده شده و بذرها نیز به چهار قسمت تقسیم شده و به‌عنوان ریزنمونه روی محیط MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP کشت شدند. کشت‌ها در اتاقک رشد در شرایط تاریکی و دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جدول ۱- ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی استفاده شده در کشت سوسپانسیون سلولی فندق

شماره محیط کشت	2,4-D (mg/L)	NAA (mg/L)	Kin (mg/L)	BAP (mg/L)	آسکوربیک اسید (mg/L)	کازئین هیدرولایست (g/L)
۱	۰/۵	–	–	۰/۵	۱۵۰	–
۲	۰/۵	–	–	۰/۵	–	–
۳	۱	–	۰/۵	–	۱۵۰	۰/۵
۴	۱	–	۱	–	۱۵۰	۰/۵
۵	۱	–	–	۰/۵	۱۵۰	–
۶	۱	–	–	۰/۵	–	۰/۵
۷	۱	–	–	۰/۵	۱۵۰	۰/۵
۸	۱	–	–	۱	۱۵۰	۰/۵
۹	۲	–	–	۰/۵	۱۵۰	۰/۵
۱۰	۲	–	–	۱	۱۵۰	۰/۵
۱۱	۴	–	۰/۵	–	۱۵۰	۰/۵
۱۲	۴	–	۰/۵	–	–	–
۱۳	۴	–	۰/۵	–	–	۰/۵
۱۴	۴	–	۰/۵	–	۱۵۰	۰/۵
۱۵	۴	–	۱	–	۱۵۰	۰/۵
۱۶	۴	–	–	۰/۵	۱۵۰	۰/۵
۱۷	–	۰/۵	۰/۵	–	–	–
۱۸	–	۱	۰/۵	–	۱۵۰	۰/۵
۱۹	–	۲	۰/۵	–	۱۵۰	۰/۵
۲۰	–	۲	۱	–	۱۵۰	۰/۵
۲۱	–	۲	–	۱	۱۵۰	۰/۵
۲۲	–	۴	۰/۵	–	۱۵۰	۰/۵
۲۳	–	۴	۱	–	۱۵۰	۰/۵

برای ایجاد کشت سوسپانسیون و بهینه‌سازی محیط کشت برای رشد سوسپانسیون سلولی فندق، کالوس‌های نرم و خوب رشد کرده از ریزنمونه برگ و بذر به محیط کشت MS مایع حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف و همچنین آسکوربیک اسید و کازئین هیدرولایست (جدول ۱) منتقل و روی شیکر اوربیتال با دور ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند. برای استقرار رشد سلولی از روش گام به گام استفاده گردید. به این صورت که ابتدا توده کالوس به ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت MS مایع انتقال داده شده و بعد در فواصل دو هفته‌ای ۵ میلی‌لیتر محیط تازه به آنها اضافه شد. پس از استقرار سوسپانسیون سلولی، کشت‌ها هر دو هفته یک بار به‌صورت ۱:۱ با محیط تازه زیرکشت شدند. برای ارزیابی تکثیر و رشد سلولی از شاخص‌هایی مانند تراکم سلولی، EC و pH محیط کشت، SCV و PCV استفاده شد.

تیمارهای محرک

پس از اینکه تراکم سلولی در کشت‌های سوسپانسیون به میزان ثابتی رسید، حجم یکسانی از سلول‌ها به محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر آسکوربیک اسید منتقل شد. یک هفته پس از زیرکشت سلول‌ها، تیمارهای مختلفی به‌شرح جدول ۲ اعمال گردید. محلول‌های متیل جاسمونات، کیتوسان و همچنین پیش‌ماده‌های آمینوبنزوئیک اسید و فنیل‌آلانین پس از تهیه، با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر ضدعفونی شده و مورد استفاده قرار گرفتند. چهار روز پس از اعمال تیمار، نمونه‌برداری انجام و شاخص‌های زنده‌مانی، تراکم سلول، pH و EC محیط کشت، وزن سلول خشک شده در خلأ و سرما (فریزدرای شده) و مقدار تاکسول اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری حجم سلول ساکن (SCV) و حجم سلول فشرده شده (PCV)

برای اندازه‌گیری SCV، ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی سلول‌ها در فالکون درجه‌بندی شده به‌مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شده و پس از رسوب سلول‌ها، حجم سلول یادداشت و به‌صورت درصد بیان گردید. برای اندازه‌گیری PCV، ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی سلول‌ها در فالکون درجه‌بندی به‌مدت ۵ دقیقه با ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. حجم سلول یادداشت و به‌صورت درصد بیان شد.

شمارش سلول

برای شمارش تعداد سلول در یک میلی‌لیتر کشت سوسپانسیون، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی برداشته شد و دو میلی‌لیتر تری‌اکسیدکروم (CrO_3) به آن اضافه گردید. محلول حاصل به‌مدت ۱۵ دقیقه در حمام آبی با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و بعد به‌مدت ۱۵ دقیقه ورتکس شد. مقداری از محلول مورد نظر روی لام هموسیتومتر منتقل و تعداد سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری شمارش گردید.

زنده‌مانی سلول

برای تعیین سلول‌های زنده از رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو استفاده شد. ابتدا محلول تریپان‌بلوی ۴٪ در بافر فسفات (۷۲ میلی‌مولار Na_2HPo_4، ۲۸ میلی‌مولار NaH_2Po_4، pH=۷/۴) تهیه شده و با استفاده از فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر گردید. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول تریپان‌بلو ۴٪ مخلوط و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی فوق روی صفحه مشبک لام هموسیتومتر قرار داده شد. سلول‌های آبی (مرده) و روشن (زنده) برای محاسبه زنده‌مانی سلول با میکروسکوپ نوری مورد شمارش قرار گرفت.

جدول ۲- تیمارهای محرک استفاده شده برای تحریک تولید تاکسول در کشت سوسپانسیون سلولی فندق

شماره تیمار	ترکیب تیماری				
	امواج فراصوت (دقیقه)	متیل جاسمونات (میکرومولار)	کیتوسان (میلی‌گرم در لیتر)	فنیل‌آلانین (میلی‌مولار)	آمینوبنزوئیک اسید (میلی‌گرم در لیتر)
۱	۱	–	–	۱	–
۲	۱	–	–	۲	–
۳	۱	–	–	–	۱۰
۴	۱	–	–	–	۲۰
۵	۲	–	–	۱	–
۶	۲	–	–	۲	–
۷	۲	–	–	–	۱۰
۸	۲	–	–	–	۲۰
۹	–	۱۰۰	–	۱	–
۱۰	–	۱۰۰	–	۲	–
۱۱	–	۱۰۰	–	–	۱۰
۱۲	–	۱۰۰	–	–	۲۰
۱۳	–	۱۵۰	–	۱	–
۱۴	–	۱۵۰	–	۲	–
۱۵	–	۱۵۰	–	–	۱۰
۱۶	–	۱۵۰	–	–	۲۰
۱۷	–	–	۳۰	۱	–
۱۸	–	–	۳۰	۲	–
۱۹	–	–	۳۰	–	۱۰
۲۰	–	–	۳۰	–	۲۰
۲۱	–	–	۶۰	۱	–
۲۲	–	–	۶۰	۲	–
۲۳	–	–	۶۰	–	۱۰
۲۴	–	–	۶۰	–	۲۰
۲۵	–	–	–	–	–

استخراج تاکسول و اندازه‌گیری آن توسط HPLC

به‌منظور بررسی میزان تاکسول، توده‌های سلولی حاصل از کشت سوسپانسیون سلولی چهار روز پس از اعمال تیمار محرک با استفاده از فریزدرایر خشک شد. عصاره‌گیری مطابق روش Khosroshahi و همکاران (۲۰۰۶) انجام شد. به این صورت که ۱۰ میلی‌لیتر متانول به ۰/۲ گرم سلول وزن شده اضافه شد و به‌مدت ۴۰ دقیقه تحت امواج فراصوت به‌طور کامل لیز شد. سپس از فیلتر ۰/۲۲ میکرولیتر عبور داده شده و در آون در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تغلیظ گردید. عصاره تغلیظ شده در دو میلی‌لیتر متانول فیلتر شده حل گردید و برای اندازه‌گیری میزان تاکسول از دستگاه HPLC و ستون XDB-C18 150 mm × 4.6 استفاده شد. فاز متحرک شامل ترکیب استونیتریل به آب به نسبت ۶۰ به ۴۰ بود که با شدت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه از ستون عبور می‌کرد. میزان تاکسول هر نمونه، تحت اشعه UV با طول موج ۲۲۷ نانومتر و به کمک استاندارد تاکسول (شرکت Sigma) اندازه‌گیری شد. میزان تاکسول براساس پیک جذب UV در طول موج ۲۲۷ نانومتر مشخص شد.

طرح آزمایشی و تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌ها بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. محاسبات آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 16 و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام گردید. نمودارها نیز توسط نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2010 رسم شد.

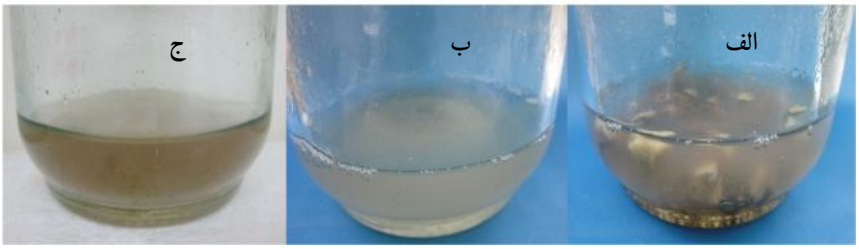
نتایج

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر رشد سلول‌های فندق در کشت سوسپانسیون

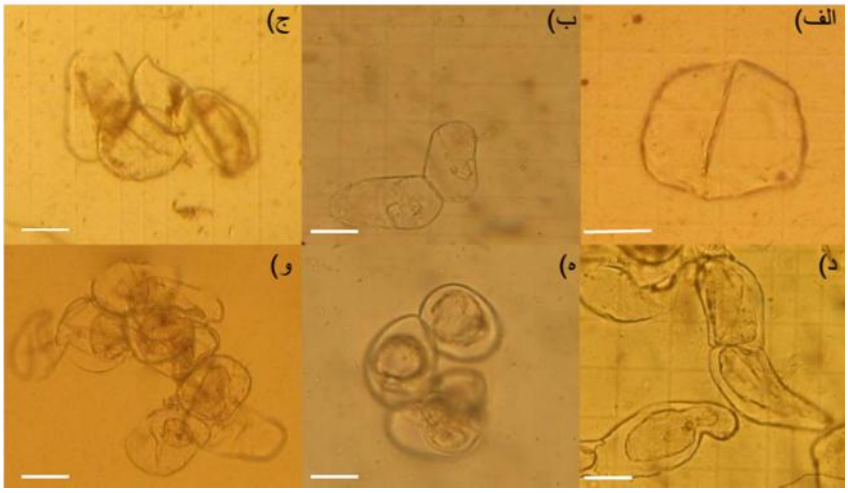
نمونه‌ای از کشت‌های سوسپانسیون سلولی فندق در شکل ۱ و تقسیم و مورفولوژی سلول‌ها در شکل ۲ آورده شده است. براساس نتایج تجزیه واریانس، بین تیمارهای تنظیم‌کننده رشد گیاهی اعمال شده از نظر شاخص‌های SCV و PCV در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌داری مشاهده شد.

بیشترین SCV و PCV به‌ترتیب با میانگین ۱۱/۴۴٪ و ۱۰/۹۴٪ در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌علاوه ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر آسکوربیک اسید بدست آمد (شکل ۳). کمترین مقدار SCV و PCV نیز به‌ترتیب با میانگین ۲/۴۱۶٪ و ۱/۹٪ در محیط کشت MS حاوی چهار میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر Kin به اضافه ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر آسکوربیک اسید و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کازئین هیدرولایست مشاهده شد (شکل ۳).

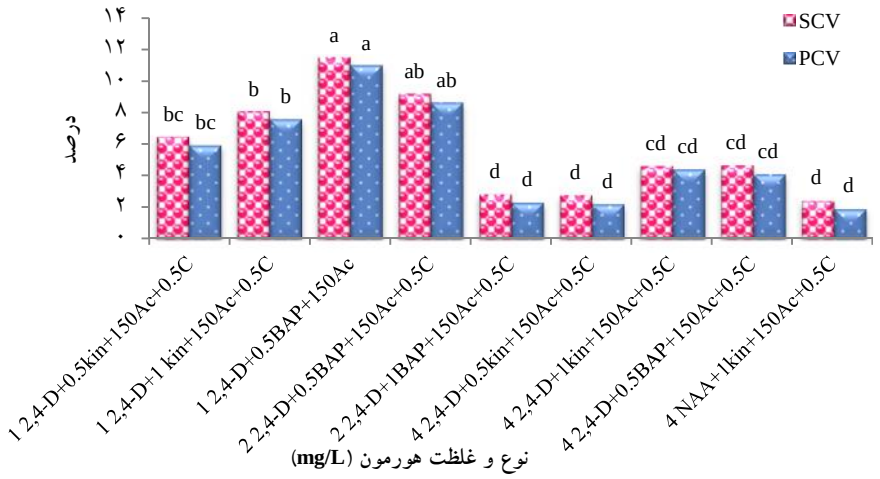
شکل ۴ منحنی رشد سلول‌های فندق در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به اضافه ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر آسکوربیک اسید را نشان می‌دهد. با گذشت زمان تعداد سلول در میلی‌لیتر، مقدار SCV و PCV افزایش یافت.



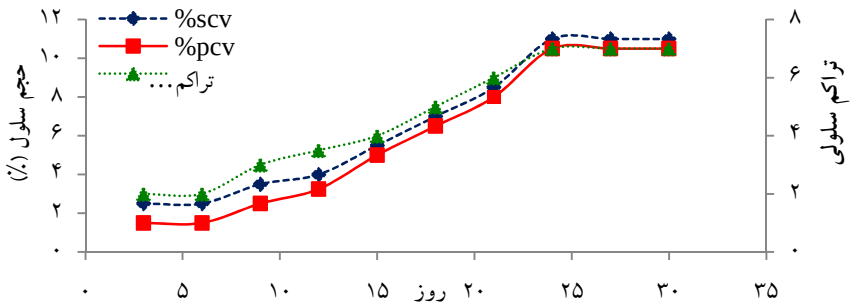
شکل ۱- کشت سوسپانسیون فندق: الف) قطعات کالوس منتقل شده به محیط کشت مایع، ب و ج) تغییر رنگ محیط کشت در اثر افزایش تراکم سلولی و احتمالاً تولید و ترشح ترکیب‌های ثانویه



شکل ۲- سلول‌های حاصل از تقسیم سلولی در کشت سوسپانسیون سلولی فندق: الف و ب) سلول‌های در حال تقسیم؛ ج، د، ه، و) افزایش تراکم سلولی در کشت‌های سلولی با گذشت زمان (خط معیار نشان‌دهنده ۵۰ میکرومتر است.)



شکل ۳- میانگین حجم سلول در کشت سوسپانسیون *Corylus avellana* تحت تأثیر سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی؛ AC: آسکوربیک اسید (mg/L)؛ C: کازئین هیدرولایست (g/L)



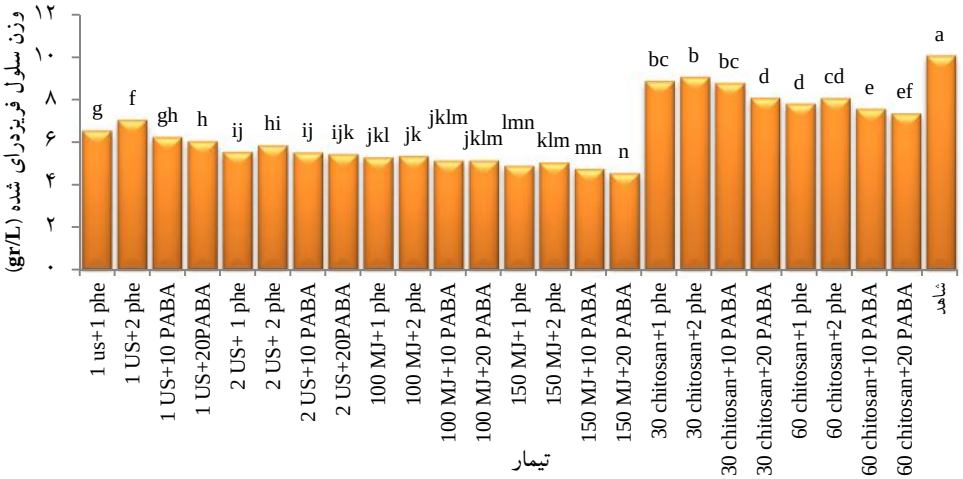
شکل ۴- منحنی رشد کشت سوسپانسیون فندق در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر آسکوربیک اسید

تأثیر تیمارهای محرک و پیش‌ماده بر رشد کشت سوسپانسیون فندق

کشت سوسپانسیون سلولی حاصل از ریزنمونه بذر

تجزیه واریانس داده ها نشان داد که بین تیمارهای محرک از نظر EC و pH محیط کشت، درصد زنده‌مانی، SCV، PCV و وزن سلول فریزدرای شده، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود داشت. مقایسه میانگین تیمارها (شکل ۵) نشان داد که در اثر تیمار سلول‌ها با محرک و پیش‌ماده تکثیر سلولی به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد (بدون محرک) کاهش یافته است. با این حال، کاهش تکثیر سلولی در تیمارهای مختلف متفاوت بود. به‌طوری که بیشترین وزن سلول فریزدرای شده نسبت به تیمار شاهد به‌ترتیب ۱۰، ۱۲ و ۱۳ درصد کاهش داشت. زنده‌مانی سلول‌ها نیز در اثر تیمار کشت‌های سلولی با محرک‌ها و پیش‌ماده به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. به‌طوری که بیشترین درصد زنده‌مانی با میانگین ۹۵٪ در تیمار شاهد مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری بیشتر از بقیه تیمارها بود. پس از آن بیشترین زنده‌مانی سلولی با میانگین ۸۹٪ و ۸۷/۹٪ به‌ترتیب در تیمارهای ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان به‌همراه دو میلی‌مولار فنیل‌آلانین و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان به‌همراه یک میلی‌مولار فنیل‌آلانین مشاهده شد. کمترین درصد زنده‌مانی با میانگین ۵٪ و ۶٪ در تیمارهای ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات به‌همراه

۱۰ میلی‌گرم در لیتر بنزوئیک اسید و ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات به‌همراه دو میلی‌مولار فنیل‌آلانین بدست آمد (شکل ۶).



شکل ۵- میانگین وزن سلول فریزدرای شده حاصل از تیمارهای محرک در کشت سوسپانسیون ریزنمونه بذر فندق

US (امواج فراصوت: دقیقه)؛ phe (فنیل‌آلانین: میلی‌مولار)؛ PABA (آمینوبنزوئیک اسید: میلی‌گرم در لیتر)؛ MJ (متیل جاسمونات: میکرومولار)؛ chitosan (کیتوسان: میلی‌گرم در لیتر)

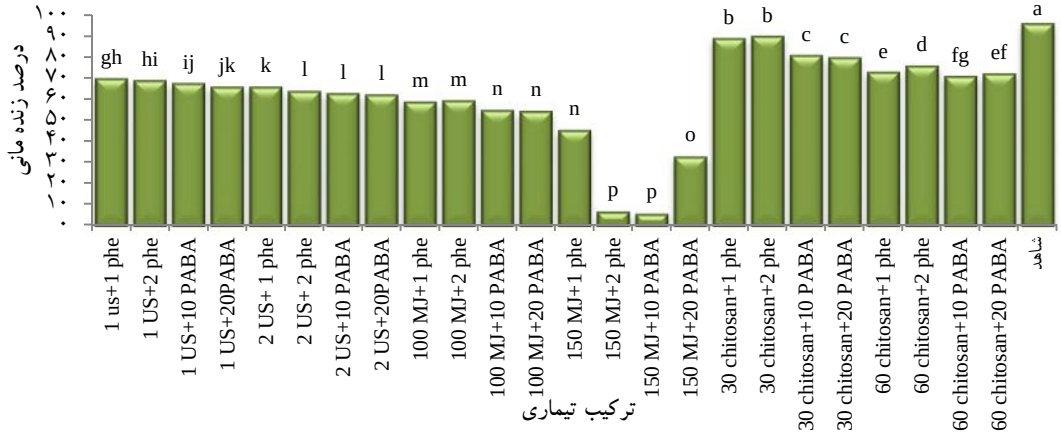
در تیمارهای محرک بیشترین SCV و PCV به ترتیب با میانگین ۱۰/۳٪ و ۹/۸٪ در تیمار ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان به همراه دو میلی مولار فنیل آلانین مشاهده شد. کمترین SCV با ۶/۶٪ در تیمار ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات به‌همراه ۲۰ میلی‌گرم در لیتر بنزوئیک اسید بدست آمد که به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد ولی بیشتر از سایر تیمارها بود (شکل ۷ و جدول ۳).

براساس مقایسه میانگین (جدول ۳) بیشترین مقدار EC با میانگین ۴/۸۷ و ۴/۶۴ میلی‌زیمنس به ترتیب در تیمارهای دو دقیقه امواج فراصوت به‌همراه دو میلی‌مولار فنیل‌آلانین و دو دقیقه امواج فراصوت به‌همراه ۱۰ میلی گرم در لیتر بنزوئیک اسید مشاهده شد. کمترین مقدار EC نیز با میانگین ۳/۸۴، ۴/۰۸ و ۴/۰۹ میلی‌زیمنس به‌ترتیب در تیمارهای ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات به‌همراه دو میلی‌مولار فنیل‌آلانین، ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به‌همراه ۲۰ میلی‌گرم در لیتر بنزوئیک اسید و تیمار ۶۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان به همراه ۲۰ میلی گرم در لیتر بنزوئیک اسید مشاهده شد. تیمارهای دارای کیتوسان دارای بیشترین مقادیر pH بودند، به‌طوری که بیشترین مقادیر pH در تیمارهای ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان به‌همراه ۱۰ میلی گرم در لیتر بنزوئیک اسید، ۶۰ میلی گرم در لیتر کیتوسان به‌همراه دو میلی‌مولار فنیل‌آلانین، ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان به همراه ۲۰ میلی گرم در لیتر بنزوئیک اسید و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان به‌همراه یک میلی‌مولار فنیل‌آلانین مشاهده شد (جدول ۳).

جدول ۳- میانگین EC و pH محیط کشت و PCV در ترکیب‌های تیماری مختلف در کشت سوسپانسیون بذر فندق

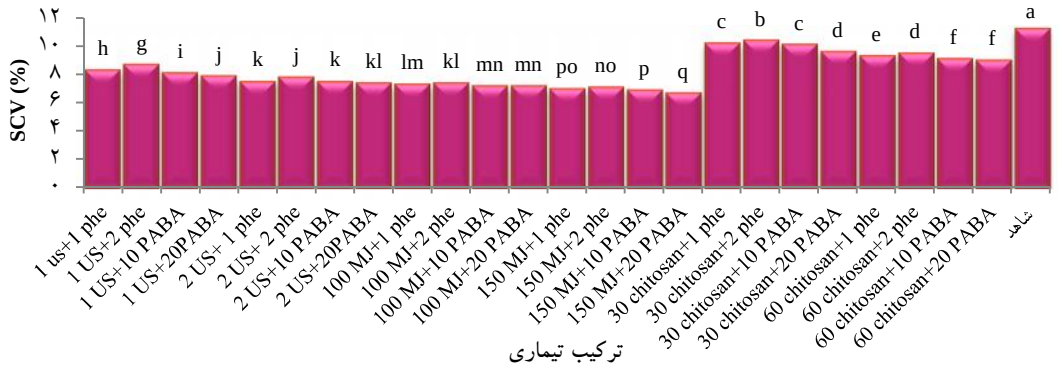
PCV (%)	pH	EC	ترکیب تیماری				
			PABA	phe	Chitosan	MJ	US
۷/۷ cdefghi	۶/۳۴ defgh	۴/۲۲۵ cde	–	۱	–	–	۱
۸/۱ bcdefgh	۶/۳ efgh	۴/۲۲ cde	–	۲	–	–	۱
۷/۵ defghi	۶/۲۹ efgh	۴/۳۵ bcde	۱۰	–	–	–	۱
۷/۳ defghi	۶/۲۳ fghi	۴/۲ cde	۲۰	–	–	–	۱
۶/۹ efghi	۶/۴ cdefgh	۴/۴۶ bcd	–	۱	–	–	۲
۷/۲ defghi	۶/۳۹ cdefgh	۴/۸۷۵ a	–	۲	–	–	۲
۶/۹ efghi	۶/۱۷ ghi	۴/۶۴ ab	۱۰	–	–	–	۲
۶/۸ efghi	۶/۰۵ hi	۴/۳ bcde	۲۰	–	–	–	۲
۶/۷ k	۶/۷۶ abcde	۴/۴۹۵ bc	–	۱	–	۱۰۰	–
۶/۸ jk	۶/۸۲ abcd	۴/۳۰۵ bcde	–	۲	–	۱۰۰	–
۶/۶ fghij	۶/۸۵ abc	۴/۱۷ cdef	۱۰	–	–	۱۰۰	–
۷/۱ fghij	۶/۸ abcd	۴/۰۸ ef	۲۰	–	–	۱۰۰	–
۶/۴ hijk	۶/۷۱ abcdef	۴/۱۵۵ cdef	–	۱	–	۱۵۰	–
۶/۵ ghijk	۶/۶ abcdefg	۳/۸۴ f	–	۲	–	۱۵۰	–
۶/۳ hijk	۶/۴۲ j	۴/۳۸۵ bcde	۱۰	–	–	۱۵۰	–
۶/۱ ijk	۶/۴۵ bcdefgh	۴/۱۰ def	۲۰	–	–	۱۵۰	–
۹/۶ abc	۶/۹ ab	۴/۳۱۵ bcde	–	۱	۳۰	–	–
۹/۸ ab	۶/۸۸ abc	۴/۲۷۵ cde	–	۲	۳۰	–	–
۹/۵ abc	۶/۹۴ ab	۴/۳۵ bcde	۱۰	–	۳۰	–	–
۹ abcd	۶/۹۶ a	۴/۳۶ bcde	۲۰	–	۳۰	–	–
۸/۷ bcde	۶/۹۵ abcdef	۴/۱۵ cdef	–	۱	۶۰	–	–
۸/۹ abcd	۶/۹۱ ab	۴/۲ cde	–	۲	۶۰	–	–
۸/۵ bcdef	۶/۸ abcd	۴/۳۷ bcde	۱۰	–	۶۰	–	–
۸/۴ bcdefg	۶/۸۹ ab	۴/۰۹ ef	۲۰	–	۶۰	–	–
۱۰/۶ a	۵/۸۱ i	۴/۴۳ bcde	–	–	–	–	–

US (امواج فراصوت: دقیقه)؛ phe (فنیل‌آلانین: میلی‌مولار)؛ PABA (آمینوبنزوئیک اسید: میلی‌گرم در لیتر)؛ MJ (متیل جاسمونات: میکرومولار)؛ Chitosan (کیتوسان: میلی‌گرم در لیتر)



شکل ۶- میانگین درصد زنده‌مانی سلول‌های حاصل از تیمارهای محرک در کشت سوسپانسیون ریزنمونه بذر فندق

US (امواج فراصوت: دقیقه)؛ phe (فنیل‌آلانین: میلی‌مولار)؛ PABA (آمینوبنزوئیک اسید: میلی‌گرم در لیتر)؛ MJ (متیل جاسمونات: میکرومولار)؛ chitosan (کیتوسان: میلی‌گرم در لیتر)



شکل ۷- میانگین حجم سلول‌های حاصل از تیمارهای محرک در کشت سوسپانسیون ریزنمونه بذر فندق

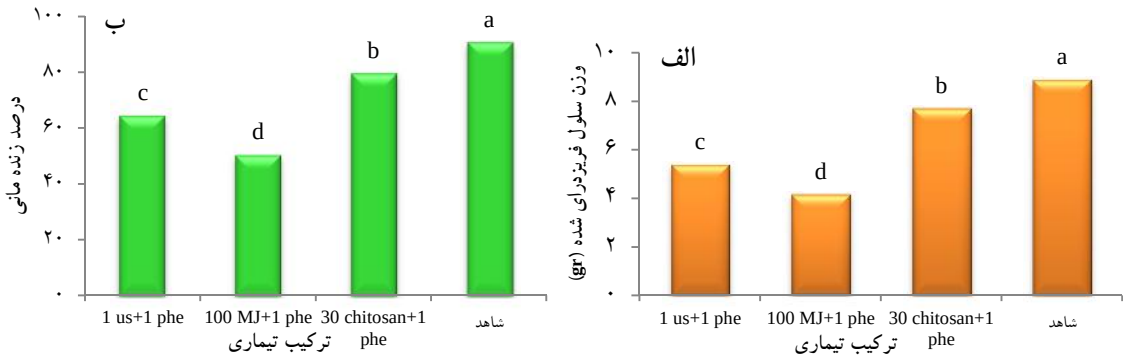
US (امواج فراصوت: دقیقه)؛ phe (فنیل‌آلانین: میلی‌مولار)؛ PABA (آمینوبنزوئیک اسید: میلی‌گرم در لیتر)؛ MJ (متیل جاسمونات: میکرومولار)؛ Chitosan (کیتوسان: میلی‌گرم در لیتر)

کشت سوسپانسیون سلولی حاصل از ریزنمونه برگ

پس از استقرار کشت سوسپانسیون سلولی و یکسان‌سازی تراکم سلولی، تأثیر تیمار محرک‌ها و پیش‌ماده تاکسول بر رشد سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که بین تیمارهای محرک به‌غیر از EC در بقیه صفات در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌دار وجود داشت.

همانند کشت سلولی حاصل از ریزنمونه بذر، بیشترین وزن سلول فریزدرای شده و بیشترین درصد زنده‌مانی و همچنین بیشترین مقدار SCV و PCV در تیمار شاهد مشاهده شد. بیشترین مهار تکثیر سلولی و کمترین درصد زنده‌مانی و در نتیجه کمترین وزن سلول فریزدرای شده در تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به‌همراه یک میلی‌مولار فنیل‌آلانین مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری کمتر از وزن سلولی سایر تیمارها بود و نیز کمترین مقدار SCV و PCV هم در این تیمار مشاهده شد. بعکس کمترین مهار تکثیر سلولی و بیشترین درصد زنده‌مانی و بیشترین مقدار SCV و PCV در تیمار ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان و یک میلی‌مولار فنیل‌آلانین مشاهده شد (شکل ۸). بیشترین مقدار pH با میانگین ۶/۷ و ۶/۶ در تیمار ۳۰ میلی‌گرم در لیتر

کیتوسان و یک میلی‌مولار فنیل‌آلانین و در تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به‌همراه یک میلی‌مولار فنیل‌آلانین و کمترین مقدار با میانگین ۵/۹ در شاهد مشاهده شد (جدول ۴).



شکل ۸- میانگین: الف) وزن سلول فریزدرای شده و ب) درصد زنده‌مانی کشت‌های سلولی حاصل از کشت سوسپانسیونی برگ پس از تیمار با محرک‌ها

جدول ۴- میانگین PCV، SCV و pH محیط کشت در سلول‌های تیمار شده حاصل از کشت سوسپانسیونی ریزنمونه برگ فندق

PCV	SCV	pH	ترکیب تیماری			
			phe	Chitosan	MJ	US
۷/۵ b	۸ b	۶/۲۲ b	۱	–	–	۱
۶/۵ c	۷ c	۶/۶ a	۱	–	۱۰۰	–
۹ a	۹/۵ a	۶/۷ a	۱	۳۰	–	–
۹ a	۹/۸ a	۵/۹ c	–	–	–	–

اندازه‌گیری تاکسول

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین تیمارهای مورد بررسی از نظر میزان تاکسول اختلاف معنی‌داری وجود داشت و کشت‌های تیمارشده نسبت به شاهد افزایش تولید تاکسول نشان دادند.

بیشترین مقدار تاکسول (۱۵/۲۷ میلی‌گرم در لیتر برابر ۱۵۲/۷ میکروگرم بر گرم وزن سلول خشک شده در خلأ و سرما) در تیمار دو دقیقه امواج فراصوت و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر بنزوئیک اسید بدست آمد که ۱۳۲/۷۸ برابر بیشتر از مقدار تاکسول در تیمار شاهد بذر بود. کمترین مقدار تاکسول (۰/۱۱۵ میلی‌گرم در لیتر) در تیمار شاهد بذر مشاهده شد (جدول ۵).

بحث

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر رشد سلول‌های فندق در کشت سوسپانسیون

در مطالعات متعددی از شاخص‌های SCV و PCV برای ارزیابی تکثیر و رشد سلول‌ها استفاده شده (Street, 1977) و رابطه مثبت و معنی‌داری بین این شاخص‌ها و تراکم سلولی در کشت سوسپانسیون سلولی خشخاش ایرانی (*Papaver bracteatum*) گزارش شده است (Farjaminezhad *et al.*, 2013). تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از عوامل اصلی در تقسیم و رشد و نمو سلول‌های گیاهی هستند.

جدول ۵- میانگین تاکسول بدست آمده در ریزنمونه‌ها و ترکیب‌های هورمونی مختلف

شماره تیمار	نوع تیمار	تاکسول (mg/L)	عملکرد ویژه (µg/g freez dried cell)
۱	1US+10 PABA	۰/۶۲۴ c	۶/۲۴
۲	1US+20 PABA	۸/۹۹ ab	۸۹/۹
۳	2US+1phe	۲/۰۶ bc	۲۰/۶
۴	2US+2phe	۱/۱۵ c	۱۱/۵
۵	2US+10 PABA	۳/۳۱ bc	۳۳/۱
۶	2US+20 PABA	۱۵/۲۷ a	۱۵۲/۷
۷	100MJ+1phe	۰/۶۱۳ c	۶/۱۳
۸	100MJ+1phe برگ	۶/۰۶۹ bc	۶۰/۶۹
۹	100MJ+2phe	۴/۹۵۸ bc	۴۹/۵۸
۱۰	100MJ+10 PABA	۱/۲۳۱ c	۱۲/۳۱
۱۱	150MJ+20 PABA	۰/۱۹۳ c	۱/۹۳
۱۲	30Chitosan+1phe	۰/۵۲ c	۵/۲
۱۳	30Chitosan+2phe	۱/۱۳۴ c	۱۱/۳۴
۱۴	30Chitosan+10 PABA	۰/۸۰۶ c	۸/۰۶
۱۵	60Chitosan+2phe	۰/۱۵۸ c	۱/۵۸
۱۶	شاهد بذر	۰/۱۱۵ c	۱/۱۵
۱۷	شاهد برگ	۳/۷۰۹ bc	۳۷/۰۹

US (امواج فراصوت: دقیقه)؛ phe (فنیل‌آلانین: میلی‌مولار)؛ PABA (آمینوبنزوئیک اسید: میلی‌گرم در لیتر)؛ MJ (متیل جاسمونات: میکرومولار)؛ Chitosan (کیتوسان: میلی‌گرم در لیتر)

در این تحقیق، محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر آسکوربیک اسید شرایط رشدی بهتری را برای سلول‌های فندق مهیا کرد که با نتایج Rezaei و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت داشت، ولی در این تحقیق اضافه کردن آسکوربیک اسید به ترکیب محیط کشت باعث تقویت تکثیر سلول‌ها شد. به‌طوری که در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌اضافه ۰/۵ گرم در لیتر کازئین هیدرولایست نیز استقرار و تکثیر سلول‌ها بسیار کند بود. رشد سلول‌ها تا ۹ روز بعد از کشت کُند و ناچیز بود ولی بعد از آن تراکم سلولی افزایش یافته و ۲۴ روز پس از کشت به حداکثر مقدار خود رسید. پس از این مدت رشد سلول متوقف شده و تراکم سلولی محیط کشت ثابت مانده است. البته توقف رشد سلول بعد از این مدت ممکن است به‌دلیل تخلیه عناصر و تنظیم‌کننده‌های رشد موجود در محیط کشت و یا افزایش تراکم مواد فنلی در محیط کشت باشد. در مطالعه‌ای روی *Pinus taeda* L. گزارش شده که مقدار SCV تا روز بیستم بدون زیر کشت افزایش یافته و بعد ثابت باقی ماند که به‌دلیل توقف رشد سلول‌ها بود (Silveira *et al.*, 2004). در کشت سوسپانسیون موز نیز به‌مرور زمان مقدار PCV افزایش یافت (Khalil & Elbanna, 2003). این پاسخ در نتیجه

حضور اکسین و سایتوکنین در محیط کشت است. سایتوکنین‌ها به‌طور مستقیم روی چرخه سلولی تأثیر دارند و در تنظیم سنتز پروتئین‌های درگیر در تشکیل و عملکرد رشته‌های دوک دخالت می‌کنند. اکسین نیز از طریق افزایش انبساط‌پذیری دیواره سلولی و تحریک رونویسی mRNAهای ویژه رمزکننده پروتئین‌های درگیر با رشد سلول در چرخه سلولی فعالیت می‌کند (Richard *et al.*, 2002). در کشت سوسپانسیون *Cperus aromaticus* با اعمال سطوح مختلف NAA رشد سلول تا ۳ هفته پس از اعمال تیمار افزایش و پس از آن به‌شدت کاهش یافت. با اعمال 2,4-D نیز رشد سلول تا هفته سوم افزایش یافت و پس از هفته سوم رشد سلول کاهش نشان داد که این کاهش در مقایسه با هورمون NAA بسیار کم بود (Daud & Falco, Keng, 2006). و همکاران (۱۹۹۶) نیز با بررسی کشت سوسپانسیون نیشکر گزارش کردند که مقدار PCV، وزن تر و خشک سلول تا روز ۳۲–۲۴ افزایش و پس از آن کاهش یافت ولی تعداد سلول تا روز دوازدهم افزایش و بعد کاهش نشان داد.

تأثیر تیمارهای محرک و پیش‌ماده بر رشد کشت سوسپانسیون فندق

به‌طور کلی، متیل جاسمونات بیشترین تأثیر را در کاهش وزن و زنده‌مانی سلول‌ها داشته است. با افزایش غلظت متیل جاسمونات و کیتوسان و همچنین زمان قرارگیری در معرض امواج فراصوت کاهش وزن و زنده‌مانی مشاهده شد. همچنین با افزایش غلظت بنزوئیک اسید وزن سلولی کاهش یافت، درحالی که با افزایش غلظت فنیل‌آلانین رشد سلولی و وزن سلولی افزایش پیدا کرد (شکل ۵). Bemani و همکاران (۲۰۱۲) نیز بیان کردند با افزایش غلظت بنزوئیک اسید وزن تر و خشک سلول‌ها کاهش یافت و کمترین آنها در غلظت یک میلی‌مولار بنزوئیک اسید بود. به‌عبارت دیگر، تیمار ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات با ایجاد سمّیت برای سلول‌ها و در نتیجه از بین رفتن سلول‌ها، تکثیر و رشد آینده سلول‌ها را در مقایسه با سایر تیمارها بیشتر مهار کرد. در حالی‌که، تیمار ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان سمّیت پایین را برای سلول‌های فندق داشته، در نتیجه تکثیر و رشد سلول‌های فندق را کمتر تحت تأثیر قرار داد (شکل ۵ و ۶).

در گزارش‌های دیگری نیز اثر مهار رشد و کاهش زنده‌مانی توسط متیل جاسمونات بر رشد سلولی گیاهان بیان شده است (Miyamoto *et al.*, 1997). متیل جاسمونات در غلظت ۱۰۰ میکرومولار رشد سلولی، تقسیم میتوز و همانندسازی DNA در کالوس گیاه توتون را تحت تأثیر قرار داده‌است (Swiatek *et al.*, 2004). متیل جاسمونات می‌تواند به‌عنوان ترکیب‌های پیام‌رسان در تحریک پاسخ بافت‌های گیاهی به محرک‌های بیوشیمیایی و مکانیکی عمل کند. متیل جاسمونات معمولاً در بافت‌ها و سلول‌های گیاهی بعد از ایجاد زخم (تنش مکانیکی) (Creelman *et al.*, 1992) و قرار گرفتن در معرض محرک‌های قارچی (محرک‌های بیوشیمیایی) (Mueller *et al.*, 1993) تجمع پیدا می‌کند. کاربرد امواج فراصوت در کشت‌های سوسپانسیون سلولی باعث وقایع هیدرودینامیک می‌شود که آسیب‌های مکانیکی و تنش‌های برشی به سلول‌ها را در پی دارد. تنش مکانیکی علت اصلی اثرات شبه محرکی امواج فراصوت، ازجمله تحریک ترشح متابولیت ثانویه است. به‌عبارت دیگر اگر چه تیمار امواج فراصوت باعث تنش مکانیکی در کشت می‌شود اما منجر به کاهش چشمگیری در رشد نمی‌شود که شاید به‌علت زمان کوتاه قرارگیری سلول‌های گیاهی در معرض امواج فراصوت باشد که آن را تحمل می‌کنند (Wu & Lin, 2002).

Rezaei و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی کشت سوسپانسیون سلولی گیاه فندق گزارش کردند که تیمارهای متیل جاسمونات و امواج فراصوت باعث کاهش رشد سلول‌ها در محیط کشت می‌شوند. آنان بیان کردند که متیل جاسمونات بیشترین و امواج فراصوت کمترین اثر را روی کاهش رشد سلول‌ها دارد.

با رشد سلول، EC محیط کشت کاهش و pH محیط کشت افزایش می‌یابد که کاهش EC می‌تواند به‌دلیل جذب

آهن محیط کشت توسط سلول‌ها باشد. علت افزایش pH محیط کشت را می‌توان به تولید پروتون در طول فعالیت‌های متابولیکی و انتقال آن به ماتریکس خارج سلولی نسبت داد (Rudo & Bongani, 2010). Rudo و Bongani (۲۰۱۰) در کشت سوسپانسیون سلولی سورگوم (*Sorghum bicolor* L.) گزارش کردند که با افزایش دوره‌های کشت سلولی، EC محیط‌های کشت سلول‌ها تا پایان دوره رشد به‌تدریج روندی کاهشی داشته است.

اندازه‌گیری تاکسول

مقدار تولید تاکسول توسط برگ و پوسته قهوه‌ای میوه گیاه فندق ۰/۷۴ میکروگرم در گرم وزن خشک گزارش شده است (Haffman & Shahidi, 2009). در این تحقیق عملکرد ویژه تاکسول در تیمار شاهد ۱/۱۵ میکروگرم در گرم وزن خشک سلول و در بقیه تیمارهای بکار رفته بیشتر از این مقدار است و بیان‌کننده این مطلب است که تاکسول تولیدی از کشت سلولی نسبت به گیاه کامل مناسب‌تر می‌باشد.

طبق نتایج بدست آمده تأثیر امواج فراصوت و متیل جاسمونات بر تولید تاکسول بیشتر از تأثیر کیتوسان بود. ترکیب امواج فراصوت با بنزوئیک اسید نسبت به ترکیب آن با فنیل‌آلانین تأثیر بیشتری بر تولید تاکسول داشت، این در حالیست که در مورد متیل جاسمونات ترکیب با فنیل آلانین مؤثرتر بوده‌است. در هر دو مدت زمان کاربرد امواج فراصوت (یک و دو دقیقه)، افزایش غلظت بنزوئیک اسید تأثیر بیشتری بر تولید تاکسول داشته است، ولی بعکس کیتوسان و متیل جاسمونات که افزایش غلظت فنیل آلانین باعث افزایش تولید تاکسول شده است، در مورد امواج فراصوت غلظت کمتر فنیل آلانین مؤثرتر بوده است (جدول ۵).

Safari و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کرد که استفاده از امواج فراصوت روی سلول‌های کشت فندق باعث تحریک تولید تاکسان‌ها شده است. نتایج Wu و Lin (۲۰۰۸) که بیان کرده‌اند تیمار سلول‌های گیاهی با امواج فراصوت باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود نیز نتایج این تحقیق را تأیید می‌کند. تأثیر امواج فراصوت می‌تواند به‌علت ایجاد واکنش‌های دفاعی در سلول‌ها و تحریک بیوسنتز تاکسان‌ها و در احتمال کمتر ناشی از افزایش نفوذپذیری غشای سلولی باشد.

مطالعاتی وجود دارد که تشدید تأثیر محرک توسط پیش‌ماده روی تولید متابولیت ثانویه را نشان می‌دهد. تجمع پاکلی‌تاکسل در کشت سلولی *Taxus chinensis* توسط ترکیب محرک‌ها و پیش‌ماده‌های مختلف توسط Luo و He (۲۰۰۴) افزایش یافت. تولید باکاتینIII و پاکلی‌تاکسل وقتی که متیل جاسمونات با موالونات (۰/۳۸mM) و N-benzoylglycine (۰/۲mM) به محیط کشت اضافه می‌شود افزایش یافت. علاوه‌بر این، زمان لازم برای بدست آوردن بیشترین تراکم تاکسوئیدها کوتاه‌تر از آزمایش‌های محرک‌ها به‌تنهایی بود (Cusido *et al*., 2002).

Rahpeyma و همکاران (۲۰۱۵) نیز بیان کردند که با اضافه کردن فنیل‌آلانین و وانادیل سولفات، تولید تاکسول افزایش یافت و بیشترین مقدار با ترکیب ۳ میکرومولار فنیل آلانین و ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌مولار وانادیل سولفات در محیط کشت تکمیل شده با فروکتوز ۳٪ مشاهده شد.

فنیل آلانین بکار رفته بیرونی تولید متابولیت‌های ثانویه را در برخی از گونه‌های گیاهی مانند *Taxus chinensis* افزایش می‌دهد (Luo & He, 2004). Furmanova و همکاران (۲۰۰۰) تجمع پاکلی‌تاکسل و 10-DAB III را در کشت سلولی *Taxus cuspidata* و *Taxus media* بعد از تغذیه با فنیل‌آلانین و آمینوبنزوئیک اسید مطالعه کرده و گزارش نمودند که در کشت سلولی *Taxus cuspidata* اضافه کردن ۵ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر فنیل‌آلانین به‌ترتیب بیشترین تأثیر را در افزایش تولید پاکلی‌تاکسل و 10-DAB III داشت.

منابع مورد استفاده

- Bemani, E., Ghanati F., Yousefzadeh Boroujeni, L. and Khatami, F., 2012. Antioxidant activity, total phenolics and taxol contents response of hazel

- Holton, R.A., Somoza, C., Kim, H.B., Liang, F., Biodiger, R.L., Boatman, P.D., Shindo, M., Smith, C.C. and Kim, S., 1995. The total synthesis of paclitaxel starting with camphor. ACS Symposium Series, 583: 288-301.
- Itokawa, H., 2003. Taxoide occurring in the genus *Taxus*: 35-78. In: Itokawa, H. and Lee, K.H., (Eds.) Taxus: The Genus Taxus. Taylor & Francis Press, 427p.
- Khalil, S.M. and Elbanna, A.A.M., 2003. Highly efficient somatic embryogenesis and plant regeneration via suspension cultures of banana (*Musa* spp.). Arab Journal of Biotechnology, 7: 99-110.
- Khosroshahi, A., Valizadeh, M., Ghasempour, A., Khosrowshahli, M., Naghdibadi, H., Dadpour, M.R. and Omidi, Y., 2006. Improved Taxol production by combhnation of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata.* Cell Biology International, 30: 262-269.
- Kim, O.T., Bang, K.H., Kim, Y.C., Hyun. D.Y., Kim, M.Y. and Cha, S.W., 2009. Upregulation of gensenoside and gene expression related to triterpene biosynthesis in ginseng hairy root cultures eliciated by methyl jasmonate. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 98: 25-33.
- Kumar, J. and Gupta, P.K., 2008. Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. Plant Biotechnology Reports, 2: 93-112.
- Lansing, A., Haertel, M., Gordon, M. and Floss, H.G., 1991. Biosynthetic studies on taxol. Planta Medica, 57-83.
- Luo, J. and He, G.Y., 2004. Optimization of elicitors and precursors for paclitaxel production in cell suspension culture of *Taxus chinensisin* the presence of nutrient feeding. Process Biochemistry, 39: 1073-1079.
- 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.
- Mueller, M.J., Brodschelm, W., Spannagl, E. and Zenk, M.H., 1993. Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90: 7490-7494.
- Rahpeyma, S., Moieni, A. and Jalali Javaran, M., 2015. Paclitaxel enhanced in cell suspension cultures of hazelnut (*Corylus avellane* L.) by a combination (*Corylus avellana* L.) cells to benzoic acid and cinnamic acid. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 40: 69-73.
- 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.
- Creelman, R.A., Tierney, M.L. and Mullet, J.E., 1992. Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 89(11): 4938-4941.
- Cusidó, R.M., Palazónn, J., Bonfill, M., Navia-Osorio, A., Morales, C. and Piñol, M.T., 2002. Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus media*. Biotechnology Progress, 18: 418-423.
- Daud, Z. and Keng, C.L., 2006. Effects of plant growth regulators on the biomass of embryogenic cells of *Cyperus aromaticus* (Ridly) Mattf and Kukenth. Biotechnology, 5: 75-78.
- DiCosmo, F. and Misawa, M., 1985. Eliciting secondary metabolism in plant cell cultures. Trends in Biotechnology, 3(12): 318-322.
- Falco, M.C., Mendes, B.M.J. and Neto, A.T., 1996. Cell suspension culture of sugarcane: growth, management and plant regeneration. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 8(1): 1-6.
- Farjaminezhad, R., Zare, N., Asghari-zakaria, R. and Farjaminezhad, M, 2013. Establishment and optimization of cell growth in suspension culture of *Papaver bracteatum*: a biotechnology approach for thebaine production. Turkish Journal of Biology, 37: 689-697.
- Frense, D., 2007. Taxanes: perspectives for biotechnological production. Applied Microbiology and Biotechnology, 73: 1233-1240.
- Fritz, V.A., Justen, V.L., Bode, A.M., Schuster, T. and Wang, M., 2010. Glucosinolate enhancement in cabbage induced by jasmonic acid application. Hortscience, 45: 1188-1191.
- Furmanova, M., Oledzka, H., Sykłowska-Baranek, K., Jo´sefowicz, J. and Gieraka, S., 2000. Increased taxane accumulation in callus cultures of *Taxus cuspidate* and *Taxus x media* by some elicitors and precursors. Biotechnology Letters, 22(18): 1449-1452.
- Hoffman, A. and Shahidi, F., 2009. Paclitaxel and other taxanes in hazelnut. Journal of Functional Foods, 1:33-37.

98: 367-372.
- Silveira, V., Floh, E.I.S., Handro, W. and Pedro Guerra, M., 2004. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 76: 53-60.
- Street, H.E., 1977. Plant Tissue and Cell Culture. Blackwelt, Oxford, 512p.
- 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.
- Wu, J. and Lin, L., 2002. Ultrasound-induced stress responses of *Panax ginseng* cells: enzymatic browning and phenolics production. Biotechnology Progress, 18: 862-866.
- Wu, J. and Lin, L., 2008. Ultrasound-induced stress responses of *Panax ginseng* cells: enzymatic browning and phenolics production. Biotechnology Progress, 18: 862-866.
- Zamir, L.O., Nedea, M.E., Belair, S., Sauriol, F., Mamer, O., Jacqmain, E., Jean, F.I. and Garneau, F.X., 1992. Biosynthetic building blocks of *Taxus canadiensis* taxanes. Tetrahedron Letters, 33: 5235-5236.
of sugar, precursor and elicitor. Engineering in Life Sciences, 15: 234-242.
- Rezaei, A., Ghanati, F. and Behmanesh, M., 2011. Increased taxol production and release by methyl jasmonate, ultrasound, and dibutyl phthalate in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cell culture. Journal of Plant Biology, 7: 55-72.
- Richard, D., Lescot, M., Inze, D. and De Veylder, L., 2002. Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 69: 167-176.
- Rudo, N. and Bongani, K.N., 2010. Mapping and characterization of the sorghum cell suspension cultures. African Journal of Biotechnology, 10(2): 253-266.
- Safari, M., Ghanati, F., Hajnoruzi, A., Rezaei, A., Abdolmaleki, P. and Mokhtari-Dizaji, M., 2012. Maintenance of membrane integrity and increase of taxanes production in hazel (*Corylus avellana* L.) cells induced by low-intensity ultrasound. Biotechnology Letter, 34: 1137-1147.
- Sato, F., Hashimoto, T. and Hachiya, A., 2001. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,

Enhanced Taxol production in cell suspension cultures of hazelnut (*Corylus avellana* L.) by combination of elicitor and precursor

R. Hazrati Jahan[1], N. Zare[2*], S. Dezhsetan[3] and P. Sheikhzadeh Mosaddeg[3]

1- MSc. Graduated Student, Department of Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardebil, Iran
2*- Corresponding author, Department of Agronomy & Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, E-mail: zarenasser@yahoo.com
3- Department of Agronomy & Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Received: November 2015 Revised: July 2016 Accepted: July 2016

Abstract

The discovery of taxanes production in hazelnut (*Corylus avellana* L.) and its cell cultures has generated considerable interest and hopes for studying and utilization of cell suspension culture of hazelnut as a biotechnological approach to the taxol production. In this research, the effects of plant growth regulators (different levels of 2,4-D, NAA, Kin and BAP) on hazelnut cell culture growth, and effects of elicitor (methyl jasmonate, chitosan and ultrasonund) and precursor (aminobenzoic acid and phenylalanine) combination on taxol production in cell suspension cultures were investigated. The results revealed that hazelnut cell growth in suspension cultures was significantly influenced by growth regulators treatments. Cell growth in MS medium containing 1 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l BAP and 150 mg/l ascorbic acid was significantly higher than other treatments. The cell growth and viability, EC and pH of medium and taxol production were significantly different between elicitor treatments. Overall, elicitor treatments inhibited cell proliferation but significantly increased the taxol production compared to the control (without elicitor). The highest taxol content (15.27 mg/l) was obtained with 2 min US and 20 mg/l aminobenzoic acid treatment in the cells derived from seed explants, which was about 132.78- fold of control.

Keywords: Ultrasound, paclitaxel, taxanes, *in vitro* culture, secondary metabolite.