

اثر نیتریک اکساید بر میزان رشد و برخی شاخص‌های فیزیولوژیک گیاهچه‌های بادرنجبویه کشت شده در شرایط *In vitro*صدیقه اسمعیل زاده بهابادی Ph.D.*، آیت اله رضایی نودهی Ph.D.^۱، شهلا نجفی Ph.D.^۱۱- دانشگاه زابل، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، زابل، ایران
۲- دانشگاه شاهد، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: esmaeilzadeh@uoz.ac.ir و shirin_esm@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۹

چکیده

هدف: در این تحقیق، اثر سدیم نیتروپروساید به عنوان عامل تولید کننده NO بر رشد، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و برخی شاخص‌های فیزیولوژیک در کشت گیاهچه‌های بادرنجبویه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: پس از راه اندازی کشت گیاهچه‌های بادرنجبویه، گیاهچه‌ها با غلظت‌های مختلف نیتروپروساید (۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرو مولار) تیمار شدند. آن‌ها بعد از ۱۰ روز جهت بررسی رشد، میزان پروتئین، متابولیت‌های ثانوی، میزان پراکسیداسیون لیپیدی و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت برداشت شدند.

نتایج: نتایج نشان داد با افزایش غلظت سدیم نیترو پروساید رشد و میزان پروتئین کاهش یافت. میزان ترکیبات فنولی، فلاونوئید کل و آنتوسیانین تحت تاثیر سدیم نیترو پروساید افزایش نشان داد. همچنین میزان مالون دی آلدئید به عنوان محصول پراکسیداسیون لیپیدی نیز به طور معنی دار افزایش یافت. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در پاسخ به تنش اکسیداتیو به ترتیب در غلظت‌های ۵۰ و ۲۵ میکرو مولار سدیم نیترو پروساید افزایش یافت در حالی که فعالیت آنزیم‌ها در غلظت ۱۰۰ میکرو مولار کاهش نشان داد.

نتیجه گیری: به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد سدیم نیترو پروساید به عنوان مولد NO به آسیب غشا سلولی آسیب می‌رساند. بنابراین رشد را در گیاهچه‌های بادرنجبویه کاهش داده و سبب تنش اکسیداتیو در آن‌ها می‌شود. برای مقابله با رادیکال آزاد تولید شده، میزان متابولیت‌های ثانوی و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی افزایش یافت.

واژگان کلیدی: آنزیم‌های آنتی اکسیدانت، بادرنجبویه، کشت درون شیشه ای، متابولیت‌های ثانوی، نیتریک اکساید.

مقدمه

بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) یکی از گیاهان دارویی است که به دلیل تولید متابولیت‌های ثانوی و اهمیت بسیاری که در مصارف پزشکی، صنایع آرایشی و بهداشتی و نیز صنایع غذایی دارد، بسیار مورد توجه است. کاربرد این گیاه دارویی در تولید مواد آرایشی، بهداشتی و غذایی در جهان گسترش یافته است، بنابراین بهبود کمیت و کیفیت ویژگی‌های گیاهی مواد موثره مهم موجود، امری ضروری است. کشت بافت گیاهی ابزار مهمی در بیوتکنولوژی گیاهی است. یکی از کاربردهای مهم آن تولید متابولیت‌های ثانوی است. کشت بافت گیاهی به‌عنوان یکی از منابع جایگزین و تجدید پذیر برای تولید متابولیت‌های ثانوی شناخته شده است (۱). پژوهش‌های قابل توجهی در سال‌های اخیر برای درک فاکتورهای محدود کننده تولید متابولیت‌های ثانوی در گیاهان صورت گرفته و راه‌های افزایش تولید آن‌ها را در کشت *in vitro* مشخص نموده است. این استراتژی‌ها شامل انتخاب لاین سلولی، بهینه سازی محیط کشت، بهینه سازی فرآیند کشت و تکنیک‌های ویژه نظیر الیستور و کشت دو فازی می‌باشد (۲). نیتریک اکساید (NO) رادیکال آزاد بوده که دارای طیف گسترده‌ای از پیامدهای فیزیولوژیک در سلول‌های گیاهی و جانوری می‌باشد. مطالعات متعدد اخیر نقش سیگنالینگ این مولکول را در تنظیم فرآیندهای مهم رشد، نمو و پاسخ‌های دفاعی مطرح نموده است (۳). تولید NO در بافت‌ها و سلول‌های گیاهی معمولاً در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی، حمله پاتوژن‌ها و چالش‌های الیستورهای قارچی رخ می‌دهد. اعتقاد بر این است که احتمالاً برجسته‌ترین نقش NO، سیگنالینگ و تنظیم پاسخ‌های دفاعی در مقابل تنش‌ها است. بیوسنتز متابولیت‌های ثانوی گیاهی برای حفاظت گیاهان در مقابل حمله حشرات، گیاه خواران، پاتوژن‌ها، و یا بقا تحت تنش‌های غیر زیستی گزارش شده است. از این‌رو، القا تولید NO توسط الیستورها در ارتباط با تحریک بیوسنتز متابولیت‌های ثانوی در گیاهان با خواص دارویی ذکر شده است (۴). مطالعات قبلی نشان داده اند که NO در تولید متابولیت‌های ثانوی از قبیل ساپونین‌ها، هیپرسین، کاتارانتین، آرمیسینین و تاکسان‌ها در بافت‌ها و سلول‌های گیاهی دخالت دارد. این متابولیت‌ها از ترکیبات بسیار ارزشمند در داروسازی هستند. برای بهینه سازی تولید تجاری متابولیت‌های ثانوی، شناخت مسیر انتقال پیام ناشی از تاثیر الیستور در تولید متابولیت‌های ثانوی بسیار مهم

است (۵). بررسی‌های به‌عمل آمده از منابع مختلف نشان داد که در ارتباط با تاثیر NO بر کشت بافت بادرنجبویه و تولید متابولیت‌های ثانوی توسط آن در این گیاه تاکنون تحقیقی صورت نگرفته است. لذا هدف از این تحقیق بررسی اثر NO بر رشد و تولید متابولیت‌های ثانوی و دیگر شاخص‌های فیزیولوژیک در کشت بافت گیاه دارویی بادرنجبویه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت و اعمال تیمار: در این تحقیق ابتدا بذورهای گیاه بادرنجبویه در محیط کشت MS (۵۰ درصد) $pH=5/7$ ، آگار ۸ گرم در لیتر، سوکروز ۱۵ گرم در لیتر بدون هورمون کشت شده و گیاهچه‌ها ایجاد شدند. سدیم نیتروپروساید (منبع تولید کننده NO) با غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار جهت تیمار مورد استفاده قرار گرفت. کشت‌های فاقد NO به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پس از گذشت ۱۰ روز از اعمال تیمار، گیاهان برداشت شده و مورد آنالیز قرار گرفتند.

اندازه‌گیری رشد و میزان پروتئین: رشد گیاه از طریق اندازه‌گیری وزن خشک به‌دست آمد. غلظت پروتئین نمونه‌ها به‌روش برادفورد (۶) تعیین شد. برای تعیین غلظت پروتئین‌های نمونه‌ها از هر عصاره پروتئینی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در لوله‌ی آزمایش ریخته و ۱ میلی‌لیتر محلول برادفورد به آن اضافه شد و پس از ورتکس کردن لوله‌ها و ماندن به‌مدت حداقل ۵ دقیقه در دمای اتاق، مقدار جذب آن‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (Perkin Elmer, Lambda 650) سنجیده شد، سپس با استفاده از نمودار استاندارد آلومین سرم گاوی غلظت پروتئین نمونه‌ها به‌دست آمد.

اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی: میزان ترکیبات فنلی کل بر اساس روش رنگ سنجی فولین-سیوکالتیو (۷) و برحسب منحنی استاندارد گالیک اسید در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. بدین ترتیب که ابتدا ۰/۱ گرم نمونه منجمد شده گیاهی در سه میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد همگن شد و به‌مدت سه ساعت در بن ماری (حمام آب گرم) در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. سپس با سرعت (g) ۹۰۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه (دو بار) سانتریفوژ شد و عصاره متانولی از رسوب جدا شد. عصاره متانولی برای سنجش فنل کل، فلاونوئیدها و فلاونول‌ها مورد استفاده قرار گرفت. به ۵۰ میکرولیتر عصاره

درصد سائیده شد. نمونه‌ها پس از همگن سازی، سانتریفوژ (۶۰۰ دور، به مدت ۱۵ دقیقه) شدند. به ۱ میلی لیتر از نمونه‌های صاف شده، ۱ میلی لیتر تیوباربیتوریک اسید (TBA) ۰/۲۵ درصد اضافه و به مدت نیم ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. میزان MDA با اندازه گیری جذب در طول موج های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر با استفاده از ضریب خاموشی (155 mM-1cm-1) محاسبه گردید (۱۱).

اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز: بدین منظور مقدار ۰/۱ گرم از نمونه منجمد شده در ۳ میلی لیتر بافر سدیم فسفات mM ۲۵ (pH ۶/۱) عصاره گیری و مخلوط اخیر در ۶۰۰ دور و دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. از محلول روشنور برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد. سپس مخلوط واکنش شامل بافر فسفات mM ۲۵ (pH ۶/۸)، هیدروژن پراکسید mM ۱۰ و عصاره آنزیمی تهیه گردید. فعالیت کاتالاز با توجه به روند تجزیه هیدروژن پراکسید و در نتیجه کاهش جذب آن در طول یک دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر سنجیده و به ازای میلی گرم پروتئین عصاره آنزیمی محاسبه شد. کلیه مراحل استخراج آنزیمی روی یخ انجام گرفت (۱۲).

اندازه گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز: بدین منظور ۰/۱ گرم نمونه منجمد شده در بافر فسفات سدیم ۶۰ میلی مولار (pH ۶/۱) در هاون روی یخ به مدت ۲ دقیقه سائیده و سپس نمونه‌ها پس از همگن سازی، سانتریفوژ (۶۰۰ دور، به مدت ۳۰ دقیقه) شدند. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات سدیم ۶۰ میلی مولار (pH ۶/۱)، گایاکول ۲۸ میلی مولار و پراکسید هیدروژن ۵ میلی مولار بود. جذب آن در طول یک دقیقه در طول موج ۴۲۰ نانومتر قرائت و فعالیت آنزیم به صورت پراکسیداسیون ۱ میکرومولار گایاکول در دقیقه در گرم وزن تر بیان شد (۱۳).

نتایج

اثر NO بر رشد و میزان پروتئین

نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف NO به طور معنی داری (۰/۰۵ P) وزن خشک را کاهش داد. با افزایش غلظت، رشد کاهش بیشتری نشان داد، به طوری که غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر سدیم نیتروپروساید میزان رشد را به میزان ۶۰ درصد کاهش داد. وزن خشک گیاهچه‌ها در تمامی غلظت‌ها به طور معنی داری

متانولی، ۵۰۰ میکرولیتر محلول فولین- سیوکالتیو اضافه شد. به مخلوط حاصل بعد از پنج دقیقه ۵۰۰ میکرولیتر محلول سدیم کربنات هفت درصد اضافه شد و جذب بعد از ۱۰ دقیقه در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد.

اندازه گیری میزان فلاونوئید کل: به منظور سنجش فلاونوئید کل، ۰/۱ گرم نمونه منجمد شده گیاهی با ۳ میلی لیتر محلول متانول اسیدی شامل متانول: اسیداستیک به نسبت ۱:۹۹ در هاون سائیده شد. به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۰۰ دور سانتریفوژ شد. محلول رویی به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. میزان جذب نمونه‌ها پس از سرد شدن توسط اسپکتروفتومتر در ۳ طول موج ۲۷۰، ۳۰۰، ۳۳۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت فلاونوئیدها، از ضریب خاموشی M-1cm-1 ۳۳۰۰۰ استفاده شد (۸).

اندازه گیری میزان آنتوسیانین: برای سنجش آنتوسیانین، ۰/۱ گرم نمونه گیاهی در ۳ میلی لیتر متانول اسیدی (متانول و اسید کلریدریک به نسبت ۹۹: ۱) خوب سائیده و سپس عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۰۰ دور سانتریفوژ شد. محلول رویی به مدت یک شب در تاریکی قرار داده شد و بعد جذب آن در طول موج ۵۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای محاسبه ی غلظت آنتوسیانین، از ضریب خاموشی M-1cm-1 ۳۳۰۰۰۱ استفاده شد (۹).

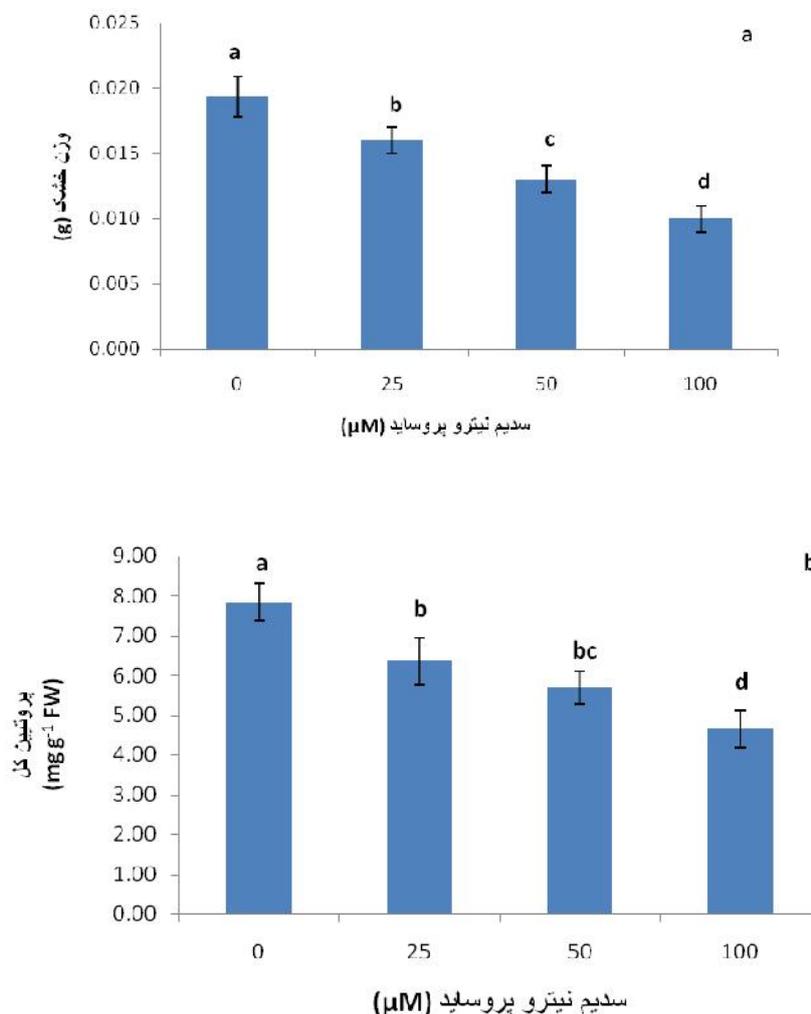
تعیین میزان پراکسید هیدروژن

بدین منظور ۰/۱ گرم از نمونه منجمد شده روی یخ با ۴ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید تا مرحله همگن شدن سائیده و سپس سانتریفوژ (۶۰۰ دور، به مدت ۱۵ دقیقه) شدند. سپس به ۰/۵ میلی لیتر از محلول روشنور، ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات سدیم (pH ۷، mM ۱۰) و ۱ میلی لیتر یدید پتاسیم اضافه شد و جذب آن در طول موج ۳۹۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر خوانده شد. با استفاده از منحنی استاندارد مقدار پراکسید هیدروژن خوانده شد (۱۰).

بررسی تمامیت غشا: میزان آسیب به غشاها با اندازه گیری مقدار مالون دی آلدئید (MDA) به عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشاها و با اندازه گیری میزان نشت الکترولیت‌ها (Electrolyte leakage) از غشای سلول‌ها تعیین شد. به منظور اندازه گیری MDA میزان ۰/۱ گرم از نمونه منجمد شده با ۴ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۱۰

میزان کاهش زنده مانی سلول‌ها در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به میزان ۲۲ درصد نسبت به نمونه‌های شاهد مشاهده شد (شکل ۱b).

کمتر از نمونه‌های شاهد بود (شکل ۱a). میزان پروتئین نیز تحت تاثیر غلظت‌های مختلف NO تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده نشد. بیشترین

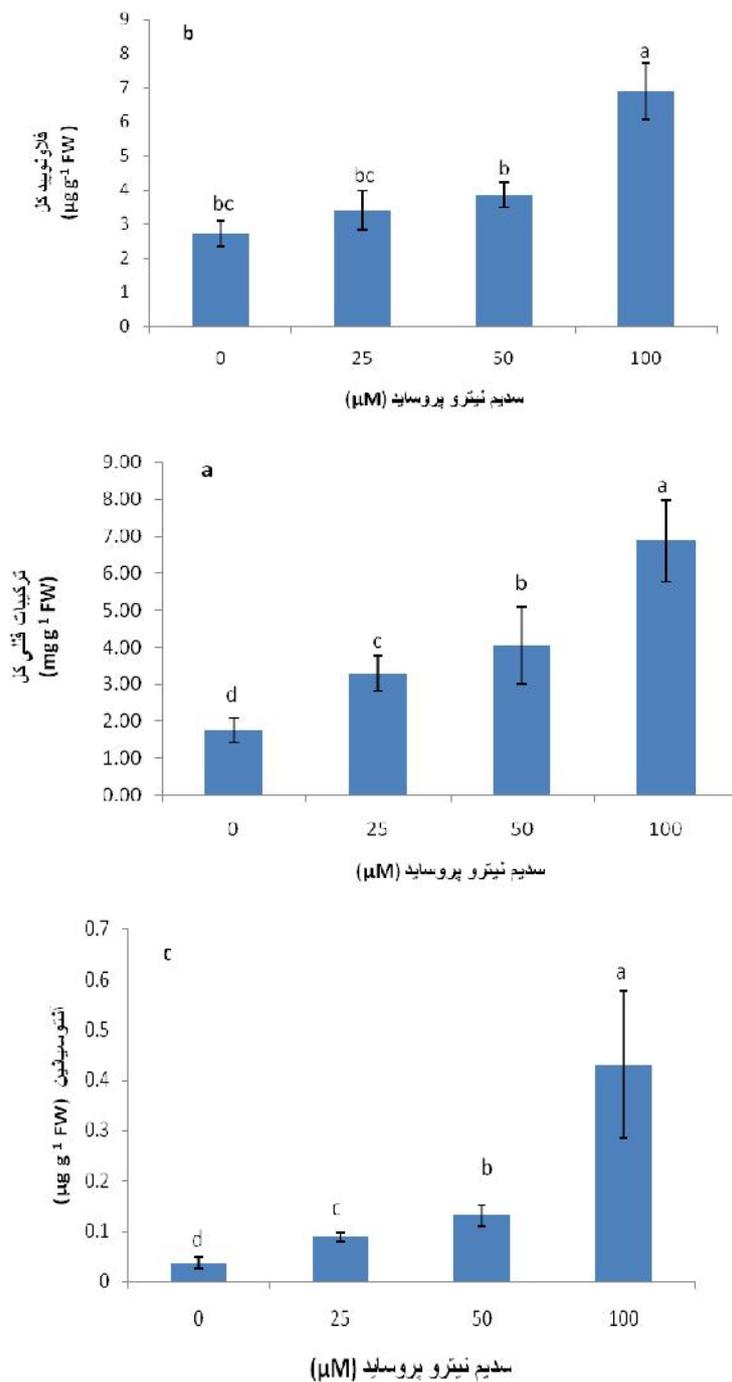


شکل ۱: اثر NO روی (a) وزن خشک و (b) میزان پروتئین در کشت گیاهچه بادرنجبویه. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و $SE \pm$ (انحراف معیار) می‌باشد. میانگین‌های دارای حرف مشترک از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۲b). میزان آنتوسیانین نیز به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر غلظت‌های مختلف سدیم نیتروپروساید به‌طور معنی‌داری نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش یافت (شکل ۲c).

اثر NO بر میزان فنول کل، فلاونوئید کل، آنتوسیانین

میزان فنول کل تحت تاثیر غلظت‌های مختلف NO به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت، به‌طوری‌که با افزایش غلظت میزان ترکیبات فنل کل نیز افزایش یافت (شکل ۲a). میزان ترکیبات فلاونوئیدی تحت تاثیر غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سدیم نیتروپروساید تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های شاهد نشان داد ولی در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میزان ترکیبات فلاونوئیدی به میزان ۲/۵ برابر نسبت به شاهد به‌طور

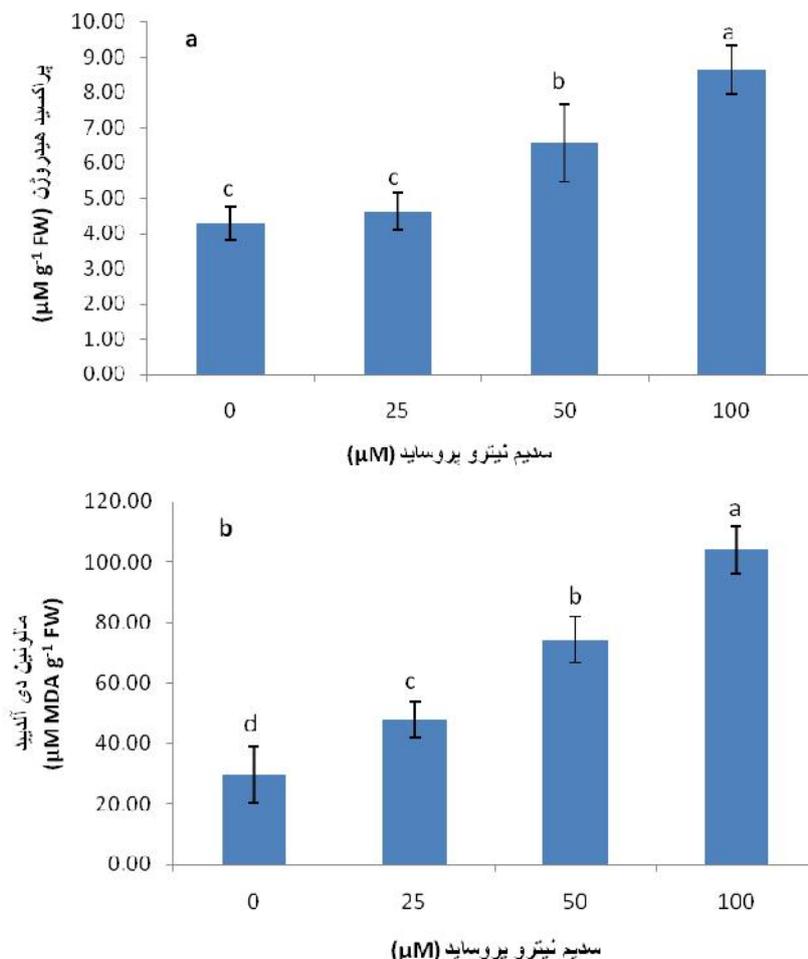


شکل ۲: اثر NO بر میزان (a) ترکیبات فنل کل و (b) فلاونوئید کل و (c) آنتوسیانین در کشت گیاهچه بادرنجبویه. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و $\pm SE$ (انحراف معیار) می باشد. میانگین های دارای حرف مشترک از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی دار ندارند.

داد. تفاوت معنی داری در نمونه های شاهد و غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر مشاهده نشد (شکل ۳a). همان طوری که شکل ۳b نشان می دهد غلظت های مختلف سدیم نیترو پروساید باعث افزایش معنی دار ($p < 0.05$) مقدار پراکسید هیدروژن در مقایسه با شاهد شد.

اثر NO بر مقدار پراکسید هیدروژن و پراکسید/اسیون لیپیدها

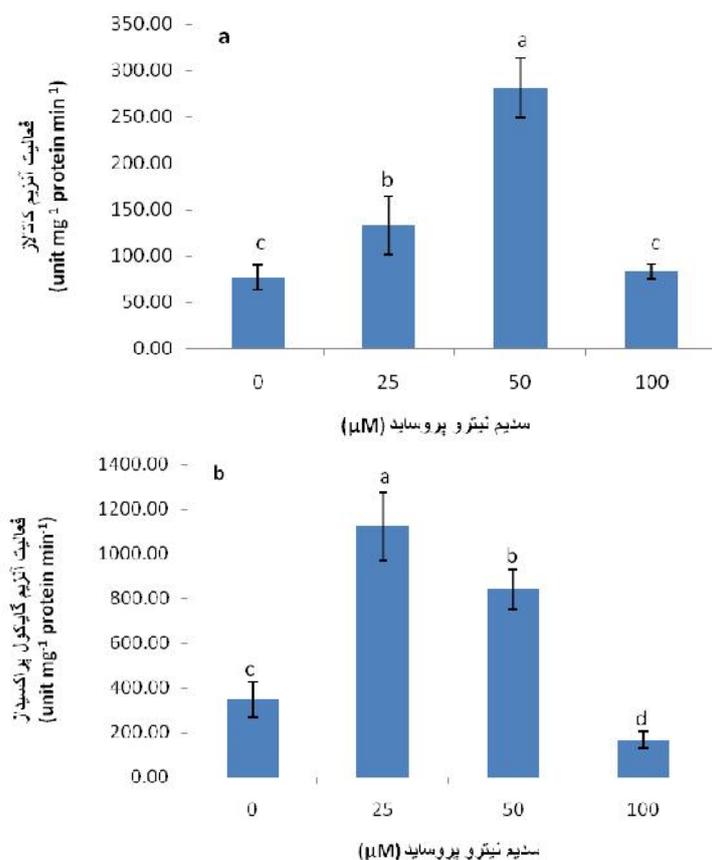
مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی که به عنوان شاخصی از تنش می باشد، تحت تاثیر غلظت های ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر سدیم نیترو پروساید نسبت به شاهد افزایش معنی داری نشان



شکل ۳: اثر NO روی میزان (a) پراکسید هیدروژن و (b) مالونین دی آلدئید در کشت گیاهچه بادرنجبویه. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و SE \pm (انحراف معیار) می باشد. میانگین های دارای حرف مشترک از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی دار ندارند.

اثر NO بر فعالیت آنزیم های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز

نتایج فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تاثیر سدیم نیتروپروکساید نشان داد در گیاهچه های تیمار شده با غلظت های ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر فعالیت این آنزیم نسبت به نمونه های شاهد به طور معنی داری افزایش یافت به طوری که بیشترین میزان فعالیت آنزیم در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر مشاهده گردید. با افزایش غلظت تا ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر میزان فعالیت آنزیم کاهش یافت به طوری که تفاوت معنی داری با شاهد نشان نداد (شکل ۴a). فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تاثیر غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر سدیم نیتروپروکساید به طور معنی داری نسبت به شاهد نشان داد. با افزایش غلظت میزان فعالیت آنزیم کاهش یافت به طوری که در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر همچنان از شاهد بیشتر بود ولی در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کاهش معنی دار فعالیت آنزیم نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۴b).



شکل ۴: اثر NO روی میزان فعالیت (a) آنزیم کاتالاز و (b) آنزیم گایکول پراکسیداز در کشت گیاهچه بادرنجبویه. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و $SE \pm$ (انحراف معیار) می باشد. میانگین های دارای حرف مشترک از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی دار ندارند.

بحث

افزایش تولید متابولیت های ثانوی تحت تاثیر NO گزارش شده است (۴). هنگامی که ریشه های مویی *Echinacea purpurea* با ۱۰۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید، تحت تیمار قرار گرفتند، تجمع ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و مشتقات اسید کافیک افزایش نشان داد و این افزایش در متابولیت ها با افزایش فعالیت سیستم آنتی اکسیدانسی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و اسید اسکوربیک همراه بود (۲۴). اگر چه اسید جاسمونیک یا متیل استر آن یعنی متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک، مولکول های سیگنال مطرحی هستند که بخشی از سیستم پاسخ های دفاعی گیاه را تشکیل می دهند و می توانند در گیاه بیوسنتز متابولیت های ثانوی را از طریق مسیرهای سیگنالینگ مجزا تحریک نمایند (۵)، اما همه آن ها در تعامل با NO تولید متابولیت های ثانوی را وساطت می کنند. به عنوان مثال تولید NO در سلول های سرخدار چینی با تیمار متیل جاسمونات از ۵۰ تا ۳۰۰ میکرومولار افزایش

NO به عنوان تنظیم کننده در متابولیسم گونه های فعال اکسیژن (ROS) عمل کند (۱۴ و ۱۵). سدیم نیتروپروساید یکی از تولید کننده های مهم NO است (۱۶) که به ازای هر ۰/۵ میلی مول بر لیتر قادر به تولید حدود ۲ میکرومول بر لیتر رادیکال NO می باشد (۱۷). در تحقیق حاضر تحت تاثیر غلظت های مختلف سدیم نیتروپروساید رشد و میزان پروتئین در گیاهچه های بادرنجبویه کاهش یافت. رادیکال NO یکی از عوامل تقویت کننده عمل کرد H_2O_2 است و به دنبال بروز پاسخ سلولی، NO باعث افزایش مرگ سلولی القا شده توسط H_2O_2 می شود (۱۸). کاهش رشد و افزایش مرگ سلولی تحت تاثیر غلظت های مختلف سدیم نیتروپروساید گزارش شده است (۱۹ و ۲۰).

مطالعات اخیر نقش NO در انتقال سیگنال (۲۱ و ۲۲) و پاسخ به تنش های زیستی و غیر زیستی تایید کرده است (۲۲ و ۲۳).

در غلظت ها و شرایط محیطی مختلف دارای اثرات فیزیولوژیکی متفاوتی است (۱۵). در تحقیق حاضر نیز افزایش فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز وابسته به غلظت بوده به طوری که بیشترین میزان فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز به ترتیب در غلظت های ۵۰ و ۲۵ میلی گرم بر لیتر سدیم نیترو پروساید مشاهده شد و در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر فعالیت آنزیم ها کاهش یافت.

نتیجه گیری

در تحقیق حاضر، با افزایش میزان غلظت سدیم نیتروپروساید، رشد و میزان پروتئین کاهش یافت. دلیل این کاهش می تواند افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا باشد که این خود نشان دهنده ارتباط مستقیم بین پراکسیداسیون لیپیدی و تولید ROSها می باشد. به دنبال افزایش پراکسیداسیون لیپیدها، افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتی و تولید متابولیت ها نیز مشاهده شد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه زابل که هزینه این طرح پژوهشی به شماره ۱۵۱۲۶ / ۸ پ مورخ ۹۲/۱۰/۱۸ را فراهم نموده اند تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

1. Fett-Neto AG, Zhang WY, Dicosmo F. Kinetics of Taxol production, growth, and nutrient uptake in cell suspensions of *Taxus caspadata*. *Biotechnol Bioeng*. 1994; 44: 205–210.
2. Exposito O, Bonfill M, Moyano E, Onrubia M, et al. Biotechnological production of taxol and related taxoids. *Current state and prospects*. *Anti Canc Agents Med Chem*. 2009; 9: 109–121.
3. Hong JK, Yun BW, Kang JG, Raja MU, et al. Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance. *J Exp Bot*. 2008; 59:147–154
4. Xu MJ. Nitric oxide: a potential key point of the signaling network leading to plant secondary metabolite biosynthesis. *Prog Nat Sci*. 2007; 17:1397–1404.
5. Zhao J, Davis LC, Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv*. 2005; 23(4): 283–333.

نشان داد که نشان دهنده تحریک وابسته به دوز متیل جاسمونات می باشد (۲۵). در تحقیق حاضر نیز میزان ترکیبات فنولی کل و فلاونوئید کل و آنتوسیانین تحت تاثیر غلظت های مختلف سدیم نیتروپروساید افزایش نشان داد. گونه های اکسیژن واکنش گر یا ROS (Reactive Oxygen Species) از جمله پراکسید هیدروژن از عوامل مهم در تنش اکسیداتیو بوده که به طور قابل توجهی رشد سلول و متابولیسم ثانویه را تحت تاثیر قرار می دهد. با توجه به این که کلیه تیمارها باعث القای تولید پراکسید هیدروژن گردیدند تصور می شود که از این طریق رشد را کاهش داده اند.

از آنجا که سرعت پراکسیداسیون لیپید (MDA) می تواند نشان دهنده تحمل یا حساسیت گیاهان نسبت به استرس های اکسیداتیو باشد (۲۶). در ادامه این پژوهش میزان مالون دی آلدئید در کشت گیاهچه های بادرنجیویه بررسی شد. بر اساس نتایج به دست آمده با افزایش غلظت سدیم نیتروپروساید میزان مالون دی آلدئید نیز افزایش یافت. لذا می توان گفت که افزایش تولید مولکول NO باعث القای استرس اکسیداتیو در گیاهچه های تحت تیمار با سدیم نیتروپروساید شد. گیاهان با استفاده از روش های غیر آنزیمی و آنزیمی می توانند رادیکال های آزاد را حذف و اثر تخریبی آنها را کمتر کنند. در روش آنزیمی، گیاه با استفاده از آنزیم های خنثی کننده رادیکال آزاد مانند سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز عمل می کنند. آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز نقش مهمی در غیر فعال کردن ROSها در گیاهان دارند، بسته به گونه گیاهی و شدت تنش میزان فعالیت آنها در گیاهان تغییر می کند (۲۷).

در مطالعه حاضر افزایش معنی داری در فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتی مشاهده شد. استفاده از NO اگزوزن منجر به افزایش فعالیت آنزیم های پراکسیداز و کاتالاز در ریشه خیار گردید (۱۵). در تحقیق دیگر تحت تاثیر غلظت های مختلف سدیم نیتروپروساید در کالوس گیاه سیب زمینی میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز تا غلظت ۴۰ میکرومولار با افزایش همراه بود و در غلظت های بعدی میزان فعالیت آن کاهش یافت. از طرفی فعالیت آنزیم های پراکسیداز و کاتالاز تا غلظت ۴۰ میکرومولار با کاهش همراه بود و از این غلظت به بعد فعالیت آنزیم افزایش یافت (۲۸). با توجه به گزارش های مختلف می توان چنین نتیجه گرفت که اثر NO وابسته به غلظت بوده و

6. Bradford M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 1976; 72: 248–254.
7. Singleton VL, Rossi JR. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Am J enol vicult.* 1965; 16: 144-58.
8. Krizek DT, Kramer GF, Upadhyaya A, Mirecki RM. UV-B Response of cucumber seedling grown under metal halid and high pressure sodium/deluxe lamps. *J Plant Physiol.* 1993; 88: 350-358.
9. Masukasu H, Karin O, Kyoto H. Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyls. *Plant Science.* 2003; 164(2): 259 – 265.
10. Velikova V, Yordanov I, Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated been plants protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci.* 2000; 151(1): 59–66.
11. De Vos CH, Schat H, De Waal MA, Vooijs R, et al. Increased resistance to copper-induced damage of the root plasma membrane in copper tolerant *Silene cucubalus*. 1991; *Physiol. Plantarum.* 1991; 82: 523–528.
12. Cakmak I, Marschner H. Manganese deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol.* 1992; 98(4): 1222-1227.
13. Polle A, Otter T, Seifert F. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of norway spruce (*Picea Abies L.*). *Plant Physiol.* 1994; 106: 53-56.
14. Hung KT, Kao CH. Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid. *Plant Physiol.* 2003; 160(8): 871-879.
15. Shi Q, Ding F, Wang X, Wei M. Exogenous nitric oxide protects cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. *Plant Physiol Biochem.* 2007; 45: 542-550.
16. Butler AR, Megson IL. Non-heme iron nitrosyls in biology. *Chemical Rev.* 2002; 102(4): 1155-1165.
17. Haihua H, Wenbiao S, Maobing Y, Langlai X. Protective effects of nitric oxide on salt stress-induced oxidative damage to wheat (*Triticum Aestivum L.*) leaves. *Chinese Sci Bulletin.* 2002; 47: 677-681.
18. Durner J, Klessig DF. Nitric oxide as a signal in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 1999; 2: 369-374.
19. Zottini M, Formentin E, Scattolin M, Carimi F, et al. Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality in vivo. *Fed Eur Biochem Soc Lett.* 2002; 515: 75-78.
20. Fadzillah NM, Yusuf N, Mahmood M. Paraquat (Methyl viologen) toxicity in centella asiatica callus cultures. *Pertanika J Tropic Agri Sci.* 2006; 29(1):57-66.
21. Hayat S, Hasan S.A, Mori M, Fariduddin Q, et al. Nitric oxide: chemistry, biosynthesis, and physiological role. In Hayat,S., Mori, M., Pichtel, J. and Ahmad, A. (eds). *Nitric Oxide in Plant Physiology.* Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA. Weinheim, Germany; 2010.
22. Liu X, Wang L, Liu L, Guo Y, et al. Alleviating effect of exogenous nitric oxide in cucumber seedling against chilling stress. *African J Biotech.* 2011; 10: 4380-4386.
23. Tan J, Zhao H, Hoang J, Han Y, et al. Effects of exogenous nitric oxide on photosynthesis, antioxidant capacity and proline accumulation in wheat seedlings subjected to osmotic stress. *Agri Sci.* 2008; 4: 307-313.
24. Wu CH, Tewari RK, Hahn EJ, Paek KY. Nitric oxide elicitation induces the accumulation of secondary metabolites and antioxidant defense in adventitious roots of *Echinacea purpurea*. *J Plant Biol.* 2007; 50: 636–643.
25. Wang JW, Wu JY. Nitric oxide is involved in methyl jasmonate-induced defense responses and secondary metabolism activities of *Taxus* cells. *Plant Cell Physiol.* 2005; 46(6): 923–930.
26. Wang WB, Kim YH, Lee HS, Kim KY, et al. Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. *Plant Physiol Biochem.* 2009; 47(7): 570-577.
27. Alscher RG, Erturk N, Heath LS. Role of superoxide dismutase (SOD) in controlling oxidative stress in plants. *J Experimental Botany.* 2002; 53: 1331-1341.
28. Xu J, Yin H, Wang W, Mi Q, et al. Effects of sodium nitroprusside on callus induction and shoot regeneration in micropropagated *Dioscorea* opposite. *Plant Growth Regul.* 2009; 59: 279–285.

Nitric oxide Effect on Growth and Some Physiological Parameters of *In vitro* Cultured Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.)

Esmailzadeh Bahabadi S. Ph.D.*¹, Rezaei A. Ph.D.², Najafi Sh. Ph.D.¹

1-Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran

2-Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran

* Email corresponding author: esmailzadeh@uoz.ac.ir shirin_esm@yahoo.com

Received: 30 Nov. 2014

Accepted: 15 Feb. 2015

Abstract

Aim: In this study, sodium nitroprusside effect as a producer of NO on growth, antioxidant enzyme activities and some physiological parameters in *in vitro* cultured *Melissa officinalis* seedlings were studied.

Material and methods: After establishment of *Melissa officinalis* seedling culture, seedlings were treated with different concentrations of sodium nitroprusside (0, 25, 50 and 100 μ M). Then, they were harvested for growth, protein content, secondary metabolites, lipid peroxidation level and antioxidant enzymes activities analysis after 10 days.

Results: Results showed that growth and protein content decreased with increasing concentration of sodium nitroprusside. Phenolic compounds amount, total flavonoids and anthocyanins increased by sodium nitroprusside. Also Malondialdehyde content as lipid peroxidation product was significantly increased. In response to oxidative stress, catalase and peroxidase enzymes activities were respectively increased at 50 and 25 μ M sodium nitroprusside while enzymes activities showed decreasing at 100 μ M.

Conclusion: Overall, the results indicate that sodium nitroprusside as NO producer damage the cell membrane. Therefore reduced *Melissa officinalis* seedling growth and caused oxidative stress in them. To overcome produced free radical, secondary metabolites amounts and antioxidant enzymes activities were increased.

Keywords: Antioxidant enzymes, *Melissa officinalis*, *in vitro* culture, secondary metabolites, Nitric oxide.