

پاسخ‌های فیزیولوژیکی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهچه‌های شاهی تحت

تنش متیل‌ایزوتیوسیانات

فریناز فرزادنژاد^۱، رویا رضوی زاده^{۱*} و لیلیا شبانی^۲

^۱گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران- ایران صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵ و ^۲گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۳/۲۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۴/۳۰).

چکیده:

یکی از آسیب‌های مهم بافتی که به دنبال فرارگیری گیاهان در معرض تنش به وجود می‌آید، ایجاد تنش اکسیداتیو است. در این پژوهش اثر سطوح مختلف متیل‌ایزوتیوسیانات بر برخی پارامترهای بیوشیمیایی و میزان فعالیت سه آنزیم آنتی‌اکسیدان اسکوربات‌پراکسیداز، کاتالاز و گایاکول‌پراکسیداز در گیاهچه شاهی در شرایط در شیشه بررسی شده است. بذره‌های گیاه شاهی بعد از ضدعفونی در محیط کشت MS کشت گردیدند. پس از یک دوره رشد ۲۰ روزه، گیاهچه‌ها در شرایط استریل با غلظت‌های صفر، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار متیل‌ایزوتیوسیانات به مدت ۳ روز تیمار گردیدند. نتایج به دست آمده نشان داد که میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کاروتنوئید و میزان پروتئین در گیاهچه‌های تحت تنش کاهش معنی‌داری داشته است. در حالیکه تنش ایزوتیوسیانات مقادیر قندهای احیاکننده، پرولین، آنتوسیانین و همچنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را افزایش داده است. به نظر می‌رسد متیل‌ایزوتیوسیانات باعث ایجاد تنش اکسیداتیو و فعال شدن پارامترهای دفاعی در گیاه شده است. بیشترین و کمترین میزان تأثیر به ترتیب در غلظت ۱ میلی‌مولار و ۰/۰۱ میلی‌مولار متیل‌ایزوتیوسیانات مشاهده شد.

کلمات کلیدی: تنش اکسیداتیو، کشت درون شیشه، متیل‌ایزوتیوسیانات.

مقدمه:

موجود می‌باشند و آنیون‌های آلی حاوی D-β تیوگلوکز و اکسیم‌های سولفونه شده هستند که گروه مهم و منحصر به فردی از متابولیت‌های ثانویه را در بذرها، ریشه‌ها، ساقه‌ها و برگ‌های گیاهان تشکیل می‌دهند. زمانی که گلوکوزینولات‌ها و آنزیم میروزیناز در مجاورت یکدیگر قرار می‌گیرند (پس از آسیب مکانیکی یا زخم) آنزیم در حضور آب به سرعت باعث هیدرولیز ترکیبات گلوکوزینولاتی می‌شود. محصولات هیدرولیز شامل یک بخش آگلیکون، گلوکز و سولفات می‌باشد. بخش آگلیکون

در درون سلول هیدرولیز گلیکوزینولات‌ها توسط آنزیم میروزیناز (تیوگلوکوزید گلوکوهِیدرولاز)، طیفی از محصولات که مهم‌ترین آن‌ها ایزوتیوسیانات‌ها هستند را به وجود می‌آورد. اخیراً مطالعات بیوشیمی و ژنتیکی صورت گرفته روی گیاه مدل آرابیدوپسیس، مسیر بیوستنز گلیکوزینولات‌ها را از پیش‌ماده آمینواسیدی تأیید کرده است. گلیکوزینولات‌ها در تمام سلول‌ها (در واکوئل) در غلظت‌های مختلف و در تمام اندام‌های خانواده شب‌بویان

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: Razavi.roya@gmail.com

تنش‌ها به طور معمول انتقال الکترون سلولی را در محفظه‌های مختلف درون سلولی مختل و منجر به تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) می‌شوند. یکی از آسیب‌های مهم بافتی که به دنبال قرارگیری گیاهان در معرض تنش ایجاد می‌شود، افزایش تجمع انواع مختلف اکسیژن‌های واکنش‌گر و ایجاد تنش اکسیداتیو می‌باشد. بسیاری از فرایندهای متابولیکی تولید گونه‌های اکسیژن فعال می‌نماید. سلول‌های گیاهی و اندامک‌های آن‌ها مثل کلروپلاست، میتوکندری و پراکسی‌زوم برای محافظت از خود در برابر این اکسیژن سمی از سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌کنند (Corpas *et al.*, 2001). به نظر می‌رسد توانایی گیاهان عالی در جاروب کردن رادیکال‌های سمی اکسیژن، عامل بسیار مهمی برای تحمل به تنش‌های محیطی باشد. آزمایشات انجام شده در شرایط در شیشه نشان داده است که بسیاری از آنزیم‌ها و ترکیبات ثانویه، گیاهان را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کنند. بررسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تعیین میزان فعالیت آن‌ها یکی از فاکتورهای تعیین‌کننده در تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی و در نتیجه کاهش یا افزایش مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی است (Corpas *et al.*, 2001).

با وجود چندین گزارش روی ترکیبات ایزوتیوسیانات، مکانیسم فیزیولوژیکی گیاه در برابر انواع این ترکیبات به طور کامل مشخص نیست (Hara *et al.*, 2010; Khokon *et al.*, 2011). به این منظور در این تحقیق تأثیر متیل ایزوتیوسیانات بر پاسخ‌های فیزیولوژیکی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز در گیاهچه‌های شاهی مورد مطالعه قرار گرفت. تره‌تیزک (شاهی) گیاهی خوراکی از تیره شب‌بویان و با نام علمی (*Lepidium sativum* L.) می‌باشد. گیاهی یکساله که برگ‌های بدون کرک و بدون دندانه آن به مصرف تغذیه انسان می‌رسد (Sheel and Agarwal, 2010). با توجه به اینکه گیاهان برای پاسخ به تنش‌ها از چندین مکانیسم بهره می‌گیرند، انجام این پژوهش برای بررسی نقش مؤثر

ناپایدار است و برای تشکیل ایزوتیوسیانات‌ها، تیوسیانات‌ها، نیتریل‌ها، اکسازولیدین تیون‌ها، اپی تیو نیتریل‌ها بسته به ساختار گلوکوزینولات‌ها و شرایط واکنش باز آرای می‌شوند. ایزوتیوسیانات‌ها دارای گروه عاملی $N=C=S$ هستند. از آنجایی که ایزوتیوسیانات‌ها با گروه‌های آمینو و سولفیدریل پپتیدها واکنش می‌دهند، این احتمال وجود دارد که بر عملکردهای پپتیدها تأثیر بگذارند (Yan and Chen, 2007). بسیاری از ایزوتیوسیانات‌های طبیعی در گیاهان از تغییرات شیمیایی ایجاد شده توسط گلیکوزینولات‌ها حاصل می‌شوند. ایزوتیوسیانات‌های طبیعی همچون آلیل ایزو تیو سیانات‌ها به عنوان عوامل طعم‌دهنده، معطرکننده و قارچ‌کش به کار می‌روند (Yan and Chen, 2007). این ترکیبات دارای طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی شامل فعالیت‌های آنتی‌اکسیدان، آنتی‌باکتریال، ضدقارچ، ضدنماتد و ضد حشره هستند (Yan and Chen, 2007). ایزوتیوسیانات‌ها ترکیباتی بسیار واکنش‌پذیر هستند، بنابراین باعث ایجاد واکنش‌های اکسیداتیو در گیاه شده و اکسیژن فعال تولید می‌کنند (Yan and Chen, 2007). در حقیقت این ترکیبات نقش دوگانه دارند، در غلظت بالا اثرات سمی روی سلول دارند (Hara *et al.*, 2010). ولی در غلظت‌های پایین‌تر به طور غیرمستقیم باعث دفاع سلولی می‌شوند. ویتامین C، ویتامین E و کاروتنوئیدها آنتی‌اکسیدان‌های مستقیم هستند به صورتی که رادیکال‌های آزاد را قبل از آنکه به سلول‌ها آسیب برسانند خنثی می‌کنند. گلوکوزینولات‌ها و محصولات هیدرولیزشان به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های غیرمستقیم در نظر گرفته می‌شوند، به دلیل اینکه اینها رادیکال‌های آزاد را مستقیماً خنثی نمی‌کنند، بلکه از طریق تنظیم فعالیت آنزیم‌های متابولیزه کننده زنوبیوتیک (آنزیم‌های فاز I و فاز II که فعالیت آنتی‌اکسیدان تأخیری را راه‌اندازی می‌کنند) عمل می‌کنند. آنزیم‌های فاز I (ستیکروم P450) و آنزیم فاز II (گلوکوتایون اس ترانسفراز، آلدئیدردوکتاز، S- میتل ترانسفراز، N- استیل ترانسفراز) هستند.

دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (Lichtenthaler, 1987). نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه و ارائه شد.

سنجش میزان آنتوسیانین: در این روش ابتدا ۰/۰۵ گرم برگ گیاه را با ترازو وزن کرده سپس با ۲/۵ سی‌سی متانول اسیدی (۹۹ سی‌سی متانول و ۱ سی‌سی اسید کلریدریک) سائیده شد. در استوانه مدرج حجم کل عصاره به ۲/۵ سی‌سی رسانده شد. عصاره در لوله‌های آزمایش سرپیچ‌دار ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه قرار گرفت و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر جذب در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد (Wagner, 1979). برای محاسبه غلظت، ضریب خاموشی ۳۳۰۰۰ سانتی‌متر بر مول در نظر گرفته شد و نتایج بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

اندازه‌گیری مقدار پرولین: مقدار پرولین در برگ‌ها و ریشه به روش Bate و همکاران (۱۹۷۳) اندازه‌گیری شد. مطابق این روش ۰/۰۲ گرم از بافت تازه برگ و ریشه توزین گردید و هر نمونه جداگانه با ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالسیلیک ۳ درصد در هاون چینی سائیده شد. پس از سانتریفوژ و افزودن معرف نین هیدرین و اسید استیک خالص به محلول رویی، نمونه‌ها در بن ماری به مدت یک ساعت قرار داده شدند. با افزودن تولوئن به نمونه‌ها و جداسازی محلول رویی، شدت جذب محلول‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. سپس با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت پرولین بر حسب میکرو مول بر گرم وزن تر محاسبه و گزارش گردید.

سنجش میزان قندهای احیاکننده: ۰/۰۵ گرم از بافت تر برگ و ریشه توزین شد و هر نمونه با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر در هاون چینی سائیده شد. مقدار قندهای احیاکننده در برگ و ریشه به روش Somogyi-Nelson (۱۹۵۲) اندازه‌گیری شد. شدت جذب محلول‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد، سپس با استفاده از منحنی استاندارد

ترکیبات ایزوتیوسیانات به‌کار رفته در القای پاسخ‌های دفاعی از طریق سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه و یافتن مناسب‌ترین غلظت این ترکیبات می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

مواد گیاهی: بذرهای گیاه شاه‌ی (*Lepidium sativum* L.) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. بذرها با آب مقطر شستشو و سپس با اتانول ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه و محلول ۲۰ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شدند. تعداد ۲۰ بذر شاهی در ظروف کشت حاوی محیط کشت MS کشت گردید و سپس محیط‌های کشت حاوی بذر به مدت ۲۰ روز در اتاق کشت با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای 25 ± 2 °C و رطوبت ۹۵-۹۸٪ نگهداری شدند.

امولسیون آبی متیل ایزوتیوسیانات در غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار تهیه گردید و سپس در شرایط استریل (کابینت لامینار ایرفلو) با استفاده از سرنگ استریل روی گیاهچه‌ها درون ظروف کشت تیمار گردید. گیاهان تیمار شده با ایزوتیوسیانات مجدداً به مدت ۳ روز در شرایط اتاق کشت نگهداری شدند (Hara *et al.*, 2010). پس از ۳ روز گیاهچه‌ها در نیتروژن مایع منجمد شدند و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و برای اندازه‌گیری پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی استفاده گردیدند.

اندازه‌گیری میزان کلروفیل و کاروتنوئید: بر اساس این روش ۰/۰۵ گرم برگ تر وزن شد و در هاون چینی حاوی ۵ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد سائیده شد. محتوای هاون با کاغذ صافی که در قیف شیشه‌ای قرار داشت صاف گردید. سپس ۱۰ میلی‌لیتر استن به آن اضافه شد. حجم محلول به ۱۵ میلی‌لیتر رسانده شد. این محلول حاوی کلروفیل a، b و کاروتنوئید است. ۳ میلی‌لیتر از عصاره نمونه‌ها در کووت ریخته شد و شدت جذب آنها در طول موج‌های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲۰ و ۴۷۰ نانومتر با استفاده از

غلظت قندهای احیا کننده بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه و گزارش گردید.

تهیه عصاره گیاهی برای اندازه گیری آنزیم: مقدار ۰/۱

گرم از بخش هوایی توزین و درون هاون قرار داده شد و ۱/۵ میلی لیتر از بافر نمک های فسفات حاوی پلی وینیل پیرولیدین (PVP) به آن اضافه شد. بافر مورد استفاده در این مرحله دارای pH برابر ۷/۴ بود. بافت مورد نظر در هاون ساییده شد به طوری که یک محلول کاملاً هموژن حاصل گردید. عصاره گیری و نگهداری بافت های هموژن در دمای پایین و روی یخ انجام شد. بافت های عصاره گیری شده در ۱۰۰۰۰ دور و دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند.

اندازه گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز:

اندازه گیری فعالیت آنزیم APX بر اساس روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) اندازه گیری شد. محلول واکنش آنزیم APX از ۶۲۵ میکرو لیتر بافر فسفات حاوی ۰/۲ میلی مولار EDTA، ۱۷۵ میکرو لیتر آسکوربیک اسید، ۵۰ میکرو لیتر پراکسید هیدروژن و ۵۰ میکرو لیتر آلبومین گاوی تشکیل شده بود. جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم APX، مقدار ۹۰۰ میکرو لیتر از محلول واکنش و ۱۰۰ میکرو لیتر از عصاره آنزیمی مخلوط شد و منحنی کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر در مدت ۶۰ ثانیه رسم گردید. یک واحد از فعالیت آنزیم APX بر اساس سرعت اکسید $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ شده بود. این عمل سه بار تکرار گردید و میانگین سه بار منبای محاسبه فعالیت APX در هر نمونه قرار گرفت. میزان فعالیت آسکوربات پراکسیداز با استفاده از ضریب خاموشی مولی برابر $2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ محاسبه شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز: اندازه گیری

فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس روش معرفی شده توسط Aebi (۱۹۸۴) انجام شد. طبق تعریف یک واحد کاتالاز مقدار آنزیمی است که موجب تجزیه

یک میکرومول H_2O_2 در مدت یک دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد شود. بنابراین محلول واکنش حاوی H_2O_2 با غلظت ۵ میلی مولار و بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH برابر با ۷ تهیه شد. ۱۵۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی و ۱۳۵۰ میکرو لیتر از محلول واکنش با هم ترکیب شدند. با شروع تجزیه H_2O_2 در محیط، واکنش آغاز شد و میزان کاهش جذب در طول زمان در طول موج ۲۴۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد. میزان فعالیت کاتالاز با استفاده از ضریب خاموشی مولی برابر $0.039 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ محاسبه شد.

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز:

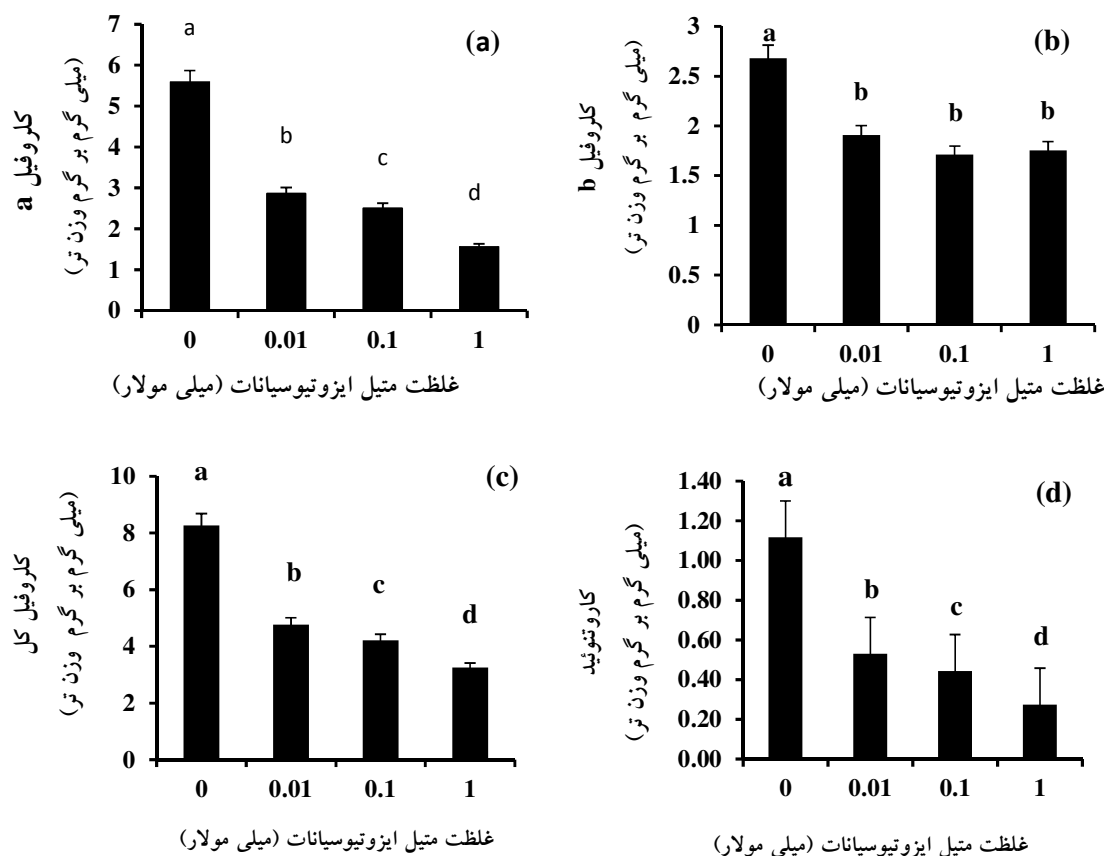
مخلوط واکنش برای اندازه گیری آنزیم گایاکول پراکسیداز مطابق با روش Lin و Kao (۱۹۹۹) حاوی بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH=۷، گایاکول ۹ میلی مولار و پراکسید هیدروژن ۱۹ میلی مولار می باشد. میزان جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر در طول ۱ دقیقه اندازه گیری شد. ضریب خاموشی، ۲۶/۶ میلی مول بر سانتیمتر در نظر گرفته شد. یک واحد فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز به عنوان مقدار آنزیمی که باعث تشکیل ۱ میکرومولار تترآگایاکول در دقیقه می شود تعریف شد.

اندازه گیری غلظت کل پروتئین ها: اندازه گیری

پروتئین کل طبق روش Bradford (۱۹۷۶) با اندکی تغییر انجام شد. جذب عصاره ها در طول موج ۵۹۵ nm با دستگاه اسپکتروفتومتر UV-mini ۱۲۴۰ مدل Shimadzu خوانده شد. میزان پروتئین محلول کل بر حسب mg/g FW گزارش گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: طرح آزمایشی به کار رفته

طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار به ازای هر تیمار انجام گرفت. آنالیز واریانس داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت. مقایسه میانگین براساس آزمون Duncan انجام گردید و سطوح معنی دار بودن تیمارها در سطح $P \leq 0.05$ محاسبه گردید.



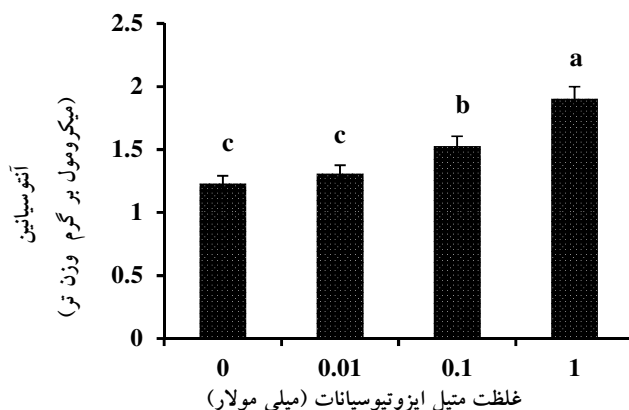
شکل ۱- تأثیر متیل ایزوتیوسیانات بر میزان کلروفیل a (a)، کلروفیل b (b)، کلروفیل کل (c) و کاروتنوئید (d). مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن می‌باشد ($P \leq 0.05$).

نتایج:

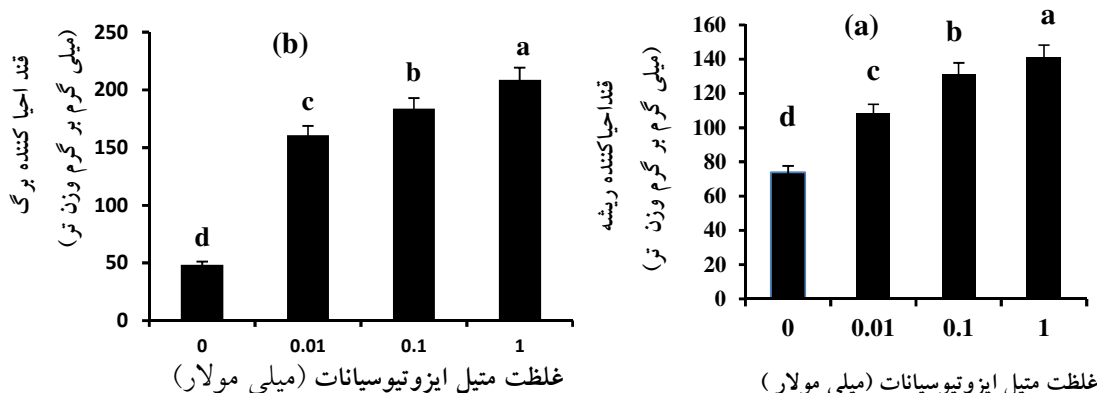
غلظت‌های ۱، ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی‌مولار متیل ایزوتیوسیانات نسبت به گیاهچه‌های شاهد به ترتیب به میزان ۶۲، ۵۱ و ۴۰ درصد کاهش نشان داد (شکل ۱ c). تیمار متیل ایزوتیوسیانات باعث کاهش معنی‌دار میزان کاروتنوئید شد. در غلظت‌های ۱، ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی‌مولار ایزوتیوسیانات کاهش میزان کاروتنوئید به ترتیب به میزان ۸۲، ۶۰ و ۵۲ درصد در مقایسه با شاهد مشاهده گردید (شکل ۱ d).

میزان آنتوسیانین: در بررسی تأثیر متیل ایزوتیوسیانات مشاهده شد که میزان آنتوسیانین برگ نسبت به گیاهچه‌های شاهد افزایش یافته است. متیل ایزوتیوسیانات در غلظت ۱ و ۰/۱ میلی‌مولار میزان آنتوسیانین برگ را به ترتیب به میزان ۱/۵۴ و ۱/۲۴ برابر در مقایسه با شاهد افزایش داده

کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها: در گیاهچه‌های مورد مطالعه میزان کلروفیل a، b و کل و نیز کاروتنوئیدها تحت تأثیر تنش متیل ایزوتیوسیانات کاهش معنی‌داری نشان داد. غلظت‌های ۱ و ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی‌مولار متیل ایزوتیوسیانات باعث کاهش میزان کلروفیل a به ترتیب به میزان ۷۲، ۵۵ و ۵۱ درصد در مقایسه با شاهد شد (شکل ۱ a). متیل ایزوتیوسیانات در غلظت ۱ میلی‌مولار باعث کاهش میزان کلروفیل b به میزان ۴۰ درصد در مقایسه با شاهد شد و غلظت ۰/۱ و ۰/۰۱ به ترتیب باعث کاهش ۴۵ و ۴۲ درصدی میزان کلروفیل b در مقایسه با شاهد گردید (شکل ۱ b). میزان کلروفیل کل در



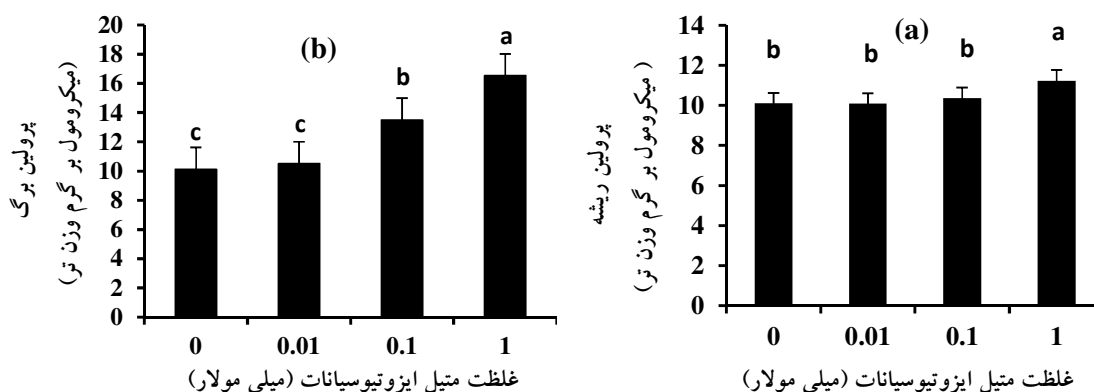
شکل ۲- تأثیر متیل ایزوتیوسیانات بر میزان آنتوسیانین در گیاهچه‌های شاهی. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن می‌باشد ($P \leq 0.05$).



شکل ۳- تأثیر متیل ایزوتیوسیانات بر میزان قندهای احیاکننده در ریشه (a) و اندام هوایی (b) گیاهچه های شاهی. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن می‌باشد ($P \leq 0.05$).

پرولین ریشه و اندام هوایی: متیل ایزوتیوسیانات در غلظت ۱ میلی مولار باعث افزایش معنی دار پرولین ریشه در مقایسه با شاهد شد. اختلاف معنی داری در میزان پرولین ریشه بین تیمار ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی مولار و گیاهچه‌های شاهد مشاهده نشد. همچنین متیل ایزوتیوسیانات در غلظت‌های ۱ و ۰/۱ میلی مولار باعث افزایش پرولین برگ به ترتیب به میزان ۱/۶، ۱/۳ برابر در مقایسه با شاهد شده است. اختلاف معنی داری در میزان پرولین برگ بین تیمار ۰/۰۱ میلی مولار و گیاهچه‌های شاهد مشاهده نشد (شکل ۴).
فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در اندام هوایی:
 میزان فعالیت هر سه آنزیم تحت تیمار با

است ولی میزان آنتوسیانین در غلظت ۰/۰۱ میلی مولار اختلاف معنی داری با شاهد نشان نداد (شکل ۲).
میزان قندهای احیاکننده: میزان قندهای احیاکننده در ریشه در غلظت های ۱، ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی مولار متیل ایزوتیوسیانات به ترتیب به میزان ۱/۷۸، ۱/۷۷ و ۱/۴۶ برابر در مقایسه با شاهد افزایش معنی داری یافته است. متیل ایزوتیوسیانات در غلظت‌های ۱، ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی مولار باعث افزایش معنی دار قندهای احیاکننده به ترتیب به میزان ۴/۴، ۳/۸ و ۳/۲ برابر در مقایسه با شاهد در اندام هوایی شد. بیشترین میزان افزایش قندها در غلظت ۱ میلی مولار و کمترین میزان در غلظت ۰/۰۱ میلی مولار مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۴- تاثیر متیل‌ایزوتیوسیانات بر میزان پروتئین ریشه (a) و اندام هوایی (b) گیاهچه‌های شاهی. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن می‌باشد ($P \leq 0.05$).

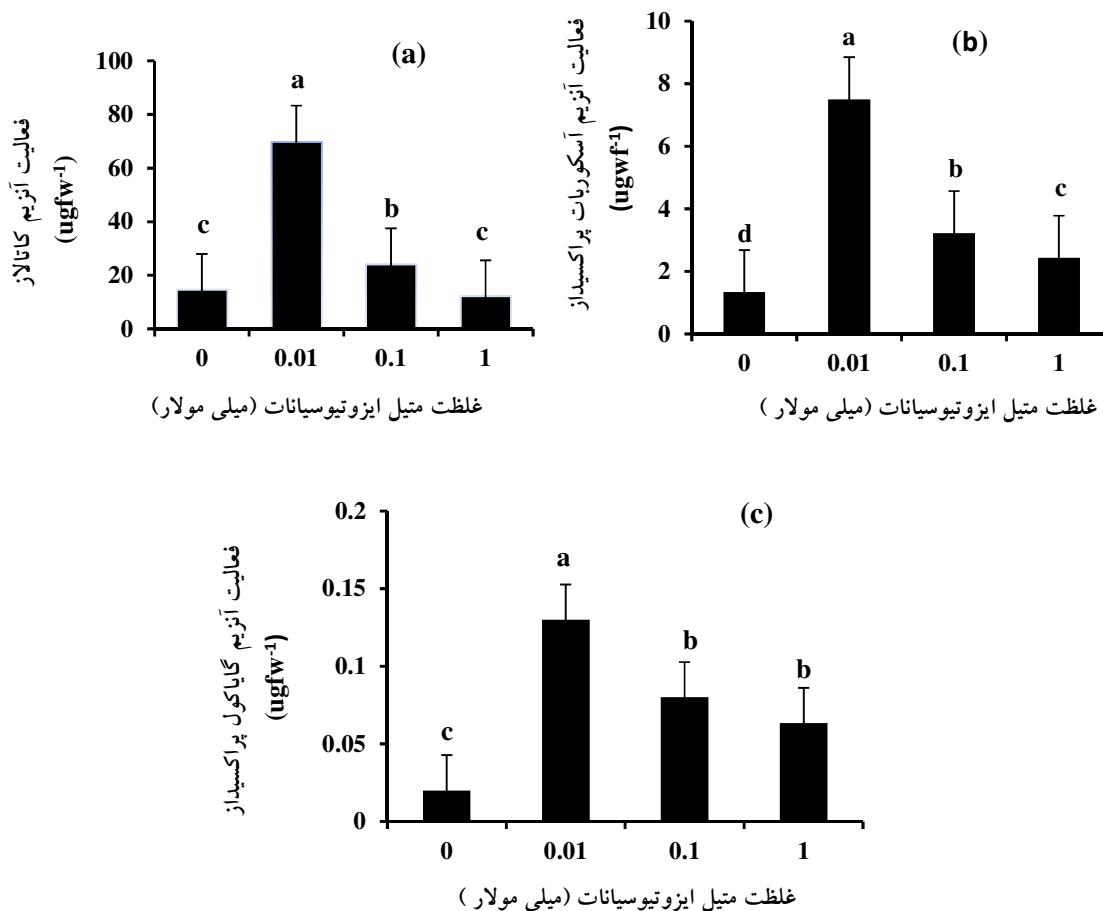
میزان پروتئین به ترتیب به میزان ۴۰، ۲۰ و ۱۰ درصد در مقایسه با شاهد شده است (شکل ۶).

بحث:

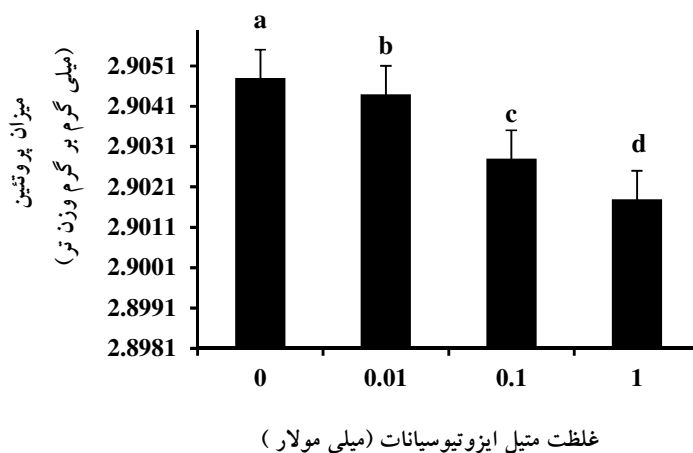
نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که تنش متیل‌ایزوتیوسیانات سبب القا پاسخ‌های فیزیولوژیکی و فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهچه‌های شاهی شده است. میزان کلروفیل در گیاهان اغلب برای ارزیابی اثر تنش‌های محیطی تعیین می‌شود. این تنش‌ها ممکن است از طریق مهار فعالیت آنزیم‌ها، فرآیندهای متابولیکی را متوقف کنند. کاهش میزان کلروفیل در گیاهان تحت تنش احتمالاً به علت مهار فعالیت آنزیم‌های سنتزکننده کلروفیل و یا افزایش تجزیه رنگدانه‌های کلروفیل می‌باشد (Sairam *et al.*, 1998). تیمار متیل‌ایزوتیوسیانات در غلظت‌های ۱ و ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی‌مولار باعث کاهش میزان کلروفیل کل نسبت به گیاهچه‌های شاهد شاهی شد. Hara و همکاران (۲۰۱۰) نیز گزارش کردند تیمار متیل‌ایزوتیوسیانات سبب کاهش میزان کلروفیل (تقریباً ۵۰ درصد) در اندام هوایی گیاهچه‌های ۵ هفته‌ای آرابیدوپسیس شده است. همچنین در تحقیق حاضر تیمار متیل‌ایزوتیوسیانات میزان کاروتنوئید برگ را نسبت به گیاهچه‌های شاهد کاهش داده است. رادیکال‌های آزاد

متیل‌ایزوتیوسیانات افزایش یافت. در بررسی اثر متیل‌ایزوتیوسیانات، افزایش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی‌مولار ایزوتیوسیانات در مقایسه با شاهد مشاهده شد. در غلظت ۱ میلی‌مولار کمترین و در غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز مشاهده شد. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی‌مولار ایزوتیوسیانات به ترتیب حدود ۷ و ۲ برابر نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت (شکل ۵ a). در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار متیل‌ایزوتیوسیانات، میزان فعالیت آسکوربات‌پراکسیداز به ترتیب به میزان ۵/۶، ۲/۴ و ۱/۸ برابر نسبت به گیاهچه‌های شاهد افزایش معنی‌داری یافته است (شکل ۵ b). تیمار متیل‌ایزوتیوسیانات در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار، میزان فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز را در برگ به ترتیب به میزان ۶/۲، ۴ و ۳ برابر در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد افزایش داده است. در غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار بیشترین میزان فعالیت آنزیم مشاهده شد (شکل ۵ c).

میزان پروتئین در اندام هوایی: پروتئین کل در گیاهچه‌های تحت تنش متیل‌ایزوتیوسیانات نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری یافت. متیل‌ایزوتیوسیانات در غلظت‌های ۱، ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی‌مولار، باعث کاهش



شکل ۵- تأثیر متیل ایزوتیوسیانات بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (a)، آسکوربات پراکسیداز (b) و گایاکول پراکسیداز (c) برگ شاهی. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن می باشد (P≤0.05).



شکل ۶- تأثیر متیل ایزوتیوسیانات بر میزان پروتئین کل در بافت برگ شاهی. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن می باشد (P≤0.05).

محیطی گزارش شده است (Murali and Teramura, 1986). در این تحقیق به نظر می‌رسد تیمار متیل‌ایزوتیوسیانات از طریق افزایش آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها سبب زدودن رادیکال‌های آزاد اکسیژن و افزایش سازگاری گیاه به شرایط تنش شده باشد. در پژوهشی Connor و همکاران (۲۰۰۲) گزارش دادند که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و آنتوسیانین در میوه زغال اخته به طور قوی در ارتباط با یکدیگر هستند و در طول دوره سرما افزایش می‌یابند. همچنین Solecka و همکاران (۱۹۹۹) اثر تنش سرما (دمای -5°C) را بر میزان آنتوسیانین در گیاه کلم بررسی کردند. نتایج آنها افزایش محتوای آنتوسیانین را در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد نشان داد.

میزان کربوهیدرات و پرولین در ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌های شاهی تحت تنش ایزوتیوسیانات افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد نشان داد. گیاهان برای حفظ تعادل یونی و تنظیم اسمزی در واکنش‌ها و سیتوپلاسم خود ترکیباتی با جرم ملکولی کم از قبیل پرولین، گلیسین، بتائین و قندهایی از قبیل گلوکز و فروکتوز که مجموعاً اسمولیت نامیده می‌شوند را انباشته می‌کنند (Parida et al., 2002). همچنین به نظر می‌رسد که قندهای محلول نقش مهمی در ارتباط با گونه‌های اکسیژن واکنش‌دهنده داشته باشند. قندها برای انجام فرایندهای آنتی‌اکسیداتیو مثل مسیر پنتوزفسفات (Barra et al., 2003; Debnam et al., 2004) و بیوستز کاروتنوئیدها نیز لازم هستند. کاهش محتوای نشاسته ذخیره شده و افزایش قندهای احیا و غیراحیاء در شرایط تنش گزارش شده است (Parida et al., 2003). آنالیزهای رونویسی ژن تأیید کرده است که پیام‌رسانی قند با کنترل تنش اکسیداتیو مرتبط است. تنش‌های متفاوت که به طور مستقیم یا غیر مستقیم باعث تجمع گونه‌های اکسیژن واکنش‌دهنده می‌شوند، مثل شوری، خشکی، حرارت پایین و سمیت فلزات سنگین باعث انباشتگی قندهای محلول شده که به عنوان مکانیسم سازشی پاسخ به شرایط تنش می‌باشد

تولید شده در طی تنش سبب تجزیه رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاهچه‌های شاهد کاهش داده است. رادیکال‌های آزاد تولید شده در طی تنش سبب تجزیه رنگیزه‌های فتوسنتزی و غیرفتوسنتزی و در نتیجه کاهش رنگیزه‌ها می‌گردند (Sairam et al., 1998). کاروتنوئیدها در چند سطح باعث حفاظت دستگاه فتوسنتزی در برابر فوتون‌های اضافی و تنش اکسیداتیو می‌شوند که از جمله واکنش با کلروفیل برانگیخته برای ممانعت از تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن می‌باشد. در واقع، کاروتنوئیدها به عنوان یک سیستم حفاظتی در برابر تنش اکسیداتیو القا شده تجزیه شده و از بین می‌روند. فرونشانی فتوشیمیایی کلروفیل‌های برانگیخته توسط کاروتنوئید منجر به برهم زدن ساختار کاروتنوئیدها و در نهایت کاهش میزان آن‌ها می‌گردد (Sanita and Gabbrielli, 1999). بنابراین احتمال دارد کاهش میزان کاروتنوئیدها تحت تیمار متیل‌ایزوتیوسیانات، به دلیل نقش این رنگیزه‌ها در محافظت کلروفیل برگ‌ها در برابر تنش اکسیداتیو ایجاد شده توسط ایزوتیوسیانات‌ها باشد. در این تحقیق مشخص شد که تیمار متیل‌ایزو تیو سیانات میزان آنتوسیانین را در برگ گیاهچه‌های شاهی در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد افزایش داده است. فلاونوئیدها ترکیبات پلی‌فنولیک و از مهمترین ترکیبات ثانویه گیاهان می‌باشند. این ترکیبات از مشتقات فنیل‌پروپانوئید می‌باشند. آنتوسیانین‌ها به عنوان یک گروه از فلاونوئیدهای محلول در آب، در یک نقطه پایانی در مسیر بیوستز فلاونوئیدها سستز می‌شوند (Mars et al., 1995). با ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاه، بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدان (Vinyard et al., 2005) و القاء مسیر فنیل‌پروپانوئید به‌ویژه مسیر بیوستز فلاونوئیدها افزایش می‌یابد (Green and Fluhr, 1995). در این پژوهش اختلاف معنی‌داری در میزان آنتوسیانین بین غلظت $0/01$ میلی‌مولار متیل‌ایزوتیوسیانات و شاهد مشاهده نشد ولی در غلظت‌های 1 و $0/1$ میلی‌مولار میزان آنتوسیانین به ترتیب به میزان 58 و 25 درصد افزایش یافته است. نتایج مشابهی از افزایش فلاونوئیدها طی تنش‌های

(Roitsch and Ehneß, 2000). در این تحقیق نیز به نظر می‌رسد افزایش کربوهیدرات‌ها به دلیل مقابله با رادیکال‌های اکسیژن ایجاد شده تحت تنش ایزوتیوسیانات باشد. پرولین نیز نقش‌های متعددی در تحمل به تنش گیاهان به عهده دارد که از جمله فعالیت آنتی‌اکسیدانی پرولین می‌باشد. پرولین می‌تواند اکسیژن یکتایی و تخریب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد را پاک‌سازی کرده و یک نقش مهم در حفاظت پروتئین‌ها در مقابل دنا توره شدن داشته باشد (Alia and Mohanty, 1991).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت تحت تنش ایزوتیوسیانات نشان داد که متیل‌ایزوتیوسیانات باعث افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز و در نتیجه تحمل بیشتر به تنش می‌شود. بالاترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار متیل‌ایزوتیوسیانات مشاهده شد. تعادل بین تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان چگونگی رخداد سیگنال‌های اکسیداتیو را تعیین می‌کند (Moller et al., 2007). القای فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان یک سازوکار سازگاری عمومی گیاهان در مقابل تنش‌های اکسیداتیو است (Foyer and Noctor, 2005). کاتالاز مهمترین آنزیم برای حذف پراکسید هیدروژن می‌باشد که از طریق شکستن آن به آب و اکسیژن، آن را حذف می‌کند. القای فعالیت کاتالاز باعث غلبه بر تنش اکسیداتیو از طریق سم‌زدایی پراکسید هیدروژن می‌شود (Mazhoudi et al., 2002). در غلظت‌های بالای متیل‌ایزوتیوسیانات، آنزیم کاتالاز ممکن است توسط پروتئین‌های القا شده توسط تنش اکسیداتیو شکسته شود که در برگ‌های مسن نخود نیز گزارش شده است (Sandalio et al., 2001). کاهش در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در سطوح بالای تنش، همچنین می‌تواند به علت شکستن مولکول‌های آنزیم توسط رادیکال‌های آزاد اکسیژن باشد (Sandalio et al., 2001). طبق نتایج این تحقیق، متیل‌ایزوتیوسیانات همچنین فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز را نسبت به گیاهچه‌های شاهد در

اندام هوایی شاهی افزایش داده است. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار متیل‌ایزوتیوسیانات مشاهده شد. افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز توسط تنش‌های غیرزیستی دلیلی بر شروع دفاع آنتی‌اکسیدانتی می‌باشد. آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در سیکل آسکوربات - گلوکاتیون شرکت کرده و از این طریق باعث از بین بردن پراکسید هیدروژن می‌شود. در تحقیقی Wang و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که تیمار آلیل‌ایزوتیوسیانات ابتدا باعث افزایش و سپس کاهش میزان فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در میوه زغال اخته شده است. فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز نیز تحت تأثیر غلظت‌های مختلف ایزوتیوسیانات افزایش نشان داده است. آنزیم گایاکول‌پراکسیداز اکسیداسیون گهرمایه وابسته به پراکسید هیدروژن را کاتالیز می‌کند. همچنین این آنزیم بیوستتر لیگنین را تحریک می‌کند و قادر به ایجاد یک سد فیزیکی در برابر تنش‌ها می‌باشد که به موجب آن بافت‌ها را بر علیه رادیکال‌های آزاد فعال که به سلول‌ها آسیب می‌رسانند تقویت می‌کند (Fang and Kao, 2000). در تحقیق حاضر کاهش فعالیت این آنزیم‌ها در غلظت‌های بالای متیل‌ایزوتیوسیانات، ممکن است از طریق مهار این آنزیم‌ها و یا غیرفعال کردن و تنظیم پایین آن‌ها باشد به طوری که در شدت بالای تنش اثر متضاد روی فعالیت آنزیم‌های دفاعی داشته و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مشاهده می‌گردد.

از نتایج دیگر این تحقیق کاهش میزان پروتئین‌های محلول در گیاهان تحت تنش ایزوتیوسیانات می‌باشد. از دلایل کاهش پروتئین‌ها در این سطوح تنش، ممکن است افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن باشد چرا که این ترکیبات موجب مهار سنتز پروتئین‌ها شده و یا منجر به واسرشتگی آنها می‌گردند (Sgherri and Navari-Izzo, 1995). همچنین می‌توان به کاهش فتوسنتز و کاهش مواد مورد نیاز برای سنتز پروتئین‌ها تحت شرایط تنش اشاره کرد (Havaux et al., 1987).

نتیجه‌گیری کلی:

نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد تنش اکسیداتیو ناشی از تیمار غلظت‌های متوسط متیل ایزوتیوسیانات سبب القا پاسخ‌های فیزیولوژیکی و افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان در گیاهچه‌های شاهی در شرایط در شیشه شده است و می‌تواند در سازگاری و مقابله گیاهان در برابر شرایط تنش اهمیت داشته باشد. احتمالاً متیل

ایزوتیوسیانات در گیاهچه‌های شاهی پاسخ‌های وابسته به دفاع سیستم آنتی‌اکسیدانی را وساطت می‌کند

سپاسگزاری:

نویسندگان مقاله از قطب تنش‌های گیاهی دانشگاه اصفهان تشکر می‌نمایند.

منابع:

- Foyer, C. H. and Noctor, G. (2005) Redox homeostis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866-1875
- Green, R. and Fluhr, R. (1995) UV-B induced PR-1 accumulation is mediated by active oxygen species. *Plant Cell* 7: 203-212.
- Hara, M., Yatsuzuka, Y., Tabata, K. and Kuboi, T. (2010) Exogenously applied isothiocyanates enhance glutathione S-transferase expression in Arabidopsis but act as herbicides at higher concentrations. *Journal of Plant Physiology* 167: 643-649.
- Havaux, M., Canaai, O. and Malkin, S. (1987) Inhibition of photosynthetic activities under slow water stress measured *in vivo* by photoacoustic method. *Physiological Plantarum* 70: 503-510.
- Khokon, M., Jahan, M. D. S., Rahman, T., Hossain, M. A., Muroyama, D., Minami, I., Munemasa, S., Mori, I. C., Nakamura, Y. and Murata, Y. (2011) Allyl isothiocyanate (AITC) induces stomatal closure in Arabidopsis. *Plant, Cell and Environment* 34: 1900-1906.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymol* 148: 350-382.
- Lin, C. C. and Kao, C. H. (1999) NaCl induced changes in ionically bound peroxidase activity in roots of rice seedling. *Plant and Soil* 216:147-153.
- Mars, K. A., Alfenito, M. R., Loyd, A. M. and Valbot, V. A. (1995) Glutathione s-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene bronze-2. *Nature* 375:397-400.
- Mazhoudi S., Chaoui A., Ghorbal M. H. and Ferjani E. (2002) Response of antioxidative enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill). *Plant Science* 127: 129 – 137.
- Moller, I. M., Jensen P. E. and Hansson, A. (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58: 459-481.
- Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. *Methods Enzymology* 105: 121 – 126.
- Alia, P. S. P. and Mohanty, P. (1991) Proline enhances primary photochemical activities in isolated thylakoid membranes of *Brassica juncea* by arresting photoinhibitory damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 181: 1238-1244.
- Barra L., Pica N., Couffi K., Walker G., Blanco C. and Trautwetter A. (2003) Glucose-6-phosphate dehydrogenase is required for sucrose and trehalose to be efficient osmoprotectants in *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS Microbiology Letters*, 229: 183-188.
- Bates, L., Waldren, R. and Teare, I. (1973) Rapid determination of free prolin for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- 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: 248-254.
- Connor, A. M., Luby, J. J., Hancock, J. F., Berkeheimer, S. and Hanson, E. J. (2002) Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during coldtemperature storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 893-898.
- Corpas, F. J., Barroso, J. B. and Del Rio, L. A. (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Science* 6: 145-50.
- Debnam P. M., Fernie A. R., Leisse A., Golding A., Bowsher C. G., Grimshaw C., Knight J. S. and Emes M. J. (2004) Altered activity of the P2 isoforme of plastidic glucose-6- phosphate dehydrogenase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) causes changes in carbohydrate metabolism and response to oxidative stress in leaves. *Plant Journal* 38: 49-59.
- Fang, W. and Kao, C. H. (2000) Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. *Plant Science* 158: 71 – 76.

- Sgherri, C. L. M. and Navari-Izzo, F. (1995) Sunflower seedling subjected to increasing water deficit stress: oxidative stress and defense mechanisms. *Physiologia Plantarum* 93:25-30.
- Sheel, Sh. and Agarwal, N. (2010) Nourishment and healing process of garden cress. *Indian Journal of Natural Products and Resources* 18: 292-297.
- Somogyi-Nelson, M. (1952) Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* 195:19-29.
- Solecka, D., Boudet, A. M. and Kacperska, A. (1999) Phenylpropanoid and Anthocyanin changes in low temperature treated winter oilseed rape leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 31:491-496
- Vinyard, P. G., Moody, C. J. and Jacob, C. (2005) Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends in Biochemical Science* 8:453-461.
- Wagner, G. J. (1979) Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids and anthocyanin in protoplast. *Plant Physiology* 68: 88-93.
- Wang, S. Y., Chi-Tsun, Ch. and Jun-jie, Y. (2010) Effect of allyl isothiocyanate on antioxidants and fruit decay of blueberries. *Food Chemistry* 120:199-204.
- Yan, X. and Chen, S. (2007) Regulation of plant glucosinolate metabolism. *Planta* 226: 1343-1352.
- Murali, N. S. and Teramura, A. H. (1986) Effectiveness of UV-B radiation on the growth and physiology of field grown soya bean modified by water stress. *Photochemical Photobiology* 44: 215-219.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22: 867 – 80.
- Parida B. K., Chhibba, I. M. and Nayyar, V. K. 2003. Influence of Ni contaminated soils on fenugreek (*Trigonella corniculata* L.) growth and mineral composition. *Scientia Horticulturae* 98: 113-119
- Roitsch, T. and Ehneß, R. (2000) Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regulation* 32: 359-367.
- Sairam, R. K., Deshmukh, P. S. and Saxena, D. C. (1998) Role of antioxidant systems in wheat genotype tolerance to water stress. *Biologia Plantarum* 41: 387-394.
- Sandalio L. M., Dalurzo H. C., Gomez M., Romero – Puertas, M. C. and Del Rio L. A. (2001) Cadmium – induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany* 52: 2115 – 2226.
- Sanita T. and Gabbrielli R. (1999) Response to cadmium in higher plants – review. *Environmental and Experimental Botany* 41: 105 – 130.

Physiological responses and antioxidant enzyme activities in seedlings of *Lepidium sativum* L. under methyl isothiocyanate stress

Farinaz Farzadnejad¹, Roya Razavizadeh^{1*} and Leila Shabani²

¹Department of biology, Payame Noor University, PO BOX 19395-3697 Tehran, Iran,

²Department of Biology, Faculty of Science, University of Shahrekord

(Received: 12 June 2013; Accepted: 21 July 2013).

Abstract:

One of the major tissue damage following exposure to stress in plants is caused by the oxidative stress. In this study, effects of different levels of methyl isothiocyanate on biochemical parameters and antioxidant enzyme activity such as ascorbate peroxidase, catalase and guaiacol peroxidase in seedlings of *Lepidium sativum* L. under *in vitro* were investigated. The seeds of *Lepidium sativum* (Garden Cress) were sterilized and cultured in MS medium. After 20 days, seedlings were treated with concentrations of 0.01, 0.1 and 1 mM methyl isothiocyanate (various levels of stress) under sterile condition. After 3 days, result showed that chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, carotenoids and protein were significantly decreased, while reduced sugar, proline and antioxidant enzymes were increased in seedlings which were under oxidative stress. Thus methylisothiocyanate appeared to induce oxidative stress and activation of the plant's defenses parameters. The maximum and minimum at concentrations of 1 mM and 0.01 mM methyl isothiocyanate observed respectively.

Key words: *In vitro* culture, Methyl isothiocyanate, Oxidative stress.

*Corresponding Author: Razavi.roya@gmail.com