

پاسخ‌های فیزیولوژیکی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهچه‌های شاهی تحت تنش متیل‌ایزوتوپوسیانات

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

^۱گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پام 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 قرارگیری گیاهان در معرض تنش به وجود می‌آید، ایجاد تنش اکسیداتیو است. در این پژوهش اثر سطوح مختلف متیل‌ایزوتوپوسیانات بر برخی پارامترهای بیوشیمیایی و میزان فعالیت سه آنزیم آنتی‌اکسیدان آسکوربات‌پراکسیداز، کاتالاز و گایاکولپراکسیداز در گیاهچه شاهی در شرایط در شیشه بررسی شده است. بذرهای گیاه شاهی بعد از ضدغذونی در محیط کشت MS کشت گردیدند. پس از یک دوره رشد ۲۰ روزه، گیاهچه‌ها در شرایط استریل با غلظت‌های صفر، ۰/۰۱ و ۰/۰۱ میلی‌مولا ر متیل‌ایزوتوپوسیانات به مدت ۳ روز تیمار گردیدند. نتایج به دست آمده نشان داد که میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کاروتینوئید و میزان پروتئین در گیاهچه‌های تحت تنش کاهش معنی‌داری داشته است. در حالیکه تنش ایزوتوپوسیانات مقادیر قدرهای احیاکننده، پرولین، آنتوسیانین و همچنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را افزایش داده است. به نظر می‌رسد متیل‌ایزوتوپوسیانات باعث ایجاد تنش اکسیداتیو و فعل شدن پارامترهای دفاعی در گیاه شده است. بیشترین و کمترین میزان تأثیر به ترتیب در غلظت ۱ میلی‌مولا و ۰/۰۱ میلی‌مولا متیل‌ایزوتوپوسیانات مشاهده شد.

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

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 گلوکوزینلاتی می‌شود. محصولات هیدرولیز شامل یک بخش آگلیکون، گلوکز و سولفات می‌باشد. بخش آگلیکون

در درون سلول هیدرولیز گلیکوزینولات‌ها توسط آنزیم میروزیناز (تیوگلوکوزید گلوکوهیدرولاز)، طیفی از محصولات که مهم‌ترین آن‌ها ایزوتوپوسیانات‌ها هستند را به وجود می‌آورد. اخیراً مطالعات بیوشیمی و ژنتیکی صورت گرفته روی گیاه مدل آراییدوپسیس، مسیر بیوستز گلیکوزینولات‌ها را از پیش‌ماده آمینواسیدی تأثید کرده است. گلیکوزینولات‌ها در تمام سلول‌ها (در واکوئل) در غلاظت‌های مختلف و در تمام اندام‌های خانواده شب‌بویان

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

تنش‌ها به طور معمول انتقال الکترون سلولی را در محفظه‌های مختلف درون سلولی مختلف 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 سمعی از سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌کنند (Corpas *et al.*, 2001). به نظر می‌رسد توانایی گیاهان عالی در جاروب کردن رادیکال‌های سمعی 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 ایزوتوپیوسیانات، 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 میتل ایزوتوپیوسیانات بر پاسخ‌های فیزیولوژیکی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، آسکوربیات‌پراکسیداز و گایاکول‌پراکسیداز در گیاهچه‌های شاهی مورد مطالعه قرار گرفت. تره‌بیزک (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 غذیه 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 ایزوتوپیوسیانات‌ها، تیوسیانات‌ها، نیتریل‌ها، اکسازولیدین‌تیون‌ها، اپی‌تیو‌نیتریل‌ها بسته به ساختار گلوکوزینولات‌ها و شرایط واکنش باز آرایی $N=C=S$ می‌شوند. ایزوتوپیوسیانات‌ها دارای گروه عاملی هستند. از آنجایی که ایزوتوپیوسیانات‌ها با گروه‌های آمینو و سولفیدردهای پیتیدها واکنش می‌دهند، این احتمال وجود دارد که بر عملکردهای پیتیدها تأثیر بگذارد (Yan and Chen, 2007). بسیاری از ایزوتوپیوسیانات‌های طبیعی در گیاهان از تغییرات شیمیایی ایجاد شده توسط گلیکوزینولات‌ها حاصل می‌شوند. ایزوتوپیوسیانات‌های طبیعی همچون آلیل ایزو تیوسیانات‌ها 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، ضدنمایند و ضد حشره هستند (Yan and Chen, 2007). ایزوتوپیوسیانات‌ها 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 سمعی روی سلول دارند (Hara *et al.*, 2010). ولی در غلظت‌های پایین‌تر به طور غیرمستقیم باعث دفاع سلولی می‌شوند. ویتامین C، ویتامین E و کاروتونوئیدها 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 آنها 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 (ستیوکروم P450) و آنزیم فاز II (گلوتاتیون اس ترانسفراز، آلدھیدروکتاز، S-میتل ترانسفراز، N-استیل ترانسفراز) هستند.

دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد (Lichtenthaler, 1987). نتایج حاصل از اندازه گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسترنزی بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه و ارائه شد.

سنجدش میزان آنتوسیانین: در این روش ابتدا ۰/۰۵ گرم برگ گیاه را با ترازو وزن کرده سپس با ۲/۵ سی سی متانول اسیدی (۹۹ سی سی متانول و ۱ سی سی اسید کلریدریک) سائیده شد. در استوانه مدرج حجم کل عصاره به ۲/۵ سی سی رسانده شد. عصاره در لوله‌های آزمایش سرپیچ دار ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه قرار گرفت و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت دور در دقيقه سانتریفوژ و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر جذب در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد (Wagner, 1979).

برگ گیاه را با ترازو وزن کرده سپس با ۰/۰۱ میلی مولار پرولین: مقدار پرولین در برگ‌ها و ریشه به روش Bate و همکاران (۱۹۷۳) اندازه گیری شد. مطابق این روش ۰/۰۲ گرم از بافت تازه برگ و ریشه توزین گردید و هر نمونه جداگانه با ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوسالیلیک ۳ درصد در هاون چینی سائیده شد. پس از سانتریفیوژ 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.

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

ترکیبات ایزوتیوپیتانات به کار رفته در القای پاسخ‌های دفاعی از طریق سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه و یافتن مناسب ترین 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 ضدغفوونی شدند. تعداد ۲۰ بذر شاهی در ظروف کشت حاوی محیط 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 ۲۵±۲ °C و رطوبت ۹۵-۹۸٪ نگهداری شدند.

امولسیون آبی متیل ایزوتیوپیتانات در غلظت‌های صفر، ۰/۰۱ و ۰/۰۱ میلی مولار 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 ایزوتیوپیتانات 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 اندازه گیری پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی استفاده گردیدند.

اندازه گیری میزان کلروفیل و کاروتونئید: بر اساس این روش ۰/۰۵ گرم برگ تر وزن شد و در هاون چینی حاوی ۵ میلی لیتر استن ۸۰ درصد سائیده شد. محتوای هاون با کاغذ صافی که در قیف شیشه‌ای قرار داشت صاف گردید. سپس ۱۰ میلی لیتر استن به آن اضافه شد. حجم محلول به ۱۵ میلی لیتر رسانده شد. این محلول حاوی کلروفیل a، b و کاروتونئید است. ۳ میلی لیتر از عصاره نمونه‌ها در کووت ریخته شد و شدت جذب آنها در طول موج‌های ۴۶۸، ۵۴۶ و ۶۶۳/۲۰ نانومتر با استفاده از

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 مolar و بافر فسفات میلی مolar با pH برابر با ۷ تهیه شد. ۱۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۱۳۵۰ میکرولیتر 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 اسپکتروفوتومتری اندازه گیری شد. میزان فعالیت کاتالاز با استفاده از ضریب خاموشی مولی برابر $cm^{-1} mM^{-1}$ ۰/۰۳۹ 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 میلی مolar با pH= ۷ میلی مolar ۹ میلی مolar و پراکسید هیدروژن ۱۹ میلی مolar می باشد. میزان جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر در طول ۱ دقیقه اندازه گیری شد. ضریب خاموشی، ۲۶/۶ میلی مول بر سنتیمتر در نظر گرفته شد. یک واحد فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز به عنوان مقدار آنزیمی که باعث تشکیل ۱ میکرومولار تراگایاکول در دقیقه می شود تعریف شد.

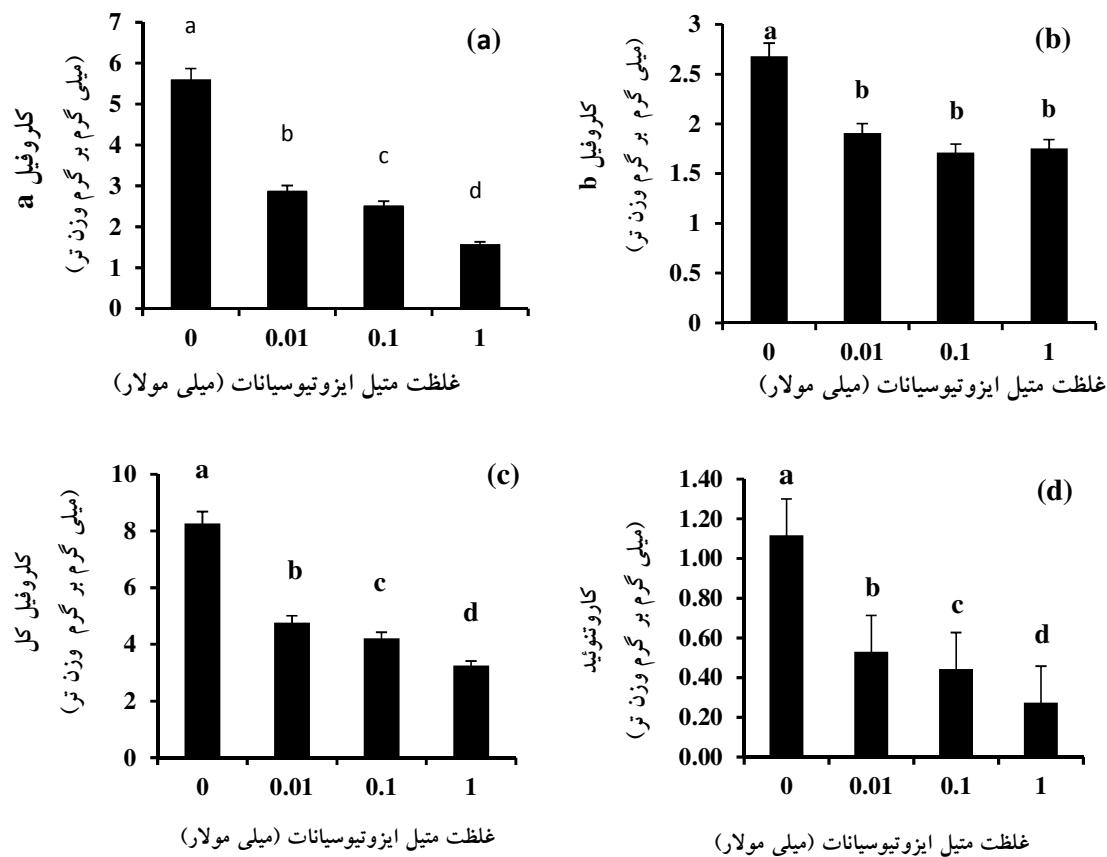
اندازه گیری غلظت کل پروتئین ها: اندازه گیری پروتئین کل طبق روش Bradford (۱۹۷۶) با اندکی تغییر انجام شد. جذب عصاره ها در طول موج ۵۹۵ nm با دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-mini ۱۲۴۰ مدل Shimadzu خوانده شد. میزان پروتئین محلول کل بر حسب mg/g FW گزارش گردید. تجزیه و تحلیل آماری: طرح آزمایشی به کار رفته طرح کاملاً 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.

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 میکرولیتر بافر فسفات حاوی ۰/۲ میلی مolar EDTA، ۱۷۵ میکرولیتر آسکوربیک اسید، ۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن و ۵۰ میکرولیتر آلبومین گاوی تشکیل شده بود. جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم APX، مقدار ۹۰۰ میکرولیتر از محلول واکنش و ۱۰۰ میکرولیتر 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 $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ آسکوربیک اسید در دمای 25°C بیان گردید. این عمل سه بار تکرار گردید و میانگین سه بار مبنای 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



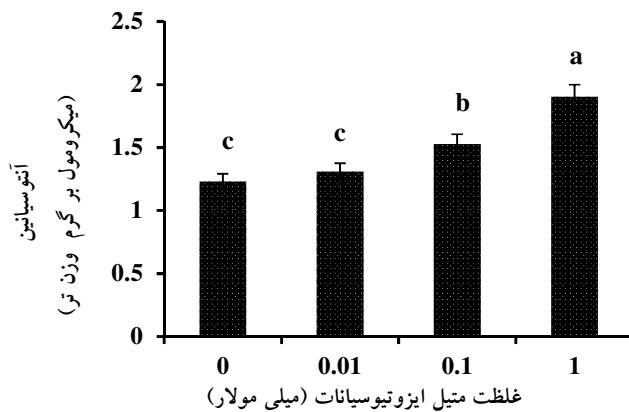
شکل ۱- تأثیر متیل ایزو‌تیوسیانات بر میزان کلروفیل a (a)، کلروفیل b (b)، کلروفیل کل (c) و کاروتینوئید (d). مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن می باشد. (P≤005).

غلوظت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی مولار متیل ایزو‌تیوسیانات نسبت به گیاهچه‌های شاهد به ترتیب به میزان ۵۱ و ۶۲ میلی مولار درصد کاهش نشان داد (شکل c). تیمار متیل ایزو‌تیوسیانات باعث کاهش معنی دار میزان کاروتینوئید شد. در غلوظت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی مولار ایزو‌تیوسیانات کاهش میزان کاروتینوئید به ترتیب به میزان ۴۰ و ۵۲ میلی مولار متیل ایزو‌تیوسیانات باعث کاهش میزان کلروفیل درصد در مقایسه با شاهد مشاهده گردید (شکل d).

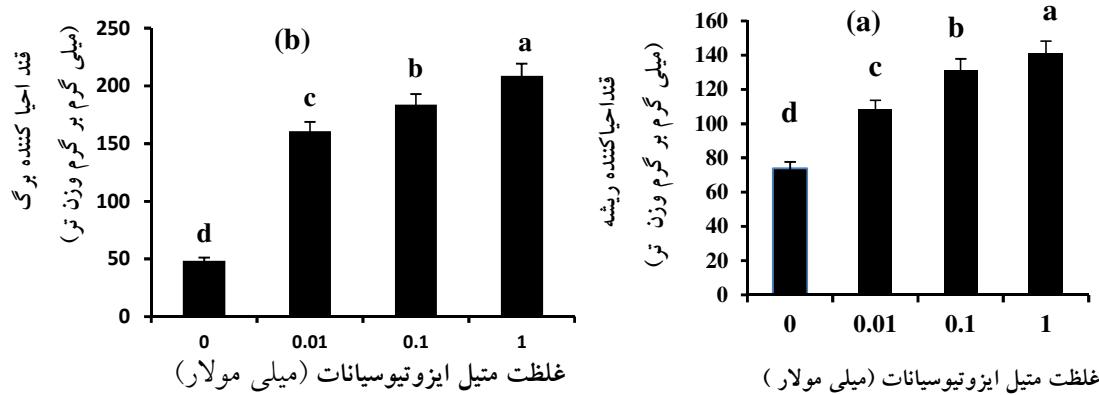
میزان آنتوکارپین: در بررسی تأثیر متیل ایزو‌تیوسیانات مشاهده شد که میزان آنتوکارپین برگ نسبت به گیاهچه‌های شاهد افزایش یافته است. متیل ایزو‌تیوسیانات در غلوظت ۰/۰۱ میلی مولار میزان آنتوکارپین برگ را به ترتیب به میزان ۱/۵۴ و ۱/۲۴ برابر در مقایسه با شاهد افزایش داده

نتایج:

کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتینوئیدها: در گیاهچه‌های مورد مطالعه میزان کلروفیل a و کل و نیز کاروتینوئیدها تحت تأثیر تنیش متیل ایزو‌تیوسیانات کاهش معنی داری نشان داد. غلوظت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی مولار متیل ایزو‌تیوسیانات باعث کاهش میزان کلروفیل به ترتیب به میزان ۵۵ و ۷۲ میلی مولار شاهد شد (شکل a). متیل ایزو‌تیوسیانات در غلوظت ۰/۰۱ میلی مولار باعث کاهش میزان کلروفیل b به میزان ۴۰ درصد در مقایسه با شاهد شد و غلوظت ۰/۰۱ و ۰/۰۱ ترتیب باعث کاهش ۴۵ و ۴۲ درصدی میزان کلروفیل b در مقایسه با شاهد گردید (شکل b). میزان کلروفیل کل در



شکل ۲- تأثیر متیل ایزو تیو سیانات بر میزان آنتوسیانین در گیاهچه های شاهی. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن می باشد ($P \leq 0.05$).

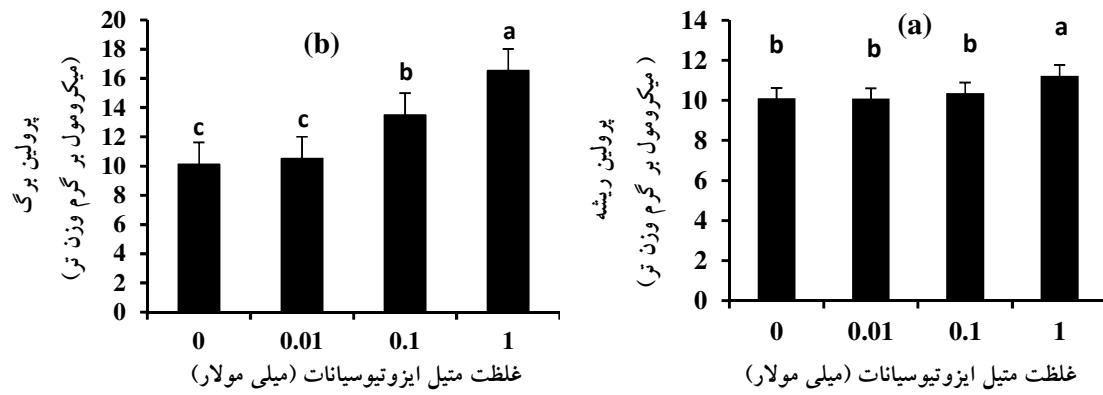


شکل ۳- تأثیر متیل ایزو تیو سیانات بر میزان قندهای احیا کننده در ریشه (a) و اندام هوایی (b) گیاهچه های شاهی. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن می باشد ($P \leq 0.05$).

پرولین ریشه و اندام هوایی: متیل ایزو تیو سیانات در غلوظت 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 گیاهچه های شاهد مشاهده نشد. همچنین متیل ایزو تیو سیانات در غلوظت های ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میلی مولار باعث افزایش پرولین برگ به ترتیب به میزان ۱/۶ و ۱/۳ برابر در مقایسه با شاهد شده است. اختلاف معنی داری در میزان پرولین برگ بین تیمار ۰/۰۱ میلی مولار و گیاهچه های 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 غلوظت ۰/۰۱ میلی مولار اختلاف معنی داری با شاهد نشان نداد (شکل ۲).

میزان قندهای احیا کننده: میزان قندهای احیا کننده در ریشه در غلوظت های ۱، ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی مولار متیل ایزو تیو سیانات به ترتیب به میزان ۱/۷۸ و ۱/۷۷ برابر در مقایسه با شاهد افزایش معنی داری یافته است. متیل ایزو تیو سیانات در غلوظت های ۱/۰ و ۰/۰۱ میلی مولار باعث افزایش معنی دار قندهای احیا کننده به ترتیب به میزان ۳/۸ و ۳/۲ برابر در مقایسه با شاهد در اندام هوایی ۴/۴ بیشترین میزان افزایش قندها در غلوظت ۱ میلی مولار و کمترین میزان در غلوظت ۰/۰۱ میلی مولار مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۴- تاثیر متیل ایزوتوپیوسیانات بر میزان پرولین ریشه (a) و اندام هوایی (b) گیاهچه‌های شاهی. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه یانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن می‌باشد ($P \leq 0.05$).

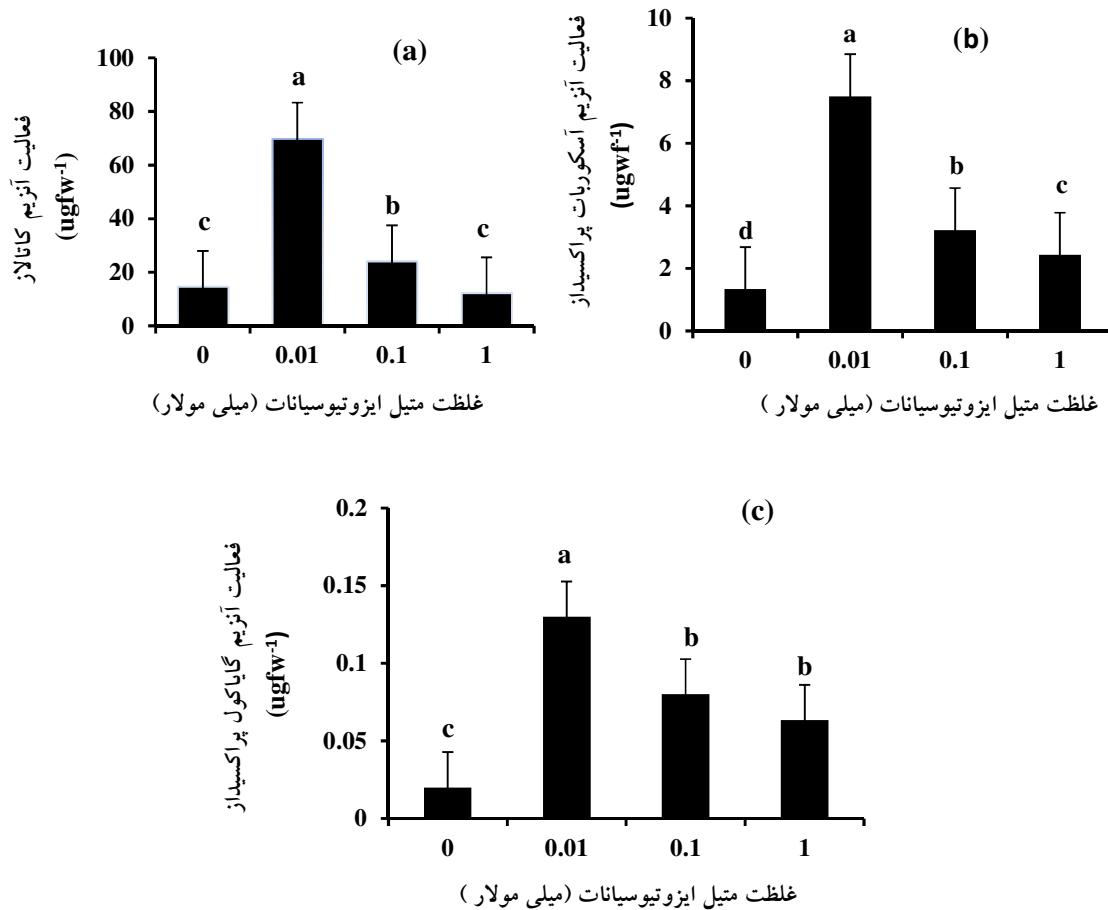
میزان پروتئین به ترتیب به میزان ۴۰، ۲۰ و ۱۰ درصد در مقایسه با شاهد شده است (شکل ۶).

بحث:

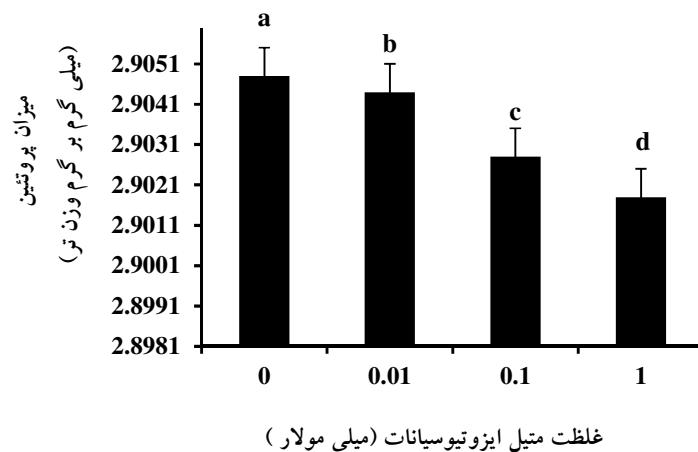
نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که تنفس متیل ایزوتوپیوسیانات سبب القا پاسخ‌های فیزیولوژیکی و فعالسازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهچه‌های شاهی شده است. میزان کلروفیل در گیاهان اغلب برای ارزیابی اثر تنفس‌های محیطی تعیین می‌شود. این تنفس‌ها ممکن است از طریق مهار فعالیت آنزیم‌ها، فرآیندهای متابولیکی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

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

میزان پروتئین در اندام هوایی: پروتئین کل در گیاهچه‌های تحت تنفس متیل ایزوتوپیوسیانات نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری یافت. متیل ایزوتوپیوسیانات در غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌مولا ر، باعث کاهش



شکل ۵- تأثیر متیل ایزو تیوسیانات 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 ($P \leq 0.05$).



شکل ۶- تأثیر متیل ایزو تیوسیانات 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 ($P \leq 0.05$).

محیطی گزارش شده است (Murali and Teramura, 1986). در این تحقیق به نظر می‌رسد تیمار متیل ایزوتویوسیانات از طریق افزایش آنتوسیانین‌ها و فلاونونئیدها سبب زوددن 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 (دما ۵°C-) را بر میزان آنتوسیانین در گیاه کلم بررسی کردند. نتایج آنها افزایش محتوای آنتوسیانین را در مقایسه با گیاه‌های شاهد نشان داد.

میزان کربوهیدرات و پرولین در ریشه و اندام هوایی گیاه‌های شاهی تحت تنش ایزوتویوسیانات افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد نشان داد. گیاهان برای حفظ تعادل یونی و تنظیم اسمزی در واکوئل‌ها و سیتوپلاسم خود ترکیباتی با جرم ملکولی کم از قبیل پرولین، گلایسین، بتائین و قندهایی از قبیل گلوکز و فروکتوز که مجموعاً اسمولیت نامیده می‌شوند را انباسته 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 پتووزفسفات (Barra *et al.*, 2003; Debnam *et al.*, 2004) و بیوستتر کاروتوئیدها 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 کترول 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 انباستگی قندهای محلول شده که به عنوان مکانیزم سازشی پاسخ به شرایط تنش می‌باشد.

تولید شده در طی تنش سبب تجزیه رنگیزه‌های فتوستزی گیاه‌چه‌های شاهد کاهش داده است. رادیکال‌های آزاد تولید شده در طی تنش سبب تجزیه رنگیزه‌های فتوستزی و غیرفوستزی و در نتیجه کاهش رنگیزه‌ها می‌گردند (Sairam *et al.*, 1998). کاروتوئیدها در چند سطح باعث حفاظت دستگاه فتوستزی 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، کاروتوئیدها به عنوان یک سیستم حفاظتی در برابر تنش اکسیداتیو القا شده تجزیه شده و از بین می‌روند. فرونشانی فتوشیمیایی کلروفیل‌های برانگیخته توسط کاروتوئید منجر به برهم زدن ساختار کاروتوئیدها و در نهایت کاهش میزان آن‌ها می‌گردد (Sanita and Gabbrielli, 1999). بنابراین احتمال دارد کاهش میزان کاروتوئیدها تحت تیمار متیل ایزوتویوسیانات، به دلیل نقش این رنگیزه‌ها در محافظت کلروفیل برگ‌ها در برابر تنش اکسیداتیو ایجاد شده توسط ایزوتویوسیانات‌ها باشد. در این تحقیق مشخص شد که تیمار متیل ایزو تبو سیانات میزان آنتوسیانین را در برگ گیاه‌های شاهی در مقایسه با گیاه‌های شاهد افزایش داده است. فلاونونئیدها ترکیبات پلی‌فنولیک و از مهمترین ترکیبات ثانویه گیاهان می‌باشند. این ترکیبات از مشتقات فنیل‌بروپانوئید می‌باشند. آنتوسیانین‌ها به عنوان یک گروه از فلاونونئیدهای محلول در آب، در یک نقطه پایانی در مسیر بیوستز فلاونونئیدها ستر می‌شوند (Mars *et al.*, 1995). با ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاه، بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدان (Vinyard *et al.*, 2005) و القاء مسیر فنیل‌بروپانوئید بهویژه مسیر بیوستز فلاونونئیدها افزایش می‌یابد (Green and Fluhr, 1995). در این پژوهش اختلاف معنی‌داری در میزان آنتوسیانین بین غلاظت ۰/۰۱ میلی‌مolar متیل ایزوتویوسیانات و شاهد مشاهده نشد ولی در غلاظت‌های ۱/۰ و ۰/۵۸ میلی‌مolar میزان آنتوسیانین به ترتیب به میزان ۲۵ درصد افزایش یافته است. نتایج مشابهی از افزایش فلاونونئیدها طی تنش‌های

اندام هوایی شاهی افزایش داده است. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در غلظت ۰/۰۱ میلی مولار متیل ایزو تیوسیانات مشاهده شد. افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز توسط تنش‌های غیرزیستی دلیلی بر شروع دفاع آنتی اکسیدانتی می‌باشد. آنزیم آسکوربات پراکسیداز در سیکل آسکوربات - گلوتاتیون شرکت کرده و از این طریق باعث از بین بردن پراکسید هیدروژن می‌شود. در تحقیقی Wang و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که تیمار آلیل ایزو تیوسیانات ابتدا باعث افزایش و سپس کاهش میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در میوه زغال اخته شده است. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز نیز تحت تأثیر غلاظت‌های مختلف ایزو تیوسیانات افزایش نشان داده است. آنزیم گایاکول پراکسیداز اکسیداسیون گهرمایه وابسته به پراکسید هیدروژن را کاتالیز می‌کند. همچنین این آنزیم بیوستر 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 غلاظت‌های بالای متیل ایزو تیوسیانات، ممکن است از طریق مهار این آنزیم‌ها و یا غیرفعال کردن و تنظیم پایین آن‌ها باشد به طوری که در شدت بالای تنش اثر متصاد روی فعالیت آنزیم‌های دفاعی داشته و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان مشاهده می‌گردد.

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

(Roitsch and Ehneß, 2000). در این تحقیق نیز به نظر می‌رسد افزایش کربوهیدرات‌ها به دلیل مقابله با رادیکال‌های اکسیژن ایجاد شده تحت تنش ایزو تیوسیانات باشد. پرولین نیز نقش‌های متعددی در تحمل به تنش گیاهان به عهده دارد که از جمله فعالیت آنتی اکسیدانی پرولین می‌باشد. پرولین می‌تواند اکسیژن یکتاپی 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 آنتی اکسیدانت تحت تنش ایزو تیوسیانات نشان داد که متیل ایزو تیوسیانات باعث افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز و در نتیجه تحمل بیشتر به تنش می‌شود. بالاترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت ۰/۰۱ میلی مولار متیل ایزو تیوسیانات مشاهده شد. تعادل بین تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان چگونگی رخداد سیگنال های اکسیداتیو را تعیین می‌کند (Moller et al., 2007). القای فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان 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 می‌کنند. القای فعالیت کاتالاز باعث غلبه بر تنش اکسیداتیو از طریق سمزدایی پراکسید هیدروژن می‌شود (Mazhoudi et al., 2002). در غلاظت‌های بالای متیل ایزو تیوسیانات، آنزیم کاتالاز ممکن است توسط پروتئازهای القا شده توسط تنش اکسیداتیو شکسته شود که در برگ‌های مسن نخود نیز گزارش شده است (Sandhalio et al., 2001). کاهش در فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در سطوح بالای تنش، همچنین می‌تواند به علت شکستن مولکول‌های آنزیم توسط رادیکال‌های آزاد اکسیژن باشد (Sandhalio et al., 2001). طبق نتایج این تحقیق، متیل ایزو تیوسیانات همچنین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را نسبت به گیاهچه‌های شاهد در

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

سپاسگزاری:
نویسنده‌گان مقاله از قطب تنش‌های گیاهی دانشگاه اصفهان تشکر می‌نمایند.

نتیجه‌گیری کلی:

نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد تنش اکسیداتیو ناشی از تیمار غلظت‌های متوسط متیل ایزوتوپیوسیانات 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

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., Munemasu, 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) Chorophylls 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 Vabbot, 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., Blanko C. and Trautwetter A. (2003) Glucose-6-phosphate dehydrogenase is required for sucrose and trehalose to be efficient osmoprotectans 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., Berkheimer, 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 isoform 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/extravacuole 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 Gabbielli 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