Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی- پژوهشی)
جلد ٦، شماره ٢، تابستان ١٣٩٤، ٢٠٣-١٩٥

اثر نیتریک اکساید بر میزان رشد و برخی شاخص‌های فیزیولوژیک گیاهچه‌های بادرنجبویه کشت شده در شرایط *In vitro*

صدیقه اسمعیل زاده بهابادی .Ph.D[1*]، آیت اله رضایی نودهی .Ph.D[2]، شهلا نجفی .Ph.D[1]

۱- 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 وshirin_esm@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۶

چکیده

هدف: در این تحقیق، اثر سدیم نیتروپروساید به‌عنوان 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) تیمارشدند. 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 به‌عنوان محصول پراکسیداسیون لیپیدی نیز به‌طور معنی‌دار افزایش یافت. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در پاسخ به تنش اکسیداتیو به‌ترتیب در غلظت‌های ۵۰ و ۲۵ میکرو مولار سدیم نیترو پروساید افزایش یافت در حالی‌که فعالیت آنزیم‌ها در غلظت ۱۰۰ میکرو مولار کاهش نشان داد.

نتیجه گیری: به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد سدیم نیترو پروساید به‌عنوان 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 آنتی‌اکسیدانتی افزایش یافت.

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

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) یکی از گیاهان دارویی است که به‌دلیل 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 داروئی در تولید مواد آرایشی، بهداشتی و غذائی 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 الیسیتور و کشت دو فازی می‌باشد (۲). نیتریک اکساید (NO) رادیکال آزاد بوده که دارای طیف گسترده‌ای از پیامدهای فیزیولوژیکی 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 معمولا در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی، حمله پاتوژن‌ها و چالش‌های الیسیتورهای قارچی رخ می‌دهد. اعتقاد بر این است که احتمالا 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 الیسیتورها 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، آرتمیسینین 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 الیسیتور 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 بذرهای گیاه بادرنجبویه در محیط کشت MS (۵۰ درصد) pH= ۵/۷ ، 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.

اندازه گیری 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 هرعصاره پروتئینی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در لوله‌ی آزمایش ریخته و ۱ میلی‌لیترمحلول برادفورد به آن اضافه شد و پس از ورتکس کردن لوله‌ها و ماندن به‌مدت حداقل ۵ دقیقه دردمای اتاق، مقدارجذب آن‌ها درطول موج ۵۹۵ نانومترتوسط اسپکتروفتومتر (Perkin Elmer, Lambda 650) سنجیده شد، سپس با استفاده از نمودار استاندارد آلبومین سرم گاوی غلظت پروتئین نمونه‌ها به‌دست آمد .

اندازه گیری 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 نانو متر اندازه گیری 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 ۱۵دقیقه (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

www.SID.ir

Archive of SID

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 نانو متر خوانده شد.

اندازه گیری میزان فلاونوئید کل: به‌منظورسنجش فلاونوئید کل، ۰/۱گرم نمونه منجمد شده گیاهی با ۳ میلی‌لیترمحلول متانول اسیدی شامل متانول: اسیداستیک به نسبت ۱:۹۹ در هاون سائیده شد . به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۶۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. محلول رویی به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرارداده شد . میزان جذب نمونه‌ها پس از سرد شدن توسط اسپکتروفتومتردر 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 در۳ میلی‌لیترمتانول اسیدی (متانول و اسیدکلریدریک به نسبت ۹۹ : ۱) خوب سائیده و سپس عصاره حاصل به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۶۰۰۰ دور سانتریفوژ شد . محلول رویی به‌مدت یک شب در تاریکی قرارداده شد و بعد جذب آن در طول موج ۵۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومترخوانده شد. برای محاسبه ی غلظت آنتوسانین، از ضریب خاموشی M-1cm-1 ۳۳۰۰۰ استفاده شد (۹) .

تعیین میزان پراکسید هیدروژن

بدین منظور۰/۱ گرم ازنمونه منجمدشده روی یخ با ۴ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید تا مرحله همگن شدن سائیده و سپس سانتریفوژ (۶۰۰۰ دور ، به‌مدت ۱۵ دقیقه) شدند. سپس به ۰/۵ میلی‌لیتراز محلول روشناور، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم (۱۰ mM, PH ۷) و ۱ میلی‌لیتر یدید پتاسیم اضافه شد و جذب آن در طول موج ۳۹۰ نانومتر با اسپکترفتومتر 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) به‌عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشاها و با اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت‌ها (Electrolyte leakage) از غشای سلول‌ها تعیین شد. به‌منظور اندازه گیری MDA میزان ۰/۱ گرم از نمونه منجمد شده با ۴ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۱۰ درصد سائیده شد . نمونه‌ها پس از همگن سازی، سانتریفوژ (۶۰۰۰ دور ، به‌مدت ۱۵ دقیقه) شدند . به ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های صاف شده ،۱ میلی‌لیتر تیوباربیتوریک اسید (TBA) ۰/۲۵ درصد اضافه و به‌مدت نیم ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرارداده شد. میزان MDA با اندازه گیری جذب درطول موج های ۵۳۲ و۶۰۰ نانومتر با استفاده از ضریب خاموشی (155 mM-1cm-1) محاسبه گردید (۱۱).

اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز: بدین منظور مقدار۰/۱ گرم از نمونه منجمد شده در۳ میلی‌لیتر بافرسدیم فسفات mM ۲۵ (pH ۶/۱) عصاره گیری و مخلوط اخیر در۶۰۰۰ دور و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. از محلول روشناور برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد. سپس مخلوط واکنش شامل بافرفسفات mM ۲۵ (pH ۶/۸)، هیدروژن پراکسید mM ۱۰و عصاره آنزیمی تهیه گردید. فعالیت کاتالاز با توجه به روند تجزیه هیدروژن پراکسید و درنتیجه کاهش جذب آن درطول یک دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومترسنجیده و به‌ازای میلی‌گرم 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 بافرفسفات سدیم ۶۰ میلی‌مولار (pH ۶/۱) در هاون روی یخ به‌مدت ۲ دقیقه ساییده و سپس نمونه‌ها پس از همگن سازی، سانتریفوژ (۶۰۰۰ دور، به‌مدت ۳۰ دقیقه) شدند. مخلوط واکنش شامل بافرفسفات سدیم ۶۰ میلی‌مولار (pH ۶/۱)، گایاکول ۲۸ میلی مولار و پراکسیدهیدروژن ۵ میلی‌مولار بود. جذب آن در طول یک دقیقه در طول موج ۴۲۰ نانومتر قرائت و فعالیت آنزیم به‌صورت پراکسیداسیون ۱ میکرومولار گایاکول در دقیقه درگرم وزن تر بیان شد (۱۳).

نتایج

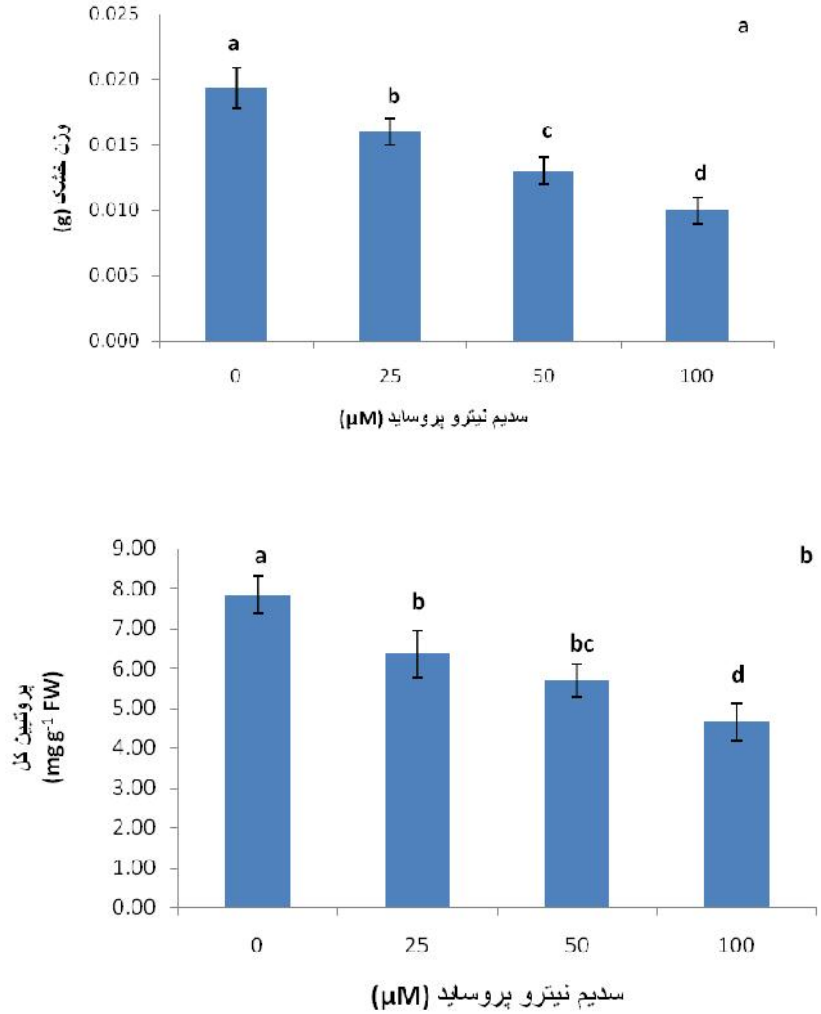
اثر NO بر رشد و میزان پروتئین

نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف NO به‌طور معنی‌داری ($p \leq ۰/۰۵$) وزن خشک را کاهش داد. با افزایش غلظت، رشد کاهش بیشتری نشان داد، به‌طوری‌که غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سدیم نیتروپروساید میزان رشد را به‌میزان ۶۰ درصد کاهش داد. وزن خشک گیاهچه‌ها در تمامی غلظت‌ها به‌طور معنی‌داری

www.SID.ir

Archive of SID

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



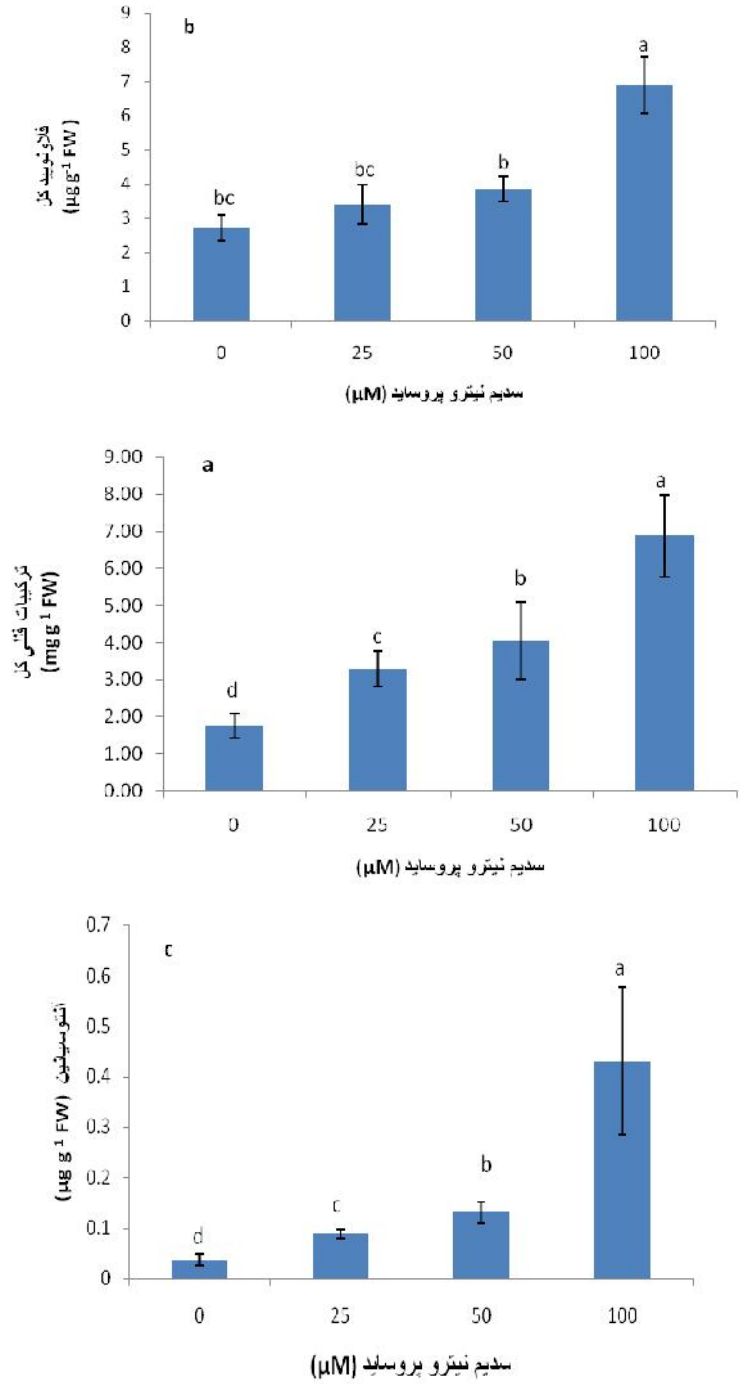
شکل ۱: اثر NO روی a) وزن خشک و b) میزان پروتئین در کشت گیاهچه بادرنجبویه. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و SE ± (انحراف معیار) می‌باشد. میانگین‌های دارای حرف مشترک از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

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 میلی گرم بر لیتر سدیم نیتروپروساید تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های شاهد نشان داد ولی در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میزان ترکیبات فلاونوئیدی به‌میزان ۲/۵ برابر نسبت به شاهد به‌طور 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).

www.SID.ir

Archive of SID



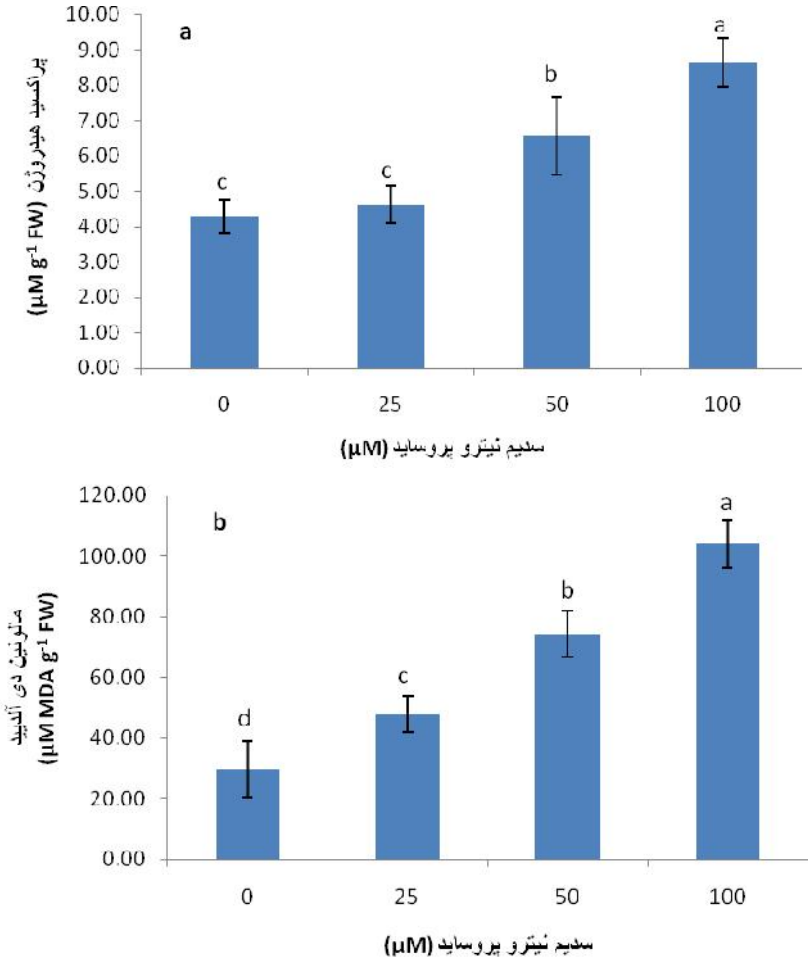
شکل ۲: اثر NO بر میزان a) ترکیبات فنل کل و b) فلاونوئید کل و c) آنتوسیانین در کشت گیاهچه بادرنجبویه. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و SE ± (انحراف معیار) می‌باشد. میانگین‌های دارای حرف مشترک از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

اثر NO بر مقدار پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدها

مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی که به‌عنوان شاخصی از تنش می‌باشد، تحت تاثیر غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سدیم نیترو پروساید نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. تفاوت معنی‌داری در نمونه‌های شاهد و غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده نشد (شکل۳a). همان‌طوری‌که شکل ۳b نشان می‌دهد غلظت‌های مختلف سدیم نیترو پروساید باعث افزایش معنی‌دار ($p \leq ۰/۰۵$) مقدار پراکسید هیدروژن در مقایسه با شاهد شد.

www.SID.ir

Archive of SID



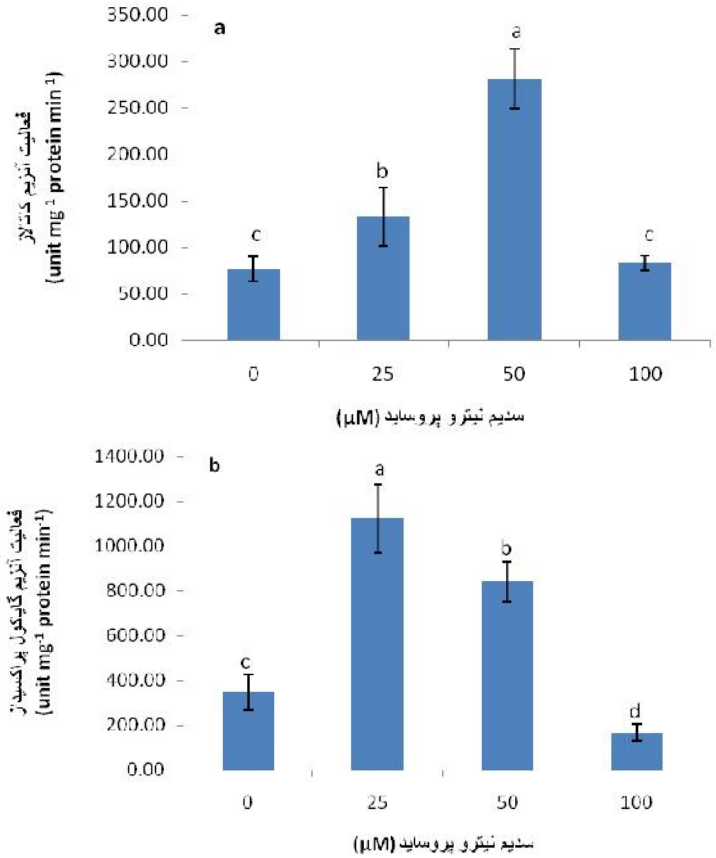
شکل ۳: اثر NO روی میزان a) پراکسید هیدروژن و b) مالونین دی آلدئید در کشت گیاهچه بادرنجبویه. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و SE ± (انحراف معیار) می‌باشد. میانگین‌های دارای حرف مشترک از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

اثر NO بر فعالیت آنزیم های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز

نتایج فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تاثیر سدیم نیتروپروساید نشان داد در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر فعالیت این آنزیم نسبت به نمونه‌های شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت به‌طوری‌که بیشترین میزان فعالیت آنزیم در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده گردید. با افزایش غلظت تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیترمیزان فعالیت آنزیم کاهش یافت به‌طوری‌که تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان نداد (شکل ۴a). فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تاثیر غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر سدیم نیتروپروساید به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد. با افزایش غلظت میزان فعالیت آنزیم کاهش یافت به‌طوری‌که در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر همچنان از شاهد بیشتر بود ولی در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۴b).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴: اثر NO روی میزان فعالیت a) آنزیم کاتالاز و b) آنزیم گایاکول پراکسیداز در کشت گیاهچه بادرنجبویه. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و SE ± (انحراف معیار) می‌باشد. میانگین‌های دارای حرف مشترک از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

بحث

NO به‌عنوان تنظیم کننده در متابولیسم گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) عمل کند (۱۴ و ۱۵). سدیم نیتروپروساید یکی از تولید کننده‌های مهم NO است (۱۶) که به‌ازای هر ۰/۵ میلی‌مول بر لیتر قادر به تولید حدود ۲ میکرومول بر لیتر رادیکال NO می‌باشد (۱۷). در تحقیق حاضر تحت تاثیر غلظت‌های مختلف سدیم نیتروپروساید رشد و میزان پروتئین در گیاهچه‌های بادرنجبویه کاهش یافت. رادیکال NO یکی از عوامل تقویت کننده عمل‌کرد H_2O_2 است و به‌دنبال بروز پاسخ سلولی، NO باعث افزایش مرگ سلولی القا شده توسط H_2O_2 می‌شود (۱۸). کاهش رشد و افزایش مرگ سلولی تحت تاثیر غلظت‌های مختلف سدیم نیتروپروساید گزارش شده است (۱۹ و ۲۰).

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

افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی تحت تاثیرNO گزارش شده است (۴). هنگامی‌که ریشه‌های مویی Echinacea purpurea با ۱۰۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید، تحت تیمار قرار گرفتند، تجمع ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و مشتقات اسید کافییک افزایش نشان داد و این افزایش در متابولیت‌ها با افزایش فعالیت سیستم آنتی اکسیدانتی 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، مولکول‌های سیگنال مطرحی هستند که بخشی از سیستم پاسخ‌های دفاعی گیاه را تشکیل می‌دهند و می‌توانند در گیاه بیوسنتز متابولیت‌های ثانوی را از طریق مسیرهای سیگنالینگ مجزا تحریک نمایند (۵)، اما همه آن‌ها در تعامل با NO تولید متابولیت‌های ثانوی را وساطت می‌کنند. به‌عنوان مثال تولید NO در سلول‌های سرخدار چینی با تیمار متیل جاسمونات از ۵۰ تا ۳۰۰ میکرومولار افزایش

www.SID.ir

Archive of SID

نشان داد که نشان دهنده تحریک وابسته به دوز متیل جاسمونات می‌باشد (۲۵). در تحقیق حاضر نیز میزان ترکیبات فنولی کل و فلاونوئید کل و آنتوسیانین تحت تاثیر غلظت‌های مختلف سدیم نیتروپروساید افزایش نشان داد. گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر یا ROS (Reactive Oxygen Species) از جمله پراکسید هیدروژن از عوامل مهم در تنش اکسیداتیو بوده که به‌طور قابل توجهی رشد سلول و متابولیسم ثانویه را تحت تاثیر قرار می‌دهد. با توجه به این‌که کلیه تیمارها باعث القای تولید پراکسید هیدروژن گردیدند تصور می‌شود که از این طریق رشد را کاهش داده‌اند.

از آنجا که سرعت پراکسیداسیون لیپید (MDA) می تواند نشان‌دهنده تحمل یا حساسیت گیاهان نسبت به استرس های اکسیداتیو باشد (۲۶). در ادامه این پژوهش میزان مالون‌دی‌آلدئید در کشت گیاهچه‌های بادرنجبویه بررسی شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده با افزایش غلظت سدیم نیتروپروساید میزان مالون دی آلدئید نیز افزایش یافت. لذا می‌توان گفت که افزایش تولید مولکول NO باعث القای استرس اکسیداتیو در گیاهچه‌های تحت تیمار با سدیم نیتروپروساید شد. گیاهان با استفاده از روش‌های 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 آنزیم‌های خنثی کننده رادیکال آزاد مانند سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز عمل می‌کنند. آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز نقش مهمی در غیر فعال کردن ROS ها در گیاهان دارند، بسته به گونه گیاهی و شدت تنش میزان فعالیت آن‌ها در گیاهان تغییر می‌کند (۲۷).

در مطالعه حاضر افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی مشاهده شد. استفاده از NO اگزوژن منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در ریشه خیار گردید (۱۵). در تحقیق دیگر تحت تاثیر غلظت‌های مختلف سدیم نیتروپروساید در کالوس گیاه سیب زمینی میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز تا غلظت ۴۰ میکرومولار با افزایش همراه بود و در غلظت‌های بعدی میزان فعالیت آن کاهش یافت. از طرفی فعالیت آنزیم‌های 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 گزارش‌های مختلف می توان چنین نتیجه گرفت که اثر NO وابسته به غلظت بوده و در غلظت ها و شرایط محیطی مختلف دارای اثرات فیزیولوژیکی متفاوتی است (۱۵). در تحقیق حاضر نیز افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز وابسته به غلظت بوده به‌طوری‌که بیشترین میزانت فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز به‌ترتیب در غلظت‌های ۵۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر سدیم نیترو پروساید مشاهده شد و در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فعالیت آنزیم‌ها کاهش یافت.

نتیجه گیری

در تحقیق حاضر، با افزایش میزان غلظت سدیم نیتروپروساید، رشد و میزان پروتئین کاهش یافت. دلیل این کاهش می‌تواند افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا باشد که این خود نشان دهنده ارتباط مستقیم بین پراکسیداسیون لیپیدی و تولید ROSها می باشد. به‌دنبال افزایش پراکسیداسیون لیپیدها، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی و تولید متابولیت‌ها 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 نموده‌اند 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 caspidata. 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.

www.SID.ir

Archive of SID

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-phosphotungestic acid reagent. Am J enol viticult. 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. Manesium deficiency and high light inensity enhance activities of superoxide dismutase, ascrobate 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.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Summer 2015; 6(2): 195-203

Original Article

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

Esmaeilzadeh 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: esmaeilzadeh@uoz.ac.ir و 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 µM). 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, chatalase and peroxidase enzymes activities were respectively increased at 50 and 25 µM sodium nitroprusside while enzymes activities showed decreasing at 100 µM.

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.

www.SID.ir