

بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنتی اکسیدانی نوشاخه‌های تکثیر شده گیاه بادرنجبویه در کشت درون شیشه‌ای

مریم ابراهیمی، خدیجه کیارستمی* و زهرا ناظم بکایی

دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۰۴ / اصلاح: ۱۳۹۶/۱۱/۱۸ / پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۲۰ / انتشار: ۱۳۹۷/۱۲/۲۸

گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: kh.kiarostami@alzahra.ac.ir

چکیده. بادرنبویه گیاهی است دارویی از تیره نعنائیان که به علت خواص درمانی خود در بسیاری از نقاط دنیا کشت می‌شود. این پژوهش به منظور بهینه‌سازی فعالیت آنتی اکسیدانی در نوشاخه‌های تکثیر یافته از کشت بافت گیاه بادرنبویه انجام شد. بذرها در محیط MS بدون هورمون برای تولید گیاهچه کشت شدند. سپس نوشاخه‌های حاصل به محیط کشت MS حاوی 2 mg/l BAP منتقل شدند. پس از ۴۵ روز سالیسیلیک اسید با غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار به محیط کشت اضافه شد. مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی نوشاخه‌ها با استفاده از آزمون‌های سنجش فعالیت جاروب کنندگی رادیکال آزاد یا DPPH، سنجش قدرت کاهشی یا RP و سنجش فعالیت جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید یا SO و مقادیر ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و رزمارینیک اسید در فواصل زمانی ۴، ۷، ۱۰ و ۱۴ روز پس از تیمار اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد کمترین مقدار IC_{50} ، بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی با قدرت کاهشی و بیشترین مقدار ترکیبات فنلی و رزمارینیک اسید در نوشاخه‌های تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید به مدت ۱۴ روز مشاهده شد. همچنین بیشترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی و بیشترین مقدار فعالیت آنیون سوپراکسید در غلظت ۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید در روز ۱۴ به دست آمد. به طور کلی استفاده از غلظت ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید به مدت ۱۴ روز برای افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی و ترکیبات ذکر شده مناسب تر تشخیص داده شد.

واژه‌های کلیدی. ترکیبات فنلی، تنظیم کننده رشد گیاهی، رزمارینیک اسید، فلاونوئیدها، نعنائیان

Effect of salicylic acid on antioxidant properties of in vitro proliferated shoots of *Melissa officinalis* L.

Maryam Ebrahimi, Khadijeh Kiarostami* & Zahra Nazem Bokaei

Received 25.12.2016 / Revised 07.02.2018 / Accepted 11.03.2018 / Published 19.03.2019

Department of Plant Biology, Faculty of Biological Science, Alzahra University, Tehran, Iran

*Correspondent author: kh.kiarostami@alzahra.ac.ir

Abstract. *Melissa officinalis* is a medicinal plant belonging to Lamiaceae family. This plant has been cultivated in many parts of the world due to its therapeutic effects. This study was conducted to improve the antioxidant activities of *Melissa officinalis* proliferated shoots obtained from tissue culture. The seeds were cultured in MS hormone-free medium in order to obtain seedlings. The shoots were then transferred to MS medium supplemented with 2 mg/L BAP. Salicylic acid (SA) was added to the medium at concentrations of 0, 50, 100 and $200 \mu\text{M}$ after 45 days. The antioxidant activity by the methods of free radical scavenging (DPPH), reducing power (RP) and superoxide anion scavenging activity (SO) was measured and the phenolics, flavonoids and rosmarinic acid contents were evaluated in proliferated shoots, 4, 7, 10 and 14 days after treatment. As a result, the highest free radical scavenging and RP activity, as well as the highest value of total phenolic and rosmarinic acid, were observed in shoots after 14 days of treatment with $100 \mu\text{M}$ SA. The elevated level of SO activity and total flavonoids were obtained from the shoots treated with $50 \mu\text{M}$ SA for 14 days. In general, treatment with $100 \mu\text{M}$ SA for 14 days was proved to be better for the increase of antioxidant activity and the amount of the compounds with recognized antioxidant activity.

Keywords. flavonoids, Lamiaceae, phenolic compounds, plant growth regulator, rosmarinic acid

مقدمه

بادرنجبویه (*Melissa officinalis*. L.) گیاهی دارویی، علفی و پایا از تیره نعنائیان است. از رایج ترین خواص درمانی بادرنجبویه می توان به خواص آرام بخشی، آنتی اکسیدانی، ضد اسپاسمی، ضد نفخ، ضد باکتری، ضد ویروسی و ضد التهابی اشاره کرد (Yosofi et al., 2011). گیاه بادرنجبویه حاوی ترکیبات شیمیایی زیادی از قبیل اسانس و ترکیبات فنلی است. ترکیبات فنلی با داشتن خاصیت آنتی اکسیدانی نقش مهمی در نگهداری محصولات غذایی و حفظ سلامتی انسان ایفا می کنند و به عنوان پیش ماده های سنتزی ترکیبات دارویی کاربرد دارند (Mohamadi et al., 2014; Raghavendra et al., 2010). بادرنجبویه حاوی مقادیر زیادی رزمارینیک اسید است به نحوی که رزمارینیک اسید در همه اندام های گیاه بادرنجبویه یافت می شود (Weitzel & Petersen, 2011). رزمارینیک اسید بیشترین سهم ترکیبات فنلی بادرنجبویه (از ۰/۵ تا ۶/۸ درصد از وزن خشک گیاه) را به خود اختصاص می دهد (Peeva et al., 2011). رزمارینیک اسید در کنار فعالیت آنتی اکسیدانی (Ozturk et al., 2010) به خاطر اثرات ضد افسردگی (Khaki et al., 2012)، ضد آرتروز (Fletcher et al., 2005) و ضد سرطان (Shahadat Hossan et al., 2014) اهمیت ویژه ای دارد. بادرنجبویه در کنار رزمارینیک اسید حاوی فلاونوئیدهایی مانند سیناروزید، کاسموزین، ایزوکوئرستین و رامنوسیتین (Ondrejovic et al., 2012) است.

کاربرد برون زای برخی از ترکیبات از جمله تنظیم کننده های رشد با فعال کردن ژن های مسیر سنتز متابولیت های ثانوی به افزایش تجمع این متابولیت ها منجر می شود. سالیسیلیک اسید یک تنظیم کننده رشد گیاهی با ماهیت فنلی است که در فرایندهای فیزیولوژیکی متعددی از قبیل مقاومت در برابر پاتوژنها، ایجاد گرما در گل آذین شیپوری، القای گل دهی در برخی از گیاهان، کنترل جذب یون توسط ریشه و هدایت روزه ای شرکت می کند (Raskin, 1992; Hayat et al., 2008). کاربرد برون زای سالیسیلیک اسید، تحمل گیاه در برابر فلزات سمی، گرما، سرما و تنش شوری را بهبود می دهد (Sakhanokho & Kelley, 2009; Rowshan et al., 2010; Kiarostami et al., 2013). بیان برخی از ژن های تولید کننده متابولیت های ثانوی تحت

تأثیر سالیسیلیک اسید القا می شود. آنزیم های مسیر فنیل پروپانویید در گیاه تحت تأثیر سالیسیلیک اسید قرار می گیرند و میزان برخی از متابولیت های ثانوی مانند ترکیبات فنلی را افزایش می دهند (Buitelaar et al., 1992).

سالیسیلیک اسید فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) را تنظیم می کند. این آنزیم واکنش های بیوسنتزی تشکیل ترکیبات دفاعی را کاتالیز می کند. گزارش های معدودی در مورد اثر سالیسیلیک اسید بر سنتز متابولیت های ثانوی وجود دارد. به گزارش شبرنگی و بیگی جازی (2014) محتوای ترکیبات فنلی در گیاه نعنا فلفلی (*Mentha piperita* L.) با افزودن سالیسیلیک اسید افزایش و محتوای ترکیبات فلاونوئیدی کاهش یافت. به گزارش Dogbo و همکاران (2012) فعالیت آنزیم PAL در گیاه کاساوا (*Manihot esculenta*) تحت تأثیر سالیسیلیک اسید به میزان زیاد افزایش یافت و به دنبال آن افزایش ترکیبات فنلی مشاهده شد. در غلظت های بسیار بالای سالیسیلیک اسید فعالیت آنزیم PAL کاهش یافت. براساس گزارش Matkowski (2008) سالیسیلیک اسید در کشت ریشه موئن گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*) از طریق فعال کردن سیستم دفاعی گیاه و به دنبال آن القای مسیر فنیل پروپانویید باعث افزایش تولید رزمارینیک اسید شد. طبق گزارش Brandão و همکاران (2014) سالیسیلیک اسید در آناگالیس (*Anagallis tenella*) سنتز بتاسیانین را افزایش می دهد ولی باعث افزایش در غلظت فلاونوئیدها نمی شود، احتمالاً به این علت که پیش ساز مشترک دو ترکیب، تیروزین است که ترجیحاً به بتاسیانین تبدیل می شود.

گیاه بادرنجبویه عمدتاً از طریق کشت بذر تکثیر می شود. تکثیر از طریق کشت بذر با مشکلاتی همراه است. از جمله روند سبز شدن بذر طولانی است و گیاهچه ها در مراحل اول زندگی رشد کندی دارند. برای تکثیر سریع گونه ها یا گونه هایی که تکثیر آنها با مشکلاتی همراه است از روش ریزازدیادی استفاده می شود. از آن جایی که تکثیر گیاه بادرنجبویه در طبیعت به کندی انجام می شود، تکثیر نوساخه ها در محیط کشت می تواند روشی جایگزین برای تولید انبوه بخش های دارویی و مورد استفاده این گیاه باشد. به علاوه دست ورزی شرایط کشت می تواند به ایجاد نمونه های با متابولیت های دارویی بیشتر منجر شود. مطالعات چندی پیرامون ریزازدیادی گیاه بادرنجبویه انجام شده است (Ebrahimi et al.,

رزمارینیک اسید با استفاده از منحنی استاندارد رزمارینیک اسید با غلظت‌های ۰ تا ۳۵ (μg/ml RA) تعیین شد (Lopez- Arnolds et al., 1995).

برای سنجش ترکیبات فنلی به ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره گیاهی ۱/۸ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۲ میلی‌لیتر معرف فولن-سیوکالتو و ۳ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷٪ اضافه شد و بعد از ۹۰ دقیقه جذب در ۷۵۰ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های ۰ تا ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گالیک اسید استفاده شد (Lopez- Arnolds et al., 2001).

مقدار ترکیبات فلاونوئیدی عصاره‌ها با استفاده از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم در طول موج ۴۱۴ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های ۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کوئرستین استفاده شد (Kulic et al., 2008).

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها سنجش فعالیت جاروب‌کنندگی رادیکال آزاد با ۲۰۲ دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)

برای سنجش فعالیت جاروب‌کنندگی رادیکال آزاد با DPPH غلظت‌های ۰/۰۱ تا ۰/۱۵ میلی‌گرم از عصاره با متانل مطلق به حجم ۱ میلی‌لیتر رسید و با ۱ میلی‌لیتر DPPH (۰/۰۰۰۴ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانل مطلق) مخلوط شد و حجم آن با متانل مطلق به ۳ میلی‌لیتر رسید. پس از ۱۵ دقیقه جذب در مقابل بلانک (۱ میلی‌لیتر DPPH و ۲ میلی‌لیتر متانل) در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. درصد مهار رادیکال آزاد توسط عصاره گیاهی با استفاده از فرمول زیر بدست آمد:

$$(IC\%) = (A_{blank} - A_{sample}) / A_{blank} \times 100$$

در این فرمول A_{blank} جذب کنترل و A_{sample} جذب محلول حاوی نمونه گیاهی است (Molyneux, 2004).

سنجش قدرت کاهشی یا Reducing Power (RP)

۰/۲ میلی‌لیتر عصاره با ۰/۵ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۰/۲ مولار (pH=۶/۶) و ۰/۵ میلی‌لیتر از پتاسیم فری سیانیدین ۱ درصد مخلوط و در ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. بعد از خنک شدن ۰/۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد (W/V) اضافه و سپس سانتریفیوژ شد (1000g، به مدت ۱۰ دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد).

به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رو شناور، ۰/۵ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر ۰/۱ میلی‌لیتر فریک کلرید ۰/۱ درصد (W/V) اضافه و

Meftahizade et al., 2010; Meftahizade et al., 2012; Mohebalipour et al., 2012). ولی تاکنون ترکیبات فعال زیستی گیاهان تکثیر شده مورد بررسی قرار نگرفته است. این پژوهش با هدف بررسی اثر غلظت‌های متفاوت سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی محتوای ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و رزمارینیک اسید در نوشاخه‌های تکثیر شده گیاه بادرنجبویه در کشت درون شیشه‌ای گیاه انجام شده است.

مواد و روش‌ها

کشت بذر و تکثیر و تیمار نوشاخه‌ها

بذر گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) از پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی تهیه شد. برای سترون سازی، بذرهای گیاه پس از شستشو با آب محتوی چند قطره شوینده در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه قرار گرفتند. سپس با هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شده و ۳ بار با آب مقطر سترون شست و شو شدند. بذرهای سترون به محیط کشت MS بدون هورمون انتقال یافتند. همه کشت‌ها در اتاق کشت با دمای 25 ± 2 درجه سانتیگراد تحت یک چرخه تاریکی- نور ۱۶/۸ ساعت به وسیله نور فلورسنت با انرژی ۵۴ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه قرار گرفتند.

راس‌های نوساقه‌های ۱۵ روزه حاصل از کشت بذر به طول تقریبی ۵ cm، جهت تکثیر به محیط کشت MS حاوی ۲ mg/l BAP منتقل شدند. پس از یک ماه نوشاخه‌های حاصل به محیط کشت MS حاوی غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومول سالیسیلیک اسید انتقال یافتند. ۴، ۷، ۱۰ و ۱۴ روز پس از تیمار با سالیسیلیک اسید، نوشاخه‌ها جمع‌آوری و جهت عصاره‌گیری و سنجش مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه عصاره متانلی

برای تهیه عصاره از روش Conde و همکاران (1995) با کمی تغییر استفاده شد. ۰/۲ گرم پودر خشک گیاه با ۲۰ میلی‌لیتر متانل ۸۰ درصد سائیده شد و به مدت ۹۰ دقیقه در بن ماری ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. عصاره‌های حاصل پس از صاف شدن برای انجام سنجش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

سنجش رزمارینیک اسید، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی

برای سنجش رزمارینیک اسید جذب عصاره‌های متانلی حاصل از برگ گیاه در طول موج ۳۳۳ نانومتر بررسی شد و میزان

کاهش می‌دهد (۲۲۹۸/۵۲) (جدول ۱).
 $\pm 27/46 \mu \text{mol ASA}$ در همین تیمار مشاهده شد.

در غیاب سالیسیلیک اسید مقدار رزمارینیک اسید با افزایش زمان افزایش یافت و در ۱۴ روز به بیشترین میزان خود رسید ($96/17 \pm 0/7 \text{ mg/g DW}$). این وضعیت در نوشاخه‌های تیمار شده با سالیسیلیک اسید هم مشاهده شد. مؤثرترین غلظت برای سنتز رزمارینیک اسید غلظت ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید بود ($11/142 \pm 4/93 \text{ mg/g DW}$ در روز ۱۴). غلظت ۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید در روز ۱۴ اثر بیشتری بر سنتز ترکیبات فلاونوئیدی داشت ($60/947 \pm 0/94 \text{ mg/g DW}$). در کل سالیسیلیک اسید با غلظت ۱۰۰ میکرومولار در روز ۱۴ مؤثرتر تشخیص داده شد. با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید کاهش در پارامترهای اندازه‌گیری شده مشاهده شد (جدول ۱).

بحث

سالیسیلیک اسید و مشتقات آن بر فعالیت‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه تأثیر می‌گذارند و نقش کلیدی در تنظیم رشد و تولید متابولیتها در گیاه دارند. افشانه کردن سالیسیلیک اسید به جوانه‌های گیاه جو این نتایج را تأیید می‌کند (Pancheva et al., 1996). سالیسیلیک اسید با فعال‌سازی گروه مشخصی از ژنهای مرتبط با دفاع و تحریک سیستم دفاعی گیاه، تولید متابولیت‌های ثانوی با فعالیت آنتی اکسیدانی را افزایش می‌دهد (Lee et al., 2003). سالیسیلیک اسید با جلوگیری از فعالیت آنزیم کاتالاز و افزایش تولید H_2O_2 سیستم دفاعی گیاه را فعال می‌کند (Chen et al., 1993).

بر اساس یافته‌های این پژوهش سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنتی-اکسیدانی نوشاخه‌ها اثر مطلوب داشت. بیشترین فعالیت آنتی-اکسیدانی با روش جاروب‌کنندگی رادیکال آزاد (DPPH) و سنجش قدرات احیایی (RP) در نوشاخه‌های تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید در روز ۱۴ مشاهده شد که متناسب با بیشترین مقدار ترکیبات فنلی و رزمارینیک اسید بود. بیشترین درصد جاروب‌کنندگی آنیون سوپراکسید در غلظت ۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید در روز ۱۴ مشاهده شد که متناسب با بیشترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی بود. به گزارش Ghorbani و همکاران (2013) در بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنتی اکسیدانی و ترکیبات ثانوی بنفشه عطری (*Viola cornuta* L.)،

جذب در ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. قدرت کاهشی به عنوان میکرومول آسکوربیک اسید معادل گرم خالص وزن تر بیان شد. از منحنی استاندارد آسکوربیک اسید در دامنه ۰ تا ۱۰۰ میکرومولار برای کالیبر کردن استفاده شد (Niciforovica et al., 2010).

سنجش فعالیت جاروب‌کنندگی آنیون سوپراکسید

۹ میلی لیتر بافر تریس - HCl (۵۰ میلی مولار و $\text{pH}=8/2$) در لوله آزمایش ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۲۵ درجه قرار داده شد. ۴۰ میکرولیتر محلول پیروگال (۴۵ میلی مولار پیروگال در ۱۰ میلی مولار HCl) به ترکیب بالا اضافه و بعد از ۳ دقیقه آنکوبه شدن در بن ماری ۲۵ درجه، یک قطره آسکوربیک اسید ۵ درصد به آن اضافه شد. بعد از ۵ دقیقه جذب آن در ۴۹۰ نانومتر خوانده و بعنوان A_0 در نظر گرفته شد. در لوله دیگر به جای آسکوربیک اسید عصاره گیاهی ریخته شد و جذب آن بعد از ۵ دقیقه در ۴۹۰ نانومتر خوانده شد و بعنوان A_1 در نظر گرفته شد. در A_2 که به عنوان شاهد در نظر گرفته شد به جای عصاره آب مقطر ریخته شد. درصد جاروب‌کنندگی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Jiao et al., 2005):

$$\text{درصد جاروب‌کنندگی رادیکال آزاد} = \frac{(A_0 - (A_1 - A_2)) \times 100}{A_0}$$

تحلیل آماری

آزمایش‌ها بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. در موارد معنی دار بودن تفاوت‌ها در آنالیز واریانس یک طرفه از آزمون Duncan جهت مقایسه میانگین‌ها استفاده شد. آنالیز آماری به کمک نرم افزار SPSS۲۱ و با ضریب اطمینان ۹۵ درصد صورت گرفت.

نتایج

در غیاب سالیسیلیک اسید بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی با قدرت کاهشی در روز ۱۴ و بیشترین درصد فعالیت آنیون سوپراکسید در روز چهارم مشاهده شد ($27/971 \pm 83/43$). غلظت ۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید در روز ۱۴ بیشترین تأثیر را بر درصد فعالیت آنیون سوپراکسید داشت ($1/78 \pm 98/96$).

تغییرات ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و میزان IC_{50} در غیاب سالیسیلیک اسید خیلی محسوس نبود و غلظت ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید در روز ۱۴ موجب افزایش مقدار ترکیبات فنلی شد ($6/56 \pm 0/13 \text{ mg/g DW}$) و کمترین مقدار IC_{50} ($0/003 \pm 0/013$) و بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی با قدرت

جدول ۱- میانگین مقدار رزمارینیک اسید، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و فعالیت آنتی اکسیدانی در نوشاخه های تکثیر شده گیاه بادرنجبویه ۱۰، ۷، ۴ و ۱۴ روز پس از افزودن سالیسیلیک اسید. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح $p \leq 0.05$.

Table 1. The mean of Rosmarinic acid, phenolics and flavonoid compounds amounts and antioxidant activity in proliferated shoots of *Melissa officinalis* 4, 7, 10 and 14, days after adding salicylic acid. Similar letters indicate no significant difference at the level of $p \leq 0.05$.

سالیسیلیک اسید (μM)	روز	رزمارینیک اسید (μg/ml RA)	ترکیبات فنلی (mgGA/gdw)	ترکیبات فلاونوئیدی (mgQE/gdw)	IC50 (μg/ml)	قدرت کاهشی (μM/ASA)	درصد جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید
۰	۴	۵۰/۱۳۳±۱/۴۸ ^a	۵/۳۶±۰/۰۵ ^{cde}	۴/۹۱±۰/۴۴ ^{de}	۰/۰۲۰±۰/۰۰۳ ^{de}	۸۹۷/۴۳±۲۷/۹۷ ^{cd}	۹۱/۸۷±۱/۰۸ ^{ef}
۰	۷	۴۵/۶۳۳±۰/۴۳ ^a	۵/۱۶±۰/۰۵ ^{bcd}	۴/۷۴±۰/۴۴ ^{de}	۰/۰۲۵±۰/۰۰۶ ^{fg}	۷۶۳/۱۲±۲۲/۰۱ ^a	۸۹/۹۹±۱/۰۸ ^{de}
۰	۱۰	۶۵/۹۶۵±۰/۷۴ ^b	۵/۰۶±۰/۰۵ ^b	۲/۵۴±۰/۲۹ ^a	۰/۰۲۷±۰/۰۰۳ ^{hi}	۷۵۰/۹۱±۳۶/۶۳ ^{ab}	۶۶/۸۷±۰/۶۲ ^b
۰	۱۴	۱۰۷/۸۵۳±۱۲/۳۵ ^d	۵/۲۱±۰/۰۱ ^{bcd}	۴/۷۴±۰/۱۷ ^{de}	۰/۰۲۳±۰/۰۰۳ ^f	۱۲۰۸/۷۸±۲۷/۹۷ ^g	۸۳/۴۳±۰/۵۳ ^{cd}
۵۰	۴	۷۸/۴۰۰±۱/۲۵ ^{bc}	۵/۴۱±۰/۰۸ ^{de}	۳/۸۹±۰/۳۶ ^{bcd}	۰/۰۱۹±۰/۰۰۰۸ ^{cd}	۸۹۷/۴۳±۳۸/۱۲ ^{cd}	۸۸/۱۲±۱/۰۸ ^{de}
۵۰	۷	۸۱/۵۳۳±۱/۷۸ ^c	۵/۵۶±۰/۰۸ ^e	۳/۲۱±۰/۱۶ ^{ab}	۰/۰۱۷±۰/۰۰۰۳ ^c	۱۰۴۳/۹۵±۳۱/۷۲ ^{ef}	۷۰/۰۹±۲/۷۲ ^b
۵۰	۱۰	۷۳/۶۰۰±۲/۹۹ ^{bc}	۵/۲۱±۰/۰۵ ^{bcd}	۵/۷۶±۰/۱۷ ^{ab}	۰/۰۲۴±۰/۰۰۳ ^f	۸۷۹/۱۱±۵۸/۸۷ ^{bc}	۸۹/۶۸±۳/۵۷ ^{de}
۵۰	۱۴	۱۰۹/۵۵۶±۲/۶۵ ^d	۵/۱۶±۰/۰۵ ^{bcd}	۶/۷۷±۰/۹۴ ^f	۰/۰۲۵±۰/۰۰۳ ^{fg}	۱۷۰۹/۳۹±۶۰/۱۲ ⁱ	۹۸/۹۶±۱/۷۸ ^g
۱۰۰	۴	۶۵/۹۶۰±۳/۹۶ ^b	۵/۵۶±۰/۰۸ ^e	۵/۷۶±۰/۳۴ ^{ef}	۰/۰۱۷±۰/۰۰۱۴ ^c	۱۴۴۰/۷۷±۴۹/۹۶ ^h	۷۹/۳۷±۱/۰۳ ^c
۱۰۰	۷	۵۳/۵۰۶±۰/۶۳ ^a	۵/۰۶±۰/۰۵ ^b	۴/۵۷±۰/۲۹ ^d	۰/۰۲۸±۰/۰۰۰۳ ⁱ	۹۴۶/۲۷±۲۶/۱۰ ^{cde}	۸۶/۵۰±۱/۷۸ ^{cde}
۱۰۰	۱۰	۶۹/۰۷۶±۳/۱۱ ^b	۵/۳۱±۰/۰۱ ^{bcd}	۵/۰۸±۰/۲۹ ^{de}	۰/۰۲۱±۰/۰۰۰۸ ^e	۱۰۵۶/۱۶±۴۹/۹۶ ^{ef}	۹۱/۲۳±۰/۸۹ ^{ef}
۱۰۰	۱۴	۱۴۲/۱۱۰±۴/۹۳ ^e	۶/۵۶±۰/۱۳ ^g	۳/۳۸±۰/۱۶ ^{abc}	۰/۰۱۳±۰/۰۰۰۳ ^a	۲۲۴۶/۶۳±۵۴/۲۵ ^j	۸۰/۴۰±۱/۷۸ ^c
۲۰۰	۴	۷۱/۹۰۶±۱/۹۸ ^{bc}	۵/۸۶±۰ ^f	۴/۰۶±۰/۲۹ ^{bcd}	۰/۰۱۵±۰/۰۰۰۳ ^b	۱۳۹۸/۰۳±۵۴/۲۶ ^h	۸۹/۶۸±۱/۷۸ ^{de}
۲۰۰	۷	۶۷/۶۵۶±۰/۲۸ ^b	۵/۲۱±۰/۰۵ ^{bcd}	۳/۸۹±۰/۱۷ ^{bcd}	۰/۰۲۳±۰/۰۰۰۳ ^f	۱۰۱۳/۴۳±۲۴/۴۲ ^{def}	۹۱/۲۳±۰/۸۹ ^{ef}
۲۰۰	۱۰	۸۳/۸۶۳±۲/۲۰ ^c	۵/۱۱±۰/۱۵ ^{bc}	۴/۴۰±۰/۱۷ ^{cd}	۰/۰۲۶±۰/۰۰۰۳ ^{gh}	۱۱۰۵/۰۰±۱۲/۲۱ ^{fg}	۹۷/۴۱±۶/۲۴ ^{fg}
۲۰۰	۱۴	۱۰۲/۳۳۳±۱/۵۳ ^d	۴/۷۶±۰/۱۳ ^a	۲/۵۴±۰ ^a	۰/۰۳۰±۰/۰۰۰۶ ^j	۱۰۰۱/۲۱±۳۷/۱۳ ^{cdef}	۵۶/۶۹±۲/۷۲ ^a

ترکیبات فلاونوئیدی در جاروب کردن آنیون سوپراکسید نقش دارند و در نتایج ما بیشترین مقدار فلاونوئید متناسب با بیشترین درصد جاروب کردن آنیون سوپراکسید بود. با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید مقدار فلاونوئیدها کاهش یافت. از آن جایی که مقدار کل ترکیبات فنلی با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید تغییر زیادی نشان نداد، می توان این فرایند را به ستر سایر ترکیبات آنتی-اکسیدانی نسبت داد. در گیاه آناگالیس (*Anagallis tenella* L.) استفاده از سالیسیلیک اسید باعث افزایش ستر بتاسیانین شد ولی مقدار فلاونوئیدها را افزایش نداد. احتمالاً به این علت که پیش ساز

افزایش مقدار سالیسیلیک اسید اثر معنی داری بر افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی با روش جاروب کنندگی رادیکال آزاد (DPPH) داشت. این فرایند به اثر سالیسیلیک اسید بر افزایش غلظت ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالاز نسبت داده شد. این نتایج در راستای نتایج این پژوهش است.

بررسی ما با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید درصد جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید کاهش یافت و غلظت ۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید اثر بیشتری بر درصد جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید داشت. به گزارش Robak و Glyglewski (1988)

(2014) در گیاه نعنا (*Mentha piperita* L.) مطابقت داشت. به گزارش این محققین محتوای ترکیبات فنلی در حضور سالیسیلیک اسید افزایش یافت اما مقدار فلاونوئیدها کاهش یافت (Shabrangi & BeigiJazi, 2014). به گزارش Nicholson و Hammerschmidt (1992) غلظت پایین سالیسیلیک اسید مانع فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز می شود که یک آنزیم کلیدی در مسیر سنتز ترکیبات فنلی است ولی فعالیت چالکون سنتاز (CS) آنزیم کلیدی مسیر سنتز فلاونوئیدها را تحریک می کند. همچنین سبب فعال شدن سیستم دفاع آنتی اکسیدانی و تولید متابولیت های ثانوی می شود. غلظت الیستور مورد استفاده از عوامل مؤثر در مقدار سنتز متابولیت های ثانوی است. از این رو علت تفاوت در نتایج محققین مختلف را می توان به غلظت سالیسیلیک اسید مورد استفاده نسبت داد (Namdeo, 2007).

در مجموع سالیسیلیک اسید به ویژه در غلظت ۱۰۰ میکرومولار بر فعالیت آنتی اکسیدانی و ترکیبات آنتی اکسیدانی گیاه بادرنجبویه اثر مثبت دارد و می توان با کاربرد این تنظیم کننده رشد، گیاهانی با محتوای بالاتر متابولیت های دارویی با ارزش مانند رزمارینیک اسید و گیاهانی با فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتر به دست آورد. غلظت و زمان تأثیر الیستور از عوامل مؤثر بر سنتز متابولیت های ثانوی است (Namdeo, 2007) و در این پژوهش زمان ۱۴ روز مناسب تر تشخیص داده شد. افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی تحت تأثیر سالیسیلیک اسید به توانایی این ماده در تولید H_2O_2 و القای سیستم دفاع آنتی اکسیدانی و به دنبال آن تغییر در بیان ژنها و افزایش مقدار پروتئینها و فعالیت آنزیم های دخیل در مکانیسم دفاع آنتی اکسیدانی بستگی دارد (Wang et al., 2015). شناخت مکانیسم دقیق تر اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنتی اکسیدانی به پژوهش های بیشتری نیاز دارد.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه الزهرا به دلیل حمایت مالی از پژوهش حاضر قدردانی می کنند.

REFERENCES

- Brandão, I.R., Kleinowski, A.M., Einhardt, A.M., Lima, M.C., Amarante, L.D., Peters, J.A. and Braga, E.J.B. 2014. Salicylic acid on antioxidant activity and betacyanin production from leaves of *Alternanthera tenella*. – Ciênc. Rural. 44: 1893-1898.

مشترک دو ترکیب، تیروزین است که ترجیحا به بتاسیانین تبدیل می شود (Brandão et al., 2014).

در این پژوهش با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید تا ۱۰۰ میکرومولار، مقدار رزمارینیک اسید، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی افزایش یافت و با افزایش غلظت به ۲۰۰ میکرومولار روند کاهشی آغاز شد. میزان اثر محرکها بر تولید متابولیت های ثانوی در کشت درون شیشه ای به غلظت ماده محرک و زمان تأثیر بستگی دارد (Wen et al., 2008). غلظت بالای برخی از محرکها (بیشتر از مقدار بهینه مؤثر برای گیاه) مانند سالیسیلیک اسید سبب القای پاسخ فوق حساس (hypersensitive response) و مرگ سلولی می شود، در حالی که غلظت های بهینه این ترکیبات با القای پاسخ دفاعی موجب افزایش تولید متابولیت های ثانوی و افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی می شوند که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. افزایش سنتز ترکیبات فنلی به افزایش فعالیت آنزیم های درگیر در مسیر سنتز این ترکیبات از جمله فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) و تیروزین آمین ترانسفراز بستگی دارد. فعالیت آنزیم PAL تحت تأثیر سالیسیلیک اسید به ویژه در غلظت ۱۰۰ میکرومولار به میزان زیاد افزایش یافته و به دنبال آن افزایش ترکیبات فنلی مشاهده می شود. با افزایش غلظت به ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار فعالیت آنزیم کاهش یافت (Dogbo et al., 2012).

آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز نقش مهمی در انتقال، تحریک و سنتز ترکیبات مسیر فنیل پروپانویید و تنظیم بیان ژنهای دفاعی به عهده دارد. افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز (PAL)، سنتز ترکیبات مشتق شده از مسیر فنیل پروپانویید را افزایش می دهد. سالیسیلیک اسید می تواند با اثر بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز سنتز ترکیبات مسیر فنیل پروپانویید را تحت تأثیر قرار دهد (Nurgroho et al., 2002). در کشت ریشه موئی گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) سالیسیلیک اسید با فعال کردن سیستم دفاعی گیاه و به دنبال آن القای مسیر فنیل پروپانویید باعث افزایش تولید رزمارینیک اسید شد (Matkowski, 2008). در این پژوهش بیشترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی در نوشاخه های تیمار شده با غلظت ۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید در روز ۱۴ مشاهده شد که با نتایج Nicholson و Hammerschmidt (1992) مطابقت داشت. کاهش در مقدار ترکیبات فلاونوئیدی با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید با نتایج Shabrangi و Beigijazi

- Buitelaar, R.M., Casário, M.T. and Tramper, J. 1992. Elicitation of thiophene production by hairy roots of *Tagetespatula*. – Enzy. Microbiol. Technol. 14: 2-7.
- Chen, Z., Silva, S. and Klessig, D.F. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. – Science 262: 1883-1886.
- Conde, E., Cadahia, E. and Garcia-Vallejo, M.C. 1995. HPLC analysis of flavonoids and phenolic acids and aldehydes in Eucalyptus spp. – Chromatographia 41:657-660.
- Dogbo, D.O., Gogbeu, S.J., N'zue., B., Yao, K.A., Zohouri, G.P., Mamyrbekova-Bekro, J.A. and Bekro Y.A. 2012. Comparative activities of phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase and phenolic compounds accumulated in Cassava elicited cell. – Afri. Crop. Sci. J. 20: 85-94.
- Ebrahimi, M., Kiarostami, Kh. and Nazem Bokae, Z. 2015. The effect of different concentrations of kinetin on *Melissa officinalis* micropropagation and rosmarinic acid content in tissue culture. 18th National and 6th International Congress of Biology, Tehran. pp: 26-29.
- Fletcher, R.S., Slimmon, T., McAuley, C.Y and Kott, L. 2005. Heat stress reduces the accumulation of rosmarinic acid and the total antioxidant capacity in spearmint (*Mentha spicata* L.). – Sci. Food . Agri. 85: 2429-2436.
- Gorbani, N., Moradi, H., Akbarpour, A. and Ghasem-nezhad, A. 2013. The phytochemical changes of violet flowers (*Viola cornuta*) response to exogenous salicylic acid hormone. – JCHR. 3:1-8.
- Hayat, S., Hasan, S.A., Fariduddin, Q. and Ahmad, A. 2008. Growth of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in response to salicylic acid under water stress. – Int. J. Plant. Sci. 3: 297-304.
- Jiao, Z, Liu, J. and Wang, S. 2005. Antioxidant activity of total pigment extract from Blackberries – Food. Technol. Biotech. 43 : 97-102.
- Kiarostami, Kh., abdolmaleki, N. and Heydari, M. 2013. Effect of salicylic acid on salinity stress reduction in canola. – Plant Biol. 4: 69- 82.
- Kulic-Bilusic, T., Katalinic, V., Dragovic-Uzelac, V., Ljubenkovic, I., Krisko, A., Dejanovic, B. and Jukic, M. 2008. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibiting activity of several aqueous tea infusions in vitro – Food. Technol. Biotech. 46: 368-375.
- Khaki, A., Imani, S.A.M. and Golzar, S. 2012. Effects of rosmarinic acid on male sex hormones (testosterone-FSH-LH) and testis tissue apoptosis after exposure to electromagnetic field (EMF) in rats. – Afr. J. Pharm. Pharmacol. 6: 248-252.
- Lee, S.E., Hwang, H.J., Ha, J.S., Jeong, H.S. and Kim, J.H. 2003. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. – Life. Sci. 73: 167-179.
- Lopez-Arnaldos, T., Lopez-Serrano, M., Ros., Barcelo, A., Calderon, A.A. and Zapata, J.M. 1995. Spectrophotometric determination of rosmarinic acid in plant cell cultures by complexation with Fe²⁺ ions. – Fresen. J. Anal. Chem.- 351: 311-314.
- López Arnaldos, T., Muñoz, R., Ferrer, M.A and Calderón, A.A. 2001. Change in phenol content during strawberry callus. – Plant. Physiol. 113:315-322.
- Matkowski, A. 2008. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants. – Biotechnol. Adv. 26: 548-560.
- Meftahizade, H., Moradkhani, H., Naseri, B., Lotfi, M. and Naseri, A. 2010. Improved *in vitro* culture and micropropagation of different *Melissa officinalis* L. genotypes. – J. Med. Plants. Res. 4: 240-246.
- Meftahizade, M., Lotfi, M. and Moradkhani, H. 2012. Optimization of micropropagation and establishment of cell suspension culture in *Melissa officinalis* L. – Afr. J. Biotechnol. 9: 4314-4321.
- Mohebalipour, N., Aharizad, S., Mohammadi, S., Motalebiazar, A. and Arefi, H.M. 2012 . Effect of .plant growth regulators BAP and IAA on micropropagation of Iranian lemon balm (*Melissa officinalis* L.) landraces. – J. Food. Agric. Environ. 10: 280-286.
- Mohamadi, S., Kiarostami, Kh. and Nazem Bokaii, Z. 2014. The Study of antioxidant property of metanolic extracts of *Melissa officinalis* L. and *Salvia officinalis* L. on stability of soybean oil. – J. Agroaliment. Proc. Technol. 20: 293-297.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. – J. Sci. Technol. 26: 211-219.
- Namdeo, A.G. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites-A review. – Pharm. Rev. 1: 69-79.
- Niciforovic, N., Mihailovic, V., Maskovic, P., Solujic, S., Stojkovic, A. and PavlovicMuratspahic, D. 2010. Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants. – Food Chem. Toxicol. 48: 3125-3130.
- Nicholson, R.L. and Hammerschmidt, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. – Annu. Rev. Phytopathol. 30: 369-389.
- Nurgroho, L.H., Verberne, M.C and Verpoorte, R. 2002 .Activities of enzymes involved in the phenylpropanoid pathway in constitutively salicylic acid-producing tobacco plants. – Plant Physiol. Bioch. 40: 755-760.
- Ozturk, M.E., Duru, M., Burco, I., Harmandar, M. and Topcu, G. 2010. A new rapid spectrophotometric method to determine the rosmarinic acid level in plant extracts. – Food. Chem. 123. 1352-1356.
- Ondrejovic, M., Kraic, F., Benkovicova, H. and Silhar, S. 2012. Optimization of antioxidant extraction from Lemon Balm (*Melissa officinalis*). – Czech. J. Food. Sci. 30: 385-393.
- Pancheva, T.V., Popova, L.P. and Uzunova, A.N. 1996. Effect of salicylic acid on growth and photosynthesis in barley plants. – J. Plant. Physiol. 149: 57-63.
- Peeva, G., Penchevb, P., Pesheva, D. and Angelovb, G. 2011. Solvent extraction of rosmarinic acid from lemon balm and concentration of extracts by nanofiltration: Effect of plant pre-treatment by supercritical carbon dioxide. – Chem. Eng. Res. Des. 89: 2236-2243.

- Raskin, I. 1992. Role of salicylic acid in plants. – Annu. Rev. Plant Biol. 43: 439-463.
- Raghavendra, H., Vijayananda, B., Madhumathi, G. and Hiremath, A. 2010. In vitro antioxidant activity of *Vitexnegundo* L. Leaf extracts. – Chiang Mai. J. Sci. 37: 489-497.
- Robak, J. and Gryglewski, R.J. 1988. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. – Biochem. Pharmacol. 37: 837-841.
- Rowshan, V., Khosh Khoi, M. and Javidnia, K. 2010. Effects of salicylic acid on quality and quantity of essential oil components in *Salvia macrosiphon*. – J. Biol. Environ. Sci. 4: 77-82.
- Sakhanokho, H.F. and Kelley, R.Y. 2009. Influence of salicylic acid on in vitro propagation and salt tolerance in *Hibiscus acetosella* and *Hibiscus moscheutos* (cv 'Luna Red'). – Afr. J. Biotechnol. 8: 1474-1481.
- Shabrangi, A. and BeigiJazi, E.A. 2014. Effect of salicylic acid on the amount of essential oil, phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity of *Mentha piperita* L. – Int. J. Agric. Crop. Sci. 7-8: 499-502.
- Shahadat Hossan, M.D., Shiblur Rahman, A.B.M., Anwarul Bashir, A.B.M. and Rahmatollah, M. 2014. Rosmarinic acid: A review of its anticancer. – W. J. Pharm. Pharmace. Sci. 3: 57-70
- Weitzel, C. and Petersen, M. 2011. Cloning and characterisation of rosmarinic acid synthase from *Melissa officinalis* L. – Phytochem. 72 : 572-578.
- Wang, Z., Ma, L., Zhang, X., Xu, L., Cao, J. and Jiang, W. 2015. The effect of exogenous salicylic acid on antioxidant activity, bioactive compounds and antioxidant system in apricot fruit. – Scientia. Hort. 181: 113-120.
- Wen, P.F., Chen, J.Y., Wan, S.B., Kong, W.F., Zhang, P., Wang, W., Zhan, J.C., Pan, Q.H. and Huang, W.D. 2008. Salicylic acid activates phenylalanine ammonia lyase in grape berry in response to high temperature stress. – Plant .G. Regu 55: 1-10.
- Yosofi, M., Hojjati, M.R., Moshtaghi, E., Rahimiyan, R., Dawodiyan Dehkordi, A. and Rafieian, M. 2011. The effect of hydro-alcoholic extract of *Melissa officinalis* on learning and spatial memory in Balb/c mice. – J. Shahrekord. Uni. Med. Sci. 13: 51-59.

How to cite this article:

Ebrahimi, M., Kiarostami, Kh. and Nazem Bokaei, Z. 2019. Effect of salicylic acid on antioxidant properties of in vitro proliferated shoots of *Melissa officinalis* L. – Nova Biol. Reperta 5: 420-427.

ابراهیمی، م.، کیارستمی، خ. و ناظم‌بکایی، ز. ۱۳۹۷. بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی نوشاخه‌های تکثیرشده گیاه بادرنجبویه در کشت درون شیشه‌ای. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۵: ۴۲۰-۴۲۷.