DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2014.10709

دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۰، شماره ۵، صفحه ۷۲۳-۷۱۴ (۱۳۹۳)

تأثیر مثبت الیسیتورهای عصاره مخمر و مس بر محتوای رزمارینیک اسید در گیاه بادرنجبویه (*Melissa offisinalis* L.)

علی ریاحی مدوار[۱*]، کبری یوسفی[۲] و معین‌الدین نصیری بزنجانی[۲]

۱*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، پست الکترونیک: ariahi@icst.ac.ir

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۱ تاریخ اصلاح نهایی: فروردین ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۲

چکیده

گیاه بادرنجبویه (*Melissa offisinalis* L.) از خانواده نعناعیان است و دارای خواص دارویی ضدباکتریایی، ضدافسردگی، ضدالتهابی، ضدسرطانی و ضدویروسی می‌باشد. بیشتر اثرات دارویی این گیاه را به ماده مؤثره آن یعنی رزمارینیک اسید نسبت می‌دهند. در این تحقیق، اثر غلظت‌های مختلف الیسیتورهای عصاره مخمر (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) و مس به فرم سولفاته (۰، ۴، ۸ و ۱۶ میکرومولار) در زمان‌های متفاوت (۴، ۸ و ۱۶ ساعت) بر مقدار رزمارینیک اسید و محتوای فلاونوئید کل در گیاهچه‌های بادرنجبویه ۳۰ روزه رشد یافته در شرایط گلخانه‌ای بررسی گردید. نتایج نشان‌دهنده اثرات مثبت و معنی‌دار عصاره مخمر بر مقدار رزمارینیک اسید، به‌ویژه در زمان‌های ۴ و ۸ ساعت می‌باشد. بیشترین مقدار این ماده در تیمار گیاهچه‌ها با غلظت ۱mg/mL این الیسیتور و در زمان ۸ ساعت مشاهده شد. از طرف دیگر، الیسیتور مس در تمامی غلظت‌های مورد استفاده و دوره‌های زمانی تیمار (بجز غلظت ۴ µM در مدت زمان ۱۶ ساعت) باعث افزایش معنی‌دار مقدار رزمارینیک اسید شد. به‌طوری که غلظت ۸µM این الیسیتور در زمان ۸ ساعت تیمار مقدار رزمارینیک اسید را حدود ۷ برابر افزایش داد. بنابراین چنین به‌نظر می‌رسد که افزایش محتوای این ماده مؤثره در گیاهچه‌های تحت تیمار با این الیسیتورها، به‌دلیل القای سنتز گونه‌های فعال اکسیژن و تولید جاسمونات‌ها و در نتیجه فعال شدن ژن‌های درگیر در بیوسنتز آن می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بادرنجبویه (*Melissa offisinalis* L.)، رزمارینیک اسید، عصاره مخمر، سولفات مس.

مقدمه

گیاه بادرنجبویه (*Melissa offisinalis*) از خانواده نعناعیان (Lamiaceae) و دارای دو گونه *M. offisinalis* و *M. romana* می‌باشد. این جنس پراکنش وسیعی از غرب اروپا (بدیهی قزوینی، ۱۳۶۶) تا نواحی غربی و مرکزی ایران دارد (Shams Ardakani *et al*., 2005). برگ‌های این گیاه نازک و کرکدار، گل‌ها به رنگ سفید یا صورتی با خوشه‌های مرکب کوچک می‌باشند که در تابستان تشکیل می‌شوند (Ali-madad, 1996). امروزه از اسانس این گیاه به فراوانی در زمینه‌های مختلفی نظیر پزشکی، غذایی، عطرسازی و آرایشی استفاده می‌شود (آدینه، ۱۳۸۱). این گیاه دارای خواص ضدباکتریایی، ضدویروسی (Apic *et al*., 2001)، ضدالتهابی (Bagdat & Cosge, 2006؛ Jun *et al*., 2011)، آنتی‌اکسیدانی (Mencherini et *al*., 2007)، ضدحساسیت و ضدرماتیسم (Lin *et al*., 2012) است و مشخص شده‌است ماده مؤثره‌ای که خواص فوق را سبب می‌شود، رزمارینیک اسید می‌باشد (Park *et al*., 2008).

یکی از ترکیب‌های اصلی موجود در عصاره بادرنجبویه، رزمارینیک اسید می‌باشد (Askari & Sefidkon, 2004). در گیاهان، رزمارینیک اسید از طریق مسیر بیوسنتزی ترکیب‌های فنلی تولید می‌شود. اسیدهای آمینه تیروزین و فنیل‌آلانین، سوبستراهای اولیه این مسیر بوده و آنزیم‌های تیروزین آمینوترانسفراز و فنیل‌آلانین آمینولیاز از کلیدی‌ترین کاتالیزکننده‌های این مسیرها می‌باشند (Petersen & Simmonds, 2003).

رزمارینیک اسید نوعی استر از کافئیک اسید است (Park *et al.*, 2008). این ترکیب در اغلب گونه‌ها و جنس‌های خانواده گل گاوزبان (Boraginaceae)، خانواده نعناعیان (Lamiaceae) و همچنین در برخی از سرخس‌ها و گیاهان شاخی شکل مانند شیپوری گزارش شده‌است (Yan *et al.*, 2006).

به‌دلیل اهمیت دارویی و کاربردهای صنعتی این ترکیب، تاکنون تولید آن در گونه‌های گیاهی مختلفی از قبیل *Salvia miltiorrhiza*، *Orthosiphon aristatus* و *Coleus blumei* تحت تأثیر الیسیتورهای زنده و غیرزنده مورد بررسی قرار گرفته‌است (Yan *et al.*, 2006؛ Szabo *et al.*, 1999؛ Mizukam *et al.*, 1992).

الیسیتورها، مولکول‌هایی با وزن مولکولی پایین می‌باشند که باعث تحریک پاسخ دفاعی در گیاهان می‌شوند. نوع و ساختار الیسیتورها تا حد زیادی متفاوت است (Radman *et al.*, 2003) و با توجه به منشأ تولیدشان، در دو گروه زنده و غیرزنده طبقه‌بندی می‌شوند (Dörnerburg & Knorr, 1995). الیسیتورهای غیرزنده شامل نمک‌های ارگانیک و فلزات سنگین (Radman *et al.*, 2003) و یا فاکتورهای فیزیکی شامل زخم‌های مکانیکی، اشعه فرابنفش و غیره (Dörnerburg & Knorr, 1995) می‌باشند. الیسیتورهای زنده می‌توانند با حمله باکتریایی، ویروسی یا قارچی ایجاد شوند. همچنین این الیسیتورها می‌توانند دارای منشأ زیستی از قبیل پلی‌ساکاریدی، گلیکوپروتئینی (Dörnerburg & Knorr, 1995)، اسیدهای آلی با وزن مولکولی پایین (Radman *et al.*, 2003) و هورمون‌های گیاهی (Thaler *et al.*, 2002) باشند.

در این تحقیق اثرات غلظت‌های مختلف دو الیسیتور عصاره مخمر و مس بر مقدار فلاونوئید کل و ماده مؤثره (رزمارینیک اسید) گیاهچه‌های بادرنجبویه رشد کرده در شرایط گلخانه بررسی گردید.

مواد و روشها

کشت گیاه

برای کشت گیاه ابتدا گلدان‌های پلاستیکی یک لیتری از خاک، کود حیوانی و پرلیت به نسبت ۱:۱:۳ به‌طور یکنواخت پر شدند. سپس بذرها به‌صورت یک لایه بر روی این محیط ریخته و برای جوانه‌زنی بهتر با پیت ماس مرطوب پوشانده شدند. سپس گلدان‌ها به گلخانه با شرایط دمایی ۲ ± ۲۸ درجه سانتی‌گراد، شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۵۵٪ منتقل و تا ۳۰ روزه شدن گیاهچه‌ها هر دو روز یکبار آبیاری شدند.

آماده‌سازی الیسیتورها

در این تحقیق از دو الیسیتور عصاره مخمر و مس برای بررسی القای تولید رزمارینیک اسید در گیاهچه‌های بادرنجبویه استفاده شد. برای آماده‌سازی الیسیتور عصاره مخمر غلظت‌های صفر (به‌عنوان شاهد)، ۰/۵، ۱ و ۲ mg/mL از عصاره مخمر (شرکت سیگما) و برای الیسیتور مس از غلظت های صفر (به‌عنوان کنترل)، ۴، ۸ و ۱۶ میکرومولار سولفات مس (شرکت سیگما) استفاده گردید. به‌منظور اعمال تیمار از روش تغییریافته De و De (۲۰۱۱) استفاده شد. به‌طور خلاصه، هر یک از غلظت‌های مذکور به‌طور جداگانه توزین و به ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول هوگلند در ظروف شیشه‌ای (۲۵۰ میلی‌لیتری) اضافه گردید. گیاهان پس از جمع‌آوری از سطح گلدان‌ها برای حذف خاک همراه ریشه‌ها، چندین بار (با آب مقطر استریل) آبکشی شدند، سپس کل گیاهچه برای ۴، ۸ و ۱۶ ساعت در معرض تیمار قرار گرفت. برای ایجاد محیطی یکنواخت از الیسیتورها و هوادهی لازم، ظروف در دمای آزمایشگاه بر روی شیکر با دور ۱۲۰ rpm قرار گرفتند.

بعد از گذشت زمان مورد نظر، گیاهچه‌ها از محیط تیمار جمع‌آوری و بعد از چند بار شستشو با آب مقطر استریل به دو قسمت تقسیم شدند. نیمی از گیاهچه ها (بافت کامل گیاهچه) به‌منظور بررسی مقدار رزمارینیک

اسید در سایه و در هوای آزاد خشک شدند و نیمی دیگر به‌منظور سنجش محتوای فلاونوئید کل، بلافاصله در ازت مایع منجمد و به فریزر ۸۰- منتقل گردیدند.

سنجش مقدار رزمارینیک اسید

مقدار رزمارینیک اسید از روش وانگ (Wang *et al.*, 2004) با کمی تغییرات اندازه‌گیری شد. به این منظور مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت خشک گیاهچه‌های تیمار شده و شاهد آسیاب و ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۳۰٪ به آن اضافه گردید. این مخلوط توسط دستگاه سونیکاتور (با استفاده از امواج فراصوت) به‌مدت ۱۵ دقیقه سونیکیت شد تا بافت‌های گیاه به اندازه کافی متلاشی و عصاره آن خارج گردد، سپس محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰rpm در دمای اتاق سانتریفیوژ گردید. محلول رویی را با آب مقطر به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسانده و به‌وسیله فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرومتری صاف گردید. به‌منظور جداسازی ترکیب‌ها از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (Agilent 1100, USA) و برای تشخیص رزمارینیک اسید از طول موج ۳۳۰ نانومتر استفاده شد. فاز جامد شامل ستون ZORBAX SB-C18 (5μm) و فاز مایع شامل یک سیستم حلال دو فازی؛ حلال A (شامل آب و ارتوفسفریک ۱٪) و حلال B (متانول و ارتوفسفریک ۱٪) به نسبت ۰/۴ و ۰/۶ بود.

از استاندارد رزمارینیک اسید (تهیه شده از شرکت سیگما) برای تعیین زمان بازداری نمونه در ستون و مقدار رزمارینیک اسید استفاده شد. برای تهیه استاندارد مطابق روش وانگ (Wang *et al.*, 2004) مقدار ۱ میلی‌گرم از نمونه استاندارد در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۳۰٪ حل گردید و بعد به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد سونیکیت شد. برای تعیین مقدار رزمارینیک اسید تولید شده در حضور هر الیسیتور، ابتدا از نمونه استاندارد غلظت‌های مختلف تهیه و پس از تزریق به دستگاه HPLC، سطح زیر منحنی بدست آمد، پس از رسم منحنی استاندارد مقدار ماده مؤثره تولید شده در حضور هر غلظت الیسیتور محاسبه گردید.

سنجش فلاونوئید کل

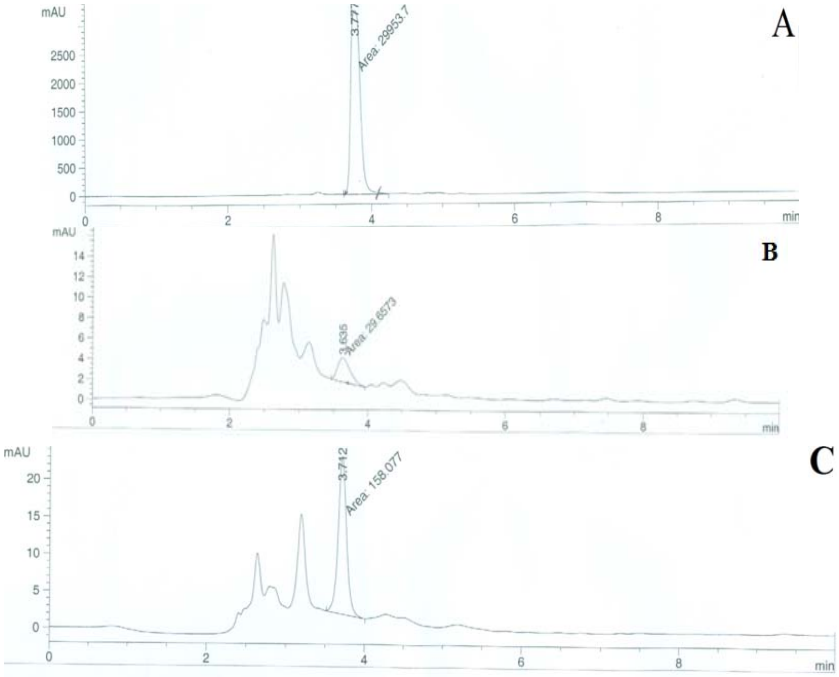
اندازه‌گیری فلاونوئیدها به روش جذب اسپکتروفتومتری ارائه شده توسط Krizek و همکاران (۱۹۹۳) انجام شد. در این روش برای مقایسه میزان تولید این ترکیب ها، ۰/۱ گرم وزن تر بافت تازه (نمونه فریز شده) در ۱۰ میلی لیتر اتانول اسیدی (شامل الکل اتیلیک ۹۵٪ و اسید استیک گلاسیال به نسبت ۹۹ به ۱) به طور کامل ساییده شد، سپس عصاره بدست آمده به مدت ده دقیقه با دور ۴۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. محلول رویی جدا شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه به آرامی در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس میزان جذب عصاره حاصل توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Varian, cary 50, Australia) در سه طول موج ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای کالیبره نمودن دستگاه، از اتانول اسیدی به‌عنوان شاهد استفاده گردید. ضریب خاموشی $\varepsilon = ۳۳۰۰ mM^{-1}\ cm^{-1}$ برای محاسبه محتوای فلاونوئید کل مورد استفاده قرار گرفت و مقدار آن برحسب μM/g fw گزارش گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

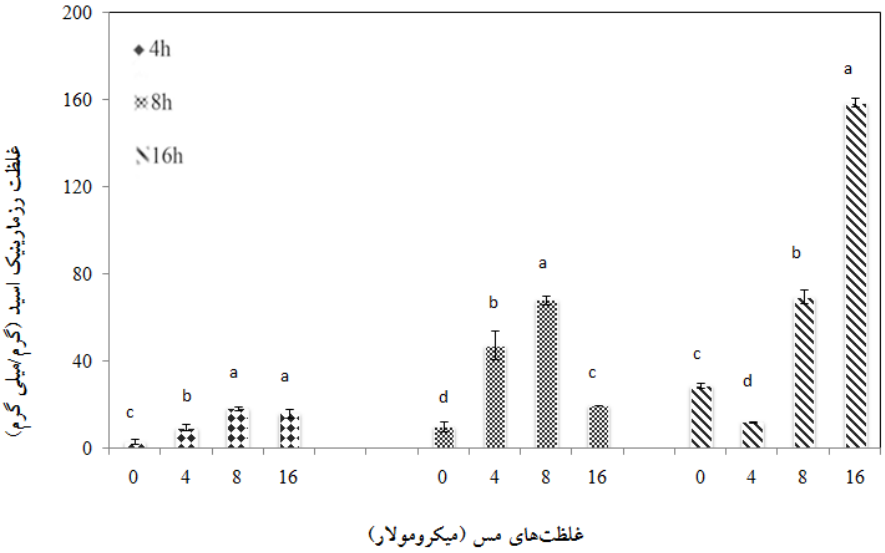
کلیه آزمایش‌ها با سه تکرار مستقل و در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. میانگین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS توسط آزمون دانکن (Duncan test) و با در نظر گرفتن سطح اطمینان $p \leq ۰/۰۵$، مورد تجزیه واریانس یک عاملی (One way ANOVA) قرار گرفتند.

نتایج

در راستای بررسی اثر الیسیتورها بر تولید ماده مؤثره گیاه بادرنجبویه، از استاندارد رزمارینیک اسید برای تعیین زمان بازداری نمونه در ستون و همچنین تعیین غلظت (برحسب میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) استفاده گردید. در شکل ۱ به‌عنوان نمونه پیک‌های کروماتوگرام مربوط به نمونه استاندارد (A)، نمونه شاهد (B) و غلظت ۱۶μM الیسیتور مس در زمان ۱۶ ساعت تیمار (C) آورده شده‌است. همان‌طور که در شکل A-۱، مشاهده می‌شود زمان بازداری نمونه در ستون بین دقیقه ۳ و ۴ می‌باشد که در همین فاصله زمانی خروج این ماده در نمونه‌های دیگر نیز مشاهده می‌گردد (شکل B-۱ و C-۱).



شکل ۱- کروماتوگرام HPLC مربوط به نمونه استاندارد (A)، نمونه شاهد (B) و گیاهچه‌های تیمار شده با ۱۶µM مس در مدت زمان ۱۶ ساعت تیمار (C)



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف الیسیتور مس در زمان‌های ۴، ۸ و ۱۶ ساعت بر مقدار رزمارینیک اسید در گیاه بادرنجبویه

تمام آزمایش‌ها با ۳ تکرار مستقل انجام شدند.

میانگین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS توسط آزمون دانکن در سطح اطمینان $p \leq ۰/۰۵$ مورد تجزیه واریانس یک عاملی قرار گرفتند.

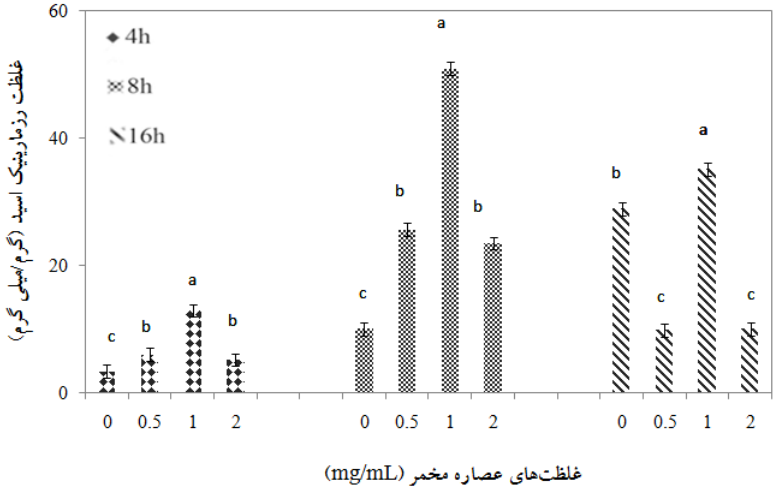
حروف متفاوت بالای نمودارها نشان‌دهنده معنی‌دار بودن نتایج در سطح ۵٪ است.

مقدار رزمارینیک اسید تولید شده در گیاهچه‌های تیمار شده با الیستور مس

همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، الیسیتور مس در هر یک از غلظت‌های ۴، ۸ و ۱۶ میکرومولار در دوره زمانی ۴ ساعت تیمار، به‌ترتیب حدود ۲/۵، ۵ و ۴ برابر نمونه شاهد و در دوره زمانی تیمار ۸ ساعت، برای هر یک از غلظت‌های مذکور به‌ترتیب حدود ۴، ۷ و ۱/۵ برابر نمونه شاهد، افزایش تولید رزمارینیک اسید را سبب شده‌است. همانطور که در شکل قابل مشاهده‌است، با افزایش غلظت الیسیتور این روند خطی نبوده و در غلظت ۱۶μM نسبت به غلظت ۸μM مقدار این ترکیب کاهش می‌یابد، به‌طوری که در زمان ۸ ساعت تیمار کاهش مقدار این ترکیب معنی‌دار می‌باشد. از طرف دیگر در دوره زمانی ۱۶ ساعت تیمار و در غلظت ۴μM، کاهش معنی‌داری در مقدار این ماده نسبت به نمونه شاهد مشاهده گردید. در حالی‌که در حضور غلظت‌های دیگر این الیسیتور (۸ و ۱۶ میکرومولار) افزایش معنی‌دار مقدار این ترکیب نسبت به نمونه شاهد مشاهده شد.

مقدار رزمارینیک اسید تولید شده در گیاهچه‌های تیمار شده با الیستور عصاره مخمر

تأثیر عصاره مخمر بر تولید رزمارینیک اسید در شکل ۳ نشان داده شده‌است. همان‌طور که در شکل قابل مشاهده است، غلظت ۱mg/mL این الیسیتور در هر سه دوره زمانی تیمار، مقدار رزمارینیک اسید را افزایش داده‌است. در حالی‌که دو غلظت دیگر فقط در دوره زمانی ۴ و ۸ ساعت تیمار باعث افزایش معنی‌دار این ترکیب شده‌اند و زمان ۱۶ ساعت تیمار، کاهش معنی‌دار مقدار این ماده را نسبت به نمونه شاهد نشان می‌دهد.



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف عصاره مخمر در زمان‌های تیمار ۴، ۸ و ۱۶ ساعت بر مقدار رزمارینیک اسید در گیاه بادرنجبویه

تمام آزمایش‌ها با ۳ تکرار مستقل انجام شدند.

میانگین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS توسط آزمون دانکن در سطح اطمینان $p \leq ۰/۰۵$ مورد تجزیه واریانس یک عاملی قرار گرفتند.

حروف متفاوت بالای نمودارها نشان‌دهنده معنی‌دار بودن نتایج در سطح ۵٪ است.

محتوای فلاونوئید کل در تیمار با الیسیتور مس در زمان‌های مختلف

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت الیسیتور مس در محیط، محتوای فلاونوئید کل در مقایسه با نمونه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافته‌است. البته افزایش زمان تیمار نیز بر میزان تولید این ترکیب‌ها تأثیر معنی‌داری دارد.

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف یون مس در زمان‌های مختلف تیمار ۴، ۸ و ۱۶ ساعت بر محتوای فلاونوئید کل در گیاه بادرنجبویه

Cu (µM)	محتوای فلاونوئید کل (µM/g fw)		
	۴h	۸h	۱۶h
۰	۱۲۱/۹۷ ± ۶/۴۵ d	۱۰۵/۱۵ ± ۸/۲۱ d	۱۳۴/۳۹ ± ۳/۲۹ d
۴	۱۵۴/۳۹ ± ۷/۲۳ c	۱۲۵/۶۱ ± ۴/۱۶ c	۱۷۰/۹۱ ± ۷/۱۵ c
۸	۲۰۶/۵۲ ± ۵/۰۷ b	۱۹۷/۲۷ ± ۲/۰۸ b	۲۵۰/۱۵ ± ۶/۱۹ b
۱۶	۲۷۲/۷۳ ± ۹/۱۹ a	۲۶۶/۳۶ ± ۵/۱۴ a	۳۳۱/۸۲ ± ۸/۱۱ a

حروف متفاوت در هر ستون بیانگر معنی‌دار بودن نتایج در سطح ۵٪ می‌باشد.

جدول ۲- اثر غلظت‌های مختلف الیسیتور عصاره مخمر در زمان‌های ۴، ۸ و ۱۶ساعت بر محتوای فلاونوئید کل در گیاه بادرنجبویه

عصاره مخمر (mg/mL)	محتوای فلاونوئید کل (µM/g fw)		
	۴h	۸h	۱۶h
۰	۱۵۵/۰۰ ± ۲/۰۳ a	۱۴۳/۰۳ ± ۳/۰۸ a	۱۹۰/۷۶ ± ۵/۰۵ a
۰/۵	۱۴۲/۸۸ ± ۳/۵۴ b	۱۳۱/۲۱ ± ۱/۱۴ b	۱۷۹/۲۴ ± ۳/۰۸ b
۱	۱۲۷/۸۸ ± ۸/۰۱ c	۱۱۹/۸۵ ± ۵/۰۸ b	۱۶۰/۶۱ ± ۶/۱۱ c
۲	۱۱۸/۰۳ ± ۴/۰۵ d	۱۱۶/۶۷ ± ۴/۰۶ b	۱۴۲/۸۸ ± ۲/۳۵ d

حروف متفاوت در هر ستون بیانگر معنی‌دار بودن نتایج در سطح ۵٪ می‌باشد.

محتوای فلاونوئید کل در تیمار با الیسیتور عصاره مخمر در زمان‌های مختلف

نتایج بدست آمده نشان داد که در تیمار گیاهچه‌های بادرنجبویه با عصاره مخمر و در زمان‌های مختلف تیمار با افزایش غلظت الیسیتور در محیط، محتوای فلاونوئید کل نسبت به نمونه شاهد (غلظت صفر) به‌صورت معنی‌داری کاهش یافته‌است (جدول ۲).

بحث

در این تحقیق، از عصاره مخمر به‌عنوان یک الیسیتور زنده و از یون مس به‌عنوان یک الیسیتور غیرزنده برای بررسی تولید رزمارینیک اسید و فلاونوئید کل در گیاهچه‌های بادرنجبویه استفاده گردید. مس به‌عنوان عنصر کم‌مصرف ضروری برای رشد گیاهان است. این عنصر به‌عنوان کوفاکتور آنزیم‌های مختلفی از قبیل ATP سنتتاز، سیتوکروم‌c اکسیداز و فرودکسین می‌باشد و در فرایندهای بیولوژیکی مهمی نظیر فتوسنتز، تنفس، سیستم‌های اکسیداسیون و احیای سلولی و تثبیت ازت دخیل است. باوجوداین، مس که از گروه فلزات سنگین است در غلظت‌های بالاتر از حد نیاز ایجاد سمّیت نموده و با تولید رادیکال‌های آزاد، تنش اکسیداتیو را در گیاهان القا می‌نماید (Gill & Tuteja, 2010؛ Sharma *et al.*, 2012). مشخص شده که رادیکال‌های آزاد دارای نقش‌های دوگانه‌ای در سلول بوده؛ از سویی در غلظت‌های بالا می‌توانند به غشاء سلولی، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها آسیب برسانند (Lombardii & Sebastiani, 2005) و از سوی دیگر قادرند در مقادیر اندک به‌عنوان یک مولکول علامت‌رسان عمل نمایند (Romero-Puertas *et al.*, 2007). در پاسخ به تولید این رادیکال‌ها معمولاً سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاهان (آنزیمی و غیرآنزیمی) فعال می‌شود (Agarwal & Pandey, 2004).

در این تحقیق، در گیاهچه‌های تیمار شده با الیسیتور مس (در تمامی غلظت‌ها و زمان‌های اعمال تیمار، بجز غلظت ۴ میکرومولار در زمان ۱۶ ساعت) محتوای

رزمارینیک اسید به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گیاه شاهد افزایش یافت. مؤثرترین غلظت الیسیتور و زمان اعمال آن، به‌ترتیب غلظت ۸ میکرومولار و زمان ۸ ساعت می‌باشد، به‌طوری که در این شرایط مقدار رزمارینیک اسید حدود ۷ برابر نمونه شاهد افزایش یافت. تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر تأثیر الیسیتور مس بر تولید رزمارینیک اسید در هیچ گیاهی گزارش نشده‌است. در هر صورت افزایش تولید این ماده مؤثره در تیمار گیاه مریم‌گلی (*Salvia miltiorrhiza*) با الیسیتور نقره (از گروه فلزات سنگین) توسط Yan و همکاران (۲۰۰۶) گزارش شده‌است. از طرف دیگر، محتوای فلاونوئید کل گیاهچه‌ها نیز در تیمار با این الیسیتور در تمامی غلظت‌ها در مقایسه با گیاه شاهد افزایش قابل‌توجهی را نشان می‌دهد. گزارش شده‌است که در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های بالای فلزات سنگین، مسیر تولید ترکیب‌های فنولی و حتی کارتنوئیدها فعال شده و مقدار این ترکیب‌ها در گیاهان افزایش می‌یابد (Posmyk *et al.*, 2009).

همان‌طور که در شکل ۳ نیز قابل مشاهده می‌باشد، تیمار گیاهچه‌های بادرنجبویه با عصاره مخمر نیز تحریک سنتز رزمارینیک اسید را به‌دنبال داشته است. بهترین اثر این الیسیتور در غلظت ۱mg/mL و بهترین دوره زمانی، در ۸ ساعت اعمال تیمار بدست آمد، به‌طوری که در این شرایط محتوای این ماده حدود ۵ برابر نمونه شاهد افزایش یافت. عصاره مخمر که از مخمر ساکارومیسس سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*) تهیه می‌گردد به‌عنوان یک الیسیتور زنده شناخته می‌شود (Yan *et al.*, 2006). این الیسیتور، ترکیبی از اسیدهای آمینه مختلف، ویتامین‌ها، ترکیب‌های معدنی، فلزات سنگین و ترکیب‌های ناشناخته دیگر می‌باشد (Pitta-Alvarez *et al.*, 2000)، و هنوز بدرستی مشخص نیست که دقیقاً کدام جزء به‌عنوان محرک عمل می‌نماید. افزایش تولید رزمارینیک اسید در حضور الیسیتورهای عصاره مخمر و ۵-متیل جاسمونات در گونه‌های گیاهی *Orthosiphon aristatus* (Mizukam *et al.*, 1992) و *Coleus blumei* (Szabo *et al.*, 1999) گزارش شده‌است.

مطالعات انجام شده توسط Naoumkina و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد که این الیسیتور در گیاهان بر روی کل مسیر سنتز فلاونوئیدها تأثیر می‌گذارد. با توجه به کاهش محتوای فلاونوئید کل (جدول ۲) در حضور این الیسیتور، احتمال دارد که عصاره مخمر موجب فعال‌تر شدن آنزیم‌های این مسیر شده، به‌طوری که محتوای رزمارینیک اسید در انتهای این مسیر را افزایش داده‌است. از طرف دیگر کاهش معنی‌دار محتوای رزمارینیک اسید در غلظت ۲mg/mL در تمام زمان‌های اعمال تیمار نسبت به غلظت ۱mg/mL و کاهش معنی‌دار آن در زمان ۱۶ ساعت نسبت به نمونه کنترل می‌تواند به دلیل فعال‌تر شدن مسیرهای دیگر سیستم آنتی‌اکسیدان از قبیل مسیر آنزیمی باشد. در هر صورت، یکی از اثرات شناخته شده این الیسیتور ایجاد استرس در گیاهان و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌باشد (Savitha *et al.*, 2006). از طرف دیگر، یکی از نتایج تجمع فلزات سنگین در گیاهان، تولید ROSها است. به‌عنوان نمونه، افزایش تولید H_2O_2 در تیمار گیاه آرابیدوپسیس با کادمیوم و مس گزارش شده‌است (Maksymiec & Krupa, 2006). علاوه بر آن نقش ROSها در القای سنتز جاسمونیک اسید و همچنین القاء بیان برخی از ژن‌های دفاعی و ژن‌های بیوسنتزکننده متابولیت‌های ثانویه ثابت شده است (Karuppanapandian *et al.*, 2011). Yan و همکاران (۲۰۰۶) علت افزایش مقدار رزمارینیک اسید در گیاه مریم‌گلی در تیمار با الیسیتورهای عصاره مخمر و نقره را به‌دلیل افزایش بیان ژن تیروزین آمینوترانسفراز مطرح کردند.

جاسمونات‌ها به‌عنوان سیگنال مولکولی کلیدی، نقش مهمی در تنظیم شبکه ترارسانی (Signaling) دارند که منجر به بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهی می‌شود (Zhou *et al.*, 2010). نقش این ترکیب‌ها در بیوسنتز انواع متابولیت‌های ثانویه ازجمله: آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، گلیکوزینولات و فنیل‌پروپانوئیدها در گونه‌های گیاهی مختلف مشخص شده‌است (Memelink *et al.*, 2001). البته راه‌اندازی تولید متیل‌جاسمونات در تیمار در گیاه *Curcuma mangga* با عصاره مخمر (Abraham *et al.*, 2011) و همچنین تجمع سریع جاسمونیک اسید تحت تیمار با مس در گونه‌های گیاهی *Phaseolus coccineus* (Maksymiec *et al.*, 2005) و آرابیدوپسیس (Maksymiec *et al.*, 2005) به اثبات رسیده‌است.

اگرچه مکانیسم دقیق تأثیر این الیسیتورها بر تولید رزمارینیک اسید دقیقاً مشخص نیست و تحقیقات بیشتری لازم است تا این مکانیسم معلوم گردد، با توجه به خواص

آنتی‌اکسیدانی رزمارینیک اسید (Park *et al.*, 2008) به‌نظر می‌رسد افزایش محتوای این ماده مؤثره در گیاهچه‌های بادرنجبویه تحت تیمار با این الیسیتورها، احتمالاً به‌دلیل القای سنتز ROSها و راه‌اندازی مسیرهای علامت‌رسان از قبیل تولید داخلی جاسمونات‌ها (Karuppanapandian *et al.*, 2011) و در نتیجه فعال شدن ژن‌های درگیر در سیستم دفاعی باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان انجام شده‌است. بنابراین سپاس و قدردانی خود را از آن مرکز محترم اعلام می‌داریم.

منابع مورد استفاده

- آدینه، ج.، ۱۳۸۱. مطالعه کشت بافت و تغییرات کیفی و کمّی مواد مؤثره سیترونلول و ژرانیول در اسانس گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) در شرایط *In vivo* و*In vitro* در منطقه همدان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه بوعلی سینا همدان، دانشکده کشاورزی.
- بدیهی قزوینی، ف.، ۱۳۶۶. بررسی اسانس و فیتوشیمی گیاه بادرنجبویه (*Melissa offisinalis*). پایان‌نامه دکترا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۸۷ صفحه.
- Abraham, F., Bhatt, A., Keng, C.L., Indrayanto, G. and Sulaiman, S.F., 2011. Effect of yeast extract and chitosan on shoot proliferation, morphology and antioxidant activity of *Curcuma mangga* in vitro plantlets. African Journal of Biotechnology, 10(40): 7787-7795.
- Agarwal, S. and Pandey, V., 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. Biologia Plantarum, 48(4): 555-560.
- Ali-madad, M., 1996. Investigation on components of essential oils of *Melissa officinalis*. M.SC.Thesis, Tehran University of Medical Sciences, 231p.
- Apic, G., Gough, J. and Teichmann, S.A., 2001. Domain combinations in archaeal, eubacterial and eukaryotic proteomes. Journal of Molecular Biology, 310(2): 311-325.
- Askari, F. and Sefidkon, F., 2004. Essential oil composition of *Melissa officinalis* L. from different regions. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 20(2): 229-237.
- Bagdat, R.B. and Cosge, B., 2006. The essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis* L.), iTS components and using fields. Journal of the Faculty of Agriculture, 21: 116-121.
- De, D. and De, B., 2011. Elicitation of diosgenin production in *Trigonella foenum*-graecum L. seedlings by heavy metals and signaling molecules. Acta Physiologiae Plantarum, 33(5): 1585-1590.
- Dörnerburg, H. and Knorr, D., 1995. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. Enzyme and Microbial Technology, 17(18): 674-684.
- Gill, S.S. and Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, 48(12): 909-930.
- Jun, H.J., Roh, M., Kim, H.W., Houng, S.J., Cho, B., Yun, E.J., Hossain, M.A., Lee, H., Kim, K.H. and Lee, S.J., 2011. Dual inhibitions of lemon balm (*Melissa officinalis*) ethanolic extract on melanogenesis in B16-F1 murine melanocytes: inhibition of tyrosinase activity and its gene expression. Food Science Biotechnolgy, 20(4): 1051-1059.
- Karuppanapandian, T., Moon, J.C., Kim, C., Manoharan, K. and Kim, W., 2011. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. Australian Journal of Crop Science, 5(6): 709-725.
- Krizek, D.T., Kramer, G.F., Upadyaya, A. and Mirecki, R.M., 1993. UV-B response of cucumber seedling grown under metal halide and high pressure sodium/deluxe lamps. Physiologia Plantarum, 88: 350-358.
- Lin, L., Zhao, H., Dong, Y., Yang, B. and Zhao, M., 2012. Macroporous resin purification behavior of phenolics and rosmarinic acid from *Rabdosia serra* (MAXIM.) HARA leaf. Food Chemistry, 130(2): 417-424.
- Lombardii, L. and Sebastiani, L., 2005. Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plant. Plant Science, 168(3): 797-802.
- Maksymiec, W., Wianowska, D., Dawidowicz, A.L., Radkiewicz, S., Mardarowicz, M. and Krupa, Z., 2005. The level of jasmonic acid in *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus coccineus* plants under heavy metal stress. Journal of Plant Physiology 162(12): 1338-1346.
- Maksymiec, W. and Krupa, Z., 2006. The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana*. Environmental and Eperimental Botany, 57(1): 187-194.
- Memelink, J., Verpoorte, R. and Kijne, W., 2001. ORC anization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. Trends in Plant Science, 6(5): 212-219.
- Mencherini, T., Picerno, P., Scesa, C. and Aquino, R., 2007. Triterpene, antioxidant, and antimicrobial compounds from *Melissa officinalis*. Journal of Natural Products, 70(12): 1889-1894.
- Mizukam, H., Ogawa, T., Ohashi, H. and Ellis, B.E., 1992. Induction of rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures by yeast extract. Plant Cell Reports, 11(2): 480-483.

abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. Process Biotechnology, 41: 50-60.
- Shams Ardakani, M.R., Amanzadeh, Y., Jahanshir, F. and Jamshidi, A.H., 2005. Pharmacognosical and plant tissue culture studies of *Melissa officinalis* L. Journal of Medicinal Plants, 4(13): 68-71.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S. and Pessarakli, M., 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. Journal of Botany, 26p.
- Szabo, E., Thelen, A. and Petersen, M., 1999. Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. Plant Cell Reports, 18(6): 485-489.
- Thaler, J.S., Karban, R., Ulman, D.E., Boege, K. and Bostok, R.M., 2002. Cross-talk between jasmonate and salycilate plant defense pathways: effects on several plants parasites. Oecologia, 131(2): 227-235.
- Wang, H., Provan, G.J. and Helliwell, K., 2004. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. Food Chemistry, 87(2): 307-311.
- Yan, Q., Shi, M., Ng, J. and Yong, J., 2006. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. Plant Science, 170(4): 853-858.
- Zhou, M.L. Zhu, X.M., Shao, J.R., Wu, Y.M. and Tang, Y.X., 2010. Transcriptional response of the catharanthine biosynthesis pathway to methyl jasmonate/nitric oxide elicitation in Catharanthus roseus hairy root culture. Applied Microbiology and Biotechnology, 88(3): 737-750.
- Naoumkina, M., Farag, M.A., Sumner, L.W., Tang, Y., Liu, C.J. and Richard, R.A., 2007. Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 104(46): 17909-17915.
- Park, S.U., Uddin, M.R., Xu, H., Kim, Y.K. and Lee, S.Y., 2008. Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant. African Journal of Biotechnology, 7(25): 4959-4965.
- Petersen, M. and Simmonds, M.S., 2003. Rosmarinic acid. Phytochemistry, 62(2): 121-125.
- Pitta-Alvarez, S.I., Spollansky, T.C. and Giulietti, A.M., 2000. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. Enzyme and Microbial Technology, 26(2-4): 252-258.
- Posmyk, M.M., Kontek, R. and Janas, K.M., 2009. Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. Ecotoxicology and Environmental Safety, 72(2): 596-602.
- Radman, R., Saez, T., Bucke, Ch. and Keshavarz, T., 2003. Elicitation of plants and microbial cell systems. Biotechnology and Applied Biochemistry, 37: 91-102.
- Romero-Puertas, M.C., Corpas, F.J., Rodríguez-Serrano, M., Gómez, M., del Río, L.A. and Sandalio, L.M., 2007. Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. Journal of Plant Physiology, 164(10):1346-1357.
- Savitha, B.C., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N. and Ravishankar, G.A., 2006. Different biotic and

Positive effect of Cu and yeast extract elicitors on the content of rosmarinic acid in *Melissa offisinalis* L.

A. Riahi-Madvar[1*], K. Yousefi[2] and M.A. Nasiri-Bezenjani[2]

1*- Corresponding author, Department of Biotechnology, Institute of Science and High technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran, E-mail: ariahi@icst.ac.ir
2- MSc. Graduate Student in Agriculture Biotechnology, Institute of Science and High technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

Received: May 2012 Revised: April 2013 Accepted: April 2013

Abstract

Lemon balm (*Mellissa offisinalis* L.) belongs to the Lamiaceae family with medicinal properties such as anti-bacterial, anti-depressants, anti-inflammatory, anti-cancer and anti-viral effects. The most pharmacological effects of this plant are related to its active ingredient, rosmarinic acid. In this research, the effects of different concentration of elicitors, yeast extract (0, 0.5, 1 and 2 mg/mL) and copper (0, 4, 8 and 16 μM) at different time intervals (4, 8 and 16 h) were investigated on rosmarinic acid and total flavonoid contents in 30-day-old seedlings of lemon balm greenhouse conditions. Results showed a significant effect of yeast extract on rosmarinic acid production, especially after 4 and 8 hours of treatment with this elicitor. The highest amount of this compound was observed in seedlings treated with 1 mg/mL of this elicitor. On the other hand, copper elicitor at all used concentrations and the duration time of treatment (except for 4 μM for 16 hours) significantly increased rosmarinic acid production, so that this elicitor at concentration of 8 μM for 8 hours treatment could induce rosmarinic acid level about 7-fold. It seems that the elevated level of this active ingredient under treatment with these elicitors is due to the induction of reactive oxygen radicals and jasmonic acid biosynthesis and subsequently expression of some genes involving in rosmaric acid biosynthesis.

Keywords: Lemon balm (*Mellissa offisinalis* L.), rosmarinic acid, yeast extract, copper sulfate.