

تغییرات محتوای سولفورافان و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاهچه‌های ازمک (*Lepidium draba* L.) در پاسخ به جاسمونات

فاطمه رضایی^۱، مهرداد لاهوتی^{۱*}، محمود ملکی^۲، علی گنجعلی^۱

^۱گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، آگروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۲۳، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۰۴/۳۱)

چکیده:

سولفورافان یک ایزوتیوسیانات مشتق شده از گلکورافانین (نوعی گلکوزینولات) تحت هیدرولیز آنزیم میروزیناز است که دارای خواص دارویی متعددی از جمله فعالیت ضد توموری در انسان است. این گلکوزینولات در گیاه ازمک از خانواده شب‌بو دارای تجمع زیادی است. هدف از انجام این پژوهش، بررسی تغییرات محتوای سولفورافان، فلاونوئیدهای کل و آنتوسیانین و همچنین بررسی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در گیاهچه‌های پنج روزه ازمک پس از تیمار با غلظت‌های مختلف هورمون جاسمونات بود. نتایج بدست آمده از این مطالعه حاکی از عدم تغییر محتوای سولفورافان پس از ۴۸ ساعت تیمار با جاسمونات و در عین حال کاهش محتوای آن در تیمار با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار جاسمونات پس از گذشت ۷۲ ساعت بود. از طرف دیگر، محتوای فلاونوئید کل در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار جاسمونات در هر دو زمان تیمار افزایش یافت و محتوای آنتوسیانین نیز در گیاهچه‌های تحت تیمار ۷۲ ساعت نسبت به نمونه شاهد به طور معنی‌داری افزایش نشان داد. علاوه بر این، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در هر دو زمان تیمار (بجز فعالیت پراکسیداز پس از تیمار ۷۲ ساعت با غلظت ۵۰ میکرومولار جاسمونات) کاهش یافت. در مجموع چنین استنباط می‌شود که تاثیر جاسمونات به عواملی نظیر غلظت هورمون، مدت زمان اعمال تیمار و نوع مسیر بیوستیزی متابولیت‌ها وابسته است. به علاوه چنین نظر می‌رسد، تحت تیمار با جاسمونات، سیستم آنتی‌اکسیدانی این گیاه بیشتر از طریق مسیر فنیل پروپانوئید تقویت می‌شود.

کلمات کلیدی: آنتی‌اکسیدان، ازمک، جاسمونات، سولفورافان.

مقدمه

می‌شوند. تاکنون بیش از ۱۲۰ نوع گلکوزینولات مختلف گزارش شده است (Fahey et al., 2001). حضور این متابولیت‌ها در گیاهان سبب مقاومت آنها در برابر تنش‌های مختلف می‌شود (Brader et al., 2006; Hopkins et al., 2009; Hirayama and Shinozaki, 2010). محل ذخیره گلکوزینولات‌ها واکوئل است و آسیب دیدن سلول این متابولیت‌ها را در معرض آنزیم میروزیناز (β-تئو گلکوزید

ازمک (*Lepidium draba* L.) گیاهی دولپه از تیره شب‌بو (Brassicaceae) و بومی ایران است (Mulligan and Frankton., 1962) که به عنوان یک منبع غنی از گلکوزینولات گلکورافانین محسوب می‌شود (Powell et al., 2005). گلکوزینولات‌ها گروهی از ترکیبات ثانویه حاوی سولفور و نیتروژن هستند که از اسیدهای آمینه مختلف مشتق

*نویسنده مسؤول، نشانی پست الکترونیکی: mlahouti@um.ac.ir

گلوکوهیدرولاز (EC 3.2.3.1) قرار می‌دهد. میروزیناز پیوند β -تیوگلوکوزیدی مولکول‌های گلوکوزینولات را می‌شکند و گلوکز، سولفات و یک ترکیب حدواسط ناپایدار به نام آگلیکون تولید می‌کند. آگلیکون به صورت خودبخودی و برحسب شرایط محیط به ترکیبات مختلفی از قبیل ایزوتیوسیانات، نیتریل و تیوسیانات تبدیل می‌شود (Rask et al., 2000).

گلوکورافانین (۴-متیل سولفینیل بوتیل گلوکوزینولات) نوعی گلوکوزینولات آلیفاتیک مشتق شده از اسید آمینه متیونین است و تحت هیدرولیز آنزیم میروزیناز، ایزوتیوسیاناتی به نام سولفورافان (۱-ایزوتیوسیانات-۴-متیل سولفونیل بوتان) تولید می‌نماید (Traka and Mithen, 2009). این ایزوتیوسیانات ویژگی‌های درمانی متفاوتی با مکانیسم‌های اثر مختلف داشته و علیه باکتری‌ها (Fahey et al., 2002)، هیستون داستیلاز (Myzak et al., 2004)، اکسیدان‌ها (Yeh and Yen, 2009)؛ (Gao et al., 2001) و متاستاز (Singh et al., 2009) عمل می‌کند.

بررسی‌های انجام شده نشان دادند که گیاه ازمک برخلاف سایر گونه‌های خانواده شب‌بو که حاوی گلوکوزینولات‌های متعدد هستند، به طور عمده حاوی دو گلوکوزینولات، گلوکوسینالین و گلوکورافانین است (Powell et al., 2005) بنابراین تخلیص گلوکورافانین (پیش‌ساز سولفورافان) از این گیاه به مراتب آسان‌تر و مقرون به صرفه‌تر است (Fahey et al., 2001). از سوی دیگر مطالعات گذشته اثبات کردند که مقدار سولفورافان در گیاهچه‌های ازمک به دو عامل زمان و فنولوژی گیاه وابسته است و بیشترین محتوای این ایزوتیوسیانات در گیاهچه‌های ۳ تا ۷ روزه گزارش گردید (Mohammadi et al., 2104). مطالعات اخیر نیز بیانگر این موضوع هستند که محتوای این ایزوتیوسیانات در گیاه ازمک تحت تاثیر محرک‌های مختلف از قبیل سالیسیلیک اسید و فلزات سنگینی از قبیل روی (Mohammadi et al., 2104) و نانو ذراتی از قبیل نانو اکسید آهن (Aminizadeh et al., 2016) قرار می‌گیرد.

یکی از مهمترین کاربردهای هورمون جاسمونات و مشتقات آن استفاده به عنوان محرک یا الیستور در جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی با اهمیت دارویی است (De Geyter et al., 2012). الیستورها ترکیبات شیمیایی یا عوامل زیستی و غیرزیستی هستند که نقش آن‌ها شبیه‌سازی تنش‌های زیستی و یا غیرزیستی بوده و باعث بروز تغییرات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در موجودات زنده می‌شوند (Baenas et al., 2014). از جمله این تغییرات تولید متابولیت‌های ثانوی در گیاهان است که در طبیعت به منظور دفاع در برابر عوامل بیماری‌زا یا مقابله با تنش‌ها عمل می‌کنند (Zhao et al., 2005). در واقع سیگنال تولید شده توسط این محرک‌ها به وسیله گیرنده‌های موجود در سطح غشاء پلاسمایی دریافت شده و یک سیگنال هدایت شبکه ایجاد می‌کند که بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز متابولیت‌های ثانوی و نیز آنزیم‌های کلیدی مربوط به آن را تنظیم می‌نمایند (Radman et al., 2003; Namdeo, 2007).

در اغلب تنش‌های زیستی و غیرزیستی، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) شامل آنیون سوپر اکسید ($O_2^{\cdot -}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، و رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\cdot}$) تولید می‌شوند (Faurie et al., 2009; Akram et al., 2012). گیاهان برای مقابله با گونه‌های فعال اکسیژن با استفاده از دو مکانیسم دفاعی مختلف شامل آنزیمی (کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و...) (Tang et al., 2006) و غیرآنزیمی (فلاونوئیدها و آنتوسیانین-ها، کارتنوئیدها، ویتامین E، آلکالوئیدها) (Tang et al., 2006; Hsieh et al., 2002) رادیکال‌های آزاد را روبش کرده و مانع آسیب رساندن آنها به سلول می‌شوند (Walker et al., 1981).

هدف از انجام این تحقیق، بررسی تغییرات محتوای سولفورافان، فلاونوئیدهای کل و آنتوسیانین به عنوان اجزای سیستم آنتی اکسیدان غیر آنزیمی و همچنین بررسی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز به عنوان سیستم آنتی اکسیدان آنزیمی در گیاهچه‌های پنج روزه ازمک پس از تیمار با غلظت‌های مختلف هورمون جاسمونات بود.

مواد و روش‌ها

کشت بذر و تیمار گیاه: بذرهای گیاه ازمک در اواخر بهار و اوایل تابستان ۱۳۹۴ از اطراف شهر کرمان جمع‌آوری شدند. شناسایی بذرها و گیاه ازمک به صورت تخصصی توسط یک کارشناس انجام شد. بذرها به ترتیب با شوینده (۳۰ ثانیه) هیپوکلریت سدیم ۵ درصد (۱۰ دقیقه)، اتانول ۷۰ درصد (۳۰ ثانیه) و در نهایت با مقدار زیادی آب مقطر استریل، شسته و ضدعفونی شدند. سپس بذرها در پلیت‌های محتوای محلول غذایی هوگلند (Hoagland and Arnon, 1950) یک دوم با pH برابر ۷ که با آگار یک درصد جامد شده بود، قرار گرفتند. به منظور جوانه‌زنی به انکوباتور (با دمای $25 \pm 2^\circ\text{C}$ و رطوبت ۶۵-۶۰٪) در شرایط تاریکی مطلق منتقل شدند. پس از گذشت سه روز بذرهای جوانه زده با طول یکسان انتخاب و به ظرف های طراحی شده حاوی محلول غذایی هوگلند منتقل و به مدت ۴۸ ساعت در ژرمیناتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۶۰ درصد قرار گرفتند. در روز پنجم، ضمن تعویض محیط با محلول هوگلند تازه، گیاهچه‌ها با غلظت‌های مختلف جاسمونات (صفر به عنوان شاهد، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار) تیمار شدند و در دو زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیماز برداشت شدند. سپس بخش هوایی گیاهچه‌ها جمع‌آوری و پس از شست‌وشو با آب مقطر استریل در حضور نیتروژن مایع منجمد و در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند.

اندازه‌گیری محتوای سولفورافان: عصاره‌گیری و تعیین مقدار سولفورافان از گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف جاسمونات طبق روش Liang و همکاران (۲۰۰۶) با کمی تغییرات انجام شد. جهت عصاره‌گیری، مقدار ۵۰۰ mg میلی گرم از اندام هوایی گیاهچه‌ها درون هاون سرد به طور کامل ساییده شد. سپس یک میلی‌لیتر آب با pH برابر ۵ به بافت ساییده شده اضافه گردید و مخلوط حاصله به مدت دو ساعت در دمای $2 \pm 42^\circ\text{C}$ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در ادامه، پنج میلی‌لیتر استونیتریل به مخلوط بدست آمده اضافه شد و بمدت

۳ دقیقه درون یخ سونیکیت گردید. عصاره بدست آمده بمدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و محلول رویی پس از عبور از فیلتر ۰/۲ میکرومتر در دمای آزمایشگاه به ستون (C18; ۴/۶ × ۲۵ سانتی‌متر) دستگاه HPLC (1100 Series شرکت Agilent) تزریق شد. برای جداسازی سولفورافان از یک حلال دو فازی شامل استونیتریل ۶۵٪ و آب ۳۵٪ در ستون استفاده گردید. شناسایی سولفورافان در طول موج ۲۵۴ نانومتر صورت گرفت و به منظور تشخیص زمان نگهداری نمونه در ستون از استاندارد سولفورافان (Sigma-Aldrich) استفاده شد. همچنین جهت تعیین غلظت سولفورافان در گیاهچه‌ها، چندین غلظت مشخص از نمونه استاندارد به دستگاه تزریق و سطح زیر منحنی آن تعیین گردید.

اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید کل: جهت اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید کل، گیاهچه‌های تیمار شده با جاسمونات، مقدار ۰/۲ گرم از اندام هوایی (فریز شده) در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول اسیدی (شامل الکل اتیلیک ۹۵٪ و اسید استیک گلیسالی به نسبت ۱:۹۹) سائیده شد و مخلوط حاضر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بمدت ۲۰ دقیقه با دور ۹۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. محلول رویی به فالكون جدید منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. میزان جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (Varian, Cary 50Australia) قرائت شد. ضریب خاموشی $\epsilon = 3300 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ گزارش گردید (Krizek et al., 1998; Rezaee et al., 2013).

اندازه‌گیری محتوای آنتوسیانین: جهت اندازه‌گیری محتوای آنتوسیانین از روش Krizek و همکاران (۱۹۹۳) استفاده شد. به‌طور خلاصه، مقدار ۰/۲ گرم اندام هوایی در متانول اسیدی (شامل متانول و اسید استیک گلیسالی به نسبت ۹۹ به ۱) سائیده شد و سپس مخلوط بدست آمده به مدت ده

(۱۹۹۱) سنجیده شد. در روش مذکور میزان جذب تراگایاکل تشکیل شده از گایاکل در نتیجه فعالیت پراکسیداز در مدت زمان ۳ دقیقه و طول موج ۴۷۰nm محاسبه گردید. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰mM با pH برابر ۵/۷، گایاکل ۰.۴٪ و یک درصد H_2O_2 و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره پروتئین محلول بود. از ضریب خاموشی تراگایاکل 25.5 cm^{-1} mM^{-1} جهت محاسبه فعالیت آنزیم استفاده شد. فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین محلول گزارش گردید.

آنالیز آماری: کلیه آزمایش‌ها با ۳ تکرار مستقل و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. میانگین داده‌ها توسط آزمون دانکن (Duncan test) و با در نظر گرفتن سطح اطمینان ۰/۰۵ $P \leq$ با استفاده از نرم افزار SPSS (v.21)، مورد تجزیه واریانس یک عاملی (One way ANOVA) قرار گرفتند. داده‌ها بر اساس میانگین نتایج حاصل از سه بار تکرار $\pm$ انحراف معیار (SD) گزارش گردید.

نتایج:

تعیین غلظت سولفورافان: جهت تعیین غلظت سولفورافان در گیاهچه‌های تیمار شده و تعیین زمان نگهداری نمونه در ستون، از استاندارد سولفورافان استفاده شد. همانطور که در شکل ۱A، قابل مشاهده است، سه دقیقه و بیست ثانیه بعد از تزریق نمونه استاندارد به ستون، پیک نمونه بدست آمد. پیک مشابهی در همین زمان برای عصاره‌های استخراج شده از گیاهچه‌ها نیز مشاهده گردید (شکل ۱B).

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌گردد، محتوای سولفورافان گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف جاسمونات بعد از ۴۸ ساعت نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. در عین حال، با افزایش زمان تیمار به ۷۲ ساعت، محتوای سولفورافان گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار نسبت به شاهد بیش از ۲/۵ بر ابر کاهش یافته بود ولی میزان کاهش محتوای این ماده در بالاترین غلظت جاسمونات نسبت به شاهد معنی‌دار نبود (شکل ۲).

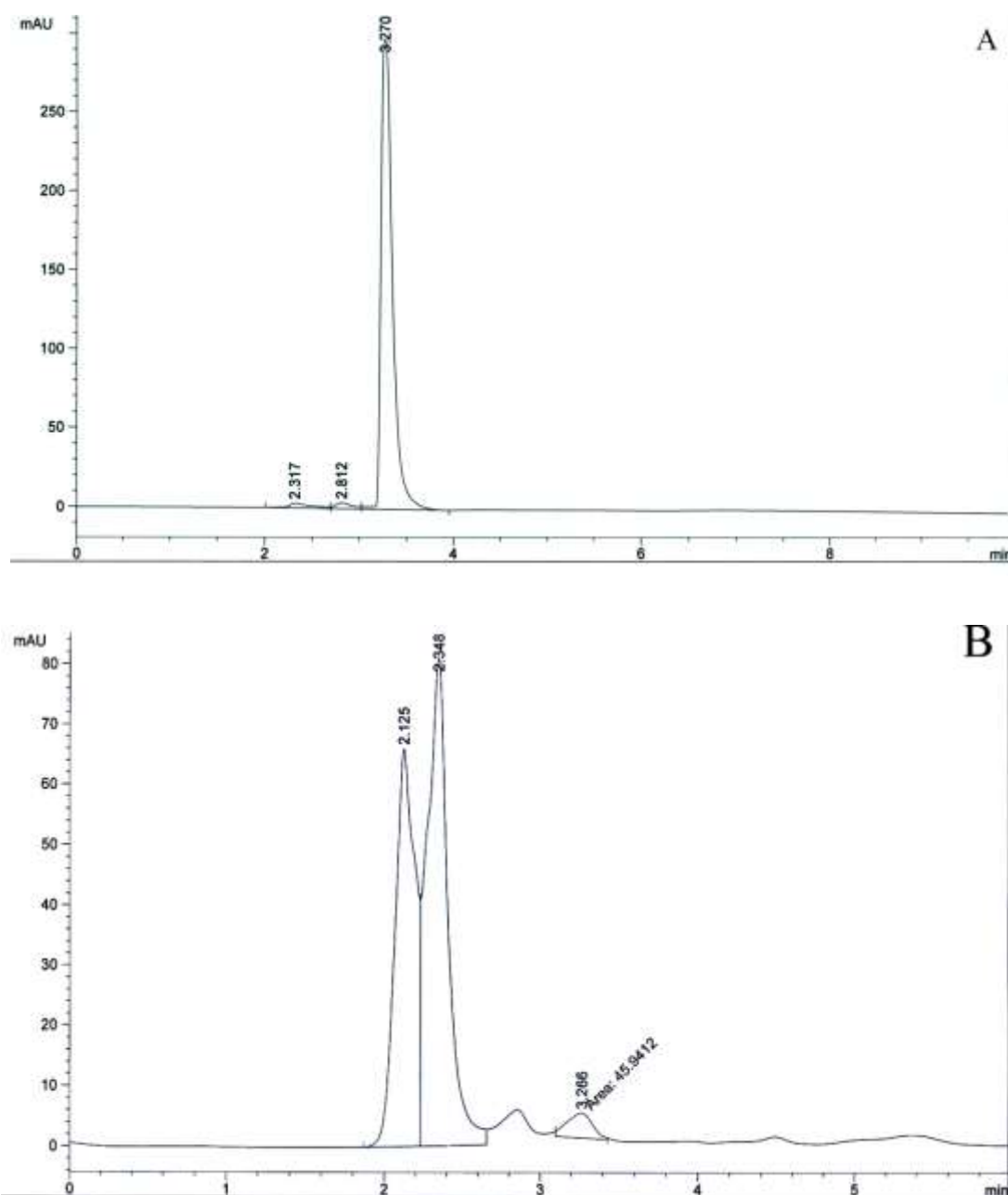
دقیقه در دمای محیط، با دور ۳۶۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید و محلول رویی جداسازی و به مدت یک شب در تاریکی قرار گرفت. در نهایت مقدار جذب نمونه‌ها در ۵۵۰ نانومتر اندازه گیری شد و با استفاده از ضریب خاموشی $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ $\epsilon = 3300$ محتوای آنتوسیانین محاسبه و بر حسب $\mu\text{M/gFW}$ گزارش گردید.

عصاره‌گیری آنزیم‌ها: جهت عصاره‌گیری پروتئین‌های محلول، مقدار ۰/۵ گرم اندام هوایی در بافر فسفات پتاسیم (۵۰ mM، pH ۵/۷) حاوی یک میلی مولار EDTA، ۱٪ پلی وینیل پیرولیدون (PVP) و یک میلی مولار PMSF ساییده شد. سوسپانسیون بدست آمده با دور ۹۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (مدل NAPCO 2028R) شد. محلول رویی جهت اندازه‌گیری محتوای پروتئین محلول کل و بررسی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POD) مورد استفاده قرار گرفت (Nasiri-Bezenjani et al., 2014).

سنجش محتوای پروتئین محلول کل: غلظت پروتئین محلول کل گیاهچه‌های تیمار شده توسط روش Bradford (Bradford et al., 1976) محاسبه گردید. بدین منظور، از سرم آلبومین گاوی (BSA) با غلظت ۵۰-۱۰۰ $\mu\text{g/mL}$ به عنوان استاندارد انجام گرفت و میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ nm قرائت شد.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT; EC.1.11.1.6) از روش Dhinsda و همکاران (۱۹۸۱) و با استفاده از محاسبه کاهش جذب H_2O_2 در ۱۹۸۱ nm 240 محاسبه گردید. مقدار H_2O_2 موجود در مخلوط واکنش با استفاده از ضریب خاموشی $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1} \epsilon = 0.28$ محاسبه شد. فعالیت آنزیم به صورت واحد آنزیمی (مقدار آنزیمی که یک میلی مول آب اکسیژنه را در یک دقیقه تجزیه می‌کند) بر حسب مقدار پروتئین کل (میلی گرم) موجود در ۱۰۰ میکرولیتر عصاره در مدت زمان یک دقیقه محاسبه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز: فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD; EC.1.11.1.7) با استفاده از روش Plewa و همکاران



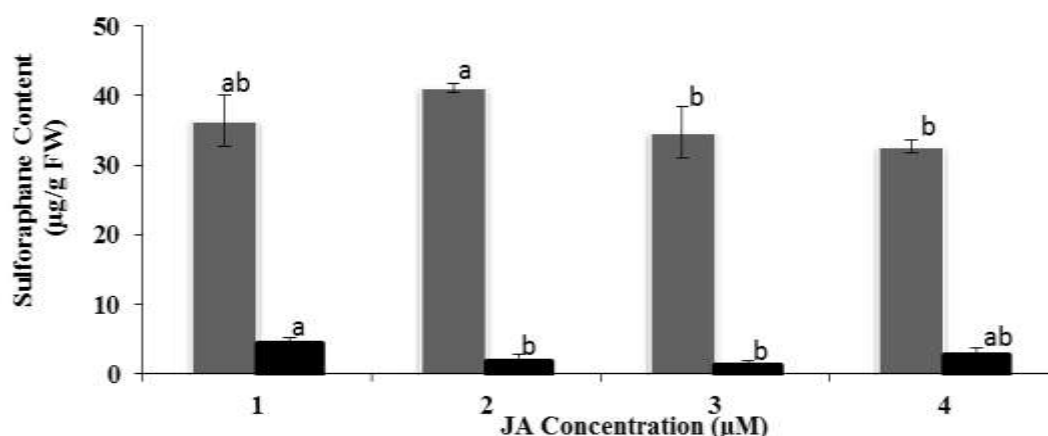
شکل ۱- کروماتوگرام مربوط به نمونه استاندارد سولفورافان (A) و نمونه شاهد (B). زمان خروج نمونه استاندارد و سولفورافان در نمونه شاهد سه دقیقه و بیست ثانیه پس از تزریق می‌باشد.

تغییر محتوای فلاونوئید کل در حضور جاسمونات:

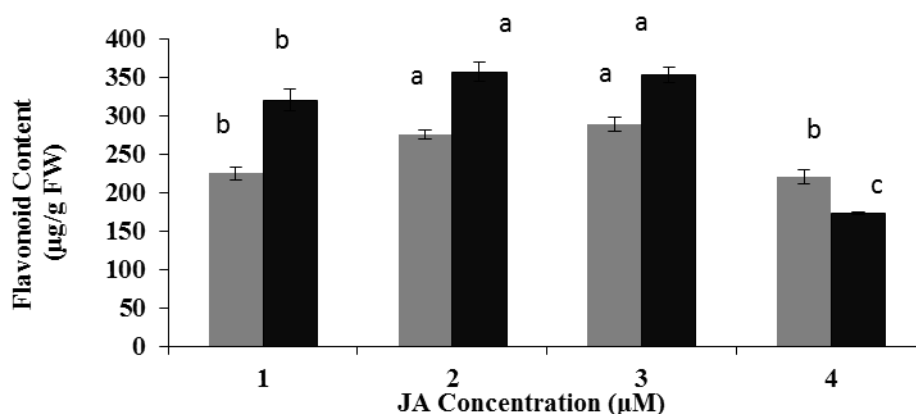
محتوای فلاونوئید کل گیاهچه‌های تیمار شده بمدت ۴۸ ساعت با غلظت‌های مختلف جاسمونات در شکل ۳ نشان داده شده است. همانطور که در شکل قابل ملاحظه است محتوای این ترکیبات در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار جاسمونات نسبت به نمونه شاهد بیش از ۲۰ درصد افزایش یافته است.

عین حال، در بالاترین غلظت این الیسیاتور محتوای فلاونوئید با نمونه شاهد اختلاف معنی داری را نشان نمی‌دهد.

تغییر محتوای این متابولیت طی ۷۲ ساعت تیمار با جاسمونات مشابه نتایج بدست آمده طی زمان ۴۸ ساعت بود. به طوریکه محتوای این متابولیت در تیمار با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار جاسمونات نسبت به نمونه شاهد بیش از ۱۰



شکل ۲- محتوای سولفورافان گیاهچه‌های ازمک تیمار شده با غلظت‌های مختلف جاسمونات در مدت زمان ۴۸ ساعت (نمودار روشن) و ۷۲ ساعت (نمودار تیره). حروف متفاوت بالای نمودارها نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد در هر کدام از زمان‌ها می‌باشند.



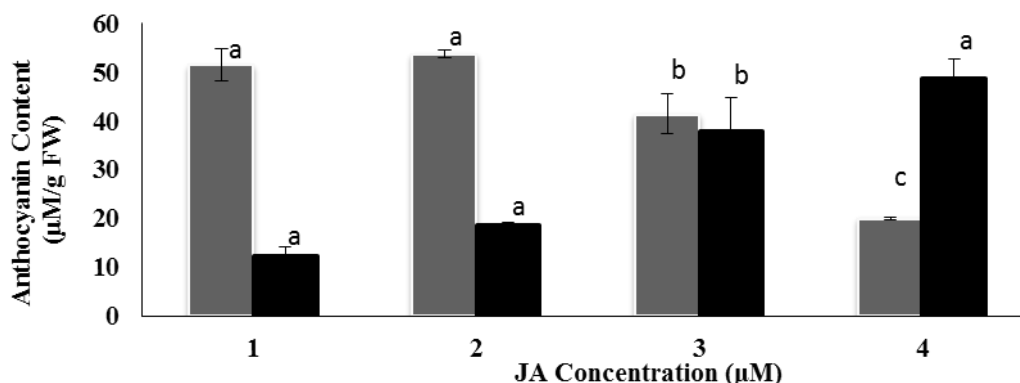
شکل ۳- محتوای فلاونوئید کل گیاهچه‌های ازمک تیمار شده با غلظت‌های مختلف جاسمونات در مدت زمان ۴۸ ساعت (نمودار روشن) و ۷۲ ساعت (نمودار تیره). حروف متفاوت بالای نمودارها نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد در هر کدام از زمان‌ها می‌باشند.

تیمار را نشان داد. در حالیکه افزایش محتوای آنتوسیانین در غلظت ۵۰ میکرومولار نسبت به نمونه شاهد، معنی‌دار نبود، در تیمار با غلظت‌های بالاتر، محتوای این متابولیت نسبت به نمونه شاهد به طور معنی‌دار افزایش پیدا کرد. به طوریکه محتوای آنتوسیانین در تیمار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار جاسمونات بیش از ۲ برابر و در تیمار با غلظت ۱۵۰ میکرومولار بیش از ۴ برابر نسبت به محتوای آنتوسیانین نمونه شاهد افزایش نشان داد.

فعالیت آنزیم کاتالاز در پاسخ به جاسمونات: فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار جاسمونات، نسبت به نمونه شاهد تغییر

درصد افزایش نشان می‌دهد، در حضور غلظت ۱۵۰ میکرومولار، محتوای فلاونوئید به صورت معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش یافت.

تغییر محتوای آنتوسیانین در حضور جاسمونات: پس از ۴۸ ساعت، محتوای آنتوسیانین گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت ۵۰ میکرومولار نسبت به نمونه شاهد تغییر معنی‌داری را نشان نداد (شکل ۴). ولی محتوای این متابولیت در تیمار با غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار جاسمونات در مقایسه با نمونه شاهد به ترتیب بیش از ۲۰ و ۶۰ درصد کاهش نشان می‌دهد. در مقابل، محتوای آنتوسیانین گیاهچه‌ها در زمان ۷۲ ساعت تیمار با جاسمونات، روندی عکس زمان ۴۸ ساعت



شکل ۴- محتوای آنتوسیانین گیاهچه‌های ازیمک تیمار شده با غلظت‌های مختلف جاسمونات در مدت زمان ۴۸ ساعت (نمودار روشن) و ۷۲ ساعت (نمودار تیره). حروف متفاوت بالای نمودارها نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد در هر کدام از زمان‌ها می‌باشند.

جدول ۱- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف جاسمونات بر فعالیت آنزیم کاتالاز ($\Delta A 240/\text{mg protein}$) در گیاهچه‌های تحت تیمار و شاهد.

غلظت جاسمونات (μM)	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
۰	$3/44 \pm 0/27^a$	$11/715 \pm 1/93^a$
۵۰	$2/963 \pm 0/63^{ab}$	$4/873 \pm 1/02^b$
۱۰۰	$3/184 \pm 0/18^{ab}$	$3/528 \pm 0/45^b$
۱۵۰	$2/325 \pm 0/58^b$	$2/691 \pm 0/48^b$

در هر ستون، حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۵٪ است و حروف مشترک نشان دهنده عدم معنی‌داری می‌باشد.

جدول ۲- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف جاسمونات بر فعالیت آنزیم پراکسیداز ($\Delta A 470/\text{mg protein}$) در گیاهچه‌های تیمار شده و شاهد.

غلظت جاسمونات (μM)	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
۰	$0/2107 \pm 0/01^a$	$0/505 \pm 0/09^b$
۵۰	$0/1235 \pm 0/01^b$	$0/825 \pm 0/08^a$
۱۰۰	$0/113 \pm 0/02^b$	$0/214 \pm 0/03^c$
۱۵۰	$0/1034 \pm 0/01^b$	$0/264 \pm 0/04^c$

در هر ستون، حروف متفاوت بالای اعداد نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۵٪ است و حروف مشترک نشان دهنده عدم معنی‌داری می‌باشد.

۲، ۳ و ۴ برابر می‌باشد.

فعالیت آنزیم پراکسیداز در پاسخ به جاسمونات: همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، با گذشت ۴۸ ساعت از اعمال تیمار، فعالیت آنزیم پراکسیداز در تمام غلظت‌های مورد استفاده از جاسمونات (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار) در مقایسه با نمونه شاهد بیش از ۴۰ درصد کاهش نشان می‌دهد. از سوی دیگر، پس از ۷۲ ساعت تیمار، فعالیت آنزیم در غلظت ۵۰ میکرومولار جاسمونات به طور معنی‌داری نسبت به

معنی‌داری را نشان نداد. در مقابل، کاهش فعالیت آنزیم در تیمار با بالاترین غلظت این الیستور (۱۵۰ میکرومولار) مشاهده گردید که در سطح ۵ درصد نسبت به نمونه شاهد معنی‌دار بود. فعالیت این آنزیم در گیاهچه‌های تیمار شده با جاسمونات بمدت ۷۲ ساعت در تمامی غلظت‌ها در مقایسه با نمونه شاهد به طور معنی‌داری کاهش نشان داد (جدول ۱). بطوریکه میزان کاهش فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار جاسمونات نسبت به نمونه شاهد به ترتیب بیش از

نمونه شاهد با افزایش مواجه شد. در عین حال کاهش معنی‌دار فعالیت این آنزیم در تیمار با غلظت‌های بالاتر (بیش از ۴۰ درصد) مشاهده گردید.

بحث:

در این مطالعه، نقش جاسمونات به عنوان یک الیستور در القای تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه ازمک در دو مسیر بیوسنتزی گلوکوزینولات و فنیل پروپانویید مورد ارزیابی قرار گرفت. از آنجائیکه گیاه ازمک دارای مقادیر قابل توجهی از گلوکورافانین (به عنوان پیش‌ساز سولفورافان) است (Powell et al., 2005)، تغییر محتوای سولفورافان گیاهچه‌ها به عنوان معیاری جهت بررسی اثر جاسمونات بر مسیر بیوسنتزی گلوکوزینولات‌ها مورد سنجش قرار گرفت. براساس مطالعات انجام شده تاکنون محتوای گلوکوزینولات و پروفایل آن‌ها در گیاهان به عواملی از قبیل ژنوتیپ، گونه، سن، اندام، تغذیه (Falk et al., 2007)، تنش‌های اعمال شده به گیاه، شرایط جغرافیایی، بکارگیری محرک‌ها (Textor and Gershenzon, 2009) و همچنین دما و pH محیط بستگی دارد (Gu et al., 2012).

نتایج بدست آمده در این پژوهش نشان داد، درحالی‌که محتوای سولفورافان گیاهچه‌ها ازمک پس از گذشت ۴۸ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف جاسمونات مشابه نمونه شاهد می‌باشد، محتوای این ایزوتیوسیانات پس از گذشت ۷۲ ساعت کاهش می‌یابد (شکل ۲). پیش از این مشخص شده بود که محتوای سولفورافان گیاهچه‌های ازمک پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میکرومولار متیل جاسمونات به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش می‌یابد (Mohammadi et al., 2014) که با نتایج مشاهده شده در این مطالعه در ارتباط با عدم تغییر محتوای این ایزوتیوسیانات پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف جاسمونات مطابقت ندارد.

نکته مهم، کاهش قابل توجه محتوای این ایزوتیوسیانات در گیاه شاهد با افزایش سن گیاهچه‌ها است، به طوریکه محتوای این ایزوتیوسیانات در زمان ۷۲ ساعت بیش از ۸ برابر زمان ۴۸

ساعت کاهش یافته است (شکل ۲). این مشاهدات با مطالعات انجام شده در ارتباط با وابستگی محتوای گلوکوزینولات‌ها و به تبع آن ایزوتیوسیانات‌های مشتق شده از آن‌ها به سن گیاه همخوانی دارد (Mohammadi et al., 2014; Sivakumar et al., 2007).

طبق نتایج بدست آمده، محتوای کل فلاونوئید که از طریق مسیر فنیل پروپانوییدی تولید می‌شوند، در گیاهچه‌های ازمک، به طور مثبت تحت تاثیر هورمون جاسمونات قرار گرفت. در نتیجه افزایش محتوای فلاونوئیدی گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار در هر دو زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت مشاهده شد (شکل ۳). در گیاهان ریحان بنفش و سبز (*Ocimum basilicum* L. نیز اسپری جاسمونات (۴۰۰ μL) به برگ‌ها سبب افزایش محتوای ترکیبات فنلی شد (Malekpoor et al., 2016). همچنین، افزایش ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تیمار برگ‌های گیاهان انار (*Pomegranate granatum* L.) با غلظت‌های مختلف متیل-جاسمونات نیز گزارش شد (Vatanparast et al., 2012) که با نتایج حاصل از این مطالعه همخوانی دارند.

از طرف دیگر، نتایج ما نشان داد که محتوای آنتوسیانین (محصول دیگر مسیر فنیل پروپانویید) گیاهچه‌های تیمار شده با جاسمونات بمدت ۴۸ ساعت، با افزایش غلظت الیستور در محیط کاهش می‌یابد. در حالی‌که روند معکوسی در تغییر محتوای این متابولیت با افزایش زمان تیمار به ۷۲ ساعت مشاهده شد و محتوای آنتوسیانین در تیمار با غلظت‌های بالاتر از ۵۰ میکرومولار افزایش یافت (شکل ۳). افزایش محتوای آنتوسیانین و بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه تمشک در تیمار با غلظت‌های مختلف جاسمونات پیش از این نیز گزارش شده بود (Ghasemnezhad and Javaherdashti, 2008). همچنین بهبود محتوای آنتوسیانین و ترکیبات فنولیک در اسپری برگ گیاه سیب با متیل جاسمونات مشاهده شد (Ozturk et al., 2014) که با نتایج بدست آمده از مطالعه کنونی (در ۷۲ ساعت) مطابقت دارد.

کاهش معنی‌دار محتوای فلاونوئید کل تنها در گیاهچه‌های

تیمار شده با بالاترین غلظت جاسمونات (۱۵۰ میکرومولار) پس از ۷۲ ساعت از اعمال هورمون رخ داد، در مقابل بیشترین افزایش محتوای آنتوسیانین نیز در همین گیاهچه‌ها مشاهده شد. چنین بنظر می‌آید که تیمار جاسمونات مسیر فنیل پروپانوییدی گیاهچه‌ها را هدف قرار داده و برحسب زمان و غلظت مورد استفاده از الیسیاتور، بخش‌های مختلف مسیر مذکور فعال می‌شود تا ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه حفظ شود.

از آنجاییکه تجمع پراکسید هیدروژن تحت تیمار با متیل جاسمونات در گیاه کرچک (*Ricinus communis*) گزارش شده بود (Soares et al., 2010)، در این مطالعه، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز که روبشگر این گونه فعال اکسیژن می‌باشند، مورد سنجش قرار گرفت. همانطور که در جداول ۱ و ۲ مشاهده می‌شود، در مجموع فعالیت این دو آنزیم تحت تیمار با جاسمونات کاهش یافته است (به استثناء تیمار با غلظت ۵۰ میکرومولار جاسمونات در مدت ۷۲ ساعت). این نتایج با مشاهدات کرامت و دانشمند (۱۳۹۱) مغایرت دارد. آنها نشان دادند که تیمار گیاه سویا با غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات با بهبود فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز همراه بود (کرامت و دانشمند، ۱۳۹۱).

در مسیر علامت‌دهی جاسمونات تنظیم در سطح رونویسی بواسطه فاکتورهای رونویسی صورت می‌گیرد. از جمله این ژن‌ها، JIN1 (Jasmonate Insensitive1) است که با مخفف MYC2 نیز شناخته شده است و نوعی فاکتور رونویسی بازی هلیکس-لوپ - هلیکس را رمز می‌کند که در تنظیم بیان ژن مسئول جاسمونات در سطح رونویسی دخالت دارد (Lorenzo et al., 2004). ژن مذکور بلافاصله در پایین دست مهار کننده های JAZ (Jasmonate Zim Domain) عمل می‌کند و آبشار رونویسی را هماهنگ می‌نماید و بنابراین علامت-دهی جاسمونات در سطح رونویسی تنظیم می‌شود. این فاکتور رونویسی بصورت مثبت تحمل به تنش اکسیداتیو وابسته به جاسمونات و نیز متابولیسم فلاونوئید را تنظیم می‌نماید (Kazan and Manners, 2008). این مسئله می‌تواند دلیلی بر

افزایش محتوای فلاونوئید کل و همچنین آنتوسیانین به عنوان محصول مسیر فنیل پروپانوییدی در این مطالعه باشد. در مقابل، دفاع وابسته به جاسمونات در برابر پاتوژن‌ها و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه (مثل ایندول گلوکوزینولات‌ها) بصورت منفی توسط JIN1/MYC2 تنظیم می‌شود (Dombrecht et al., 2007)، که می‌تواند خود دلیلی بر کاهش محتوای سولفورافان تحت تیمار با این الیسیاتور بویژه در تیمار بمدت ۷۲ ساعت باشد. پیشنهاد شده است که این کنترل‌های تنظیمی، بواسطه JIN1/MYC2 و با هماهنگ نمودن آبشار رونویسی درگیر در رونویسی تعدادی از عوامل رونویسی (AP2/ERFs, MYBs, zinc fingers و WRKYs) عمل می‌کند. هریک از این فاکتورها، خود، در تنظیم بیان ژن پایین دست نقش‌های اثبات شده دارند (Kazan and Manners, 2008).

بر اساس نتایج مربوط به افزایش محتوای فلاونوئید کل و کاهش محتوای سولفورافان و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان چنین استنباط می‌شود که بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه از مک تحت تیمار با جاسمونات از طریق فعال شدن مسیر فنیل پروپانوییدی صورت گرفته است. از طرف دیگر، اگرچه اعمال جاسمونات در گیاهچه‌های از مک با افزایش محتوای فلاونوئید کل و آنتوسیانین همراه بوده است، ولی در شرایط انجام آزمایش این الیسیاتور، محرک مناسب جهت تحریک بیوسنتز سولفورافان نمی‌باشد. لذا بررسی‌های بیشتری از لحاظ غلظت جاسمونات، زمان اعمال تیمار و حتی سن گیاهچه‌ها باید انجام شود تا تاثیر آن بر محتوای این ایزوتیوسیانات مشخص گردد.

تشکر و قدردانی:

این تحقیق از محل اعتبارات متمرکز معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد تامین شده است. بنابراین نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از آن دانشگاه محترم اعلام می‌دارند.

منابع:

کرامت، ب. و دانشمند، ف. (۱۳۹۱) نقش دوگانه متیل جاسمونات بر عملکردهای فیزیولوژیک در گیاه سویا (*Glicine max* L.) فرایند و کارکرد گیاهی ۱(۱): ۲۶-۳۸.

- Akram, N. A., Ashraf, M. and Al-Qurainy, F. (2012) Aminolevulinic acid-induced changes in some key physiological attributes and activities of antioxidant enzymes in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants under saline regimes. *Scientific Horticulture* 142: 143-148.
- Aminizadeh, M., Riahi-Madvar, A. and Mohammadi, M. (2016) Nano-Metal oxides induced sulforaphane production and peroxidase activity in seedlings of *Lepidium draba* (Brassicaceae). *Progress in Biological Sciences* 6 (1): 75-83.
- Baenas, N., García-Viguera C. and Moreno D. A. (2014) Biotic Elicitors Effectively Increase the Glucosinolates Content in Brassicaceae Sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62: 1881-1889.
- Brader, G., Mikkelsen, M. D., Halkier, B. A., and Tapio, P. E. (2006) Altering glucosinolate profiles modulates disease resistance in plants. *The Plant Journal*. 46: 758-767.
- Bradford, M. M. (1967) rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Chen, J., Yan, Z., and Li, X. (2014) Effect of methyl jasmonate on cadmium uptake and antioxidative capacity in *Kandelia obovata* seedlings under cadmium stress *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 104: 349-356.
- De Geyter, N., Gholami, A., Goormachtig, S., and Goossens, A. (2012). Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends in Plant Science*. 17, 349- 359.
- Dhindsa, R. S., Plumb-dhindsa, P., and Thorpe, T. A. (1981) Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*. 32(1): 93-101.
- Dombrecht, B., Xue, G. P., Sprague, S. J., Kirkegaard, J. A., Ross, J. J., Reid, J. B., Fitt, G. P., Sewelam, N., Schenk, P. M., Manners, J. M., and Kazan K. (2007) MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 2225-2245.
- Fahey, J. W., Haristoy, X., Dolan, P. M., Kensler, T. W., Scholtus, I., Stephenson, K. K., Talalay, P., Lozniewski, A. (2002) Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo [a] pyrene-induced stomach tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 7610-7615.
- Fahey, J. W., Zalcmann, A. T., Talalay, P. (2001) The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56: 5-51.
- Falk, K. L., Tokuhisa, J. G. and Gershenzon, J. (2007) The effect of sulfur nutrition on plant glucosinolate content: physiology and molecular mechanisms. *Plant Biology*. 9(5): 573-581.
- Faurie, B., Cluzet, S., and Merillon, J. M. (2009) Implication of signaling pathways involving calcium, phosphorylation and active oxygen species in methyl jasmonate induced defense responses in grape vine cell cultures. *Journal of Plant Physiology*. 66: 1863-1877.
- Gao, X., Dinkova-Kostova, A. T. and Talalay, P. (2001) Powerful and prolonged protection of human retinal pigment epithelial cells, keratinocytes, and mouse leukemia cells against oxidative damage: the indirect antioxidant effects of sulforaphane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98: 15221-15226.
- Ghasemnezhad, M. and Javaherdashti, M. (2008) Effect of methyl jasmonate treatment on antioxidant capacity, internal quality and post harvest life of raspberry fruit. *Caspian Journal of Environmental Sciences*. 6: 73-78.
- Gu, Z., Guo, Q. and Gu, Y. (2012) Factors influencing glucoraphanin and sulforaphane formation in Brassica plants: A review. *Journal of Integrative Agriculture*. 11(11): 1804-1816.
- Hirayama, T. and Shinozaki, K. (2010) Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *The Plant Journal*. 61: 1041-1052.
- Hoagland, D. R. and Arnon, D. I. (1950) The water-culture for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station*. 347: 25-32.
- Hopkins, R. J., van Dam, N.M. and Van Loon, J. J. (2009) Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions. *Annu RevEntomol* 54: 57-83.
- Hsieh, T. H., Lee, J. T., Charnng, Y. Y. and Chan, M.T. (2002) How to define resistance to water deficit stress? *Plant Physiology* 130: 618-626.
- Kazan, K. and Manners, J. M. (2008) Jasmonate Signaling: Toward an Integrated View *Plant Physiology*, (146): 1459-1468.
- Krizek, D. T., Britz, S. J. and Mirecki, R. M. (1998) Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. new red fire lettuce. *Physiologia Plantarum*. 103: 1-7.

- Krizek, D. T., Kramer, G. F., Upadaya, 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.
- Liang, H., Yuan, Q., Dong, H. and Liu, Y. (2006) Determination of sulforaphane in broccoli and cabbage by high-performance liquid chromatography. *Journal of food Composition and Analysis*. 19: 473-476.
- Lorenzo, O., Chico, J. M., Sánchez-Serrano, J. J. and Solano, R. (2004) Jasmonate Insensitive1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 16: 1938-1950.
- Malekpoor, F., Salim, A. and Ghasemi Pirbalouti, A. (2016) Effect of jasmonic acid on total phenolic content and antioxidant activity of extract from the green and purple landraces of sweet basil (*Poloniae Pharmaceutica*). *Drug Research*. 73(5): 1229-1234.
- Mohammadi, M., Riahi-Madvar, A. and Pourseyedi S. (2014) Elicitors Induced Sulforaphane Production in *Lepidium draba*. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 4 (35): 64-70.
- Mulligan, G. A. and Frankton, C. (1962) Taxonomy of the genus *Cardaria* with particular reference to the species introduced into North America. *Canadian Journal of Botany*. 40: 1411-1425.
- Myzak, M. C., Karplus, P. A., Chung, F. L. and Dashwood, R. H. (2004) A novel mechanism of chemoprotection by sulforaphane inhibition of histone deacetylase. *Cancer Research*. 64: 5767-5774.
- Namdeo, A. (2007) Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review, *Pharmacognosy reviews*. 1: 69-79.
- Nasiri-Bezenjani, M., Riahi-Madvar, A., Baghizadeh, A. and Ahmadi, A. (2014) Rosmarinic Acid Production and Expression of Tyrosine Aminotransferase Gene in *Melissa officinalis* Seedlings in Response to Yeast Extract. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 16(4): 921-930.
- Ozturk, B., Ozkan, Y. and Yildiz, K. (2014) Methyl jasmonate treatments influence bioactive compounds and red peel color development in 'Braeburn' apple. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 38: 688-699.
- Plewa, M. J., Smith, S. R. and Wagner, E. D. (1991) Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 247(1): 57-64.
- Powell, E. E., Hill, G. A., Juurlink, B. H. and Carrier, D. J. (2005) Glucoraphanin extraction from *Cardaria draba*: Part 1. Optimization of batch extraction. *Journal of chemical technology and biotechnology*. 80: 985-991.
- Radman, R., Saez, T., Bucke, C. and Keshavarz, T. (2003) Elicitation of plants and microbial cell systems, *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 37: 91-102.
- Rask, L., Andréasson, E., Ekblom, B., Eriksson, S., Pontoppidan, B. and Meijer, J. (2000) Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Molecular Evolution*. Springer. 93-113.
- Rezaee, F., Ghanati, F. and Behmanesh, M. (2013) Antioxidant activity and expression of catalase gene of *Eustoma grandiflorum* L in response to boron and aluminum. *South African Journal of Botany*. 84: 13-18.
- Singh, S. V., Warin, R., Xiao, D., Powolny, A. A., Stan, S. D., Arlotti, J. A., Zeng, Y., Hahm, E. R., Marynowski, S. W. and Bommarreddy, A. (2009) Sulforaphane inhibits prostate carcinogenesis and pulmonary metastasis in TRAMP mice in association with increased cytotoxicity of natural killer cells. *Cancer research*. 69: 2117-2125.
- Sivakumar, G., Aliboni, A. and Bacchetta, L. (2007) HPLC screening of anti-cancer sulforaphane from important European Brassica species. *Food Chemistry* 104(4): 1761-1764.
- Soares, A. M., de Souza, T. F., Jacinto, T. and Machado, O. L. T. (2010) Effect of methyl jasmonate on antioxidative enzyme activities and on the contents of ROS and H₂O₂ in *Ricinus communis* leaves. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 22: 151-158.
- Textor, S. and Gershenzon, J. (2009) Herbivore induction of the glucosinolate-myrosinase defense system: major trends, biochemical bases and ecological significance. *Phytochemistry Reviews*. 8(1): 149-170.
- Traka, M. and Mithen, R. (2009) Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochemistry Reviews*. 8: 269-282.
- Vatanparast, G., Mirdehghan, H., Karimi, H. and Vazifeshenas, M. (2012) Foliar application of salicylic acid, methyl jasmonate and potassium sulfate on photosynthetic characteristics and fruit quality of pomegranate. *Iran Agricultural Research*. 31: 23-34.
- Walker, C. D., Webl, Robson A. D. and Graham R. D. (1981) Copper in soils and plants. Academic Press 189-212.
- Yeh, C. T. and Yen, G. C. (2009) Chemopreventive functions of sulforaphane: A potent inducer of antioxidant enzymes and apoptosis. *Journal of Functional Foods*. 1: 23-32.
- Zhao, J., Davis, L. C. and Verpoorte, C. (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 23: 283-333.