اثر سدیم نیتروپروساید بر پرآوری و فعالیت آنتی‌اکسیدانی سیب گوشت قرمز رقم بناب

فاطمه زاهدزاده[۱]، فرشاد کاکاوند[۲*]، نسرین فرهادی[۱]،فریبرز زارع نهندی[۱]،سمیرا زینالی فرخی[۱]

[۱] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

[۲] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان

*نویسنده مسئول: kakavand.f@gmail.com

چکیده

سدیم نیتروپروساید (SNP) به‌عنوان یک ترکیب رها کننده نیتریک اکساید (NO) در تنظیم بسیاری از کارکردهای متنوع سلولی در گیاه نقش دارد. این پژوهش با هدف بررسی تأثیر سدیم نیتروپروساید بر پرآوری و صفات آنتی‌اکسیدانی سیب گوشت قرمز در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. برای این منظور گیاهچه‌های حاصل از کشت مریستم سیب گوشت قرمز رقم بناب در محیط کشت MS دارای غلظت‌های مختلف سدیم نیتروپروساید (۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکرومولار) کشت گردید. پس از یک دوره طولانی(شش ماه) ضریب پرآوری، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز و فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و مقدار آنتوسیانین ریز نمونه‌های تیمار شده اندازه‌گیری شد. استفاده از سدیم نیتروپروساید موجب افزایش معنی‌دار ضریب پرآوری ریز نمونه‌های کشت شده سیب گوشت قرمز گردید و بالاترین پرآوری (۷/۱۸) در غلظت ۴۰ میکرومولارSNP حاصل شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ریز نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف SNP افزایش بسیار معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد نشان داد و بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۳۵/۵۱) در تیمار ۴۰ میکرومولارSNP حاصل شد. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز تحت تأثیر استفاده از سدیم نیتروپروساید در محیط کشت قرار نگرفت ولی اثر تیمارهای مختلف سدیم نیتروپروساید بر فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز و فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز معنی‌دار بود. مقدار آنتوسیانین ریز نمونه‌ها به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر استفاده از سدیم نیتروپروساید به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. بر اساس نتایج به‌دست آمده استفاده از ۴۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید برای افزایش پرآوری و صفات آنتی‌اکسیدانی سیب گوشت قرمز توصیه می‌شود.

***کلمات کلیدی:*سدیم نیتروپروساید، درون شیشه‌ای، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فنیل آلانین آمونیالیاز، آنتوسیانین**

مقدمه

امروزه تلاش‌های گسترده‌ای برای استفاده از ظرفیت بیوسنتزی سلول‌ها برای بدست آوردن محصولات مفید و با ارزش از سلول‌های گیاهی در حال انجام است. آنتوسیانین‌ها از رنگدانه‌های فلاونوئیدی طبیعی که برای سلامتی بدن مفید هستند کشت بافت، روش مهمی برای تولید مستقیم رنگدانه‌ها در سطح وسیع می‌باشد که با استفاده از ترکیبات خاصی در شرایط درون شیشه‌ای تولید این ترکیبات طبیعی را می‌توان افزایش داد (Corpas *et al.*, 2011).

سدیم نیتروپروساید (SNP)[1] یک ترکیب رها کننده نیتریک اکساید (NO) است که به‌عنوان ترکیب مهم در گیاهان، در پژوهش‌های مختلف مورد توجه قرار گرفته است (Li *et al.*, 2008). رادیکال آزاد NO یک مولکول فعال زیستی است که در تنظیم بسیاری از کارکردهای متنوع سلولی در گیاه از رشد ریشه تا پاسخ‌های سازگاری به تنش

[1] Sodium nitroprusside (SNP)

های زیستی و غیر زیستی نقش دارد. بررسی‌های اخیر نشان داده است که NO می‌تواند به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان در گیاهان عمل کند و در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیک، پاتوفیزیولوژیک و نموی دخالت نماید. نیتریک اکسایدیک محرک رشد گیاه، نقش محوری در تنظیم بسیاری از فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گیاهان، از جمله فتوسنتز ایفا می‌کند. این امر منجر به حداکثر رساندن رشد، عملکرد و کیفیت محصول و کمک به بهبود ترکیبات فعال گیاهان می‌گردد (Corpas*et al.*, 2011).

این مطالعه با هدف بررسی تأثیر استفاده از سدیم نیترو پروساید بر پرآوری و مقدار آنتوسیانین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهچه‌های درون شیشه‌ای سیب قرمز انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

از گیاهچه‌های بدست آمده از کشت مریستم جانبی در شرایط درون شیشه‌ای سیب گوشت قرمز رقم بناب استفاده شد. جهت تکثیر گیاهچه‌ها از محیط کشت MS(Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن سکوسترون[۲]، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر زغال فعال و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز استفاده شد.

تیمارها و صفات مورد ارزیابی

تیمارهای مورد بررسی غلظت‌های ۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید بود. نیتروپروساید پس از ضدعفونی با فیلتر به محیط کشت اضافه شد. بازکشت گیاهچه‌ها در محیط‌کشت جدید با همان ترکیب اولیه از سدیم نیتروپروساید به فواصل هر سه هفته انجام گردید. شش ماه پس از آغاز کشت ضریب پرآوری ریز نمونه‌ها و اندازه‌گیری‌های بیوشیمیایی شامل ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل‌اکسیداز، کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و مقدار آنتوسیانین کل با استفاده از بافت تازه برگ انجام گردید. این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار و ۳ مشاهده در هر تکرار انجام شد.

برای محاسبه ضریب پرآوری ریزنمونه‌ها، تعداد شاخه‌ها بعد از پایان آزمایش تقسیم بر تعداد شاخه‌ها در ابتدای آزمایش شد و به‌صورت درصد بیان گردید.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی: این پارامتر از طریق روش DPPH ارزیابی گردید (Brand-Williams *et al*., 1995).

فعالیت آنزیم‌ها: اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس تجزیه سوبسترا (پراکسید هیدروژن) انجام شد (Aebi, 1983). اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس تشکیل تتراگایاکول از گایاکول در حضور پراکسید هیدرژن و گایاکول بود(Chance and Maehly, 1955). به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آسکوربات پراکسیداز از روش Nakano و Asada (1981) استفاده گردید. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز بر اساس تجزیه‌ی سوبسترا (۴- متیل پیروکاتکول) در طول موج ۴۱۰ نانومتر انجام شد (GaleazziandSgarbieri, 1981). اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنیل آلانین‌آمونیالیاز با استفاده از بافتریس و بر اساس میزان تولید سینامیک اسید انجام گرفت (Wang *et al.*, 2006). فعالیت ویژه آنزیم‌ها بر اساس میلی‌مول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین گزارش گردید. اندازه‌گیری پروتئین محلول با استفاده از روش Bradford (1976) انجام شد.

سنجش میزان آنتوسیانین‌ها: آنتوسیانین ریز نمونه‌ها با استفاده از محلول متانول اسیدی (الکل متیلیک و کلریدریک اسید به نسبت ۹۹ به ۱) استخراج و در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت شد (krizek*et al.*, 1998)

تجزیه داده‌ها با نرم‌افزار آماری SPSS Ver. 16انجام گرفت و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد.

---

[۲] FeEDDHA

نتایج و بحث

تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف سدیم نیتروپروساید (۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکرومولار) بر صفات رشدی و آنتی‌اکسیدانی سیب گوشت قرمز در شرایط درون شیشه‌ای نشان داد که ضریب پرآوری، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل‌اکسیداز و فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و همچنین مقدار آنتوسیانین به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر استفاده از این ترکیب قرار گرفتند و اثر سدیم نیتروپروساید بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز معنی‌دار نبود.

استفاده از سدیم نیتروپروساید موجب افزایش معنی‌دار ضریب پرآوری ریز نمونه‌های کشت شده سیب گوشت قرمز گردید و بالاترین پرآوری (۷/۱۸٪) در غلظت ۴۰ میکرومولارSNP حاصل شد، هرچند غلظت بالای استفاده از این ترکیب (۵۰ میکرومولار) اثر منفی بر تکثیر ریزنمونه‌ها داشت (جدول ۱). بر اساس نظرXuو همکاران (2009) سدیم نیتروپروسایداز طریق تنظیم تعادل تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی موجب افزایش باززایی ریز نمونه‌ها می‌گردد.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ریز نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف SNP افزایش بسیار معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد نشان داد و بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۳۵/۵۱٪) در تیمار ۴۰ میکرومولارSNP حاصل شد و کمترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (۱۵/۷۷٪) در ریز نمونه‌های شاهد مشاهده گردید. باوجوداینکه فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز تحت تأثیر استفاده از سدیم نیتروپروساید در محیط کشت قرار نگرفت ولی از نظر کمی فعالیت این دو آنزیم با افزایش غلظت SNP روند نزولی نشان داد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ریز نمونه‌های تیمار شده با سدیم نیتروپروساید در مقایسه با شاهد افزایش قابل توجهی داشتند و بیشترین فعالیت آنزیم (۲/۶۱۹ واحد در میلی‌گرم پروتئین) در غلظت ۳۰ میکرومولارSNP مشاهده شد. فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل‌اکسیداز و فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز تحت تأثیر تیمارهای مختلف سدیم نیتروپروساید روند متفاوتی نشان داد. بیشترین فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در تیمارهای شاهد (۰/۱۰۴ واحد در میلی‌گرم پروتئین) و غلظت ۴۰ میکرومولارSNP (۰/۰۹۰ واحد در میلی‌گرم پروتئین) حاصل شد و غلظت‌های ۳۰ (۰/۶۸۵ واحد در میلی‌گرم پروتئین) و ۴۰ (۰/۴۴۸ واحد در میلی‌گرم پروتئین) میکرومولار سدیم نیتروپروساید بیشترین فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز را نشان دادند(جدول ۱). نیتریک اکساید نقش مؤثری در افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان مختلف دارد. کاربرد سدیم نیترو پروساید از طریق بهبود سیستم آنزیمی گیاه سبب افزایش رشد و عملکرد گیاهان تحت تنش می‌گردد (Tian and Li., 2006). در گیاهان مختلف کاربرد سدیم نیتروپروساید اثرات مختلفی بر فعالیت آنزیم‌ها دارد. بسیاری از محققان افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را تحت تأثیر کاربرد سدیم نیتروپروساید نشان می‌دهد (Tian and Li, 2006; Li *et al.*, 2008). بااین‌وجود Xu و همکاران (2009) کاهش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز و افزایش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز را تحت تأثیر سدیم نیتروپروساید گزارش کرده‌اند. مقدار آنتوسیانین ریز نمونه‌های سیب گوشت قرمز به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر استفاده از سدیم نیتروپروساید به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و بیشترین مقدار در تیمارهای ۲۰ (۲۷/۷۱ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن تر) و ۵۰ (۲۷/۴۵ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن تر) میکرومولارSNP حاصل شد(جدول ۱). در تحقیق EsmaeilzadehBahabadi و همکارانش (۲۰۱۵) میزان آنتوسیانین تحت تأثیر غلظت‌های مختلف سدیم نیتروپروساید افزایش نشان داد.

بر اساس نتایج به‌دست آمده استفاده از ۴۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید برای افزایش پرآوری و صفات آنتی‌اکسیدانی سیب گوشت قرمز توصیه می‌شود.

جدول ۱- اثر سدیم نیتروپروساید بر پرآوری و صفات آنتی‌اکسیدانی سیب گوشت قرمز رقم بناب.

سدیم نیتروپروساید	ضریب پرآوری	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (٪)	کاتالاز (واحد/میلی گرم)	پراکسیداز (واحد/میلی گرم)	آسکوربات پراکسیداز (واحد/میلی	پلی‌فنل اکسیداز (واحد/میلی	فنیل‌آلانین آمونیالیاز (واحد/میلی	آنتوسیانین (میلی‌گرم/کیلو گرم وزن تر)

(میکرو مولار)	ی (٪)		پروتئین)	پروتئین)	گرم پروتئین)	گرم پروتئین)	گرم پروتئین)	
۰	/۹۱ ۳ ^{d*}	۱۵/۷۷^{b}	۰/۰۴۱^{a}	۰/۲۱۲^{a}	۰/۲۳۲^{b}	۰/۱۰۴^{a}	۰/۱۴۳^{c}	۴/۸۱^{b}
۲۰	/۳۸ ۵ ^{c}	۲۲/۹۲^{b}	۰/۰۳۶^{a}	۰/۲۰۸^{a}	۱/۴۸^{ab}	۰/۰۵۱^{c}	۰/۳۵۰^{bc}	۲۷/۷۱^{a}
۳۰	/۳۶ ۶ ^{b}	۲۷/۵۱^{ab}	۰/۰۳۶^{a}	۰/۲۱۱^{a}	۲/۶۲^{a}	۰/۰۷۸^{b}	۰/۶۸۵^{a}	۱۰/۵۴^{ab}
۴۰	/۱۸ ۷ ^{a}	۳۵/۵۱^{a}	۰/۰۱۳^{b}	۰/۱۶۵^{a}	۰/۸۶۲^{ab}	۰/۰۹۰^{ab}	۰/۴۴۸^{ab}	۲۱/۷۵^{ab}
۵۰	/۳۳ ۳ ^{d}	۲۷/۸۰^{ab}	۰/۰۲۹^{ab}	۰/۱۸۹^{a}	۱/۴۵^{ab}	۰/۰۸۶^{b}	۰/۳۸۰^{bc}	۲۷/۴۵^{a}

* در هر صفت و گروه مقایسه شده، تیمارهای با حروف یکسان اختلاف معنی‌داری ندارند.

منابع

Aebi, H. 1983. Catalase. Methods of Enzymatic Analysis 3. VerlagChemie, Weinheim, Germany, 273-277.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry; 72: 248-54.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebenson Wiss Technology; 28: 25-30.

Chance, B. and Maehly, A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. In: Collowick S.P., Kapplan N.O., (eds). Methods in enzymology. Academic Press, New York, 764-775.

Corpas, F.J., Leterrier, M., Valderrama, R., Airaki, M., Chaki, M., Palma, J.M. and Barroso, J.B. 2011. Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. Plant Science; 181(5): 604-611.

EsmaeilzadehBahabadi, S., Rezaei, A. and Najafi, S.H. 2015. Nitric oxide effect on growth and some physiological parameters of *in vitro* cultured lemon balm (*Melissa officinalis* L.). Journal of Cell & Tissue; 6(2): 195-203. (in Persian).

Galeazzi, M.A.M. and Sgarbieri, V.C.J. 1981. Substrate specificity and inhibition of polyphenoloxidase from a dwarf variety of banana (*Musa Cavendishii* L.). Journal of Food Science; 46: 1404-1406.

Krizek, D.T., Brita, S.J. and Miewcki, R.M. 1998. Inhibitory effects of ambient level of solar UV-A and UV-B on growth of cv. New Red Fire lettuce. PlantPhysiology; 103: 1-7.

Li, Q.Y., Niu, H.B., Yin, J., Wang, M.B., Shao, H.B., Deng, D.Z., Chen, X.X., Ren, J.P. and Li, Y.C. 2008. Protective role of exogenous nitric oxide against oxidative stress induced by salt stress in barley (*Hordeumvulgare*). Colloids and Surfaces B: Biointerfaces; 56: 220-225.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.Plant Physiology; 15: 473-497.

Nakano, Y. and Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology; 22: 867-280.

Tian, X. and Li, Y. 2006. Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. Biologia Plantarum; 50: 775-778.

Wang, J., Zheng, L., Wu, J. and Tan, R. 2006. Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonialyase activation and taxol production induced by low energy ultrasound in *Taxus yunnanensis*cell suspension cultures. Cell Physiology; 14:391-397.

Xu, J., Yin, H., Wang, W., Mi, Q. and Liu, X. 2009. Effects of sodium nitroprusside on callus induction and shoot regeneration in micropropagated *Dioscorea opposite.* Plant Growth Regulation, 59:279–285.

The Effect of Sodium Nitroprusside on Proliferation and Antioxidant Activity of Red-fleshed Apple Var. Bonab

Fatemeh Zahedzadeh[1], Farshad Kakavand[2*], Nasrin Farhadi[1], FariborzZare Nahandi[1], Samira Zeinali Farokhy[1]

[1]Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz
[2]Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan
[*]*Corresponding Author: kakavand.f@gmail.com*

Abstract

Sodium nitroprusside (SNP) as a nitric oxide (NO) donor has a role in regulation of various plant cell functions. Present study was conducted to investigation the sodium nitroprusside effects on proliferation and antioxidant characters of red-fleshed apple. The obtained plantlets from meristem culture of red apple Var. Bonab were culture in MS medium with different concentrations of SNP (0, 20, 30, 40 and 50 µM). After prolong period (6 months) proliferation rate, antioxidant capacity, activity of catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase, poly phenol oxidase and phenylalanine ammonia-lyase as well as anthocyanin content of treated explants were measured. Sodium nitroprusside caused a significant increase in proliferation rete of red apple and the highest rate (7.18%) was obtained in 40 µM SNP. Antioxidant capacity of treated explants with different concentrations of SNP showed a significant increases in comparison with control explants and the highest antioxidant activity (35.51%) was obtained in 40 µM SNP. The activity of catalase, peroxidase and ascorbate peroxidase did not influence by Sodium nitroprusside but the effect of different SNP treatments on activity of poly phenol oxidase and phenylalanine ammonia-lyase was significant. The anthocyanin content of explants significantly increased by application of SNP. According to obtained results the application 40 µM SNP for increasing the proliferation rate and antioxidant characters of red-fleshed apple is suggested.

***Keywords*: Sodium Nitroprusside, In Vitro, Antioxidant Capacity, Phenylalanine Ammonia-lyase, Anthocyanin**