

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال هشتم، شماره بیست و هشتم، تابستان ۱۳۹۵، صفحه ۴۷-۶۲

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۰۷/۲۰

تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۴/۱۱/۱۲

تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۵/۰۲/۲۵

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۰۳/۲۲

بررسی تأثیر امواج فراصوت بر ویژگی‌های رشدی و بیوشیمیایی کشت سلولی خشخاش ایرانی و تولید تبائین در آن

علی اصغر عسکری، ناصر زارع*، رسول اصغری زکریا، سعید خماری و لیلی هنرمند
گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

چکیده

امواج فراصوت با انرژی پایین، آثار فیزیولوژیک متعددی بر سلول‌ها و بافت‌های گیاهی داشته و کاربردهای مهمی در بیوتکنولوژی گیاهی به ویژه در تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه دارا است. در پژوهش حاضر، اثر تیمار امواج فراصوت بر کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خشخاش ایرانی بررسی شد. برای این منظور، سلول‌های کشت سوسپانسیون با امواج فراصوت تیمار شد. سپس، زنده‌مانی و رشد سلول‌ها، فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، مقدار پروتئین کل، پراکسید هیدروژن، پرولین و تبائین سلول‌ها در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸ و ۱۴۴ ساعت پس از اعمال تیمار بررسی شد. نتایج نشان داد که در اثر اعمال تیمار امواج فراصوت، زنده‌مانی و وزن خشک (رشد) سلولی به طور معنی‌داری کاهش یافته است. علاوه بر این، با افزایش مدت زمان پس از اعمال تیمار، زنده‌مانی و رشد سلولی نیز بیشتر تحت تأثیر قرار گرفت، اما مقدار پرولین و پروتئین کل سلولی در اثر اعمال تیمارهای امواج فراصوت و همچنین، با افزایش زمان پس از اعمال تیمار در مقایسه با شاهد افزایش نشان داد. مقدار پراکسید هیدروژن و میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز به طور معنی‌داری تحت تأثیر امواج فراصوت، زمان‌های پس از اعمال تیمار و همچنین اثر متقابل بین آنها قرار گرفت. به طوری که امواج فراصوت باعث افزایش مقدار پراکسید هیدروژن و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان فوق در مقایسه با سلول‌های شاهد گردید. مقدار تبائین در سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های شاهد در زمان ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار به طور معنی‌داری افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: امواج فراصوت، کشت سوسپانسیون سلولی، متابولیت ثانویه، خشخاش ایرانی

مقدمه

فرکانس شنوایی انسان هستند. محدوده فرکانسی قابل

شنیدن برای انسان ۲۰ تا ۲۰۰۰۰ هرتز است. به فرکانس

امواج فراصوت دارای فرکانسی بیشتر از بازده

* نگارنده مسؤول نشانی پست الکترونیک: nzare@uma.ac.ir، شماره تماس: ۰۴۵۳۳۵۱۰۱۴۰

Copyright©2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

DNA شده، در نتیجه به اختلالات متابولیک جبران‌ناپذیر و مرگ سلول منجر شوند (Karuppanapandian *et al.*, 2011). شواهد نشان می‌دهد که ROSها می‌توانند به عنوان یک مولکول پیام‌رسان در گیر در تنظیم مراحل مختلف فیزیولوژیک و رشد و نمو و دفاع در برابر پاتوژن (مثلاً پاسخ فوق حساسیت) در گیاهان عمل کند (Vellosillo *et al.*, 2010). در شرایط پایدار، ROSها توسط سیستم‌های مختلف آنتی‌اکسیدانی مهار می‌شوند (Navrot *et al.*, 2007). سلول‌های گیاهی برای مقابله با آثار مخرب ROSها از یک سری سازوکارهای دفاعی برخوردار هستند که قادرند با جمع‌آوری کامل گونه‌های فعال اکسیژن و احیای آن به آب از آسیب به مولکول‌های زیستی مهم پیشگیری کنند. سازوکارهای دفاع سلولی از آنتی‌اکسیدان‌ها (نظیر آسکوربات، گلوکاتایون، توکوفرول، کاروتنوئیدها) و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، گائیکول پراکسیداز) تشکیل شده است. چنانچه میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن بر میزان فعالیت سیستم‌های دفاعی غلبه کند، تنش اکسیداتیو در سلول‌های گیاهی اتفاق خواهد افتاد (Esfandiari *et al.*, 2008). با افزایش شدت آسیب‌های وارد شده به مولکول‌های زیستی و ایجاد اختلالات متابولیکی، در نهایت مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی اجرا شده و سلول از بین می‌رود (Esfandiari *et al.*, 2007).

گرایش روزافزون جوامع بشری به استفاده از داروهایی با منشأ گیاهی سبب افزایش تقاضای مواد مؤثره گیاهان دارویی شده است. با توجه به این که

صوتی پایین‌تر از ۲۰ هرتز، فرسوت و به فرکانس‌های صوتی بالاتر از ۲۰ هزار هرتز فراسوت اطلاق می‌گردد. مطالعات اولیه در مورد امواج فراسوت عمدتاً در مورد آثار مضر آن بر موجودات زنده متمرکز بود. با این حال، اخیراً به آثار مفید امواج فراسوت با انرژی پایین بر سازوکار فیزیولوژیک سلول‌ها و بافت‌های گیاهی و کاربردهای آن در بیوتکنولوژی گیاهی به ویژه در تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه پرداخته شده است (Oliveira؛ Pong *et al.*, 2006؛ Wu and Lin, 2002) *et al.*, 2009). شدت‌های پایین امواج فراسوت می‌تواند تأثیرات مختلفی بر سلول از قبیل: تغییر فعالیت آنزیمی، رشد سلولی و ساختار اندامک‌ها داشته باشد (Bochu *et al.*, 1998). امواج فراسوت در شدت‌های پایین می‌تواند به عنوان محرک غیرزنده برای القای واکنش‌های دفاعی گیاه و تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سلول گیاهی عمل کند. علاوه بر این، امواج فراسوت می‌تواند نفوذپذیری غشای سلولی را تحریک کرده، باعث افزایش آزادسازی فرآورده درون سلولی شود (Wu and Lin, 2008). نشان داده شده است که اعمال کوتاه مدت امواج فراسوت با شدت‌های پایین بر سلول‌های گیاهی، واکنش‌های دفاعی در گیاهان از قبیل انفجار اکسیداتیو (تولید سریع پراکسید هیدروژن) و جریان غشایی کلسیم را تحریک می‌کند (Lin and Wu, 2002). گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) محصول متابولیسم طبیعی سلولی است، اما تحت شرایط تنش تعادل بین تولید و حذف ROSها در اجزای سلول گیاهی دچار اختلال می‌شود. ROSها می‌توانند تقریباً به تمامی درشت‌مولکول‌ها حمله کرده، موجب آسیب جدی اجزای سلولی، آسیب و جهش در

ایرانی به تیمار امواج فراصوت از طریق مطالعه فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و بررسی تغییرات در مقدار پراکسید هیدروژن و پرولین و همچنین تغییر میزان تبائین سلول‌ها در اثر اعمال تیمار امواج فراصوت انجام شد.

مواد و روش‌ها

القای تولید کالوس و راه‌اندازی کشت

سلولی: بذرهای گیاه *P. bracteatum* Lindl. از بانک ژن مؤسسه تحقیقات مراتع و جنگل‌های کشور تهیه شد. بذور مورد نظر ابتدا با آب دوبار تقطیر شستشو شد. سپس، به مدت ۳۰ ثانیه با اتانول ۷۰ درصد و ۲۰ دقیقه توسط محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد ضدعفونی شد. سپس، سه بار با آب دیونیزه اتوکلاو و شستشو شد. بذور ضدعفونی شده روی دستمال کاغذی استریل قرار گرفتند تا کاملاً آبگیری شوند. در نهایت، بذور روی محیط کشت جامد (MS Murashige and Skoog, 1962) کشت داده شد. کشت‌ها در اتاقک رشد در شرایط تاریکی و دمای 20 ± 2 درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از گذشت حدود دو هفته از کشت بذور، ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون از گیاهچه رشد یافته، برش داده شد و روی محیط کشت جامد حاوی هورمون‌های 2,4-D و کینتین به ترتیب با غلظت‌های ۱/۰ میلی‌گرم بر لیتر کشت شدند. کشت‌ها در دمای 20 ± 2 درجه سانتیگراد با دوره روشنایی ۱۶ ساعت نگهداری شدند. واکشت کالوس‌ها هر دو هفته یک بار انجام گرفت. توده‌های کالوس ترد و نرم *P. bracteatum* به حدود ۵۰ میلی‌لیتر محیط MS مایع حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، ۱/۰ میلی‌گرم

میزان تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی بسیار اندک است، راهکارهای مختلفی برای تجاری‌سازی استحصال آنها به کار گرفته شده است. علی‌رغم پیشرفت‌های زیاد در زمینه سنتز مصنوعی مواد مؤثره گیاهی، به دلیل ناشناخته بودن و پیچیدگی ساختمان شیمیایی اغلب آنها، تولید این ترکیبات به صورت سنتتیک مشکل و مستلزم هزینه‌های زیاد است. در نتیجه، تاکنون موفقیت چشمگیری در تولید این ترکیبات دارویی ارزشمند حاصل نشده است و هنوز هم استخراج از منابع گیاهی تنها منبع به صرفه اقتصادی دستیابی به این ترکیبات است (Allen et al., 2008). استفاده از محرک‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی برای تحریک هر چه بیشتر تولید این ترکیبات در کشت‌های سلولی به عنوان یک ابزار در بیوتکنولوژی مطرح گردیده است (Dornenburg and Knorr, 1995). گیاه خشخاش ایرانی (*Papaver bracteatum* Lindl.) حاوی آلکالوئیدهای دارویی مهم نظیر: مورفین، کدئین، تبائین، نوسکاپین، پاپاورین و سنگوئینارین با ارزش اقتصادی بالایی در صنایع داروسازی است (Omid et al., 2012). خشخاش ایرانی آلکالوئید مورفینی تبائین را تولید می‌کند که به صورت شیمیایی به کدئین تبدیل می‌شود، اما فعالیت آنزیمی لازم برای دمتیله کردن آن به کدئین و مورفین را ندارد (Milo et al., 1987). در این گیاه، ۹۸ درصد از کل آلکالوئیدها را تبائین تشکیل می‌دهد (Seddigh et al., 1982). با توجه به اهمیت این گیاه به عنوان یک گیاه دارویی مهم و کاربرد آلکالوئید تبائین در صنایع داروسازی، مطالعه حاضر با هدف بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیک کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خشخاش

سنجش قابلیت رشد سلولی با اندازه‌گیری وزن خشک سلولی انجام شد. برای این منظور، سلول‌ها در دوره‌های زمانی تعیین شده با استفاده از کاغذ صافی واتمن و قیف بوختر تحت شرایط خلأ از محیط کشت جدا و بلافاصله با ترازو توزین شدند. برای اندازه‌گیری زنده‌مانی سلولی، در شرایط کاملاً استریل، حجم یکسان از سلول‌ها از محیط کشت سوسپانسیون برداشته و با محلول بافر فسفات دو بار شستشو داده شد. سپس، ۵ میلی‌لیتر از محلول

MTT (2,5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3)

(diphenyl tetrazolium bromide) با غلظت ۱۰ میلی‌مولار به سلول‌ها اضافه و به مدت ۴ ساعت در شرایط تاریکی در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس، MTT حذف و پس از شستشوی سلول‌ها با بافر فسفات، بافر سدیم دودسیل سولفات به سلول‌ها افزوده و به مدت ۴ ساعت در آن با دمای ۶۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس، سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ (مدل K1۴-۱، شرکت Sigma، آلمان) و رسوب داده شد. جذب نوری محلول رویی با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Smart Spec، شرکت Bio-Rad، آمریکا) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. درصد زنده‌مانی سلول‌ها در تیمارهای امواج فراصوت از رابطه ۱ محاسبه شد.

رابطه ۱: درصد زنده‌مانی = (جذب نمونه‌های تیمار شده) / (جذب نمونه‌های شاهد) $\times 100$

سنجش میزان پراکسید هیدروژن: میزان پراکسید هیدروژن با روش Loreto و Velikova (۲۰۱۱) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۰/۳ گرم سلول‌تر گیاهی در ۳ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید (TCA) یک درصد همگن شد. سپس، نمونه‌ها به لوله‌های

بر لیتر کینتین و ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید منتقل و روی شیکر با ۱۲۰ دور در دقیقه و شرایط دمایی 24 ± 2 درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی لامپ فلورسنت (شدت نور ۴۰۰ تا ۵۰۰ لوکس) قرار داده شد. پس از استقرار کشت سوسپانسیون، کشت‌ها دو هفته یک بار واکشت شدند.

تیمار سلول‌ها با امواج فراصوت: برای این منظور، از حمام امواج فراصوت (مدل Sonirex Digitec، شرکت Binder، آلمان) با فرکانس ۳۷ کیلوهرتز استفاده شد. به این ترتیب که کشت‌های سوسپانسیون سلولی در روز دهم پس از کشت به مدت صفر و ۳۰ ثانیه تحت تأثیر امواج فراصوت قرار گرفت، سپس روی شیکر با ۱۲۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. به منظور بررسی پاسخ فیزیولوژیک سلول‌ها به محرک و تحریک تولید و تجمع بتائین در دوره‌های زمانی مختلف پس از تحریک، سلول‌ها در زمان‌های: ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸ و ۱۴۴ ساعت پس از اعمال تیمار امواج فراصوت جمع‌آوری و ارزیابی شد.

اندازه‌گیری اسیدپتیه محیط کشت، وزن خشک و زنده‌مانی سلول: امواج فراصوت با ایجاد منافذ در غشای سلولی، ورود و خروج مولکول‌ها به سلول‌ها و در نتیجه غلظت پروتون‌ها در محیط سلولی را تغییر می‌دهد (Wu and Lin, 2002). این تغییر در غلظت پروتون‌های محیط کشت سلول (خارج سلولی) را می‌توان از طریق اندازه‌گیری اسیدپتیه محیط کشت سلولی بررسی کرد. برای اندازه‌گیری اسیدپتیه محیط کشت، حدود ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت سوسپانسیون حاوی سلول برداشته شد و اسیدپتیه آن با دستگاه pH-متر (مدل 827، شرکت Metrohm، سوئیس) اندازه‌گیری گردید.

داده‌های به دست آمده محاسبه و منحنی استاندارد ترسیم گردید. سپس، اعداد حاصل از قرائت نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر در معادله خط رگرسیونی قرار داده و مقدار پروتئین کل نمونه‌ها محاسبه شد. فعالیت آنزیم کاتالاز با روش Aebi (۱۹۸۴)، فعالیت آنزیم پراکسیداز با روش Chance و Maehly (۱۹۵۵) و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با روش Giannopolitis و Ries (۱۹۷۷) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری مقدار پرولین: استخراج پرولین از نمونه‌های سلولی با روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) انجام گرفت. بدین منظور، ۰/۱ گرم سلول تر گیاهی در ۱۰ میلی لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳/۳ درصد ساییده و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. به ۲ میلی لیتر از عصاره حاصل، ۲ میلی لیتر معرف نین هیدرین و ۲ میلی لیتر گلاسیال استیک اسید خالص افزوده شد. لوله‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت، سپس به آب یخ منتقل شد. مخلوط واکنش پس از اضافه شدن ۴ میلی لیتر تولوئن به شدت ورتکس شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت تا دو فاز آن از هم جدا شوند. پس از تشکیل دو فاز، فاز بالایی با دقت جدا و مقدار جذب در دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. با استفاده از محلول‌های استاندارد و رابطه رگرسیون، بین غلظت و مقدار جذب در ۵۲۰ نانومتر، غلظت پرولین برای هر نمونه بر حسب میکروگرم پرولین در هر گرم وزن تر گیاهی محاسبه گردید.

استخراج و اندازه‌گیری تبائین: استاندارد تبائین از شرکت تماد (تهران، ایران) تهیه گردید. ۰/۲ گرم سلول

سانتریفیوژ منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. به ۰/۷۵ میلی لیتر از محلول روشناور، ۰/۷۵ میلی لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی مولار (اسیدیته=۷) و ۱/۵ میلی لیتر یدید پتاسیم ۱ مولار اضافه شد. غلظت پراکسید هیدروژن نمونه‌ها از طریق اندازه‌گیری جذب نوری آن در طول موج ۳۹۰ نانومتر محاسبه گردید. منحنی استاندارد نمونه‌ها در محدوده ۲ تا ۱۰ میلی مولار تهیه شد و جذب نوری آنها نیز در طول موج ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری و برای تعیین محتوای پراکسید هیدروژن سلولی استفاده گردید. در نهایت، غلظت پراکسید هیدروژن به صورت میکرومولار در گرم وزن تر گیاهی محاسبه گردید.

سنجش پروتئین کل و فعالیت برخی

آنزیم‌های آنتی اکسیدان در سلول‌ها: برای ارزیابی فعالیت آنزیم، ابتدا استخراج پروتئین صورت گرفت. برای این منظور، ۰/۵ گرم از سلول‌های تر گیاهی در هاون حاوی ۵ میلی متر بافر Tris-HCl ۰/۱ نرمال با اسیدیته برابر با ۷/۴ و ۱۰ درصد گلیسرول در یک بستر یخی همگن گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. عصاره سلولی به دست آمده برای سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز مورد استفاده قرار گرفت. پروتئین کل با روش Bradford (۱۹۷۶) سنجش شد. از پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی گرم بر لیتر استفاده شد و میزان جذب نور در نمونه‌های استاندارد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Plus SmartSpec™، شرکت Bio Rad، آمریکا) در طول موج ۵۹۵ نانومتر سنجش شد. معادله خط رگرسیونی با استفاده از

میانگین \pm انحراف معیار بیان شد. همچنین، نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel (۲۰۱۰) رسم گردید.

نتایج

شاخص‌های وزن خشک، زنده‌مانی سلولی و

اسیدیته محیط کشت: اسیدیته محیط کشت، وزن خشک و زنده‌مانی سلولی به طور معنی‌داری تحت تأثیر امواج فراصوت، مدت زمان پس از اعمال تیمار و همچنین اثر متقابل بین آنها قرار گرفت. بر اساس نتایج مقایسه میانگین تیمارهای امواج فراصوت در بازه‌های زمانی ۱۲، ۲۴ و ۳۶ ساعت پس از اعمال تیمار، اسیدیته بیشتری در مقایسه با شاهد در بازه‌های زمانی ذکر شده داشتند، اما در بازه‌های زمانی ۴۸ ساعت و ۱۴۴ ساعت پس از اعمال تیمار، اسیدیته محیط کشت در شاهد نسبت به امواج فراصوت بیشتر بود (جدول ۱). در اثر اعمال تیمار امواج فراصوت، وزن خشک سلولی نسبت به شاهد (بدون تیمار امواج فراصوت) به طور معنی‌داری کاهش یافت و این روند کاهشی با افزایش زمان پس از اعمال تیمار نیز بیشتر شد (جدول ۱). اعمال تیمار امواج فراصوت سبب ایجاد تنش مکانیکی به سلول و در نتیجه خسارت به غشای سلولی می‌شود. این تنش و صدمات ناشی از امواج فراصوت می‌تواند سبب کاهش رشد سلولی شود. با افزایش مدت زمان پس از اعمال تیمار (۲۴ ساعت و پس از آن) زنده‌مانی سلولی نیز بیشتر تحت تأثیر قرار گرفت. علاوه بر این، در کشت‌های فاقد تیمار امواج فراصوت با گذشت زمان، زنده‌مانی سلولی افزایش یافت، اما در کشت‌های تیمار شده با امواج فراصوت با گذشت زمان زنده‌مانی سلولی به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۱- A).

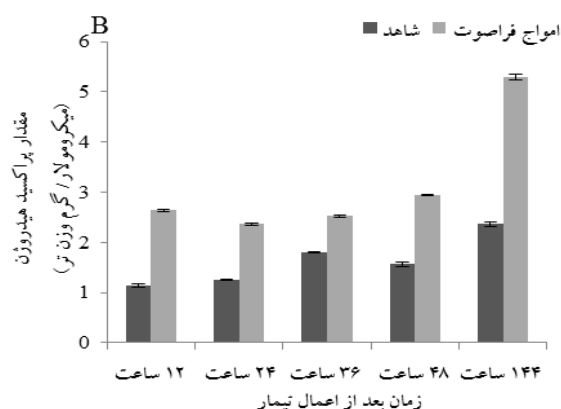
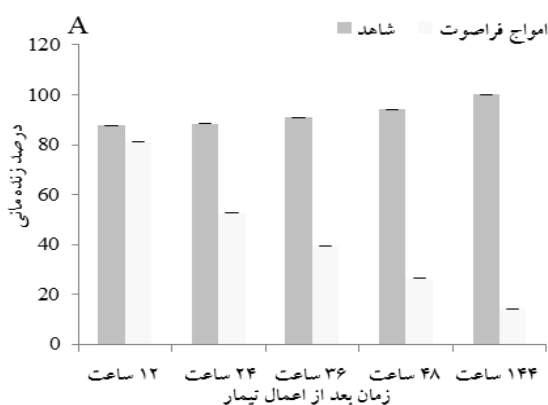
حاصل از کشت سوسپانسیون پس از اعمال تیمار امواج فراصوت با استفاده از فریزدرایر خشک و در هاون پودر شد. سپس، ۲ میلی‌لیتر متانول به آنها افزوده و مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در سونیکاتور (مدل Sonorex Digitec، شرکت Bandelin، آلمان) قرار گرفت و برای آنالیز با دستگاه HPLC (مدل PLATIN blue، شرکت Knauer، آلمان) از فیلتر دارای منافذ ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد. برای شناسایی و تعیین مقدار تبائین از HPLC به همراه پمپ PLATIN blue مجهز به آشکارساز آرآیبه فوتونی (PDA)، سیستم تزریق اتوماتیک، رابط نرم‌افزاری Ezchrom و استاندارد تبائین استفاده شد. فاز متحرک مورد استفاده شامل: بافر آمونیوم استات یک درصد با اسیدیته برابر با ۵/۸ و استونیتریل با نسبت ۶۵ به ۳۵ به صورت ایزوکراتیک و سرعت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد بود. استونیتریل و آب با خلوص کروماتوگرافی و سایر مواد مورد استفاده از شرکت Merck (آلمان) تهیه شد. پیش از تزریق نمونه و استاندارد با فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ میلی‌متری در ویال دو میلی‌متری صاف و ۱۰ میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC تزریق شد. از منحنی استاندارد تبائین برای تعیین غلظت تبائین نمونه‌ها بر حسب میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد.

طرح آزمایشی و تجزیه و تحلیل آماری:

آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ و نرمال بودن داده‌ها با آزمون تک نمونه‌ای کولموگروف-اسمیرنوف و نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد. نتایج حاصل از بررسی حاضر به صورت

جدول ۱- تأثیر امواج فراصوت بر اسیدیته محیط کشت و رشد (وزن خشک) کشت سلولی *P. bracteatum* Lindl. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

تیمار	زمان پس از اعمال تیمار (ساعت)	اسیدیته محیط کشت	وزن خشک (میلی گرم)
شاهد	۱۲	۳/۱۶ ^g	۰/۳۵ ^d
	۲۴	۳/۷۶ ^f	۰/۳۶ ^{cd}
	۳۶	۴/۲۴ ^d	۰/۳۷ ^{bc}
	۴۸	۴/۷۲ ^b	۰/۳۹ ^{ab}
	۱۴۴	۵/۵۳ ^a	۰/۴۰ ^a
امواج فراصوت	۱۲	۳/۹۷ ^e	۰/۳۱ ^e
	۲۴	۴/۰۹ ^e	۰/۳۰ ^{ef}
	۳۶	۴/۴۶ ^e	۰/۲۸ ^{ef}
	۴۸	۴/۵۹ ^{bc}	۰/۲۷ ^g
	۱۴۴	۴/۶ ^{bc}	۰/۲۵ ^h



شکل ۱- تأثیر امواج فراصوت بر درصد زنده‌مانی (A) و مقدار پراکسید هیدروژن درون سلولی (B) در کشت سوسپانسیون سلولی خشخاش ایرانی (*P. bracteatum* Lindl.)

واریانس داده‌ها، بین تیمارها از نظر مقدار پرولین و پروتئین کل در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری وجود داشت. مقدار پرولین در اثر اعمال تیمارهای امواج فراصوت و با گذشت زمان پس از اعمال تیمار در مقایسه با شاهد (بدون امواج فراصوت) افزایش یافت (شکل ۲- A). تأثیر تیمارهای امواج فراصوت بر مقدار پروتئین کل در شکل ۲- B نشان داده

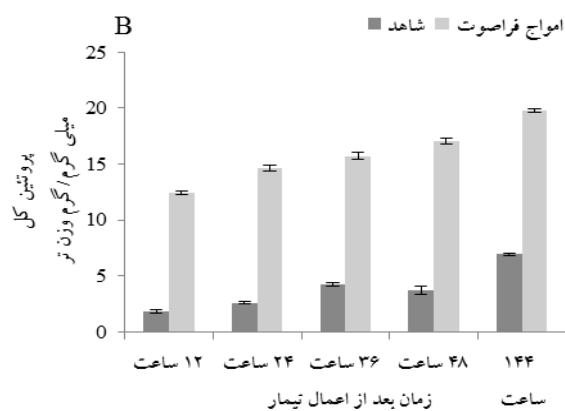
میزان پراکسید هیدروژن: با توجه به شکل ۱- B، در اثر اعمال تیمار امواج فراصوت، میزان پراکسید هیدروژن در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت. به طوری که در بازه زمانی ۱۴۴ ساعت پس از اعمال تیمار امواج فراصوت میزان پراکسید هیدروژن در بیشترین سطح خود قرار داشت.

مقدار پرولین و پروتئین کل: بر اساس تجزیه

گذشت زمان تا ۴۸ ساعت افزایش، و در دوره زمانی ۱۴۴ ساعت کاهش نشان داد. همان طور که در شکل ۳- C نشان داده شده است، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز در تیمار امواج فراصوت همانند سایر آنزیم‌های مورد بررسی، نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار و قابل توجهی نشان داده است. در بازه زمانی ۱۴۴ ساعت پس از اعمال تیمار بیشترین مقدار فعالیت مشاهده شد. در نمونه‌های شاهد نیز فعالیت این آنزیم در بازه‌های زمانی ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۱۴۴ ساعت پس از اعمال تیمار روند افزایشی داشت.

اثر امواج فراصوت بر تولید تبائین: همان طور

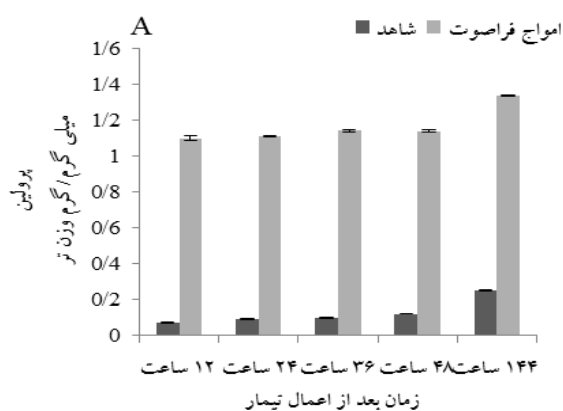
که در شکل ۴ ملاحظه می‌شود، بیشترین مقدار تبائین در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار امواج فراصوت به دست آمد. این در حالی است که سلول‌های شاهد در این دوره زمانی کمترین میزان تبائین را داشتند. در سایر دوره‌های زمانی پس از اعمال تیمار، مقدار تبائین در سلول‌های تیمار شده تفاوت معنی‌داری با سلول‌های شاهد نشان نداد. کاهش مقدار تبائین در سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های شاهد در بازه زمانی ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار بیشتر از بقیه بود.



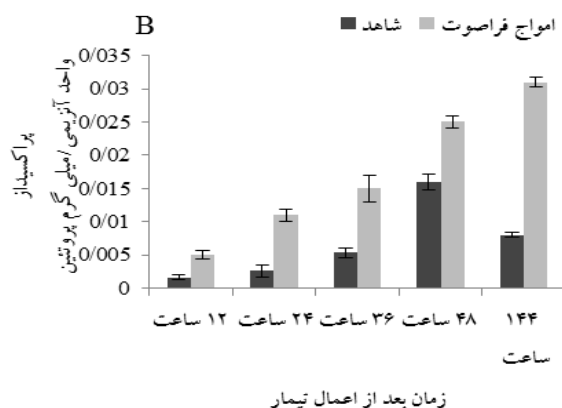
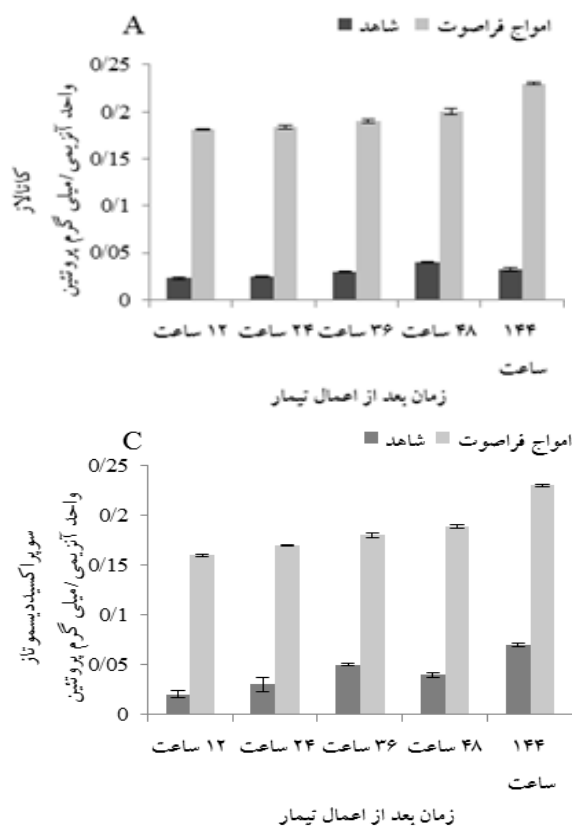
شده است. مقدار پروتئین کل در تیمارهای امواج فراصوت در تمامی بازه‌ها در مقایسه با شاهد افزایش نشان داد، به طوری که بیشترین مقدار پروتئین کل در بازه زمانی ۱۴۴ ساعت پس از اعمال تیمار مشاهده شد.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: بین تیمار امواج

فراصوت، زمان‌های پس از اعمال تیمار و همچنین اثر متقابل بین آنها از نظر فعالیت آنزیم‌های مورد بررسی، اختلاف معنی‌داری وجود داشت. همان طور که در شکل ۳-A ملاحظه می‌شود، فعالیت آنزیم کاتالاز در اثر اعمال تیمارهای امواج فراصوت در تمامی بازه‌های زمانی پس از تیمار افزایش معنی‌داری در مقایسه با شاهد نشان داده است. علاوه بر این، با افزایش زمان پس از اعمال تیمار نیز فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافت، به طوری که بیشترین فعالیت این آنزیم در دوره زمانی ۱۴۴ ساعت پس از اعمال تیمار مشاهده گردید. اثر امواج فراصوت بر فعالیت پراکسیداز در شکل ۳-B نشان داده شده است. در اثر اعمال امواج فراصوت فعالیت این آنزیم نیز افزایش پیدا کرد، به طوری که با افزایش بازه‌های زمانی، فعالیت این آنزیم نیز افزایش چشمگیری نسبت به شاهد داشت. در نمونه‌های شاهد نیز فعالیت این آنزیم با



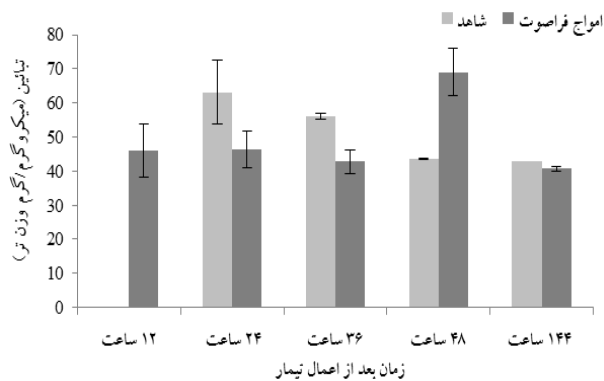
شکل ۲- تأثیر امواج فراصوت بر مقدار پروتئین (A) و پروتئین کل درون سلولی (B) در کشت سوپانسیون سلولی خشک‌شاخ ایرانی (*P. bracteatum* Lindl.)



شکل ۳- تأثیر امواج فراصوت بر فعالیت آنزیم کاتالاز.

(A) آنزیم پراکسیداز، (B) و سوپراکسید دیسموتاز درون سلولی، (C) در کشت سوسپانسیون سلولی خشخاش ایرانی

(*P. bracteatum* Lindl.)



شکل ۴- تأثیر امواج فراصوت بر تولید تباین در کشت سوسپانسیون سلولی خشخاش ایرانی (*P. bracteatum* Lindl.)

قرار می‌دهد. بنابراین، افزایش اسیدیته محیط کشت سلولی می‌تواند ناشی از افزایش انتشار مواد درون سلولی در اثر امواج فراصوت باشد (Wu and Lin, 2002). علاوه بر این، قلیایی شدن محیط کشت، یک نشانگر در واکنش سلول‌های گیاهی به محرک‌ها است و تصور می‌شود که ناشی از دپلاریزه شدن غشای پلاسمایی و متعاقباً تغییرات K^+/H^+ همراه با ورود Ca^{2+}

بحث

در پژوهش حاضر، اسیدیته محیط کشت در اثر اعمال امواج فراصوت در دوره‌های زمانی ۱۲، ۲۴ و ۳۶ ساعت در مقایسه با شاهد روند افزایشی داشت (جدول ۱). امواج فراصوت در شدت‌های پایین باعث ایجاد منافذ ریز موقت در دیواره و غشای سلولی می‌شود و در نتیجه جذب و ترشح مواد توسط سلول را تحت تأثیر

کشت سوسپانسیون فندق بیان کردند که مقدار پراکسید هیدروژن در تیمار امواج فراصوت نسبت به شاهد به طور معنی داری افزایش یافت. ایشان علت این افزایش را نوعی اختلال یا تغییر فیزیکی در دیواره یا غشای سلولی نظیر تخریب، شکاف یا تغییر شکل در اثر برخورد امواج فراصوت به سطح سلول بیان کرده‌اند. میزان پراکسید هیدروژن اندام هوایی و ریشه‌های گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) نیز تحت تأثیر پرتوهای فرابنفش در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش نشان داد (Pourakbar and Abedzadeh, 2014).

پرولین یکی از مولکول‌هایی است که در شرایط تنش، از مولکول‌ها و سلول‌ها در برابر اکسیژن پایه و رادیکال‌های آزاد حفاظت می‌کند (Alia et al., 1997). پرولین به عنوان خنثی‌کننده اکسیژن پایه (Alia and Saradhi, 1993) و جاروب‌کننده OH^- است و می‌تواند به عنوان پایدارکننده پروتئین، DNA و غشاها در شرایط تنش عمل کند (Hamilton and Heckathorn, 2001). به بیان دیگر، امواج فراصوت سبب افزایش تولید و تجمع ROSها مانند پراکسید هیدروژن و اکسیژن پایه می‌شود که افزایش پرولین از ساختارهای مولکولی و یکپارچگی غشای سلولی در برابر این تغییرات ناشی از امواج فراصوت محافظت می‌کند (Vendruscolo et al., 2007). در پژوهش حاضر، تیمار با امواج فراصوت باعث افزایش معنی‌دار مقدار پرولین و محتوای پروتئین کل سلول‌های خشک‌ش ایران شد. این افزایش در مقدار پرولین و پروتئین در ۱۲ ساعت پس از تیمار با امواج فراصوت مشاهده شد و تا ۱۴۴ ساعت (۶ روز) پس از اعمال تیمار ادامه داشت (شکل ۲-A و B). Safari و همکاران

و خروج Cl^- باشد (Boller, 1995). Lin و Wu (۲۰۰۲) در مطالعه سلول‌های گیاه *Panax ginseng* بیان کردند که استفاده از امواج فراصوت سبب افزایش اسیدیته محیط کشت سلولی در شدت‌های بالای امواج فراصوت شده است.

در تحقیق حاضر، زنده‌مانی و رشد سلول‌های خشک‌ش ایرانی در اثر تیمار با امواج فراصوت و با افزایش دوره‌های زمانی پس از اعمال تیمار در مقایسه با شاهد کاهش یافته است (شکل ۱-A و جدول ۱). Safari و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی تأثیر امواج فراصوت در فندق بیان کردند که امواج فراصوت در شدت‌های بالا در مدت زمان‌های ۲۰ و ۴۰ دقیقه سبب کاهش معنی‌داری در وزن خشک سلولی شده است. تیمار امواج فراصوت سبب آسیب‌های مکانیکی و ایجاد منافذ در غشای سلولی شده (Wu and Lin, 2002)، از طریق آسیب زدن به اندامک‌ها و اجزای سلول، در نهایت موجب مرگ سلولی و کاهش تکثیر و رشد آن می‌شود. Rezaei و همکاران (۲۰۱۱) نیز کاهش زنده‌مانی سلولی در کشت سوسپانسیون فندق تحت تأثیر امواج فراصوت را گزارش کرده‌اند.

در مطالعه حاضر، مقدار پراکسید هیدروژن تحت تأثیر تیمار امواج فراصوت نسبت به سلول‌های شاهد افزایش یافت (شکل ۱-B). مولکول پراکسید هیدروژن می‌تواند در مسیر ترانس‌مانی، در القای پاسخ‌های دفاعی سلول‌های گیاه نقش ایفا نماید (Stone and Yang, 2006؛ Finkel, 2011)، اما در غلظت‌های بالا باعث تنش اکسیداتیو در سلول و در آسیب مولکولی (تخریب پروتئین، DNA و غشاها سلولی) می‌شود (Mittler, 2002). Rezaei و همکاران (۲۰۱۱) نیز در

کلروپلاست تبدیل به آب می‌شوند (Hausladen and Hayat and Ahmad, 2007؛ Alscher, 1993). بنابراین، سلول‌ها در پاسخ به تولید این گونه ترکیبات در اثر تیمار امواج فراصوت، سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی خود که شامل بیان ژن‌های تولیدکننده آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و غیره را فعال‌تر می‌کنند. در این راستا، Safari و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی واکنش سلول‌های فندق به امواج فراصوت بیان کردند که بیان ژن‌های کاتالاز در سلول‌های تیمار شده با امواج فراصوت در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری داشته و بیشترین بیان مربوط به بازه زمانی ۲۰ دقیقه بوده است. فعالیت آنزیم کاتالاز در اندام هوایی و ریشه گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) تحت تأثیر پرتوهای فرابنفش در مقایسه با گیاهان شاهد به طور معنی‌داری کاهش نشان داده است (Pourakbar and Abedzadeh, 2014). افزایش بیان ژن پراکسیداز، تأثیر مهمی در تجمع گونه‌های فعال اکسیژنی و در نتیجه فعال‌سازی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی طی مواجهه با تنش دارد (Burbridge et al., 2007). Lin و Wu (۲۰۰۲) در بررسی تنش امواج فراصوت در سلول‌های *Panax ginseng* بیان کردند که با افزایش سطوح امواج فراصوت، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز نسبت به شاهد افزایش داشته و در پی آن، ترکیبات فنلی نیز افزایش یافته است. لازم به ذکر است اگرچه پراکسید هیدروژن در غلظت‌های بالا سمی است، اما در غلظت‌های پایین می‌تواند به عنوان یک محرک برای بیان ژن‌های مرتبط با تنش و یک پیام‌رسان ثانویه عمل نماید (Kumar et al., 2012).

(۲۰۱۲) نیز با استفاده از امواج فراصوت در کشت سوسپانسیون سلولی فندق گزارش کردند که مقدار پرولین سلول‌ها در اثر اعمال امواج فراصوت نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشته است. علاوه بر این، Nihal و همکاران (۲۰۱۳) نیز در بررسی اثر امواج فراصوت بر فعالیت‌های آنزیمی، نوکلئیک اسیدها و محتوی پروتئینی در کالوس‌های گیاه *S. indicum* L. گزارش کردند که مقدار پروتئین در اثر تیمار با امواج فراصوت افزایش می‌یابد. Lamberova و Kosolapova (۲۰۰۸) اثر امواج فراصوت بر وزن تر سلولی و محتوی پروتئینی در کالوس‌های گیاه *Sesamum indicum* L. را به تشکیل منافذ کوچک یا حفرات معروف به منافذ آکوستیک بر سلول‌ها که سبب افزایش جریان‌ات یونی، انتقال مواد مغذی، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و آمینو اسیدهای موجود در محیط کشت سلولی به سلول‌ها می‌شود، نسبت داده‌اند.

در پژوهش حاضر، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در سلول‌های تیمار شده با امواج فراصوت نسبت به سلول‌های شاهد افزایش یافت. تیمار با امواج فراصوت باعث ایجاد وقایع هیدرودینامیک و به دنبال آن، تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن نظیر پراکسید هیدروژن می‌شود (شکل ۱-B). علاوه بر این، تنش‌های محیطی سبب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در کلروپلاست و سایر اندامک‌های سلولی می‌شود که این رادیکال‌های آزاد توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌شود، سپس توسط آنزیم‌های پراکسیداز و گلووتاتیون ردوکتاز در

نوسکاپین، مورفین، پاپاورین و غیره باشد.

جمع‌بندی

در اثر اعمال تیمار امواج فراصوت درصد زنده‌مانی سلولی و وزن خشک سلولی نسبت به شاهد کاهش یافت. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در اثر اعمال تیمارهای امواج فراصوت در همه بازه‌های زمانی افزایش معنی‌داری در مقایسه با شاهد نشان داد و ۱۴۴ ساعت پس از اعمال تیمار بیشترین مقدار فعالیت آنها به دست آمد. تیمار امواج فراصوت به مدت ۳۰ ثانیه، میزان تباین سلول‌های خشک‌خاش ایرانی را در بازه زمانی ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار افزایش داد. بنابراین، می‌توان از این روش به عنوان راهکاری برای تقویت تولید این آلکالوئید استفاده کرد.

سپاسگزاری

نگارندگان از دانشگاه محقق اردبیلی به خاطر حمایت مالی تحقیق حاضر سپاسگزاری می‌نمایند.

در تحقیق حاضر، تأثیر امواج فراصوت بر تولید متابولیت‌های ثانویه و در نتیجه افزایش تولید تباین در بازه زمانی ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار، ممکن است بخشی از واکنش دفاعی سلول‌ها به تنش‌های مکانیکی ناشی از امواج فراصوت باشد. علاوه بر این، زمان پس از اعمال تیمار یکی از عوامل موثر در پاسخ سلول‌ها به محرک هم در سطح مولکولی و هم در سطح تولید متابولیت‌های ثانویه است (Ramani and Jayabaskaran, 2008). گزارش شده است که در محیط کشت مایع، امواج فراصوت سبب وقوع وقایع هیدرودینامیک مانند حفره‌زایی آکوستیک می‌شود (Lin et al., 2001) که می‌تواند باعث بروز تنش مکانیکی در سلول‌ها شود. Wu و Lin (۲۰۰۸) بیان کردند که تیمار کوتاه مدت سلول‌های گیاهی با امواج فراصوت با انرژی کم سبب افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه ارزشمند می‌شود. در مطالعه حاضر، کاهش مقدار تباین در برخی از دوره‌های زمانی پس از اعمال تیمار، در سلول‌های تیمار شده نسبت به سلول‌های شاهد می‌تواند ناشی از تحریک مسیرهای بیوسنتزی سایر آلکالوئیدهای گیاه خشک‌خاش ایرانی مانند

منابع

- Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. Methods in Enzymology 105: 121-126.
- Alia, P. and Saradhi, P. (1993) Suppression in mitochondrial electron transport is the prime cause behind stress-induced proline accumulation. Biochemical and Biophysical Research Communications 19(3): 54-58.
- Alia, P., Saradhi, P. and Mohanty, P. (1997) Involvement of proline in protecting thylakoid membrane against free radical-induced photodamage. Journal of Photochemistry and Photobiology 38: 253-257.
- Allen, R. S., Miller, J. A. C., Chitty, J. A., Fist, A. J., Gerlach, W. L. and Larkin, P. J. (2008) Metabolic engineering of morphinan alkaloids by over expression and RNAi suppression of salutarinol 7-O-acetyltransferase opium poppy. Plant Biotechnology Journal 6: 22-30.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline in water-stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.
- Bochu, W., Yoshikoshi, A. and Sakanishi, A. (1998) Carrot cell growth response in a stimulated

- ultrasonic environment. *Colloid Surfaces B: Biointerfaces* 12: 89-95.
- Boller, T. (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46: 189-214.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry Journal* 72: 248-254.
- Burbridge, E., Diamond, M., Dix, P. J. and McCabe, P. F. (2007) Use of cell morphology to evaluate the effect of a peroxidase gene on cell death induction thresholds in tobacco. *Plant Science Journal* 172: 853-860.
- Chance, B. and Maehly, A. C. (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology* 2: 764-755.
- Dornenburg, H. and Knorr, K. (1995) Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 17: 674-684.
- Esfandiari, E. A., Shakiba, M. R., Mahboob, S. A., Alyari, H. and Toorchi, M. (2007) Water stress, antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in wheat seedling. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 5: 149-153.
- Esfandiari, E., Mahboob, S. A. and Shekari, F. (2008) Destructive effect of active oxygen species, plant defense mechanisms and it's necessary. 10th Agricultural and Plant Breeding Congress, Karaj, Iran (in Persian).
- Finkel, T. (2011) Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of Cell Biology* 194: 15-17.
- Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59: 309-314.
- Hamilton, E. W. and Heckathorn, S. A. (2001) Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by antioxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine *Plant Physiology* 126: 1266-1274.
- Hausladen A. and Alscher R. G. (1993) Glutathione-active oxygen in plants. In: *Antioxidants in higher plants* (Eds. Alscher R. G. and Hess J. L.) 12-15. CRC Press, Boca Raton.
- Hayat, S. and Ahmad, A. (2007) *Salicylic acid: a plant hormone*. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Karuppanapandian, T., Wang, H. W., Prabakaran, N., Jeyalakshmi, K., Kwon, M., Manoharan, K. and Kim, W. (2011) 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced leaf senescence in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) and senescence inhibition by co-treatment with silver nanoparticles. *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 168-177.
- Kumar, R. R., Sharma, S. K., Gadpayle, K. A., Singh, K., Sivaranjani, R., Goswami, S. and Rai, R. D. (2012) Mechanism of action of hydrogen peroxide in wheat thermotolerance-interaction between antioxidant isoenzymes, proline, and cell membrane. *African Journal of Biotechnology* 11(78): 14368-14379.
- Lamberova, M. E. and Kosolapova, A. S. (2008) Researching of ultrasonic influence on callus formation, on maintenance of the general protein on enzymes activity and inhibitor of trypsin in extracts from the soybean of the grade (Altom) and plants cells growth of culture *in vitro*. *International Workshops and Tutorials on Electron Devices and Materials EDM'2008*, Novosibirsk, NSTU.
- Lin, L. and Wu, J. (2002) Enhancement of shikonin production in signaled two-phase suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* cells using low-energy ultrasound. *Biotechnology and*

- Bioengineering 78: 81-88.
- Lin, L., Wu, J., Ho, K.P. and Qi, S. (2001) Ultrasound-induced physiological effects and secondary metabolite (saponin) production in *Panax ginseng* cell cultures. *Ultrasound in Medicine and Biology* 27: 1147-1152.
- Loreto, F. and Velikova, V. (2001) Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology* 127: 1781-1787.
- Milo, J., Alvy, A., Palevitch, D. and Ladizinsky, G. (1987) Thebaine content and yield in induced tetraploid and triploid plants of *Papaver bracteatum* Lindl. *Euphytica* 36: 361-367.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7(9): 405-410.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-497.
- Navrot, N., Roubier, N., Gelbaye, E. and Jacquot, J. P. (2007) Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* 129: 185-195.
- Nihal, E., Sajida, A. and mozahim, K. (2013) Ultrasonic waves stimulate the activity of thymine nucleotid biosynthetic enzymes, nucleic acid and proteins content of *Sesamum indicum* L. stem calli. *Dirasat Pure Sciences* 39: 91-97.
- Oliveira, M., Febres, V., Costa, M., Moore, G. and Otoni, W. (2009) High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Reports* 28(3): 387-395.
- Omidi, M., Koohzadi, F., Solouki, M., Taghizad, F. R. and Alizadeh, H. (2012) Comparison of morphinan alkaloids during different stages of growth in the medicinal plant opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Journal of Medicinal Plants* 4(44): 140-149 (in Persian).
- Pong, M., Umchid, S., Guarino, A. J., Lewin, P. A., Litniewski, J., Nowicki, A. and Wrenn, S. P. (2006) *In vitro* ultrasound-mediated leakage from phospholipid vesicles. *Ultrasonics* 45: 133-145.
- Pourakbar, L. and Abedzadeh, M. (2014). Effects of UV-B and UV-C radiation on antioxidative enzymes activity of *Melissa officinalis* and influences of salicylic acid in UV-stress ameliorations. *Iranian Journal of Plant Biology* 21: 23-34 (in Persian).
- Ramani, S. and Jayabaskaran, C. (2008) Enhanced catharanthine and vindoline production in suspension cultures of *Catharanthus roseus* by ultraviolet-B light. *Journal of Molecular Signaling* 3: 1-9.
- 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. *Iranian Journal of Plant Biology* 3(7): 55-72 (in Persian).
- Safari, M., Ghanati, F., Behmanesh, M., Hajnorouzi, A., Nahidian, B. and Ghahremani, M. (2013) Enhancement of antioxidant enzymes activity and expression of CAT and PAL genes in hazel (*Corylus avellana* L.) cells in response to low-intensity ultrasound. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 2847-2855.
- 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 hazal (*Corylus avellana* L.). *Biotechnology Letters* 34(6): 1137-1141.
- Seddigh, M. D., Jolliff, G., Calhoun, W. M. and Carne, J. (1982) *Papaver bracteatum* potential commercial source of codeine. *Economic Botany* 36(4): 433-441.

- Stone, J. R. and Yang, S. (2006) Hydrogen peroxide: A signaling messenger. *Antioxidants & Redox Signaling* 8(3-4): 243-270.
- Vellosillo, T., Vicente, J., Kulasekaran, S., Hamberg, M. and Castresana, C. (2010) Emerging complexity in reactive oxygen species production and signaling during the response of plants to pathogens. *Plant Physiology* 154: 444-448.
- Vendruscolo, E. C. G., Schuster, I., Pileggi, M., Scapim, C. A., Molinari, H. B., Marur, C. J. and Vieira, L. G. (2007) Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *Journal of Plant Physiology* 164: 1367-1376.
- Wu, J. and Lin, L. (2002) Elicitor-like effects of low-energy ultrasound on plant (*Panax ginseng*) cells: Induction of plant defense responses and secondary metabolite production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59: 51-57.
- Wu, J. and Lin, L. (2008) Ultrasound-induced stress responses of *Panax ginseng* cells: enzymatic browning and phenolics production. *Biotechnology Progress* 18: 862-866.

Evaluation of ultrasound effects on growth and biochemical characteristics of Iranian poppy cell cultures and thebaine production

Ali Asghar Askari, Nasser Zare *, Rasoul Asghari Zakaria, Saeid Khomari
and Leyli Honarmand

Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili,
Ardabil, Iran

Abstract

Low-energy ultrasound shows multiple physiological effects on plant cells and tissues, and has numerous applications in plant biotechnology, especially in elicitation of secondary metabolites production. In this research, the effects of ultrasound on Iranian poppy cell suspension culture were investigated. For this purpose, cell suspension cultures were treated with ultrasound and then, cell viability and growth, activity of some antioxidant enzymes and amount of total protein, hydrogen peroxide, proline and thebaine were measured. The results showed that viability and dry weight (growth) of cells were significantly decreased under ultrasound treatment. In addition, increase in time after treatment led to severe reduction in cell viability and growth. Amount of proline and total protein were increased under ultrasound treatment, compared to the control. Analysis of variance revealed that hydrogen peroxide content of cells and activity of catalase, peroxidase and superoxide dismutase enzymes were significantly influenced by ultrasound, time after treatment and their interaction. So that, ultrasound treatment led to increased content of hydrogen peroxide and also elevated activity of aforementioned antioxidant enzyme in comparison to the control cells. Thebaine production in cells was significantly increased on 48 hours after treatment with ultrasound, compared to that of the control cells.

Key words: Ultrasound, Cell suspension culture, Secondary metabolite, *Papaver bracteatum* Lindl.

* nzare@uma.ac.ir