

تشدید تقسیم سلول در کالوس‌های آلوئه‌ورا تیمار شده با لیزر کم‌توان و ارتباط آن با متابولیت‌های ثانویه

Aggravation of cell division in *Aloe vera* calli treated by low level laser and its relation with secondary metabolites production

منصور امیدی^{۱*}، مهسا توکلی^۱، سیدعلی پیغمبری^۱، هدیه پاکیان^۱، شهریار عبدالحسینی^۲

۱- به‌ترتیب استاد، دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲- به‌ترتیب استادیار، کارشناس ارشد، پژوهشکده لیزر و اپتیک، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران

Omidi M^{*1}, Tavakoli M¹, Peighambari SA¹, Pazokian H², Abolhoseini Sh²

1- Professor, Graduated MSc Student, Professor, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

2- Assistant Professor, MSc, Laser and Optics Research Center, Institute of Nuclear Science and Technology, Tehran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Momidi@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۵)

چکیده

زندگی همه موجودات زنده وابسته به تقسیم و تنظیمات میتوز است. چرخه سلولی توسط چندین مکانیسم تنظیم می‌شود. از مهم‌ترین مکانیسم‌های کنترلی، نقاط کنترلی چرخه سلولی هستند که باعث توقف یا ادامه چرخه سلولی می‌شوند. دیگر مکانیسم‌های آبخار فسفات افزایشی و فسفات زدایی است که واکنش‌های چرخه سلولی را به جریان می‌اندازد. از این رو عامل سیتوبلاسمی MPF و سایکلین و کیناز وابسته به سایکلین نقش مهمی در هدایت سیکنال‌ها ایفا می‌کنند. در این پژوهش، کالوس‌های جوان به دست آمده از طوقه گیاه آلوئه‌ورا تحت تیمار با لیزر هلیوم نئون با طول موج ۶۳۲/۸ نانومتر و توان یک یا دو میلی وات به مدت یک، سه، پنج و ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. سطح کالوس‌های تیمار شده برای مدت دو ماه هر ۱۰ روز یک‌بار اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد احتمالاً لیزر کم توان هلیوم نئون با تأثیر بر سیتوکروم اکسیداز در زنجیره انتقال الکترون سبب تأمین انرژی لازم برای فرآیندهای بیان ژن و تولید پروتئین‌های ضروری در مسیر تقسیم شده و با تأمین فسفات لازم جهت فرآیندهای فسفریلاسیون و جلوگیری از مرگ سلول‌ها، سطح کالوس‌های تیمار شده را به‌طور چشمگیری افزایش داده و تقسیمات سلولی پایایی را موجب شده‌است. نتایج حاصل از بررسی فیتوشیمیایی نشان داد با افزایش سطح کالوس میزان مجموع سه متابولیت ثانویه آلونین، باربالوئین و ایزوباربالوئین کاهش می‌یابد اما با توجه به افزایش چند برابری سطح کالوس، این موضوع قابل اغماض بوده و می‌تواند با تولید کالوس‌های بزرگ‌تر و با پتانسیل رشد بیش‌تر مقدار متابولیت‌های مذکور را افزایش داد. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، لیزر کم توان می‌تواند به‌عنوان یک الیستور کم هزینه و مناسب به‌منظور بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه در پژوهش‌های آتی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

تقسیم سلولی
چرخه سلولی
سطح کالوس
لیزر کم توان
متابولیت ثانویه

کمپلکس زنجیره انتقال الکترون به نام سیتوکروم c اکسیداز جذب شده و سبب افزایش شیب پروتون و در نهایت افزایش ساخت ATP می‌شود (Farivar et al. 2014). کلیه رویدادهای سلولی از جمله تقسیم سلول و تک تک مراحل آن وابسته به انرژی حاصل از هیدرولیز ATP است (Törnroth-Horsefield and Neutze 2008). چرخه سلولی از وقایع مهمی به‌شمار می‌رود که بقای جاندار را تحت تأثیر قرار می‌دهد و در یوکاریوت‌ها از چهار مرحله G₁, S, G₂ و میتوز تشکیل شده است (Gaurisankar and Tanya 2008). چرخه سلولی تحت کنترل ژنتیکی بوده و تعداد فراوانی از پروتئین‌های دخیل در فرایند همانندسازی (RF)⁷ و پروتئین‌های اسکلت سلولی این وقایع را از طریق فسفریلاسیون کنترل می‌کنند (Debra et al. 1995). سایکلین و کیناز وابسته به سایکلین⁸ از جمله مهم‌ترین مولکول‌های تنظیم‌کننده چرخه سلولی هستند که کشف آن‌ها موجب پیشرفت بزرگی در زمینه علم فیزیولوژی شده است (DeSouza and Osmani 2007). علاوه بر این، عامل سیتوپلاسمی فعالی در سلول‌ها وجود دارد که به فاکتور راه‌اندازی رشد و تکامل (MPF⁹) معروف است و باعث شروع میتوز در سلول‌های سوماتیکی می‌شود. MPF در واقع یک CDK-سایکلین است که سوبستراهای فراوانی دارد و در هنگام میتوز افزایش می‌یابد (Lodish 2000). با توجه به این‌که تکثیر سلولی به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر تولید متابولیت‌های ثانویه در مقیاس وسیع، درمان آسیب‌های فیزیکی در انسان و سایر جانداران، رشد و نمو و تجاری سازی تولید مطرح می‌باشد، پژوهش حاضر با هدف مطالعه اثر لیزر کم توان بر تقسیمات سلولی پیاپی از طریق بررسی وقایع چرخه سلولی انجام شد. از سوی دیگر در این مقاله ارتباط بین تقسیمات سلولی و میزان متابولیت‌های ثانویه در گیاه آلوئه‌ورا به‌منظور بررسی امکان استفاده از لیزر کم توان به‌عنوان یک الیستور فیزیکی مورد بحث و بررسی قرار گرفته است.

لیزر به معنای تقویت نشر نور برانگیخته می‌باشد و در تقسیم‌بندی براساس توان به سه نوع گرم یا سخت (پرتوان)، نرم یا سرد (کم توان) و دارای توان متوسط دسته‌بندی می‌شود (Rybiński and Garczyński 2004). لیزرهای کم توان فاقد اثر حرارتی بر روی بافت بوده و با تحریک نوری بر روی سلول، باعث واکنش‌های نوری در بافت می‌شوند که به آن تحریک زیست نوری¹ می‌گویند. توان این لیزرها معمولاً زیر ۲۵۰ میلی‌وات می‌باشد. عملکرد و مکانیسم لیزر در سلول‌ها هنوز مورد بحث و پژوهش است اما در منابع مختلف به دفعات از لیزر کم توان به‌عنوان افزاینده محتوای انرژی سلول به‌طور طولانی مدت یاد شده است (Chen et al. 2005; AlGhamdi KM et al. 2011). گیاه آلوئه‌ورا (*Aloe vera L.*) از تیره لاله² از جمله گیاهان دارویی است که از هزاران سال پیش مورد استفاده بشر بوده و در حال حاضر از متابولیت‌های ثانویه آن در صنایع مختلف استفاده‌های فراوانی می‌شود (Zarrinpanje et al. 2012). متابولیت‌های ثانویه ترکیباتی پیچیده با وزن مولکولی پایین هستند که به مقدار بسیار کم در سلول‌ها ذخیره می‌شوند و در بسیاری از فرآیندهای سلولی گیاه درگیر هستند. متابولیت‌های اصلی و اساسی این گیاه آلوئین³ و آلوئین⁴ هستند که یک منبع طبیعی از دو دیاسترومر به نام‌های آلوئین A (باربالوئین⁵) و آلوئین B (ایزوباربالوئین⁶) محسوب می‌شوند. آلوئین یک گلیکوزید آنتراکینونی و قابل حل در آب می‌باشد (Lulinski 2007; Doria et al. 2010). تمامی سلول‌های پیکر یک موجود زنده، انرژی مورد نیاز خود را از طریق میتوکندری سلول فراهم می‌کنند. ATP، شکل رایج انرژی ذخیره شده در سلول است که جهت انجام واکنش‌ها، سوخت و ساز سلولی، مقابله با تنش‌ها و بقای سلول مورد نیاز می‌باشد (Törnroth-Horsefield and Neutze 2008). پرتو لیزر کم توان این امکان را مهیا می‌سازد تا انرژی سلولی (ATP) افزایش یابد. اگر پرتو لیزر به داخل سلول نفوذ کند، بلافاصله توسط آخرین

¹ Photobiostimulation² Liliaceae³ Aloin⁴ Aloenin⁵ Barbaloin⁶ Iso-Barbaloin⁷ Replication Factors⁸ Cyclin depended kinase⁹ Maturing-Promoting Factor

مواد و روش‌ها

به منظور تهیه ریزنمونه‌های لازم جهت القای کالوس، گیاهچه‌های قوی و جوان آلونه‌ورا از گلخانه دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انتخاب و به آزمایشگاه گروه زراعت و اصلاح نباتات منتقل شدند. ریزنمونه‌ها به صورت حلقوی از طوقه گیاهچه‌ها تهیه و بر روی محیط کشت پایه MS 1/2 با ترکیب هورمونی 0/5 میلی‌گرم بر لیتر BAP و دو میلی‌گرم بر لیتر NAA کشت و در تاریکی تحت شرایط دمایی 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Tavakoli et al. 2014). ظهور اولین نشانه‌های تشکیل کالوس نه روز به طول انجامید و پس از 15 روز کالزایی تکمیل شد ولی برای گسترش بهتر کالوس تا سه هفته پس از کشت ریزنمونه، کالوس‌ها پرتوتابی نشدند. پس از به دست آمدن کالوس‌های مناسب، سطح کالوس‌ها با استفاده از کاغذ شطرنجی اندازه‌گیری شد. سپس تعداد پنج قطعه کالوس با اندازه تقریبی چهار سانتی‌متر مربع در هر پتری حاوی محیط کشت MS 1/2 و ترکیب هورمونی فوق‌الذکر واکشت شدند و مورد پرتوتابی قرار گرفتند. آزمایش به صورت فاکتوریل با دو فاکتور توان لیزر (یک و دو میلی‌وات) و مدت زمان پرتوتابی (یک، سه، پنج و 10 دقیقه) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. لیزر مورد استفاده در این پژوهش از نوع هلیوم-نئون با طول موج 632/8 نانومتر و اندازه لکه‌ای به قطر 1/1 میلی‌متر بود و نمونه‌ها در فاصله 25 سانتی‌متری از روزنه خروجی قرار گرفتند. مساحت کالوس‌های تیمار شده بدون واکشت مجدد، برای دو ماه، هر ده روز یک بار اندازه‌گیری شد. تجزیه آماری داده‌های آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. ارزیابی میزان متابولیت‌های ثانویه با دستگاه HPLC در دو زمان کاملاً متفاوت پس از پرتوتابی صورت گرفت. تعداد پنج نمونه شامل کالوس‌های تیمار شده با توان یک و دو میلی‌وات به مدت سه دقیقه در دو زمان چهار روز و 180 روز پس از پرتوتابی به همراه نمونه‌های کالوس حاصل از پرتوتابی با توان دو میلی‌وات به مدت 10 دقیقه چهار روز بعد از پرتوتابی جهت اندازه‌گیری میزان سه متابولیت ثانویه آلونین، باربالونین و ایزو باربالونین انتخاب شدند.

نتایج و بحث

سطح کالوس‌های تیمار شده با دزهای مختلف لیزر کم‌توان افزایش بسیار چشمگیری در مقایسه با نمونه شاهد نشان داد (شکل 1). تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بین دزهای مختلف تیمار لیزر و نیز بین زمان‌های مختلف پرتوتابی مشاهده شد. اثر متقابل دو فاکتور مورد مطالعه غیرمعنی‌دار بود که نشان دهنده آن است که این دو فاکتور به صورت مستقل از یکدیگر بر روی صفت مورد نظر عمل می‌نمایند.

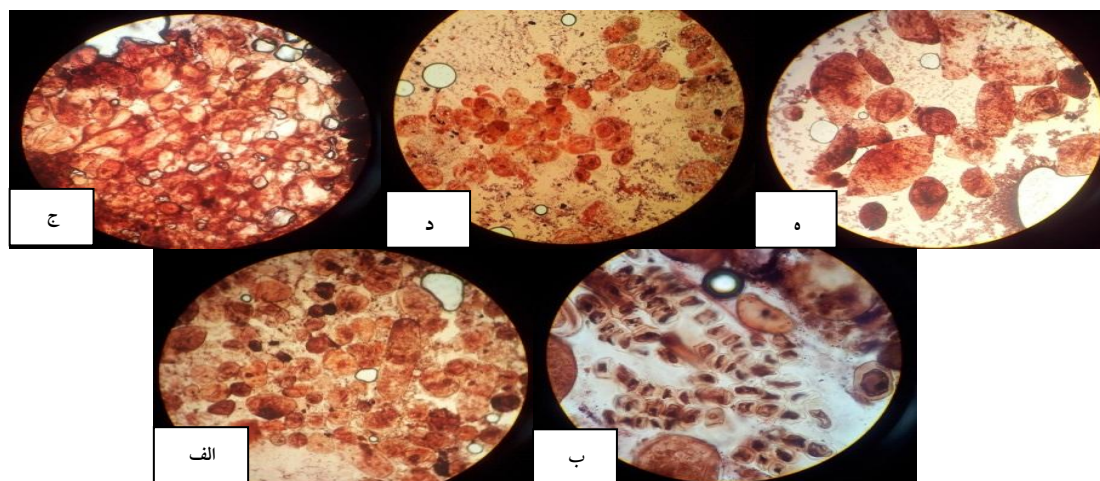
با پیش‌روی زمان از روز اول پرتوتابی تا پایان دو ماه، سطح کالوس‌ها افزایش یافت و تنها در دو تیمار 3 و 4 کاهش اندکی در اواخر دوره دو ماهه اندازه‌گیری مشاهده شد. این کاهش، نسبت به حداکثر سطح مشاهده شده در اندازه‌گیری‌ها بود (افزایش سطح به طور تقریبی تابع الگوی نمایی بوده است) ولی در نهایت نسبت به روز اول پرتوتابی در همه تیمارها افزایش مساحت مشاهده شد (شکل 3). تیمار شماره 6 (لیزر کم توان هلیوم نئون با توان دو میلی‌وات به مدت سه دقیقه) حداکثر رشد کالوس را به همراه داشت و به عنوان بهترین تیمار شناسایی شد در حالی که کم‌ترین رشد کالوس پس از شاهد، در تیمار شماره 8 یعنی لیزر هلیوم نئون با توان دو میلی‌وات به مدت ده دقیقه مشاهده شد.

به دلیل عدم مشابهت پژوهش حاضر با تحقیقات انجام شده، کالوس‌های تیمار شده در دو بازه زمانی بسیار متفاوت چهار روزه و 180 روزه برای کروماتوگرافی انتخاب شدند. ویژگی متمایز این دو گروه این بود که کالوس‌های چهار روزه همچنان رنگ روشن و ظاهر شکننده داشتند ولی کالوس‌هایی که 180 روز از پرتوتابی آن‌ها گذشته بود، رنگی تیره و ظاهری خمیری داشته و تقسیمات سلولی پیاپی و سه واکشت را پشت سر گذاشته بودند. نتایج حاصل از ارزیابی متابولیت‌های ثانویه با دستگاه کروماتوگرافی رابطه معکوسی را بین تقسیمات سلولی و مجموع متابولیت‌های ثانویه کالوس‌ها نشان داد. کالوس‌های تیمار شده با لیزر کم‌توان هلیوم نئون با طول موج 632/8 به مدت سه دقیقه که بیش‌ترین اثر را روی افزایش سطح کالوس‌ها داشت، کم‌ترین میزان متابولیت ثانویه را پس از چهار روز نشان داد (شکل 4).

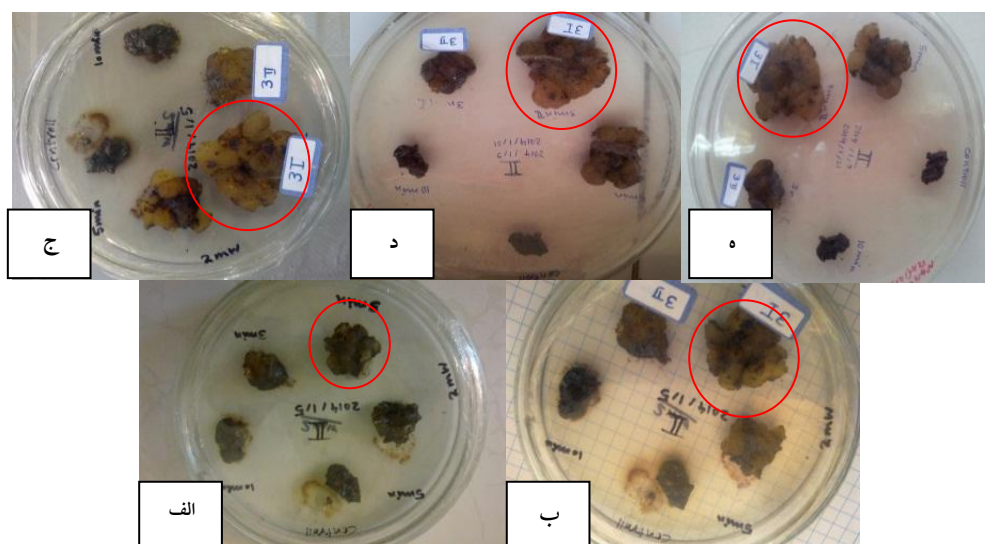
پرتو لیزر کم‌توان مورد استفاده در این پژوهش سهم بسزایی در تکثیر و تقسیم سلول‌ها طی فرآیند میتوز داشته است. در این راستا

افزایش باززایی کالوس (افزایش خاصیت قطبی کالوس) و ریشه‌زایی در کالوس‌های گندم تحت تیمار با لیزر هلیوم نئون مشاهده شده‌است (Salyaev et al. 2001b). به‌علاوه گیاهچه‌های حاصل از بذور تیمار شده با لیزر هلیوم نئون شاخص‌های رشد بالاتری را نسبت به شاهد نشان می‌دهند (Chen et al. 2005).

افزایش میزان رشد و تقسیمات سلولی در نتیجه تیمار با لیزر کم-توان در پژوهش‌های دیگری نیز بررسی و تایید شده‌است. از جمله، درصد کالوس‌های القا شده توسط لیزر کم‌توان در چند گونه چمن وحشی، نسبت به شاهد بررسی شده و افزایش کالزایی تحت تیمار با لیزر هلیوم نئون حتی در برخی از گونه‌ها از مرز ۵۰ درصد نیز پیشی گرفته‌است (Salyaev et al. 2001a). هم‌چنین



شکل ۱- مقایسه اندازه و انبوهی سلول‌های کالوس گیاه آلوده‌ورا پس از تیمار با لیزر با توان یک میلی‌وات زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ده برابر. (الف شاهد، ب) لیزر یک دقیقه، (ج) لیزر سه دقیقه، (د) لیزر پنج دقیقه، (ه) لیزر ۱۰ دقیقه.



شکل ۲- افزایش سطح کالوس پس از تیمار با لیزر هلیوم نئون با طول موج ۶۳۲/۸ نانومتر و توان دو میلی‌وات. (الف) چندساعت پس از اعمال تیمار، (ب) ده روز پس از تیمار، (ج) ۲۰ روز پس از تیمار، (د) ۴۰ روز پس از تیمار، (ه) ۵۰ روز پس از تیمار.

شد (Manteitel et al. 1991). از طرفی دیگر افزایش محتوای ATP در سلول‌ها منجر به افزایش مقادیر ROS و آنزیم‌های پراکسیداز می‌شود که این موضوع در تحقیقات زیادی مورد تایید واقع شده‌است. به‌طور مثال در نمونه‌های بذر گیاه گندم تحت تیمار با لیزر هیلوم نئون، آنزیم‌های لیبید پراکسیداز و هیدروژن اکسیداز افزایش یافته‌است که خود گویای تولید ATP در سلول می‌باشد (Abdelghafar et al. 2013). از آنجاکه اغلب فرآیندهای چرخه سلولی از جمله تشکیل صحیح زیرواحدهای CDK¹ یا پروتئین‌های اسکلت سلولی مانند لامینای هسته و میکروتوبول‌ها، بیان گروه متعددی از ژن‌های هسته‌ای و سیتوپلاسمی (کلروپلاست و میتوکندری) و جذب یا تولید ویتامین‌های فراوان به‌عنوان کوآنزیم به انرژی حاصل از هیدرولیز ATP وابسته‌است، پرتو لیزر کم‌توان با تولید این انرژی، موجبات تکثیر بیشتر سلول‌ها را فراهم می‌آورد (Courvalin et al. 1992; Heald et al. 1993).

یکی دیگر از دلایل افزایش میزان تقسیمات سلولی و میتوز در این پژوهش می‌تواند فسفات فراوانی باشد که در نتیجه تولید آدنوزین تری فسفات و هیدرولیز آن، در اختیار سلول قرار می‌گیرد. این فسفات‌های آزاد با اتصال به اسیدهای آمینه سرین یا ترئونین موجود در پروتئین‌ها امکان فسفریله شدن آن‌ها را فراهم می‌کنند (Lohka et al. 1988; Chao et al. 2012). فسفریله شدن پروتئین‌ها یک مکانیسم مفید برای کنترل فرآیندهای چرخه سلولی است و دلیل عمده آن تغییرات برگشت‌پذیر صورت‌بندی² پروتئین‌ها می‌باشد (Debra et al. 1995). چند نمونه از فسفریلاسیون چرخه ای در سلول که بیش‌تر مورد بررسی قرار گرفته‌اند شامل فسفریلاسیون هیستون H₁ جهت غیرمتراکم‌سازی و همانندسازی DNA، فسفریله شدن لامینای هسته در مرحله پروفاز برای تخریب غشای هسته، فسفریله کردن پروتئین کاندسین³ جهت فشرده‌سازی کروموزوم‌ها و فسفریله شدن کوهیزین⁴ جهت تفکیک صحیح کروموزوم‌های خواهری است (Bradbury et al. 1974; Freedman and Heald 2010; Lodish 2000).

در تحقیق دیگری شاخص میتوز در سلول‌های ریه تحت تیمار با لیزر کم‌توان افزایش یافته‌است (Silva et al. 2003). در پژوهش دیگری نیز رشد و نمو بیش‌تر گیاهچه‌های حاصل از بذور گندم-های بهاره تیمار شده با لیزر کم‌توان نسبت به نمونه‌های شاهد به اثبات رسید (Drozd and Szajsner 1999).

همچنین در تحقیقات دیگری افزایش نرخ و شاخص‌های رشد بررسی و تایید شده‌اند (Kobrzyński and Róanowski 2000). هنگامی که پرتو نور به سلول نفوذ می‌کند به‌طور کلی مسیرهای موجود در کلروپلاست مانند تثبیت کربن، بیوسنتز گلوکان‌ها و لیپیدها بلافاصله تقویت شده که به نوبه خود سبب تجمع این مواد درون گرانول‌ها و واکوئل‌های ذخیره‌ای می‌شود (Chauton et al. 2013; Tavakoli et al. 2014). پس از یک فاز تاخیر، فرآیندها و واکنش‌های میتوکندریایی مانند چرخه کربس و تجزیه لیپیدها افزایش می‌یابند (Chauton et al. 2013). بنابراین می‌توان این‌طور بیان کرد که سوخت و سازهای سلولی در یک الگوی چرخه‌ای رخ می‌دهند و برخی از این چرخه‌ها در پاسخ به عوامل خارج سلولی مانند نور (لیزر کم‌توان) به جریان می‌افتند (فسفریلاسیون نوری)؛ در حالی که تعدادی دیگر به‌وسیله ساعت‌های بیولوژیکی درونی فعال می‌شوند که به بیان ژن و تنظیمات آن وابسته‌است (Tessmar-Raible et al. 2011). این موضوع می‌تواند توجیهی بر تقسیمات پیاپی سلول‌های کالوس پس از یک فاز تاخیری در این پژوهش باشد. پروسه‌های میتوکندریایی علاوه بر نقشی که در کنترل و تنظیم آپوپتوزیس دارند، اغلب سبب تولید انرژی به‌عنوان هزینه حیات سلول شده و به زنجیره انتقال الکترون منتهی می‌شوند (Chauton et al. 2013). پس این موضوع را می‌توان از دو منظر بررسی کرد. اول این‌که پرتو لیزر توسط سیتوکروم اکسیداز جذب شده و آن را فعال می‌سازد و دوم این‌که تقویت پروسه‌های میتوکندریایی به خودی خود سبب تجزیه مواد تولید شده در طی پروسه‌های کلروپلاست شده و انرژی در دسترس سلول را افزایش می‌دهد. به‌طور کلی در اغلب منابع به افزایش میزان ATP در اثر تیمار با لیزر کم‌توان اشاره شده‌است (Vasilevski 1987; Karu et al. 2013). در پژوهشی تیمار سلول‌ها با پرتو لیزر کم‌توان هیلوم نئون با طول موج ۶۳۲/۸ نانومتر باعث افزایش ۲۰ درصدی در تعداد میتوکندری‌های سلول

¹ Cyclin dependent Kinase

² Conformation

³ Condesin

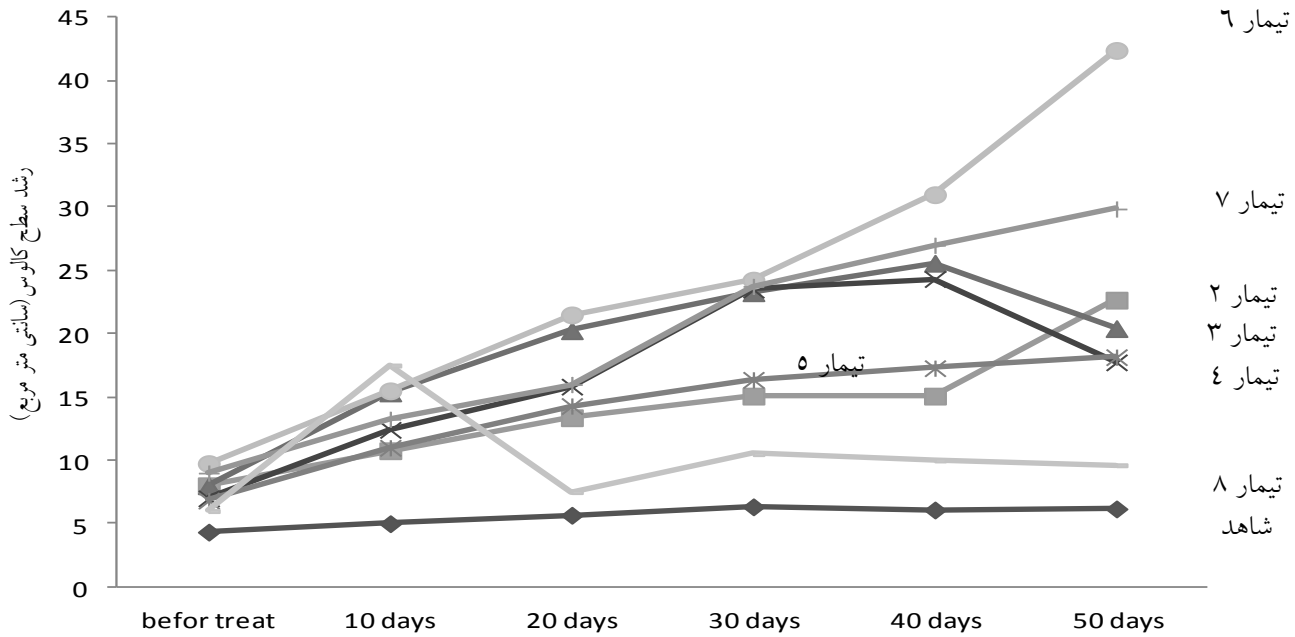
⁴ Cohisin

تقسیم کالوس اثر می‌گذارد. به‌خصوص خانواده ژنی IAA² که کاهش میزان آن‌ها از حد معینی سبب کاهش یا کند شدن تقسیمات میتوز می‌شود (Bögre and Meskiene 2000). باید به این نکته نیز توجه کرد که سلول‌های کالوس از آن جهت که در معرض نور قرار ندارند و فتوستتز نمی‌کنند در مقایسه با سلول‌های گیاهی فتوستتز کننده زودتر مواد غذایی محیط خود را به مصرف می‌رسانند. همچنین نتایج نشان می‌دهند که در دزهای بالای لیزر کم‌توان کالوس‌ها توانایی رشد و تقسیم خود را در مقایسه با دزهای پایین‌تر از دست می‌دهند و به رنگ تیره و سیاه گرایش می‌یابند. این نتایج با نتایج آزمایش بر روی گیاه چای کوهی تحت تیمار با الیستور متیل جاسمونات و سالیسیک اسید مطابقت دارد (Mehrabani et al. 2012). نتایج بررسی فیتوشیمیایی نشان داد مجموع سه متابولیت ثانویه اندازه‌گیری شده (آلوتنین، باربالوتنین و ایزوباربالوتنین)، با افزایش سطح کالوس‌ها کاهش می‌یابد. به معنی دیگر بین تقسیمات پیاپی کالوس‌ها و سنتز و ذخیره متابولیت‌های ثانویه رابطه معکوسی وجود دارد. تاکنون مورد مشابهی در خصوص استفاده از لیزر کم‌توان به عنوان الیستور جهت افزایش متابولیت‌های ثانویه گزارش نشده است اما گزارش‌هایی مبنی بر استفاده از نور به‌عنوان الیستور طبیعی با اثرات مثبت وجود دارد (Namdeo 2007). نتایج پژوهش‌هایی که در آن‌ها اثر نور دریافتی به‌عنوان الیستور مورد بررسی قرار گرفته است، نشان داده که با افزایش میزان نور، تولید متابولیت‌های ثانویه افزایش می‌یابد. مثلاً نتایج آزمایش روی ریزنمونه‌های گل محمدی تحت تیمار با شدت نوری ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ لوکس نشان داد که میزان تولید آنتوسیانین کالوس‌ها نسبت به شرایط تاریکی به شدت افزایش می‌یابد (Abdirad et al. 2012). هم‌چنین گزارش شده که آنزیم مهم مسیر سنتز فلاونوئیدها (چالکون سینتاز) به‌وسیله نور پس از یک فاز تاخیری چند ساعته فعال می‌شود؛ یعنی برای فعال‌سازی آن به چند ساعت نور نیاز است (Irani and Grotewold 2005).

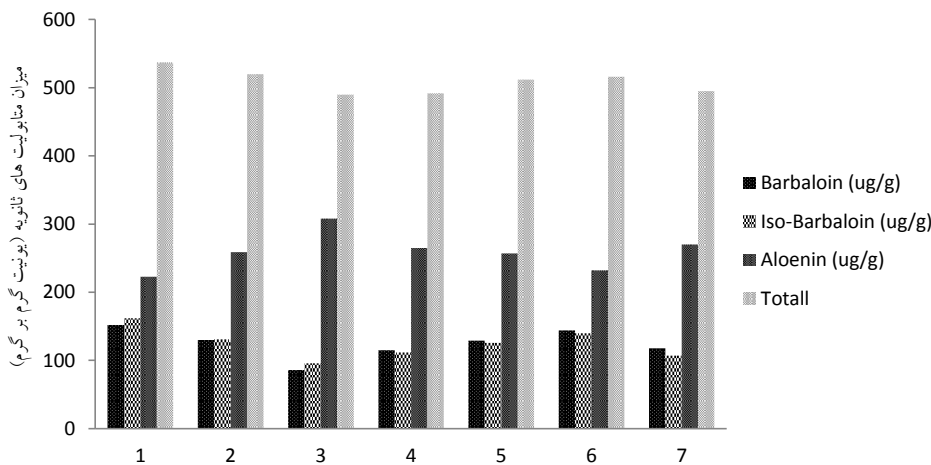
فعالیت‌ها نیازمند انرژی فراوان و محتوای فسفات بالایی است که باید پیش از ورود سلول به مرحله تقسیم مهیا شود. تیمار با پرتو لیزر کم‌توان می‌تواند به خوبی پاسخگوی این نیاز باشد. در بررسی مخمرهای تیمار شده با لیزر کم‌توان با طول موج ۶۳۲/۸ نانومتر میزان فعالیت آنزیم‌های میتوکندریایی مانند NADH دهیدروژناز و سیتوکروم اکسیداز به ترتیب ۲۴۱ و ۱۲۸ درصد بیش‌تر از میزان شاهد شده است (با در نظر گرفتن شاهد به‌عنوان صد درصد) و سپس رفته رفته کاهش یافته تا به مقدار موجود در سلول‌های شاهد برسد (Fedoseyeva et al. 1988). تحقیقات نشان داده که بیش از ۸۰ درصد نوکلئوتیدهای آدنین دار موجود در سلول‌ها از ATP به دست می‌آیند؛ بنابراین محتوای بالای ATP و کاهش تدریجی آن می‌تواند با چرخه فسفریلاسیون ADP و ATP و سنتز DNA جدید در طی پروسه همانندسازی مرتبط باشد (Karu et al. 1995).

از منظر دیگر، می‌توان از پرتو لیزر کم‌توان به‌عنوان یک میتوزن^۱ یاد کرد. در تحقیقات گذشته از میتوزن‌ها به‌عنوان یک عامل بیرونی تحریک کننده و راه‌انداز سیگنال‌های درونی استفاده شده است. اغلب این سیگنال‌ها تحریک کننده چرخه سلولی هستند. گزارش‌هایی در خصوص استفاده از پرتو لیزر به‌عنوان میتوزن فیزیکی برای بررسی نرخ تقسیمات سلولی در نتیجه افزایش اسمیلات‌ها وجود دارد (Courvalin et al. 1992). هم‌چنین انواعی از نانوالیستورها برای تحریک تقسیمات سلولی یا آپوپتوزیس مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Polyana et al. 2008). نتایج حاصل از کاربرد لیزر تراپی به‌عنوان میتوزن برای تکثیر سلول‌ها در بافت‌های انسانی بیانگر آن است که لیزر کم‌توان فعال‌کننده پروتئین کینازها (MAP کیناز) یا یک سیگنال تنظیمی خارج سلولی پروتئین کینازها می‌باشد (Kawano et al. 2012). پس از گذشت دو ماه از پرتوتابی، سطح کالوس‌های اندازه‌گیری شده اندکی کاهش یافت (شکل ۳). علت کاهش تقسیمات سلولی در پایان دو ماه را می‌توان به کاهش مواد غذایی در دسترس کالوس‌ها نسبت داد (کالوس‌ها به مدت دو ماه واگشت شدند). یکی از این مواد ضروری برای تقسیم کالوس اکسین است که از طریق فعال‌کردن ژن‌های مهم و اساسی دخیل در تنفس سلولی بر

² Indol Acetic Acid¹ Mitogen



شکل ۳- نمودار تغییرات سطح کالوس‌های آلوئه‌ورا تحت تیمار با لیزر کم‌توان هلیوم نئون به مدت دو ماه پس از تیمار (تیمار ۱) شاهد؛ تیمار ۲) یک میلی‌وات به مدت یک دقیقه؛ تیمار ۳) یک میلی‌وات به مدت سه دقیقه؛ تیمار ۴) یک میلی‌وات به مدت پنج دقیقه؛ تیمار ۵) یک میلی‌وات به مدت ده دقیقه؛ تیمار ۶) دو میلی‌وات به مدت سه دقیقه؛ تیمار ۷) دو میلی‌وات به مدت پنج دقیقه؛ تیمار ۸) دو میلی‌وات به مدت ده دقیقه



شکل ۴- نمودار تغییرات متابولیت‌های ثانویه کالوس‌های آلوئه‌ورا تحت تیمار با لیزر کم‌توان هلیوم نئون. تیمار ۱) شاهد اول؛ تیمار ۲) توان یک میلی‌وات به مدت سه دقیقه ۶/۵ ماه پس از اعمال تیمار؛ تیمار ۳) توان دو میلی‌وات به مدت سه دقیقه ۶/۵ ماه پس از اعمال تیمار؛ تیمار ۴) شاهد دوم؛ تیمار ۵) توان یک میلی‌وات به مدت سه دقیقه چهار روز پس از اعمال تیمار؛ تیمار ۶) توان دو میلی‌وات به مدت سه دقیقه چهار روز پس از اعمال تیمار؛ تیمار ۷) توان دو میلی‌وات به مدت ده دقیقه پس از اعمال تیمار.

اسیدهای آمینه پیش‌ساز بسیاری از متابولیت‌های ثانویه هستند، افزایش متابولیت‌های ثانویه را در این پژوهش تایید می‌کند. از طرف دیگر لیزر کم‌توان از طریق فعال کردن سیتوکروم اکسیداز، سنتز ATP و در نتیجه cAMP را افزایش می‌دهد (Pradedova et al. 2006). میزان cAMP در تنش‌ها به‌عنوان پیک ثانویه افزایش می‌یابد و از این طریق نیز میزان سنتز متابولیت‌های ثانویه را کنترل می‌کند. البته قابل ذکر است که گرچه میزان متابولیت ثانویه با رشد کالوس در مقیاس کاهش می‌یابد اما با توجه به افزایش چندبرابری سطح کالوس این موضوع قابل اغماض بوده و با دستیابی به کالوس‌های بزرگ‌تر و با پتانسیل رشد بیش‌تر، می‌توان متابولیت‌های بیش‌تری حاصل نمود. به‌طور کلی لیزر کم‌توان استفاده شده در این پژوهش به‌طور معنی‌داری سبب افزایش سطح کالوس شد بنابراین می‌تواند به‌عنوان الیستور کم‌هزینه و بدون عوارض جانبی در کم‌ترین زمان سبب افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه (نسبت متابولیت ثانویه به میزان کل بیوماس تولیدی) شود. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که لیزر کم‌توان می‌تواند به‌عنوان یک الیستور مناسب به منظور بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه در پژوهش‌های آتی مورد استفاده قرار گیرد.

در نتایج حاصل از بررسی اثر لیزر بر پراکسیداسیون لیپیدها در کشت درون شیشه‌ای گندم گزارش شده که واکنش القا شده در سلول‌ها پس از تیمار با لیزر به دو صورت می‌باشد. یکی عکس-العمل سریع سلول در مواجهه با لیزر بوده که در نتیجه آن فعالیت‌های پراکسیداسیون لیپیدها افزایش می‌یابد و دومی (که پایاتر می‌باشد)، فعالیت‌های ثانویه‌ای است که میزان متابولیت‌های لازم جهت سازگاری سلول را افزایش داده و در نهایت سبب پروسه‌های مورفوژنتیکی می‌شود (Salyaev et al. 2003). این موضوع در تیمار مستقیم میتوکندری‌های جدا شده از کالوس‌های ذرت زراعی نیز تایید شده‌است. از آن‌جا که میتوکندری‌های سلول مادری در تقسیم میتوز به صورت نابرابر به سلول‌های دخترتری ارث می‌رسند، این پروسه در سلول‌های دخترتری نیز ادامه می‌یابد (Salyaev et al. 2007). در آزمایش دیگری مشاهده شد در اثر تیمار کالوس‌های گندم با لیزر هلیوم نئون مورد استفاده در این پژوهش، میزان اسیدهای آمینه‌ای که در شرایط تنش افزایش می‌یابند¹ (مانند پرولین، آلانین و فنیل آلانین) در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری داشته‌است (Dudareva et al. 2012). بنابراین اثر لیزر مشابه اثر تنش‌های محیطی شناخته شده و از آن‌جاکه این

¹ Stress amino acids

منابع

Abdirad S, Rezanejad F, Kalantari KF (2011) The Effect of Different Light Intensities on Callogenesis and Calli Pigments Content of Shoot and Floral Explants of *Rosa damascena* Mill and *Rosa miniature*. *Agriculture Biotechnology* 3: 43-65.

Abu-Elsaoud Abdelghafar M, Tuleukhanov Sultan T (2013) Can He-Ne laser induce changes in oxidative stress and antioxidant activities of wheat cultivars from Kazakhstan and Egypt. *Science international* 10:39-50.

AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA (2011) Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Medical Science* 6:18-23.

Bögre L, Meskiene I (2000) Stress the role of MAP kinases in mitogenic stimulation. *Plant Molecular Biology* 43:705-718.

Bradbury EM, Inglis RJ, Matthews HR (1974) Control of cell division by very lysine rich histone (F1) phosphorylation. *Nature* 247-257.

Chao WC, Kulkarni K, Zhang Z, Kong EH, Barford D (2012) Structure of the mitotic checkpoint complex. *Nature* 484:208-213.

Chauton MS, Winge P, Brembu T, Vadstein O, Bones AM (2013) Gene Regulation of Carbon Fixation, Storage, and Utilization in the Diatom *Phaeodactylum tricorutum* Acclimated to Light/Dark Cycles1. *Plant Physiology* 161:1034-1048.

Chen YP, Yue M, Wang XL (2005b) Influence of He-Ne laser irradiation on seeds thermodynamic parameters and seedlings growth of *Isatis indigotica*. *Plant Science* 168:601-606.

Courvalin JC, Segil N, Blobel G, Worman HJ (1992) The lamin B receptor of the inner nuclear membrane undergoes mitosis-specific phosphorylation and is a substrate for p34cdc2-type protein kinase. *Journal of Biology and Chemistry* 267:19035-8.

DeSouza CP, Osmani SA (2007) Mitosis, not just open or closed. *Eukaryotic Cell* 6:1521-7.

Debra J, wolgemuth DJ, KunsooShuang WU, Stuart E. avnik (1995) Genetic Control of Mitosis, Meiosis and

- Cellular Differentiation during Mammalian Spermatogenesis, *Reprod. Fertility Developing* 7: 669-83.
- Drozd D, Szajsner H (1999) the effect of laser radiation on spring wheat genotypes. *International Agrophysics* 13:197-202.
- Doria SPM, Imad AA, Sreeraj G, Shanmugam K, Bommuraj V, Sofiant K, Conjeeveram G, Srinivasan N (2010) Synthesis and antibacterial activity of aloin. *European Journal of Scientific Research* 43:297-306.
- Dudareva LV, Shmakov VN, Sobenin AM, Rudikovskaya EG (2012) Low- Intensity Laser Radiation Changes Amino Acid Composition of Wheat Callus Tissues. *Doklady Biochemistry and Biophysics* 446:260-262.
- Farivar Sh, Malekshahi T, Shiari R (2014) Biological Effects of Low Level Laser Therapy. *Journal of Lasers Mededical Science* 5:58-62.
- Fedoseyeva GS, Karu TI, Lyapunova TS, Pomoshnikova NA, Meissel MN (1988) The activation of yeast metabolism with He-Ne laser. *Lasers life Science* 2:147-154.
- Freedman BS, Heald R (2010) Functional Comparison of Linker Histones in *Xenopus* Reveals Isoform-Specific Regulation by Cdk1 and RanGTP. *Biology* 20:1048-52.
- Gaurisankar SA, Tanya D (2008) Anti-cancer effects of curcumin: cycle of life and death Review. *Cell Division* 3:14.
- Heald R, McLoughlin M, McKeon F (1993) Human weel maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase. *Cell* 74:463-74.
- Irani N, Grotewold E (2005) Light-induced morphological alteration in anthocyanin-accumulating vacuoles of maize cells. *Plant Biology* 5:7-9.
- Karu T (1989) Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. *Photochemical Photobiology* 3: 638-40.
- Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G (1995) irradiation with He-Ne laser ATP level in cells cultivated in vitro. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 27:219-223.
- Kawano Y, Utsunomiya-Kai Y, Kai K, Miyakawa I, Ohshiro T, Narahara H (2012) The production of VEGF involving MAP kinase activation by low level laser therapy in human granulosa cells. *Laser Therapy* 21: 269-74.
- Kobrzyński M, Róanowski B (2000) Influence of heavy metal (cadmium and lead), He-Ne and AR laser light on mitotic activity of meristem cells of rye roots (*Secale cereale L.*). 14th Congress Polish Genetic Society 6:279-280.
- Lodish H (2000) *Molecular cell biology*. 4th edition. Chapter 13: Regulation of the Eukaryotic cell cycle. England, 482-512.
- Lohka MJ, Hayes MK, Maller J (1988) Purification of maturation-promoting factor, an intrinsic regulator of early mitotic events. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85:3009-13.
- Lulinski BRD, cathy kapica RD (2007) some notes on aloe vera. Retrieved 3:11-12.
- Manteifel VM, Andreichuk TN, Karu TT (1991) the effect of irradiation by He-Ne laser and phytohemagglutinin on lymphocyte mitochondria. *Molecular Biology* 25:273-280.
- Mehrabani B, Nazeri S, Piri K (2012) Evaluation of total produced phenol in Chaei Koochi (*Stachyslavan dulifolia Vahi*) callus culture and possibility of its enhancement using Elicitors. *Agronomy Biotechnology* 2: 77-88.
- Namdeo AG (2007) Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites. *Pharmacognosy Reviews* 1:17-19.
- Pradedova EV, Ishcheeva OD, Ozolina NV, Salyaev RK (2006) Effect of cAMP and Jasmonic and Salicylic Acids on Tonoplast Proton Pumps. *Doklady Akademii Nauk* 3:411-413.
- Polyana KM, Berenice Q, Yamanaka O, José RB Farias, Magda A, Binneck E, Fuganti R, Renata S, Nepomuceno AL (2008) Differential gene expression and mitotic cell analysis of the drought tolerant soybean (*Glycine max L. Merrill Fabales, Fabaceae*) cultivar MG/BR46 (Conquista) under two water deficit induction systems. *Genetics and Molecular Biology* 31:512-521.
- Rybiński W, Garczyński S (2004) Influence of laser light on leaf area and parameters of photosynthetic activity in DH lines of spring barley (*Hordeum vulgare L.*). *International Agrophysics* 18:261-267.
- Salyaev RK, Dudareva LV, Lankevich SV, Ekimova EG, Sumtsova VM (2003) Effect of Low-Intensity Laser Radiation on the Lipid Peroxidation in Wheat Callus Culture. *Russian Journal of Plant Physiology* 4:498-500.
- Salyaev RK, Dudareva LV, Lankevich SV, Sumtsova VM (2001b) The effect of low-intensity coherent radiation on morphogenetic processes in wheat callus culture. *Doklay Biological Science* 376:113-114.
- Salyaev RK, Dudareva LV, Lankevich SV, Makarenko SP, Sumtsova VM, Rudikovskaya EG (2007) Effect of low-intensity laser irradiation on the chemical composition and structure of lipids wheat tissue culture. *Doklay Biology Science* 412:87-88.
- Salyaev RK, Dudareva LV, Lankevich SV, Sumtsova VM (2001a) Effect of low-intensity coherent radiation on callusogenesis in wild grasses. *Doklay Biochemistry Biophysics* 6:279-280.
- Silva Jr, Silva RL, Melo GB, Melo VA, Lima SO, Antonioll AR, Bagnato VS (2003) Proliferative effect of medicinal plants and laser on liver regeneration. A considerable experimental model: from an experimental model to clinical applications. *Acta Cirúrgica Brasileira* 18:18-21.
- Tavakoli M, Peighambari SA, Pazokian H, Maleki M, Abolhasani SH, Tabatabaai A (2014) Microscopic changes in callus of *Aloe vera* (*Aloe vare L syn: A.barbadansis Miller*) treated with laser. *Plant breeding congress. Iran, Tehran university* 490-493. (In Farsi)
- Tavakoli M, Maleki M, Peighambari SA, Omidi M (2014) Effect of growth regulators on callus induction in *Aloe vera L.* the 1st International Congress of Genetic, Tehran, Shahid Beheshti university 1102-1105.
- Tessmar-Raible K, Raible F, Arboleda E (2001) Another place, another timer: marine species and the rhythms of life. *Biological Essays* 33:165-172.
- Törnroth-Horsefield S, Neutze R (2008). Opening and closing the metabolite gate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:19565–19566.

Vasilevski G (1987) Results of the Laser Application in the Primary Production and Food Industry. XIII Yugoslavian Symposium of Agricultural Technique 216-228.

Zarinpanjeh N, OladzadAbbasabadi A, Omid M (2012) Effects of plant growth regulators and vitamin

combinations on callus induction somatic embryogenesis and plantlet production of *Aloe vera* L. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 20:181-191. (In Farsi).