کاربرد امواج فراصدا با انرژی پایین به منظور تحریک مسیر پیام‌رسانی هیدروژن پراکسید و تولید متابولیت‌های ثانویه در یاخته‌های جداکشت جعفری

سارا سبحان‌نژاد، فائزه قناتی*

گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس- تهران

چکیده

پدیده کاواک‌زایی (کاویتاسیون) و تولید گونه‌های فعال اکسیژن از آثار رایج امواج فراصدا (اولتراساوند) در محیط‌های مایع است. تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌تواند با فعال کردن مسیر پیام‌رسانی یاخته‌ای (سلولی) و آماده‌سازی اولیه یاخته (سلول) گیاهی سبب حفاظت از گیاه در برابر تنش گردد. از بین گونه‌های مختلف اکسیژن، هیدروژن پراکسید قادر است به عنوان یک پیامبر ثانویه عمل کرده و با به راه انداختن واکنش‌های آبشاری در یاخته گیاهی سبب القای مسیرهای دفاعی، از جمله افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه شود. در تحقیق حاضر، یاخته‌های جداکشت جعفری با امواج فراصدا با شدت ۴۵۵ mW/cm^2 و بسامد ثابت ۲۹ کیلوهرتز، برای مدت زمان ۱۰، ۲۰ و ۴۰ دقیقه تیمار شده و درصد زنده‌مانی یاخته‌ها، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز، میزان H_2O_2 و محتوای فلاونوئیدهای آپیژنین و کوئرستین مورد سنجش قرار گرفتند. نتایج به دست آمده نشان دادند که تیمار یاخته‌ها با امواج فراصدا سبب افزایش فعالیت آنزیم پی‌ای‌اِل و به دنبال آن افزایش میزان آپیژنین و کوئرستین می‌گردد. نتایج به دست آمده پیشنهاد می‌کنند که امواج فراصدا با انرژی پایین از طریق افزایش تولید هیدروژن پراکسید سبب القای مسیر فنیل پروپانوئیدی و افزایش تولید فلاونوئیدهای دارویی نظیر آپیژنین و کوئرستین می‌گردند.

کلید واژه‌ها: آپیژنین، امواج فراصدا (اولتراساوند)، پدیده کاواک‌زایی (کاویتاسیون)، کوئرستین، گیاه جعفری

۱. مقدمه

توانایی درک و پاسخ به محرک‌های فیزیکی در بین تمامی موجودات از اهمیت زیادی برخوردار است. امواج فراصدا (اولتراساوند) به عنوان یک محرک فیزیکی می‌توانند تغییرات پایداری در سامانه‌های زنده ایجاد کنند [۱و۲]. مطالعات اولیه بر روی اثرات و خطرات احتمالی استفاده از امواج فراصدا در درمان بر انسان و جانوران متمرکز بودند. درحالی که امروزه اثرات مفید و کاربردهای بالقوه امواج فراصدا با شدت پایین در سامانه‌های زیستی و فرآیندهای زیست‌فن‌اورانه توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. امواج فراصدا با شدت‌های بالا اثرات مخربی بر روی سامانه‌های زنده دارند در حالیکه بنابر مطالعات انجام شده استفاده از امواج فراصدا با انرژی پایین می‌تواند سبب القای فعالیت‌های آنزیمی، تغییر ساختار اندامک‌های درون یاخته‌ای و هم‌چنین تحریک رشد یاخته‌ها شود [۳]. هم‌چنین تولید مولکول‌های علامت‌رسان مانند نیتریک اکسید و به دنبال آن افزایش فعالیت هیدروژن پراکسید و فنیل آلانین آمونیا لیاز به عنوان دیگر اثرات امواج فراصدا گزارش شده‌اند [۴و۵]. گونه‌های فعال اکسیژن[1] طی متابولیسم طبیعی یاخته‌های (سلول‌های) زنده (فرآیندهایی مانند فتوسنتز و تنفس) تولید می‌شوند. هم‌چنین تحریک گیاهان با محرک‌های مختلف زیستی و غیرزیستی سبب افزایش تولید آن‌ها می‌گردد. مهم‌ترین گونه‌های فعال اکسیژن، آنیون سوپراکسید ($O_2^{\bullet-}$)، رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\bullet}$)، هیدروپراکسیل ($OOH^{\bullet}$) و هیدروژن پراکسید (H_2O_2) هستند [۶]. گونه‌های فعال اکسیژن دارای نقش‌های متفاوت و دوگانه‌ای هستند به گونه‌ای که گاهی باعث تشدید خسارت به گیاه می‌شوند و در مواقعی باعث فعال‌شدن مسیر علامت‌رسانی (سیگنالینگ) یاخته‌ای (سلولی) و بروز پاسخ‌های دفاعی می‌گردند. این پاسخ دفاعی در برخی موارد به شکل افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه مفید و دارویی می‌باشد. گونه‌های فعال اکسیژن واکنش‌های زنجیره‌ای را به راه می‌اندازند که حاصل آن تغییر سریع ساختارهای

* نویسنده پاسخگو: ghangia@modares.ac.ir

[1] ROS; Reactive Oxygen Species

[Downloaded from joasi.ir on 2026-11-22]

[DOR: 20.1001.1.23455748.1393.2.1.6.9]

مولکولی و اعمال آن‌ها است. بنابراین نوع و غلظت گونه‌های فعال اکسیژن عوامل کلیدی و تعیین‌کننده‌ای در مفید و یا مضر بودن آن‌ها محسوب می‌شوند [۷].

گیاه جعفری (پتروزلینوم کریسپوم اِل.)[1] گیاهی علفی از خانواده (آپیاسی)[2] می‌باشد. گیاهان این خانواده از نظر محتوای اسانس بسیار حائز اهمیت هستند. از ترکیبات مهم گیاه جعفری می‌توان به فلاونوئیدهایی مانند کوئرستین[3] و آپیژنین[4] اشاره کرد. آپیژنین با ایجاد اثر مهاری بر روی آنزیم‌های آرتی (ریورس ترانسکریپتاز)[5] و پروتئاز در رتروویروس‌ها دارای خاصیت ضد ویروسی می‌باشد. از دیگر خواص آن می‌توان به اثرات ضد آلرژی، ضد باکتریایی، ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد. هم‌چنین این ترکیب از طریق القای بیان ژن[6] p۵۳ و کاهش بیان ۲-bcl، تکثیر لاین یاخته‌های سرطانی را مهار می‌کند [۸ و ۹]. کوئرستین نیز آنتی اکسیداتیو، ضد سرطان، ضد التهاب و گشادکننده عروق می‌باشد. اگرچه سازوکار تأثیرکوئرستین به طور کامل شناخته شده نیست اما پیشنهاد شده است که این تأثیرات از طریق کلات کردن فلزات[7]، جاروب کردن رادیکال‌های آزاد، مهار آنزیم‌ها و یا بیان ژن‌های حفاظت‌کننده انجام می‌شود [۱۰].

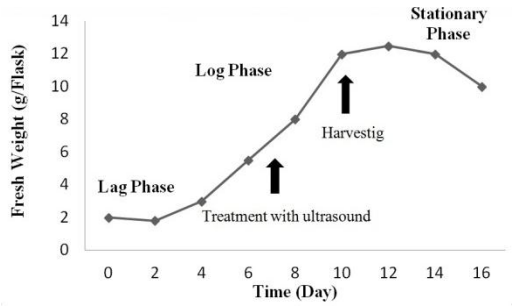
با توجه به اثرات دارویی و ضد سرطانی ترکیبات مختلف موجود در گیاه جعفری و در دسترس بودن منابع کافی از این گیاه، بنیان‌گذاری لاین‌های یاخته‌ای با توان بالای تولید این ترکیبات و بالاتر بردن کارآیی تولید همراه با حفظ و بقای یاخته اهمیت بسیار زیادی دارد. مطالعات انجام شده بر روی کاربرد امواج فراصدا در گیاهان عمدتاً بر خروج بیشتر متابولیت‌های ثانویه از یاخته‌های گیاهی متمرکز بوده و تاثیر این امواج بر سامانه دفاعی یاخته کمتر مورد توجه قرار گرفته است [۱۱ و ۱۲].

لذا هدف تحقیق حاضر ارزیابی استفاده از امواج فراصدا با بسامد پایین در تولید متابولیت‌های ثانویه دارویی در یاخته‌های جداکشت[8] جعفری و شفاف‌سازی سازوکار این تأثیر می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. کشت یاخته‌ای (سلولی) و تیمار یاخته‌ها با امواج فراصدا

یک رده یاخته‌ای با رشد سریع از بذرهای جعفری در محیط پایه اِل‌اِس[9] جامد با ترکیب ۱/۵ mgL^{-1} کینتین، ۱/۵ mgL^{-1} تیامین، ۰/۷۵ mgL^{-1} پیریدوکسین، ۰/۷۵ mgL^{-1} نیکوتینیک اسید و PH=۵/۸ بنیانگذاری شد [۱۳]. پس از چند نسل واکشت[10] یاخته‌ها در این محیط و رسیدن به ثبات ژنتیکی[11]، کشت[12] تعلیقی از این یاخته‌ها بنیان‌گذاری شد. یاخته‌ها در تاریکی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و بر روی شیکر[13] با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه نگهداری شده و بعد از چندین نسل واکشت منحنی رشد آن‌ها رسم گردید (شکل ۱).



شکل ۱ منحنی رشد یاخته‌های جعفری در محیط کشت تعلیقی.

براساس این منحنی، یاخته‌ها در روز هفتم واکشت، (در فاز لگاریتمی رشد) تحت تیمار[1] با امواج فراصدا قرار گرفتند. به منظور تیمار یاخته‌ها از پروب فراصدا مرکب از ۴ بلور (کریستال) پیزوالکتریک استفاده شد که در انتهای یک لوله شیشه‌ای استوانه‌ای به قطر ۲ سانتی‌متر قرار داشت. تیمار یاخته‌ها با امواج فراصدا با شدت ۴۵۵ W/cm^2 و بسامد ثابت ۲۹ کیلوهرتز برای

[1] Petroselinum Crispum L.
[2] Apiaceae
[3] Quercetin
[4] Apigenin
[5] RT; Reverse Transcriptase
[6] Gene
[7] Metal chelation

[8] Explant
[9] LS
[10] Subculture
[11] Genetic
[12] Culture
[13] Shaker

[Downloaded from joasi.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.23455748.1393.2.1.6.9]

مدت زمان ۱۰،۲۰ و ۴۰ دقیقه انجام گرفت. یاخته‌ها پس از سه روز از محیط جدا شده و بررسی‌های مورد نظر بر روی آن‌ها انجام شدند.

۲-۲. اندازه‌گیری رشد یاخته‌ای (سلولی) و تعیین درصد زنده‌مانی یاخته‌ها

از وزن تر به عنوان معیاری برای تعیین رشد یاخته‌ها (سلول‌ها) استفاده شد. بدین منظور یاخته‌ها بر روی قیف بوخنر واجد کاغذ صافی و نایلون مش (۴۲ میکرومتر) و با استفاده از فشار منفی (پمپ خلاء) صاف شده و سپس وزن شدند. هم‌چنین برای تعیین درصد زنده‌مانی[2]، یاخته‌ها بلافاصله پس از برداشت با محلول آبی اوانس بلو (۰٫۲۵درصد) رنگ‌آمیزی و پس از گذشت سه دقیقه با آب مقطر شسته و در زیر میکروسکوپ نوری[3] مشاهده شدند. با شمارش یاخته‌های مرده و زنده و محاسبه کل آن‌ها، درصد زنده بودن یاخته‌ها تعیین گردید [۱۴].

۲-۳. مقدارسنجی پتاسیم یدید تحت تأثیر امواج فراصدا

دزیمتری KI، روشی است که بر پایه تبدیل مولکول های ید به یون، در محلول آبی KI، استوار است و از آن می‌توان برای شناسایی پدیده کاواک‌زایی (کاویتاسیون)[4] استفاده کرد [۱۵]. مطابق این روش، محلول ۰٫۱ مولار پتاسیم یداید تحت تأثیر امواج فراصدا قرار گرفت و میزان یون I^{3-} تولید شده در فواصل زمانی مشخص از شروع تیمار در طول‌موج ۳۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر[5] قرائت شد.

۲-۴. آشکارسازی رادیکال هیدروکسیل تولید شده تحت تأثیر امواج فراصدا

همان‌گونه که ذکر شد، در اثر فروریزش حباب‌ها پس از تیمار با امواج فراصدا رادیکال هیدروکسیل تشکیل می‌شود که در حضور ماده‌ای به نام لومینول[6] با آن واکنش داده و نور تولید می‌کند. به منظور تصویربرداری از نقاط نورانی ایجاد شده، محلول آبی M ۰٫۰۵ لومینول (سیگما)، حاوی Na_2CO_3 ۰٫۱ M تهیه شده تحت تأثیر امواج فراصدا قرار گرفت. نور تولید شده در حین این واکنش نشان‌دهنده حضور رادیکال هیدروکسیل در محلول می‌باشد که اثر آن با افزایش زمان باز بودن دیافراگم دوربین عکاسی تصویربرداری شده است. عکس‌برداری با دوربین کنن ایی‌اُاِس[7] با لنز ۱۳۵-۱۸ میلی‌متر در اتاق تاریک و در فاصله کانونی ۱۰۰ میلی‌متر انجام شد. مدت زمان نوردهی ۱۸۰ ثانیه، اندازه دیافراگم ۵٫۶ و حساسیت آن روی ۳۲۰۰ درجه تنظیم شد [۱۶].

۲-۵. اندازه‌گیری مقدار هیدروژن پراکسید (H_2O_2)

برای اندازه‌گیری محتوای هیدرژن پراکسید ۲۰۰ میلی‌گرم یاخته منجمد شده بر روی یخ با ۳ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید ۰٫۱ درصد سائیده و سپس سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ rpm، ۱۵ دقیقه) شد. به ۱ میلی‌لیتر از محلول روشناور ۱ میلی‌لیتربافر پتاسیم فسفات (۱۰ mM، pH=۷) و ۱ میلی‌لیتر پتاسیم یدید ۱ M اضافه گشته و جذب آن در طول موج ۳۹۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد. مقدار هیدروژن پراکسید با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه گردید [۱۷].

۲-۶. استخراج و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (پی‌اِی‌اِل)

برای استخراج آنزیم پی‌اِی‌اِل[8]، ۲۰۰ میلی‌گرم توده یاخته‌ای (سلولی) منجمد شده با ۳ میلی‌لیتر بافر Tris-HCl (۵۰ mM، pH=۸٫۲) حاوی بتا مرکاپتواتانول ۱۵ mM، در هاون و بر روی یخ سائیده شد. نمونه‌ها پس از همگن‌سازی، سانتریفیوژ (۱۵۰۰۰ rpm، ۳۰ دقیقه) شده و مایع روشناور برای سنجش فعالیت پی‌اِی‌اِل مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت پی‌اِی‌اِل

[1] Treatment
[2] Viability
[3] Olympus, BH_2, Japan
[4] Cavitation
[5] GBC, Cintra 6, Australia
[6] Luminol
[7] Canon Eos
[8] PAL

[Downloaded from joasi.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.23455748.1393.2.1.6.9]

براساس میزان تولید سینامیک اسید اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۱ میلی‌لیتر از بافر استخراج، ۰/۵ میلی‌لیتر ۱۵ mM اِل- فنیل‌آلانین[1]، ۰/۴ میلی‌لیتر آب دیونیزه و ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره حاوی آنزیم بود و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. واکنش با افزودن ۰/۱ میلی‌لیتر ۶MHCl، متوقف شده فرآورده آن، سینامیک اسید، به کمک اتیل‌استات استخراج شد. سپس اتیل‌استات مورد تبخیر قرار گرفته و باقی مانده در ۳ میلی‌لیتر ۰/۰۵ MNaOH حل گردید. غلظت سینامیک اسید با اندازه‌گیری مقدار جذب در طول‌موج ۲۹۰ نانومتر و به کمک استاندارد سینامیک اسید تعیین شد. یک واحد از فعالیت پی‌ای‌اِل، برابر با ۱ میکرومول از سینامیک اسید تولید شده در دقیقه می‌باشد [۱۸].

۲-۷. استخراج و تحلیل فلاونوئیدهای آپیژنین و کوئرستین

به منظور استخراج آپیژنین و کوئرستین، سلول‌ها با استفاده از پمپ خلاء بر روی نایلون مش جمع‌آوری شده و میزان ۱۰ گرم از آن در نیتروژن مایع پودر و سپس توسط ۱۵ میلی‌لیتر متانول/آب به نسبت ۴۰/۶۰ (v/v) سائیده شدند. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. پس از آن فاز رویی جدا و تحت جریانی از هوای صاف شده و به کمک پمپ هوا مورد تبخیر قرار گرفت. سپس جهت انجام اچ‌پی‌اِل‌سی[2] به هریک از عصاره‌های خشک شده، ۰/۵ میلی‌لیتر متانول اضافه شد و۴۰ میکرولیتر از آن جهت تحلیل به دستگاه اچ‌پی‌اِل‌سی تزریق گردید. برای فاز متحرک از ترکیب متانول، استونیتریل، اسید استیک، فسفریک اسید و آب دیونیزه به نسبت (۱۰۰، ۲۰۰، ۱۰، ۱۰ و ۱۰۰ V/V) استفاده شد. آنالیز ترکیبات فلاونوئیدی با روش ایزوکراتیک[3] و نرخ جریان[4] ۰/۸ میلی‌لیتر بر دقیقه، در طول‌موج ۳۲۵ نانومتر و توسط دستگاه اچ‌پی‌اِل‌سی[5] و ستون C18، ۲۵۰mm×۴/۶mm و قطر داخلی ۵ میکرومتر انجام شد. محتوای فلاونوئیدی هریک از دو ترکیب کوئرستین و آپیژنین با استفاده از سطح زیر منحنی و با قرار دادن در معادله رگرسیون حاصل از منحنی استاندارد مربوط به هر ترکیب محاسبه شد [۱۹ و ۲۰]. استاندارد هر دو ترکیب از شرکت سیگما تهیه شد.

۲-۸. تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایش‌ها با سه تکرار از حداقل سه نمونه مستقل انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم افزار اِس‌پی‌اِس‌اِس[6] نسخه ۲۲ و آزمون دانکن جهت تعیین معنادار بودن تفاوت‌ها در سطح $P \leq ۰/۰۵$ انجام شد.

۳. نتایج

بررسی تغییرات رشد (وزن تر) یاخته‌های جفریپس از تیمار با امواج فراصدا در زمان‌های مختلف تغییر معناداری را در میزان رشد یاخته‌هایی که به مدت ۱۰ دقیقه در معرض امواج فراصدا قرار داشتند نشان نداد اما میزان رشد یاخته‌هایی که به مدت ۲۰ دقیقه با امواج فراصدا تیمار شده بودند در مقایسه با شاهد به طرز معناداری افزایش یافت (شکل ۲). رنگ‌آمیزی با اوانس بلو نیز حفظ مورفولوژی[7] و تمامیت یاخته و زنده بودن این دو گروه از یاخته‌ها را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد (شکل۲).

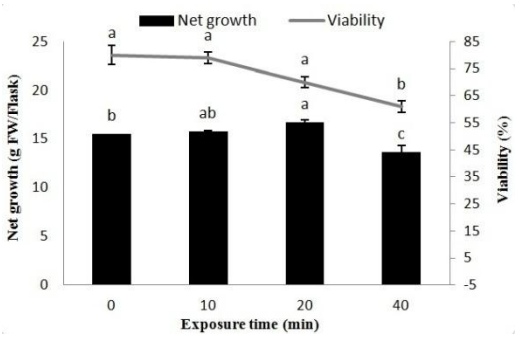
قرار گرفتن یاخته‌های جعفری به مدت ۴۰ دقیقه در معرض امواج فراصدا باعث کاهش معنادار ($P \leq ۰/۰۵$) رشد یاخته‌ها در مقایسه با گروه شاهد گردید (شکل۲).

همان‌گونه که ذکر شد امواج فراصدا می‌توانند سبب ایجاد حباب‌های گاز و به دنبال آن انفجار این حباب‌ها به سمت داخل (فروپکیدن) گردند که حاصل آن ایجاد رادیکال‌های فعال است. این رادیکال‌های فعال می‌توانند سبب تبدیل مولکول‌های ید به یون I^{3-}، در محلول آبی KI شوند. نتایج مربوط به دزیمتری شیمیایی پتاسیم یدید بر روی سامانه طراحی شده در

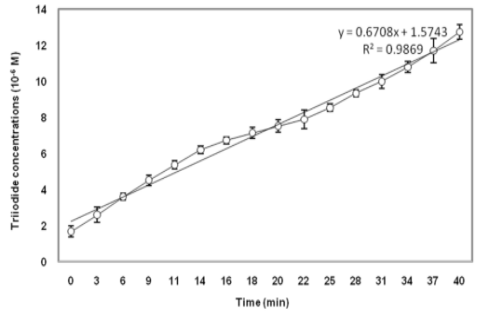
[1] L-Phenylalanine
[2] HPLC
[3] Isocratic
[4] Flowrate
[5] Knauer, Germany
[6] SPSS
[7] Morphology

[Downloaded from joasi.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.23455748.1393.2.1.6.9]

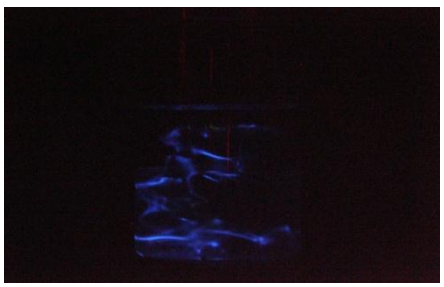
تحقیق حاضر نیز، افزایش غلظت I^{3-} نسبت به زمان را نشان دادند (شکل ۳). در اثر فروریش حباب‌ها پس از تیمار یاخته‌های جداکشت جعفری با امواج فراصدا رادیکال هیدروکسیل تشکیل می‌شود که در حضور لومینول با آن واکنش داده و نور تولید می‌کند (شکل ۴).



شکل ۲ میزان رشد و زنده بودن یاخته‌های جداکشت جعفری پس از قرار گرفتن در معرض امواج فراصدا در زمان‌های مختلف. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت نشان دهنده معنادار بودن تفاوت‌ها در سطح $P \leq ۰/۰۵$ براساس آزمون دانکن می‌باشند.

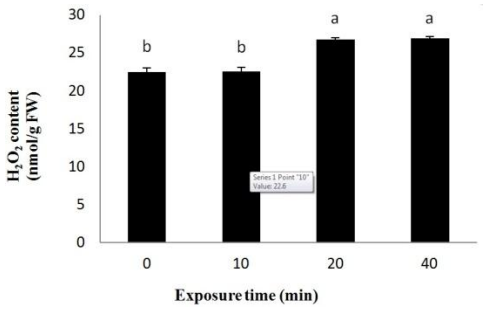


شکل ۳ غلظت I^{3-} تولید شده نسبت به زمان.

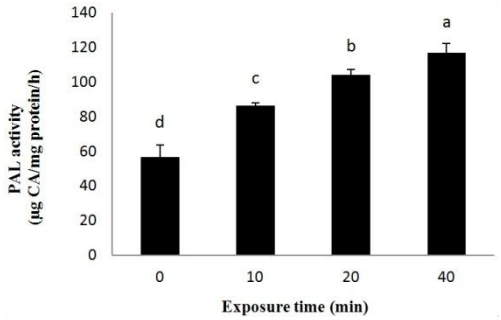


شکل ۴ آشکارسازی حضور رادیکال‌های هیدروکسیل با لومینول، پس از قرار گرفتن در معرض امواج فراصدا.

میزان تجمع هیدروژن پراکسید در یاخته‌های جعفری که به مدت ۱۰ دقیقه با امواج فراصدا تیمار شده بودند افزایش معناداری نسبت به یاخته‌های شاهد نداشت ولی در سایر تیمارها میزان هیدروژن پراکسید به شکل معنی‌داری نسبت به یاخته‌های گروه شاهد افزایش یافت (شکل۵).



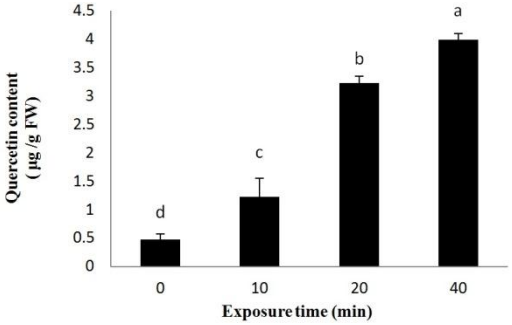
شکل ۵ تغییرات میزان هیدروژن پراکسید (H_2O_2) تحت تأثیرامواج فراصدا در یاخته‌های جداکشت جعفری مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت نشان دهنده معنادار بودن تفاوت‌ها در سطح $P \leq ۰/۰۵$ بر اساس آزمون دانکن می‌باشند.



شکل ۶ تغییر فعالیت پی‌ای‌ال تحت تاثیر امواج فراصدا در زمان‌های مختلف در یاخته‌های جداکشت جعفری مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیارمی‌باشند. حروف متفاوت نشان دهنده معنادار بودن تفاوت‌ها در سطح $P \leq ۰/۰۵$ بر اساس آزمون دانکن می‌باشند.

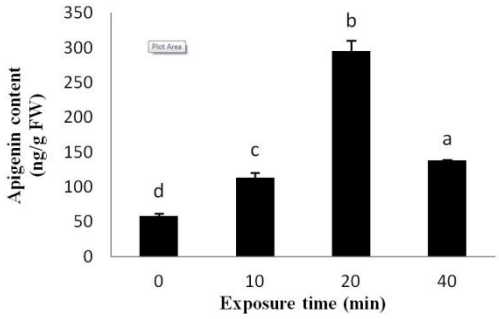
محتوای کوئرستین در یاخته‌های تیمار شده با امواج فراصدا در تمامی زمان‌ها و به صورت متناسب با زمان تابش افزایش معناداری نسبت به یاخته‌های گروه کنترل نشان داد. به طوری که بیشترین میزان کوئرستین در یاخته‌هایی که به مدت ۴۰ دقیقه در معرض تابش امواج قرار داشتند مشاهده گردید. این مقدار تقریباً ۸ برابر کوئرستین استخراج شده از یاخته‌های گروه شاهد بود (شکل ۷).

[Downloaded from joasi.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.23455748.1393.2.1.6.9]



شکل ۷ تغییر در محتوای کوئرستین تحت تاثیر امواج فراصدا در زمان‌های مختلف در یاخته‌های جداکشت جعفری مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت نشان دهنده معنادار بودن تفاوت‌ها در سطح $P \leq ۰/۰۵$ بر اساس آزمون دانکن می‌باشند.

هم‌چنین محتوای آپیژنین تحت تیمار با امواج فراصدا در تمامی زمان‌ها نسبت به یاخته‌های کنترل افزایش معناداری نشان داد. این افزایش تا زمان ۲۰ دقیقه به صورت متناسب با زمان اتفاق افتاد. میزان آپیژنین در یاخته‌هایی که به مدت ۴۰ دقیقه در معرض امواج قرار داشتند نسبت به تیمار ۲۰ دقیقه کمتر بود گرچه همچنان نسبت به یاخته‌هایی شاهد افزایش معناداری داشت (شکل۸).



شکل ۸ روند تغییر در محتوای آپیژنین تحت تاثیر امواج فراصدا در زمان‌های مختلف در یاخته‌های جداکشت جعفری مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت نشان دهنده معنادار بودن تفاوت‌ها در سطح $P \leq ۰/۰۵$ براساس آزمون دانکن می‌باشند.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

بخشی از اثر محرک‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی به شکل افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه بروز می‌کند که نوعی پاسخ دفاعی گیاه به تنش اعمال شده می‌باشد. بنابراین یکی از راهکارهای افزایش تولید ترکیبات ارزشمند دارویی موجود در گیاه و استخراج آن‌ها استفاده از محرک‌ها در کشت‌های یاخته‌ایی و شرایط آزمایشگاهی است که نسبت به استفاده از گیاه کامل بسیار کارآمدتر و سریعتر می‌باشد. تأثیر مثبت محرک‌ها به عوامل مختلفی از جمله میزان رشد و زنده‌مانی یاخته‌ها، ساختارهای درون یاخته‌ایی و مسیرهای علامت‌رسانی (سیگنالینگ) وابسته می‌باشد. بنابراین درک سازوکار اثر محرک‌ها و استفاده صحیح از آن‌ها به طوری که در ضمن داشتن اثرات قابل توجه بر تولید متابولیت‌های ثانویه کمترین اثر منفی را بر عوامل (فاکتورهای) حیاتی یاخته (سلول) داشته باشند، ضروری است. به دنبال درک محرک‌های مکانیکی تغییراتی در یاخته اتفاق می‌افتد که عبارتند از: تغییر پتانسیل غشا، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و به صورت هم‌زمان با آن افزایش کلسیم درون یاخته‌ای که ممکن است توسط مجراهای (کانال‌های) کلسیمی وابسته به کشش[1] انجام گیرد [۱]. نتایج حاصل از این تحقیق نشان دادند که استفاده از امواج فراصدا در زمان‌های کوتاه نه تنها میزان رشد و زنده‌مانی یاخته‌ها را کاهش نداده بلکه تا حدی سبب افزایش زی‌توده (زی‌جرم)[2] نیز شد. تولید و آزادسازی ROS ها نظیر رادیکال سوپر اکسید ($O_2^{\bullet-}$)، رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\bullet}$) و هیدروژن پراکسید (H_2O_2) از نخستین پاسخ‌های یاخته به تنش می‌باشند که در طی چند دقیقه پس از القای تنش صورت می‌گیرند. امواج فراصدا با ایجاد پدیده کاواک‌زایی (کاویتاسیون)، سبب تولید گونه‌های فعال اکسیژن در محیط برون یاخته‌ای (سلولی) می‌شوند. رادیکال‌های آزاد تولید شده، غشای یاخته را تحت تأثیر قرار داده و نفوذپذیری آن را افزایش می‌دهند که نتیجه این امر ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن در داخل یاخته می‌باشد. بنابراین امواج فراصدا علاوه بر اینکه به صورت مستقیم در محیط خارج یاخته‌ای باعث ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند، در داخل یاخته نیز به صورت غیرمستقیم ایجاد رادیکال‌های آزاد می‌کنند. نتایج حاصل از این

[1] Stretch-activated Ca^{2+} channels
[2] Biomass

[Downloaded from joasi.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.23455748.1393.2.1.6.9]

تحقیق افزایش میزان هیدروژن پراکسید درون یاخته‌ای در اثر تیمار با امواج فراصدا را نشان دادند که بخشی از آن حاصل پدیده کاواک‌زایی تحت تابش فراصدا و به دنبال آن ورود پراکسید هیدروژن به درون یاخته‌ها و تجمع در آن‌ها می‌باشد. گونه‌های فعال اکسیژن از عوامل مهم در تنش اکسیداتیو بوده که بطور قابل توجهی رشد یاخته و متابولیسم ثانویه را تحت تأثیر قرار می‌دهند [۲۱]. سامانه دفاعی آنتی‌اکسیدان گیاهان با افزایش سنتز برخی ترکیبات و افزایش فعالیت برخی آنزیم‌ها اثرات مخرب گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش داده و باعث حفظ تعادل محیط درونی یاخته می‌شود. افزایش میزان هیدروژن پراکسید در یاخته‌های تیمار شده با امواج فراصدا در زمان‌های طولانی‌تر می‌تواند یکی از دلایل کاهش رشد و زنده‌مانی در این گروه از یاخته‌ها باشد. هم‌چنین این مولکول به عنوان یک گونه فعال اکسیژن علاوه بر آسیب به گیاه می‌تواند به عنوان یک مولکول علامت‌رسان (سیگنالینگ) عمل کرده و با القای این مسیرها باعث فعال شدن واکنش‌های دفاعی گیاه و در نتیجه سبب افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه شود [۷]. فنیل پروپانوئیدها گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه گیاهان و از آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی می‌باشند که نقش آن‌ها در سلامت انسان از طریق جاروبگری رادیکال‌های آزاد نشان داده شده است [۸-۱۰]. آنزیم پی‌اِی‌اِل یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز ترکیبات فنیل پروپانوئیدی است که نقش مهمی در واکنش گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارد و منجر به تجمع ترکیبات فنلی و القای متابولیسم ثانویه می‌گردد [۲۲]. در تحقیق حاضر تیمار با امواج فراصدا سبب افزایش فعالیت آنزیم پی‌اِی‌اِل در یاخته‌های جعفری شد و متعاقب آن میزان دو ترکیب آپیژنین و کوئرستین به عنوان دو ترکیب مهم فنیل پروپانوئیدی موجود در یاخته‌های جعفری به طرز چشمگیری افزایش یافت. علاوه بر این همان‌طور که ذکر شد این ترکیبات با دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و به عنوان جزیی از آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی وارد عمل شده و طی یک مسیر دفاعی، گیاه را در برابر تنش وارد شده محافظت می‌کنند. با توجه به افزایش قابل توجه میزان درون یاخته‌ای این دو ترکیب می‌توان گفت که امواج فراصدا اثر قابل توجهی بر بیوسنتز آپیژنین و کوئرستین داشته‌اند و بیشتر از اینکه باعث افزایش خروج آن‌ها به محیط کشت شوند با القای مسیرهای بیوسنتزی آن‌ها باعث افزایش سنتز آن‌ها در یاخته‌های جعفری شده‌اند. به نظر می‌رسد امواج فراصدا صرفاً از طریق تأثیر فیزیکی مستقیم برروی یاخته‌ها باعث افزایش تولید این ترکیبات نمی‌شوند بلکه این امر را با ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن در محیط و به دنبال آن به راه انداختن مسیرهای علامت‌رسانی انجام می‌دهند که نتیجه آن القای متابولیسم ثانویه و واکنش‌های دفاعی یاخته‌ای است.

۵. فهرست منابع

[1] F.W. Telewski, "A unified hypothesis of mechanoperception in plants," American Journal of Botany, vol. 93, pp. 1466–1476, 2006.
[2] G. Haar, "Therapeutic applications of Ultrasound," Progress in Biophysics and Molecular Biology, vol. 93, pp.111–129, 2007.
[3] Y. Liu, H. Takatsuki, A. Yoshikoshi, B. Wang, A. Sakanishi, "Effects of ultrasound on the growth and vacuolar H^+-ATPase activity of aloearborescens callus cells," Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, vol. 32, pp.105-116, 2003.
[4] J. Wu, X. Ge, "Oxidative burst, jasmonic acid biosynthesis, and taxol production induced by low-energy ultrasound in Taxuschinensis cell suspension cultures," Biotechnology and Bioengineering, vol. 85, pp. 714–721, 2004.
[5] J.Wu, L. Lin, "Elicitor-like effects of low-energy ultrasound on plant (Panax ginseng) cells: induction of plantdefense responses and secondary metabolite production," Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 59, pp. 51–57, 2002.
[6] R.S. Franco, G.A. Georgakilas, "Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis," Cancer Letters, vol. 266, pp. 6–11.
[7] J. Dat, S. Vandenabeele, E. Vranova, M. Van Montagu, D. Inze, F.Van Breusegem, "Duel action of the active oxygen species during plant stress responses," Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 57, pp. 779-795, 2000.
[8] H.W.Lee, Y.H. Ko, "Effects of apigenin and ethanol extract of parsley (Petroselinum crispum L.) on viral neuraminidase activity," Asian Journal of Experimental Biological Sciences, vol. 3, pp.675-681, 2012.
[9] S. Chakravarthi, C.F. Wen, N. Haleagrahara, "Apoptosis and expression of bcl-2in cyclosporine induced renaldamage and its reversal by beneficial effects of 4', 5', 7'- trihydroxyflavone," Journal of Analytical Bio-Science, vol. 32, pp. 320-327, 2009.

[Downloaded from joasi.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.23455748.1393.2.1.6.9]

[10] I. Erlund, "Review of the flavonoids quercetin, hespertin, and naringenin. Dietary sources, bioactivity, bioavailabilityand epidemiology," Nutrition Research, vol. 24, pp. 851–874, 2004.

[11] A. Rezaei, F. Ghanati, M. Behmanesh, M. Mokhtari-Dizaji, "Ultrasound-potentiated salisylic acid–induced physiological effects and production of taxol in hazelnut (Corylusavellana L.) cell culture," Ultrasound in Medicine & Biology , vol. 37, pp. 1938-1947, 2011.

[12] S. Zhao, O.B. Baik, "Application of ultrasound as pretreatment for extraction of podophyllotoxin from rhizomes of Podophyllumpeltatum," Ultrasonics Sonochemistry, vol. 19, pp. 22-31, 2012.

[13] E. Rajabbeigi, F. Ghanati, P. Abdolmaleki, A. Payez "441Antioxidant capacity of parsley cells (Petroselinum crispum L.) and static magnetic field in relation to iron-induced ferritin levels," Electromagnetic Biology and Medicine, 32(4), pp. 430-441, 2013.

[14] M. Smith, J.P. Palta, B.H. McCown, "The measurement of isotonicity and maintenance of osmotic balance in plant protoplast manipulations," Plant Science Letters, vol. 33, pp. 249-258, 1984.

[15] A. Ebrahiminia, M. Mokhtari-Dijazi, T. Toliyat, "Correlation between iodide dosimetry and terephthalic acid dosimetry to evaluate the reactive radical production due to the acoustic cavitation activity," Ultrasonics Sonochemistry, vol. 20, pp. 366–372, 2012.

[16] A. Hajnorouzi, R. Afzalzadeh, F. Ghanati, "Study on the homogeneity of sound amplitude in ultrasound bath and spherical reactor," Journal of Acoustical Engineering Society of Iran, vol. 1, no. 2, pp. 32-40, 1393 (In Persian).

[17] V. Velikova, I. Yordanov, A. Edreva, "Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated been plants protective role of exogenous polyamines," Plant Science, vol. 151, pp. 59–66, 2000.

[18] N. Ochoa-Alejo, J.E. Gomez-Peralta, "Activity of enzymes involved in capsaicin biosynthesis in callus tissue and fruits of chili pepper (Capsicum annuum L.)," Journal of Plant Physiology, vol. 141, pp. 147–152, 1993.

[19] X. Chen, J. Xiao, "RP-HPLC-DAD Detrmination of Flavonoids: Separation of Quercetin, luteolin and Apigenin in Marchantia Convoluta," Iranian Journal of Pharmaceutical Research, vol. 3, pp. 175-181, 2005.

[20] L.Z. Lin, J.M. Harnly, "Identification of the phenolic components of Chrysanthemum flower (Chrysanthemum morifolium Ramat)," Food Chemistry, vol. 120, pp. 319–326, 2010.

[21] M.N. Banu, A. Hoque, M. Watanabe-Sugimoto, K. Matsuoka, Y. Nakamura, Y. Shimoishi, Y. Murata, "Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expressionand suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress," Journal of Plant Physiology, vol. 166, pp. 146-156, 2009.

[22] J. Kováčik, B. Klejdus, M. Bačkor, "Nitric oxide signals ROS scavenger-mediated enhancement of PAL activity in nitrogen-deficient Matricariachamomilla roots: side effects of scavengers," Free Radical Biology & Medicine, vol. 46, pp. 1686–1693, 2009.

[Downloaded from joasi.ir on 2026-11-22]

[DOR: 20.1001.1.23455748.1393.2.1.6.9]