اثر متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در کشت سلول *Scrophularia straita Boiss.*

نرگس خانپور اردستانی[۱]، مظفر شریفی[۱*] و مهرداد بهمنش[۲]

[۱] **دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم گیاهی**

[۲] **دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک**

تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۲۶

چکیده

در این پژوهش اثر متیل‌جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار به‌عنوان یک الیسیتور (elicitor) بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز در کشت سلول *Scrophularia striata* و محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئید آن در بازه زمانی ۴، ۸، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد مطالعه قرار گرفت. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در طی ۱۲ ساعت اولیه دوره تیمار کاهش و پس از آن تا پایان دوره آزمایش افزایش یافت. در حضور متیل‌جاسمونات فعالیت کاتالاز در کلیه نمونه‌ها در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری داشت، در حالیکه فعالیت پراکسیداز پس از ۱۲ ساعت به طور معنی‌داری افزایش یافت. به‌منظور درک بهتر سازوکار متیل‌جاسمونات، میزان تجمع پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدهای غشا نیز بررسی شد. میزان پراکسید هیدروژن تنها در کشت‌هایی که به مدت ۸ ساعت در تیمار متیل‌جاسمونات بودند نسبت به کشت‌های شاهد افزایش معنی‌داری داشت، در حالیکه میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا تغییر معنی‌داری نشان نداد. بررسی میزان فنول کل در سلول‌های شاهد و تیمار شده نشان داد که میزان ترکیبات فنولی با شیب ملایمی رو به افزایش بود و در کشت‌های تیمار شده با متیل‌جاسمونات پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت افزایش معنی‌دار ترکیبات فنولی نسبت به شاهد دیده شد. نمونه‌های تیمار شده با متیل‌جاسمونات، از ۲۴ ساعت پس از تیمار تا آخر دوره، نسبت به ۱۲ ساعت اول به طور معنی‌داری از محتوای فلاونوئیدی بالاتری نسبت به شاهد برخوردار بودند. البته در حضور متیل‌جاسمونات افزایش توان آنتی‌اکسیدانی و افزایش میزان ترکیبات فنولی با کاهش شاخص‌های تنش اکسیداتیو هماهنگ می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، ترکیبات فنولی، فلاونوئید، متیل‌جاسمونات، *Scrophularia striata*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۴۴۷۹، پست الکترونیکی: msharifi@modares.ac.ir

مقدمه

گیاه *Scrophularia striata* یک گیاه بومی ایران است که در مناطق سردسیر و کوهستانی زاگرس رشد می‌کند. از زمان‌های قدیم از این گیاه برای درمان و بهبود زخم‌های حاصل از سوختگی استفاده می‌کردند (۱). همواره اعتقاد بر این بوده که این گیاه علاوه بر اینکه باعث تسریع التیام زخم می‌گردد از عفونت‌های شایع باکتریایی در زخم نیز جلوگیری می‌کند؛ دارای اثرات ضد میکروبی، ضد تومور و ضد التهاب است (۲). برخلاف تأثیرات دارویی شناخته شده، در مورد ترکیبات مؤثره موجود در این گیاه اطلاعات بسیار کمی در دست می‌باشد. بسیاری از خواص دارویی این جنس را به حضور فنیل‌اتانوئید گلیکوزیدها نسبت می‌دهند. روش‌های کشت بافت گیاهی اغلب به‌عنوان مدل برای بررسی‌های گوناگون فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و ژنتیکی در گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۸). کشت

سلول‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی برای تولید فراورده‌های دارویی گیاهی به‌عنوان یک روش جایگزین و قابل قبول نسبت به استفاده از عصاره گیاه کامل به‌کار گرفته شده و منبع مناسب و مهمی برای تولید متابولیت‌های ثانوی با ارزش می‌باشد. محتوای متابولیت‌های ثانوی در کشت سلول به وسیلهٔ دست‌ورزی تنظیم کننده‌های رشد، بهینه سازی ترکیبات محیط کشت مانند قند، نیترات، فسفات و افزودن پیش سازها، الیسیتورها و بهینه کردن شرایط کشت با تغییر پارامترهایی مانند نور، pH و هوادهی قابل ارتقا می‌باشد. استفاده از الیسیتورها یکی از مؤثرترین راهکارها برای بهبود تولید متابولیت‌های ثانوی زیستی است، این مولکول‌ها تولید متابولیت‌های ثانوی مانند آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، ترکیبات فنولی و فیتوالکسین‌ها را در کشت سلول گیاهی به طور مؤثری تحریک می‌کنند (۳۴).

جاسمونات‌ها (Jas)، شامل جاسمونیک اسید(JA) و متیل-جاسمونات (MeJA)، یک خانواده از ترکیبات سیکلوپنتانون هستند که از طریق مسیر اکتادکانوئیک از لینولنیک اسید ساخته می‌شوند. به طور کلی این ترکیبات از رشد گیاه جلوگیری می‌نمایند، اما به‌عنوان یک شاخه از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، فرایندهای متنوعی از قبیل رسیدن میوه، پیری، تشکیل غده، تشکیل دانه گرده، پاسخ-های دفاعی علیه آسیب‌های مکانیکی و حمله حشرات و بیماری‌زاها را راه‌اندازی می‌کنند (۲۰). این ترکیبات به‌عنوان الیسیتور و از طریق القای (Elicitation) دستگاه دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانوی نیز می-شوند (۲۰ و ۴۱). به‌علاوه اینکه متیل‌جاسمونات تولید گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS) (Reactive Oxygen Species) را القا می‌کند (۴۰). مهمترین گونه‌های فعال اکسیژن، رادیکال‌های آنیون سوپراکسید ($O_2^{\bullet-}$)، هیدروکسیل ($OH^{\bullet}$) و هیدروژن پراکسید (H_2O_2) هستند (۱۷). این ترکیبات نقش پیامبر ثانوی را در پاسخ‌های سلولی بر عهده دارند ولی مقادیر بالای آنها باعث آسیب شدید به سلول می‌شود (۲۸). رادیکال‌های آزاد در واکنش با پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA در سلول می‌توانند باعث تغییر فعالیت و یا غیرفعال شدن آنها شده و در نهایت باعث آپوپتوزیس و مرگ سلول‌ها گردند (۱۲). رادیکال های آزاد با پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلول سبب تغییر ساختار و نسبت لیپیدهای غشا شده و باعث کاهش تمامیت غشا و در نتیجه افزایش نفوذپذیری آن می‌گردند. گیاه با استفاده از مکانیسم‌های آنزیمی و غیرآنزیمی می-تواند غلظت گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن را کاهش دهد و از این طریق از اثرات مخرب آن بکاهد. البته موفقیت کامل گیاه در این راستا به میزان فعالیت دستگاه آنتی‌اکسیدانی گیاه و غلظت گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن بستگی دارد (۳۲). دستگاه دفاعی آنتی‌اکسیدان شامل آنزیم‌های نظیر سوپراکسید دیسموتاز (SOD) ، کاتالاز (CAT) ، پراکسیداز (POD) و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی شامل فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و سایر ترکیبات فنولی، آسکوربات، آلفا توکوفرول، بتاکاروتن و غیره می‌باشد (۲۲).

از آنجا که تحقیقات چندانی راجع به گیاه *S. striata* انجام نشده است، هدف تحقیق حاضر مطالعه ارتباط بین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تجمع گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن و محتوای ترکیبات فنولی در کشت سلول این گیاه پس از تیمار با متیل‌جاسمونات در زمان‌های متفاوت می‌باشد.

مواد و روشها

جمع‌آوری و کشت بذرها: بذرهای *Scrophularia striata* Boiss. از منطقه آسمان آباد، روستای جانجان، استان ایلام جمع‌آوری شدند. بذرها پس از شستشوی سطحی با مایع شوینده، به مدت ۷۰ ثانیه در الکل ۷۰٪ قرار گرفتند، پس از آبکشی با آب مقطر، ۱۰ دقیقه در پراکسید هیدروژن ۳/۳٪ قرار داده شدند. سپس ۱۵ دقیقه به محلول هیپوکلریت سدیم ۲٪ منتقل شدند، پس از شستشوی کامل در مرحلهٔ آخر ۷۰ ثانیه در الکل ۷۰٪ قرار گرفتند و با آب مقطر استریل آبکشی شدند. بذرهای استریل به مدت یک

شبانه‌روز در محلول ۰/۷۵ گرم در لیتر جیبرلین که از قبل توسط فیلتر ۰/۲ میکرومتر استریل شده بود در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد در محیط MS (Murashige and Skoog) بدون هورمون کشت داده شدند. بذرها به مدت سه روز در فیتوترون در تاریکی و پس از آن دو هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند و از گیاهچه‌های حاصل برای کشت بافت استفاده شد.

تشکیل کالوس و راه‌اندازی کشت سلولی: به‌منظور ایجاد کالوس، قطعاتی از ساقه گیاهچه‌ها به طول یک تا دو سانتی‌متر به محیط کشت MS پایه حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید و ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین منتقل شد. بعد از گذشت ۳ تا ۷ روز القای کالوس-ها در قطعات شروع شد. کالوس‌ها در محیط جامد هر دو هفته یکبار واکشت شدند. برای راه‌اندازی کشت سلولی تعلیقی، درون هر ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری، حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع MS با ترکیبات هورمونی یاد شده در بالا و بدون آگار، مقدار ۲ گرم کالوس ترد و هم‌سن وارد گردید و با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی روی شیکر قرار گرفتند و به‌منظور تکثیر و همگن‌سازی، هر دو هفته یکبار واکشت گردید. در هر مرحله سلول‌ها با استفاده از قیف بوخنر و در شرایط مکش جمع‌آوری شدند و به محیط تازه منتقل گردیدند.

تیمار سلول‌ها با متیل‌جاسمونات: قبل از اعمال تیمار، دوره رشد برای سلول‌ها تعیین گردید. بدین منظور بعد از انتقال ۱ گرم توده سلول کاملاً همگن شده به ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع جدید MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر نفتالن استیک اسید و ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینو پورین، از روز اول تا روز ۲۹ بعد از انتقال، به فاصله زمانی دو روز یکبار، نمونه‌برداری انجام شد و بر اساس وزن تر توده سلولی منحنی رشد ترسیم گردید.

به‌منظور اعمال تیمار، مجدداً محیط کشت تعلیقی تهیه گردید و ۱ گرم سلول (وزن تر) با استفاده از قیف بوخنر و در شرایط مکش برداشت و به ارلن حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع منتقل گردید. از طرفی محلول متیل-جاسمونات تهیه و توسط فیلتر با قطر منافذ ۰/۲ میکرومتر استریل شد. با توجه به منحنی رشد بدست آمده، در روز هفتم از دوره رشد سلولی به محیط کشت‌های سلولی مقداری از محلول متیل‌جاسمونات اضافه گردید، به گونه-ای که غلظت نهایی آن ۰/۱ میلی‌مولار باشد. این غلظت با توجه به آزمایش‌های مقدماتی در سه غلظت ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار متیل و اندازه‌گیری رشد و درصد زنده‌مانی سلول‌ها انتخاب شد. محیط‌های کشت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد روی شیکر با ۱۱۰ دور در دقیقه قرار گرفتند و در زمان‌های ۴، ۸، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار برداشت شدند. در این آزمایش حداقل ۳ تکرار برای هر زمان در نظر گرفته شد. میزان رشد سلولی در حضور متیل-جاسمونات براساس اندازه‌گیری وزن تر سلول‌ها در ساعات پس از تیمار تعیین شد.

تعیین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: با همگن-سازی ۰/۱ گرم سلول در ۳ میلی‌لیتر بافر HEPES- KOH ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷/۸) دارای EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و سانتریفیوژ عصاره حاصل در ۱۲۰۰۰ (rpm) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، آماده‌سازی تمام نمونه-ها انجام شد و بخش روشناور حاصل برای تعیین غلظت پروتئین به روش Bradford (1976) و سنجش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز مورد استفاده قرار گرفت. ترکیب واکنش در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر شامل بافر HEPES-KOH ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷/۸) حاوی EDTA ۰/۱میلی-مولار، کربنات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۱۰/۲)، L-متیونین۱۲ میلی‌مولار، نیترو بلو تترازولیوم (NBT) ۷۵ میلی‌مولار، ریبوفلاوین ۱ میکرومولار و ۳۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. در کنار هر نمونه، یک شاهد در نظر گرفته شد که دارای تمام موارد فوق بدون عصاره آنزیمی

بود و به جای آن همان اندازه از بافر استخراج اضافه گردید. نمونه‌ها و شاهد به مدت ۱۵ دقیقه در معرض نور لامپ فلورسنت قرار گرفتند تا تغییر رنگ حاصل گردد. سپس جذب آنها در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت گردید و تفاوت جذب بین هر نمونه و شاهد محاسبه گردید. واحد فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به‌عنوان مقدار آنزیمی در نظر گرفته شد که منجر به مهار ۵۰ درصد احیای NBT در حضور نور گردید (۱۰).

تعیین فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز

روش استخراج پروتئین: در این مرحله ۰/۱ گرم از سلول‌ها در ۳ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۲۵ میلی‌مولار (pH=۶/۸) کاملاً ساییده شد. همگنای حاصل در ۱۲۰۰۰ (rpm) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی با دقت جدا و برای سنجش غلظت پروتئین موجود در سلول‌ها و نیز فعالیت آنزیم استفاده شد. غلظت پروتئین نمونه‌ها به روش Bradford (1976) تعیین گردید.

فعالیت آنزیم کاتالاز براساس میزان تجزیه H_2O_2 و در نتیجه کاهش میزان جذب آن در طول موج ۲۴۰ نانومتر سنجیده و به ازای میلی‌گرم پروتئین عصاره آنزیمی برای یک دقیقه محاسبه شد. مخلوط واکنش (۳ میلی‌لیتر)، شامل ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۲۴۵۰ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات ۲۵ میلی‌مولار (pH=۶/۸) و ۵۰۰ میکرولیتر H_2O_2 ۱۰ میلی‌مولار تهیه شد. کلیه مراحل استخراج آنزیمی روی یخ انجام شد (۹).

برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز به روش ذکر شده Pandolfini و همکاران (1992) عمل گردید. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات سدیم ۶۰ میلی‌مولار (pH=۶/۱)، گایاکول ۲۸ میلی‌مولار و پراکسید هیدروژن ۵ میلی‌مولار و ۵۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. جذب نمونه‌ها در طول زمان یک دقیقه در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت گردید و فعالیت آنزیم پراکسیداز به صورت تغییرات جذب به میلی-گرم پروتئین عصاره بیان گردید.

تعیین مقدار پراکسید هیدروژن (H_2O_2): بدین منظور ۰/۱ گرم سلول، روی یخ با ۳ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید ۰/۱٪ تا مرحله همگن شدن سائیده و بعد سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰rpm، به مدت ۱۵ دقیقه) شدند. به ۱ میلی‌لیتر از محلول روشناور، ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم (۱۰ میلی‌مولار، pH=۷) و ۱ میلی‌لیتر یدید پتاسیم اضافه شد و جذب آن در طول موج ۳۹۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر قرائت شد. با استفاده از منحنی استاندارد مقدار پراکسید هیدروژن محاسبه گردید (۳۷).

تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا: میزان آسیب به غشاها با اندازه‌گیری مقدار مالونیل دی‌آلدئید (MDA) به‌عنوان فراورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشا تعیین شد. به‌منظور اندازه‌گیری MDA میزان ۰/۱ گرم از سلول با ۳ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید ۱۰٪ سائیده شد. نمونه‌ها پس از همگن‌سازی، سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰rpm، به مدت ۱۵ دقیقه) شدند. به ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های صاف شده، ۱ میلی‌لیتر تیو باربیتوریک اسید (TBA) ۰/۲۵٪ اضافه گردید و به مدت نیم ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. میزان MDA با اندازه‌گیری جذب در طول موج‌های ۵۳۲ نانومتر و ۶۰۰ نانومتر با استفاده از ضریب ثابت خاموشی (ε =۱۵۵ $mM^{-1}cm^{-1}$) محاسبه گردید (۱۵).

تعیین میزان فنول کل: میزان ترکیبات فنولی کل بر اساس روش رنگ‌سنجی فولین- سیوکالتیو و بر حسب منحنی استاندارد گالیک اسید در طول موج ۷۶۲ نانومتر اندازه-گیری شد. بدین ترتیب که ابتدا ۰/۳ گرم سلول در ۳ میلی-لیتر متانل۸۰٪ همگن شد. سپس با سرعت ۵۰۰۰ (rpm) به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و عصاره متانلی از رسوب جدا شد. عصاره متانلی برای سنجش فنول کل و فلاوونوئیدها مورد استفاده قرار گرفت. به ۵۰۰ میکرولیتر

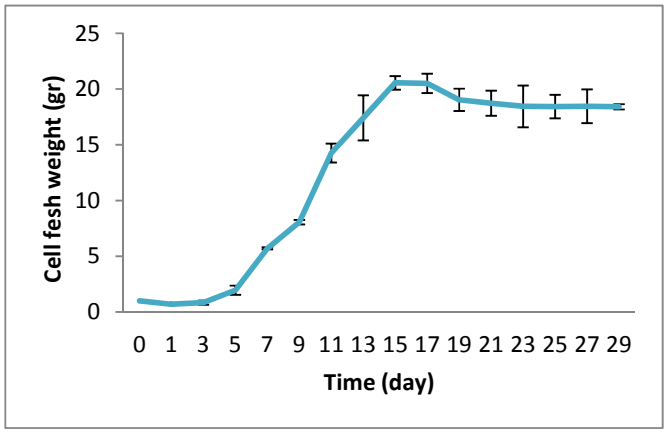
عصاره متانلی، ۲/۵ میلی‌لیتر محلول فولین- سیوکالتیو اضافه شد. به مخلوط حاصل بعد از ۲ دقیقه ۲ میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات ۷٪ اضافه شد و جذب بعد از ۶۰ دقیقه در طول موج ۷۶۲ نانومتر خوانده شد (۲۷). در نهایت، مقدار فنول کل بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد.

سنجش و اندازه‌گیری فلاونوئید: به ۵۰۰ میکرولیتر عصاره متانلی، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آلومینیوم‌کلرید ۱۰٪، ۱۰۰ میکرولیتر پتاسیم استات ۱ مولار، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ و ۲/۸ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه، جذب هر یک از نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر سنجیده شد و میزان فلاونوئید براساس منحنی استاندارد روتین (Rutin) محاسبه شد (۱۱).

تحلیل‌های آماری: کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار از حداقل سه نمونه مستقل انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش anova و نرم‌افزار MSTAT-C و معنی‌دار بودن اختلاف بین آنها با آزمون دانکن در سطح P ≤۰/۰۵ انجام شد.

نتایج

تعیین منحنی رشد سلول: پیش از اعمال تیمار، میزان رشد سلول‌ها در مدت ۲۹ روز در کشت تعلیقی بررسی شد (شکل ۱). نتایج نشان داد که پس از کشت، سلول‌ها به مدت سه روز در فاز تأخیری بودند، سپس میزان سلول‌ها افزایش یافته که این روند تا روز پانزدهم ادامه داشت. پس از این زمان وزن سلول‌ها نسبتاً بدون تغییر ماند. شیب رشد سلولی در روز هفتم افزایشی بود که در این زمان سلول‌ها در دوره لگاریتمی رشد بوده و بشدت در حال تقسیم بودند. در این زمان حجم توده سلولی به میزان مناسبی رسیده، بنابراین روز هفتم به‌عنوان زمان مناسب برای افزودن تیمار انتخاب گردید.



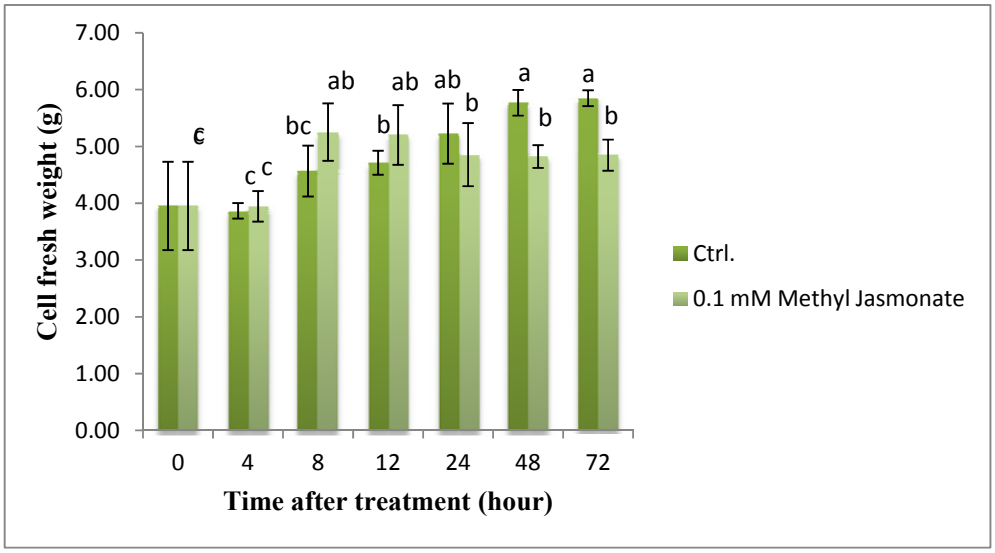
شکل ۱- منحنی رشد سلولی در کشت تعلیقی *S. striata* در محیط کشت MS. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± SE است.

تأثیر متیل‌جاسمونات بر رشد سلولی: اندازه‌گیری وزن تر سلول‌ها نشان داد که تیمار ۰/۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات از روز هفتم در بازه زمانی ۴ تا ۲۴ ساعت در نمونه‌های تیمار شده نسبت به نمونه‌های شاهد، تأثیری بر رشد نداشت (شکل ۲)، در حالیکه در بازه زمانی ۴۸ تا ۷۲ ساعت رشد سلولی به طور معنی‌داری کاهش یافت (P≤۰/۰۵).

تأثیر متیل‌جاسمونات بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

تغییرات فعالیت سوپراکسید دیسموتاز: همان گونه که در شکل ۳a نشان داده شده است، مقایسه میانگین‌ها در سطح P≤۰/۰۵ نشان داد که فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از

روز هفتم در بازه زمانی ۴ تا ۱۲ ساعت در نمونه‌های شاهد رو به افزایش بود و بعد تا ۷۲ ساعت که معادل روز دوازدهم از منحنی رشد می‌باشد کاهش معنی‌داری داشت.



شکل ۲- تاثیر متیل‌جاسمونات بر رشد سلولی در کشت تعلیقی *S. striata*. متیل‌جاسمونات در روز هفتم دوره رشد به محیط کشت اضافه شد و سلول‌ها در زمان‌های ۴، ۸، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار برداشت شدند. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P≤۰/۰۵ است.

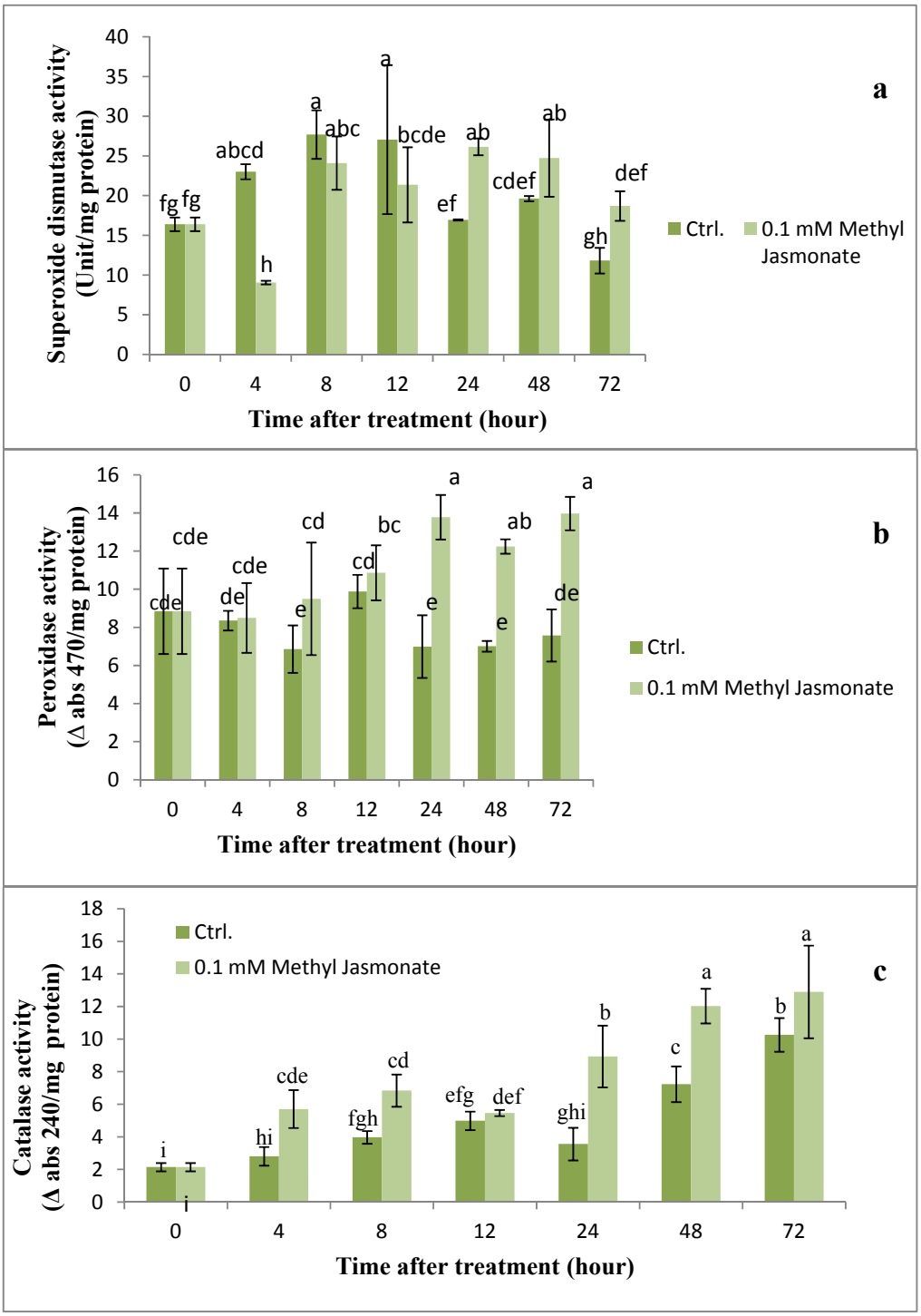
در نمونه‌های تیمار شده با ۰/۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات، در زمان ۴ ساعت پس از شروع تیمار فعالیت آنزیم کاهش یافت و بعد تا ۴۸ ساعت پس از آغاز تیمار، افزایش یافت و بعد شروع به کاهش نمود. از طرفی مقایسه بین نمونه-های شاهد و تیمار شده در هر زمان نشان داد که در زمان-های ۴ و ۱۲ ساعت پس از شروع تیمار، فعالیت آنزیم مذکور در نمونه‌های تیمار شده پایین‌تر از نمونه‌های شاهد بود، درحالیکه در بازه زمانی ۲۴ تا ۷۲ ساعت فعالیت آنزیم در نمونه‌های تیمار شده به صورت معنی‌داری بالاتر از نمونه‌های شاهد بود.

تغییرات فعالیت پراکسیداز: بررسی نتایج اندازه‌گیری فعالیت پراکسیداز نشان داد که از روز هفتم در بازه زمانی مورد مطالعه (۴ تا ۷۲ ساعت)، بجز ۱۲ ساعت پس از تیمار، تغییر معنی‌داری در نمونه‌های شاهد وجود نداشت (P≤۰/۰۵). در حالیکه در نمونه‌های تیمار شده با متیل-جاسمونات از ۲۴ ساعت پس از شروع تیمار افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم پراکسیداز در مقایسه با زمان آغاز آزمایش یعنی روز هفتم داشت (شکل ۳b). این نتایج نشان داد که در حضور متیل‌جاسمونات پس از ۱۲ ساعت فعالیت پراکسیداز از نمونه‌های شاهد به طور معنی‌داری بیشتر است.

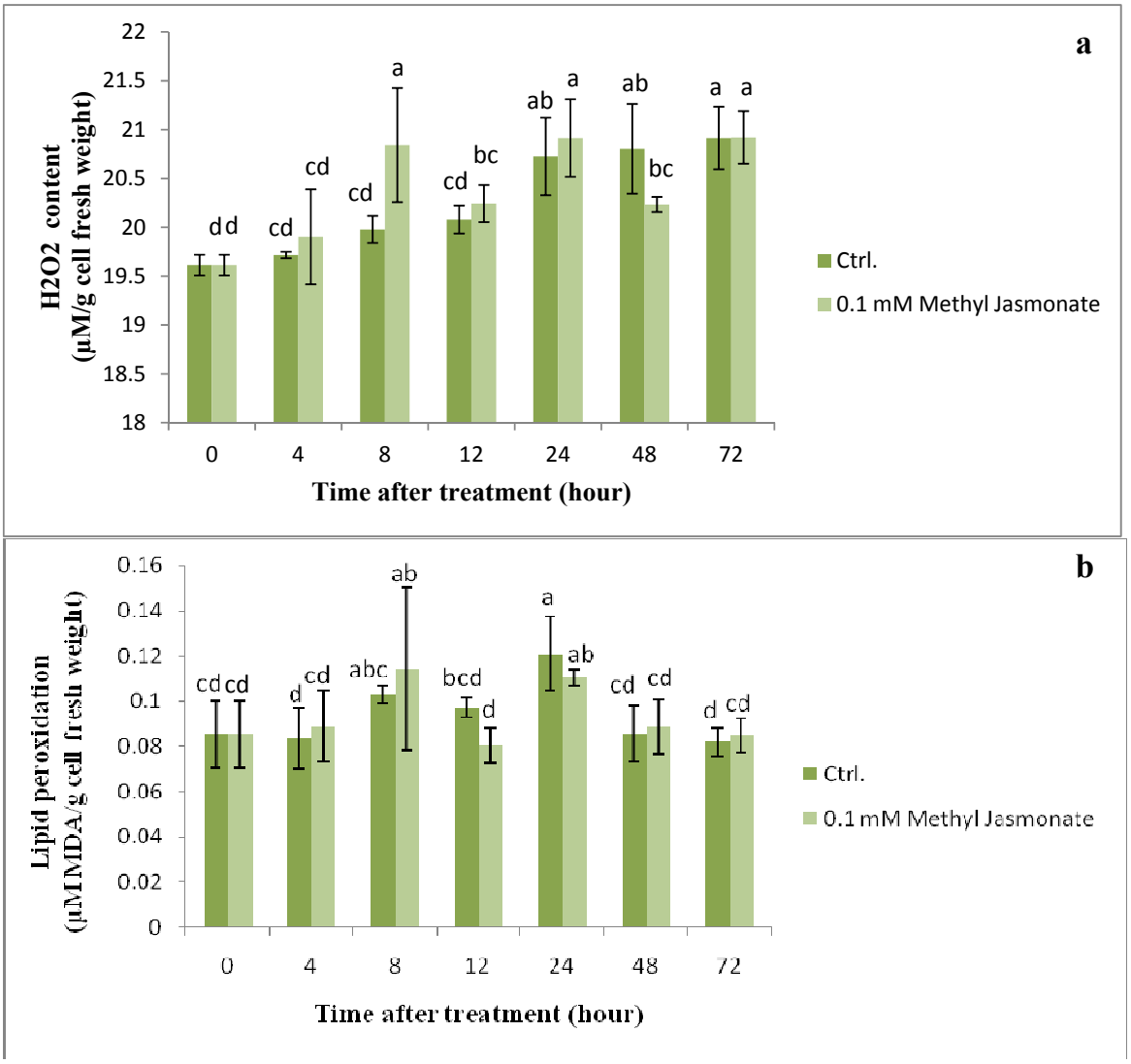
فعالیت کاتالاز: به طور کلی فعالیت کاتالاز در کشت سلولی از روز هفتم به بعد در نمونه‌های شاهد و نمونه‌های تیمار شده با متیل‌جاسمونات رو به افزایش بود. فعالیت کاتالاز در سلول‌های تیمار شده با متیل‌جاسمونات تقریباً در کلیه نمونه‌ها در مقایسه با شاهد افزایش یافت (شکل ۳c).

مقدار پراکسید هیدروژن: اندازه‌گیری میزان تجمع پراکسید هیدروژن در سلول‌ها نشان داد که این ترکیب از روز هفتم تا ۷۲ ساعت، هم در سلول‌های شاهد و هم در نمونه‌های تیمار شده با متیل‌جاسمونات رو به افزایش بود، اما تنها در سلول‌هایی که به مدت ۸ ساعت پس از تیمار متیل-جاسمونات برداشت شدند نسبت به سلول‌های شاهد افزایش معنی‌داری داشت و در سایر تیمارها میزان پراکسید

هیدروژن بین تیمار و سلول‌های شاهد تغییر معنی‌داری نداشت (شکل ۴a).



شکل ۳- تاثیر متیل‌جاسمونات بر فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (a)، پراکسیداز (b) و کاتالاز (c). متیل‌جاسمونات در روز هفتم به محیط کشت اضافه گردید. سلول‌ها در زمان‌های ۴، ۸، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار برداشت شدند. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P \leq ۰/۰۵$ است.

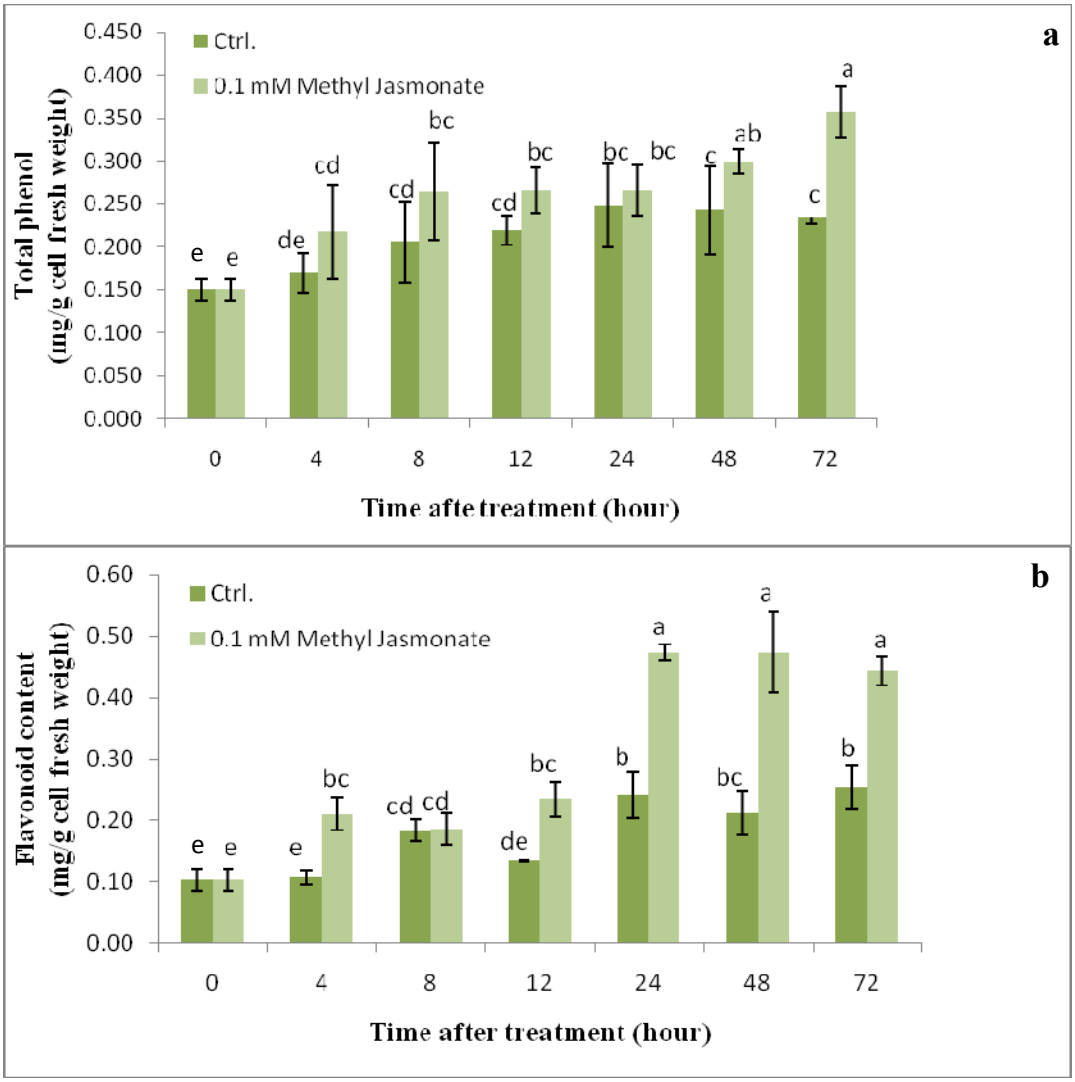


شکل ۴- تاثیر متیل‌جاسمونات بر میزان پراکسید هیدروژن (a) و پراکسیداسیون لیپید (b). متیل‌جاسمونات در روز هفتم به محیط کشت اضافه گردید. سلول‌ها در زمان‌های ۴، ۸، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار برداشت شدند. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P≤۰/۰۵ است.

پراکسیداسیون لیپیدهای غشا: با توجه به نتایج بدست آمده، میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا از روز هفتم تا ۷۲ ساعت، هم در سلول‌های شاهد و هم در نمونه‌های تیمار شده با متیل‌جاسمونات تغییری نداشت و تنها در نمونه-هایی که به مدت ۸ و ۲۴ ساعت برداشت شدند افزایش معنی‌داری دیده شد. همچنین در حضور ۰/۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات در میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلول‌های تیمار شده در مقایسه با نمونه‌های شاهد تفاوت معنی‌داری (P≤۰/۰۵) مشاهده نگردید (شکل ۴b).

تأثیر متیل‌جاسمونات بر تجمع متابولیت‌های ثانوی: بررسی میزان فنول کل در سلول‌های شاهد و تیمار شده نشان داد که در کشت تعلیقی میزان ترکیبات فنولی با شیب ملایمی رو به افزایش است که از روز هفتم تا ۷۲ ساعت مورد مطالعه، در هر گروه نسبت به روز هفتم معنی‌دار بود. به علاوه اینکه مقایسه مقدار فنول در سلول‌های تیمار شده با متیل‌جاسمونات با نمونه‌های شاهد نشان داد که میزان این ترکیبات در تمام ساعات پس از اعمال تیمار به طور

جزئی بیشتر بوده و در ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار افزایش معنی‌داری داشت (شکل ۵a).



شکل ۵- تاثیر متیل‌جاسمونات بر فنل کل (a) و فلاونوئید (b). میزان فنل کل بر اساس استاندارد گالیک اسید و میزان فلاونوئید بر اساس استاندارد روتین (Rutin) اندازه‌گیری شدند. متیل‌جاسمونات در روز هفتم به محیط کشت اضافه گردید. سلول‌ها در زمان‌های ۴، ۸، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار برداشت شدند. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P≤۰/۰۵ است.

نتایج اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید نشان داد که با گذشت زمان هم در نمونه‌های شاهد و هم در نمونه‌های تیمار شده با متیل‌جاسمونات، میزان فلاونوئید سلول‌ها روند افزایشی دارد. شدت افزایش میزان فلاونوئید در نمونه‌های تیمار شده بسیار بیشتر بود، به گونه‌ای که از ۲۴ ساعت پس از تیمار، این سلول‌ها نسبت به ۱۲ ساعت اول به طور معنی-داری از محتوای فلاونوئیدی بالاتری برخوردار بودند (شکل ۵b).

بحث

متیل‌جاسمونات باعث القای تنش اکسیداتیو در گیاهان تحت تیمار می‌شود (۱۳). به دلیل اینکه متیل‌جاسمونات تولید ROS را در گیاهان القا می‌کند، بنابراین یک دستگاه

آنتی‌اکسیدانی مؤثر برای حفظ عملکردهای متابولیسم در شرایط القا ضروریست. دستگاه آنتی‌اکسیدان آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز و گلوتاتیون ردوکتاز حفاظت علیه تأثیرات سمی ROS را بر عهده دارد. سوپراکسید دیسموتاز اولین آنزیم در فرایند سمیت‌زدایی ROS به‌شمار می‌رود. این آنزیم نقش حیاتی در دفاع آنتی-اکسیدانی ایفا می‌کند، زیرا تبدیل O_2^- را به H_2O_2 کاتالیز می‌کند، درحالیکه کاتالاز و پراکسیداز، H_2O_2 را تخریب می‌کنند. در این مطالعه کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در ۱۲ ساعت اول پس از اعمال تیمار متیل-جاسمونات ممکن است به دلیل غیرفعال کردن آنزیم در اثر تولید بیش از حد ROS باشد (۳۶). در حالیکه فعالیت این آنزیم در سلول‌هایی که در بازه زمانی ۲۴ تا ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار برداشت شدند، نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز احتمالاً بدلیل سنتز از نو (De-novo) پروتئین-های آنزیمی و القای بیان ژن رمزگذاری سوپراکسید دیسموتاز می‌باشد (۳۸). فعالیت سوپراکسید دیسموتاز موجب تبدیل رادیکال سوپراکسید به H_2O_2 می‌گردد، سپس H_2O_2 توسط کاتالاز در پراکسی‌زوم و آسکوربات پراکسیداز در سیتوپلاسم، میتوکندری و کلروپلاست سم-زدایی می‌گردد (۵ و ۱۶).

در گیاهچه بادام‌زمینی، متیل‌جاسمونات در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۵۰ میکرومولار باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز گردیده است (۲۵). همچنین در گیاه آرابیدوپسیس و کلزا، تیمار متیل-جاسمونات فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز را افزایش داد (۲۰). از آنجا که H_2O_2 سوبسترای کاتالاز می‌باشد، می‌توان فرض کرد که بخشی از افزایش فعالیت کاتالاز به دلیل تولید H_2O_2 در سلول‌های تیمار شده با متیل‌جاسمونات و یا فعالیت سوپراکسید دیسموتاز است. با توجه به نتایج این مطالعه، اندازه‌گیری میزان تجمع پراکسید هیدروژن در سلول‌ها نشان داد که این ترکیب تنها در سلول‌هایی که به مدت ۸ ساعت پس از تیمار متیل-جاسمونات برداشت شدند نسبت به سلول‌های شاهد افزایش معنی‌داری داشت و در سایر تیمارها در میزان پراکسید هیدروژن نسبت به سلول‌های شاهد تغییر معنی-داری مشاهده نشد. بنابراین با توجه به فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و میزان تجمع پراکسید هیدروژن می‌توان نتیجه گرفت که غلظت ۰/۱ میلی‌مولار متیل-جاسمونات به‌عنوان القا کننده عمل نموده و با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانع از رخ دادن انفجار اکسیداتیو شده است. علامت‌رسانی جاسمونات توسط یک ROS یعنی H_2O_2 وساطت می‌شود، بنابراین افزایش سطح H_2O_2 در ساعت ۸ پس از تیمار به‌عنوان یک مولکول محرک باعث فعال شدن دستگاه آنتی‌اکسیدانی، افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز و جلوگیری از انفجار اکسیداتیو شده است، ازاین‌رو تعدیل سطح H_2O_2 انجام شده است.

از طرفی ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن در تنش‌های مختلف می‌تواند باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشا شده که افزایش میزان مالونیل دی‌آلدئید به‌عنوان محصول نهایی این اکسیداسیون نشان‌دهنده تخریب و افزایش نفوذپذیری غشا سلول‌هاست. رادیکال‌های آزاد موجود در سلول باعث صدمه به لیپیدها و اسیدهای چرب غشا شده و رادیکال-های لیپید و پراکسی و هیدروپراکسی تولید می‌کنند، رادیکال‌های جدید تولید شده می‌توانند به واکنش‌های اکسیداسیون لیپیدها سرعت بخشند. مالونیل دی‌آلدئید یک محصول پراکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع نشده در فسفولیپیدها است. بنابراین مالونیل دی‌آلدئید به‌عنوان یک معرف برای بررسی صدمات غشا در شرایط تنش مورد استفاده قرار می‌گیرد و شاخص مناسبی برای پراکسیداسیون لیپید غشا محسوب می‌شود (۱۹، ۲۳ و ۳۵). Wang در سال ۱۹۹۹ گزارش کرد که در گیاه توت فرنگی، متیل-جاسمونات با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار موجب تغییر نسبت اسیدهای چرب غشا شده و در نتیجه سوبسترا برای

رادیکاهای آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی کاهش می‌یابد. متیل‌جاسمونات با بالا نگه‌داشتن سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز مانع اثر رادیکال‌های آزاد حاصل از تنش بر غشا می‌گردد (۳۹). آنزیم پراکسیداز نیز به‌عنوان گیرنده و جمع کننده پراکسیدها عمل کرده و از اثرات مخرب این مولکول‌ها می‌کاهد (۴۲). بنابراین در این مطالعه، عدم تغییر معنی‌دار میزان مالونیل دی‌آلدئید موید کارآمدی دستگاه آنتی-اکسیدانی برای مقابله با تنش اکسیداتیو در غلظت استفاده شده متیل‌جاسمونات می‌باشد.

گیاهان ترکیبات فنولی را در پاسخ به برخی ترکیبات پیام-رسان که نقش دفاعی مهمی دارند، آزاد می‌کنند. ترکیبات فنولی به خصوص فلاونوئیدها و همچنین فلاونول‌ها به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی قادر به بدام انداختن رادیکال‌های آزاد و کاهش تنش اکسیداتیو هستند (۳). این ترکیبات با مکانیسم‌های متعددی مانند پاکروبی رادیکال-های آزاد، دادن هیدروژن، خاموش کردن اکسیژن یکتایی، کلات کردن یون‌های فلزی و یا در همکاری با پراکسیدازها در جمع‌آوری یا حذف پراکسید هیدروژن، نقش آنتی-اکسیدانی خود را ایفا می‌کنند (۱۴ و ۲۴). مطالعات نشان می‌دهد که رابطه مثبتی بین محتوای فنول کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها وجود دارد (۱۸). در سلول‌های گیاهی ترکیبات فنولی به‌ویژه پلی‌فنول‌ها در کاهش سم‌زدایی پراکسید هیدروژن بسیار کارا عمل کرده و به‌عنوان سیستم پشتیبان چرخه آسکوربات- گلوتاتیون در دفع رادیکال‌های پراکسید هیدروژن شرکت می‌کنند. وقتی فنول‌ها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در این واکنش‌ها شرکت می‌کنند، به رادیکال فنوکسیل اکسید می‌شوند. رادیکال‌های فنوکسیل از طریق واکنش با آسکوربات به حالت اولیه برمی‌گردند (۳۳). در این مطالعه، افزایش ترکیبات فنولی با گذشت زمان بیانگر راهبرد سلول‌ها برای مقابله با تنش اکسیداتیو است. به‌علاوه، فلاونوئیدها یکی از گسترده‌ترین و متنوع‌ترین ترکیبات طبیعی هستند که همانند سایر ترکیبات فنولی توانایی جذب رادیکال‌های آزاد را دارند. در تنش‌های اکسیداتیو ترکیبات فنولی به‌ویژه فلاونوئیدها می‌توانند با فسفولیپیدهای غشا از طریق پیوند هیدروژنی با سرهای قطبی فسفولیپیدها ارتباط برقرار کنند، در نتیجه این ترکیبات در سطح داخل و خارج غشا جمع شده و به دلیل جلوگیری از دستیابی مولکول‌های آسیب‌رسان به ناحیه هیدروفوبی دوقطبی به حفظ سیالیت و تمامیت غشا کمک می‌کنند (۲۶). این گیاه دارای مقادیر قابل توجهی از فلاونوئیدها مثل نپترین (Nepetrin)، کوئرستین(Quercetine) و ایزورامنتین-۳- روتینوزید (Isorhamnetin-3-o-rutinoside) می‌باشد (۲۹). با توجه به وجود ترکیبات فلاونوئیدی در این گیاه می‌توان نتیجه گرفت که بخشی از اثرات حفاظتی در آن از طریق تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی و مهار تولید ROS اعمال می-گردد (۴).

کاربرد متیل‌جاسمونات مقدار ترکیبات فنولی را در برخی گیاهان نظیر سیب زمینی، سیب قرمز، مارچوبه و لوبیا سبز افزایش داد (۶). Pinot و همکارانش در سال ۱۹۹۸ بیان کردند که چالکون سنتتاز که پیش‌ساز فلاونوئیدها را تولید می‌کند توسط متیل‌جاسمونات القا می‌شود. متیل‌جاسمونات دارای نقش دوگانه در تکامل و دفاع می‌باشد. این ترکیبات می‌توانند با القای مسیرهای علامت‌رسانی باعث فعال‌شدن واکنش‌های دفاعی در گیاه شده و در نتیجه باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی گردند (۴۱). با توجه به اینکه تأثیر متیل‌جاسمونات بر سنتز ترکیبات فنولی به غلظت آن وابسته است (۲۱)، با توجه به نتایج به‌دست آمده از اندازه-گیری ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در سلول‌ها پس از تیمار با متیل‌جاسمونات، می‌توان نتیجه گرفت که این مولکول در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار باعث تحریک آبشار علامت‌رسانی در سلول شده و از این طریق باعث افزایش تولید ترکیبات فنولی مختلف می‌شود. بنابراین به نظر می رسد که متیل‌جاسمونات به‌عنوان الیسیتور سبب افزایش

قدرت سیستم آنتی‌اکسیدانی و کاهش تنش اکسیداتیو شده و سنتز این ترکیبات را افزایش داده است.

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه گیاه *S. striata* از گذشته به‌عنوان یک گیاه دارویی کاربرد داشته است و از سوی دیگر نقش ترکیبات فنولی در موارد بالینی به خوبی شناخته شده است، استفاده از متیل‌جاسمونات در غلظت مناسب می‌تواند راهکاری مؤثر برای راه‌اندازی آبشار علامت‌رسانی سلولی و افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی ارزشمند در کشت‌های سلولی در بازه زمانی کوتاه باشد و سبب افزایش کارایی درمانی آن - گردد. علاوه بر آن، افزایش ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی به دلیل افزایش توان آنتی‌اکسیدانی سلول در حفاظت سلول علیه تنش‌های اکسیداتیو نیز نقش مؤثری خواهد داشت.

منابع

۱- اردشیری لاجیمی، ع.، برزگر، م.، رضایی طاویرانی، م.، هاشمی، م.، حیدری، س.، مقدم‌نیا، ح.، کلانتری، ش. ۱۳۸۸. بررسی اثر عصاره گیاه اسکلروفولاریا استریاتا بر سلول‌های فیبروبلاست انسانی. مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی. ۱۹(۳): ۱۶۸- ۱۷۲.

۲- زمانیان عضدی، م.، اردشیری لاجیمی، ع.، رضایی طاویرانی، م.، رضایی طاویرانی، م. و خدارحمی ر. ۱۳۹۱. بررسی اثر آنتی- بیوتیکی عصاره آبی گیاه اسکروفولاریا استریاتا بر اشرشیاکلی در مقایسه با تتراسایکلین. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام. ۲۰ (۴): ۱۲۷- ۱۳۳.

۳- شرافتی چالشتری، ف.، شرافتی چالشتری، ر. و مؤمنی، م. ۱۳۸۷. اثر ضدمیکروبی عصاره آبی و اتانولی گیاه گل میمونی (*Scrophularia striata*) بر اشرشیاکلی در شرایط آزمایشگاهی. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد. ۳۲- ۳۷.

۴- ظاهری، م.، ابراهیمی وسطی کلایی، س. و چراغی، ج. ۱۳۹۰. اثر حفاظتی عصاره بخش‌های هوایی اسکروفولاریاتا در برابر نفروتوکسیسیتی ناشی از کادمیوم و جیوه در موش. مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل. ۱۳ (۴): ۴۸- ۵۳.

5- Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 50: 601- 639.

6- Basilio Heredia, J., Cisneros- Zevallos, L. 2009. The effect of exogenous ethylene and methy jasmonate on the accumulation of phenolic antioxidants in selected whole and wounded fresh produce. Food Chemistry. 115: 1500- 1508.

7- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248- 254.

8- Brown, D. C. W., and Thorpe, T. A. 1984. Organization of plant tissue culture laboratory. Pp. 1-12. In cell culture and somatic cell genetics of plants, Vol. 1. D. K. Vasil (editor). Academic Press, New York.

9- Cakmak, I., and Horst, W. J. 1991. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). Physiol. Plant. 83: 463- 468.

10- Chance, B., Maehly, A. C. 1955. Assay of catalase and peroxidase, in: L. Packer (Ed.), Methods in Enzymology, Academic Press, New York. 2: 764.

11- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., and Chern, J. C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis. 10: 178- 182.

12- Chen, B., Huang, J., Wang, J., Huang, L. 2008. Ultrasound effects on the antioxidative defense systems of *Porphyridium cruentum*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 16: 88- 92.

13- Chong, T. M., Abdullah, M. A., Fadzillah, N. M., Lai, O. M. and Lajis, N. H. 2005. Jasmonic acid elicitation of anthraquinones with some associated enzymic and non-enzymic antioxidant responses in *Morinda elliptica*. Enzyme and Microbial Technology. 36: 469- 477.

14- Chu, Y. H., Chang, C. L. and Hsu, H. F. 2000. Flavonoid content of several vegetable and their

antioxidant activity. Journal of the Science of Food and Agriculture. 80: 561-566.

15- De Vos, C. H. R., Schat, H., De Waal, M. D. A., Vooijs, R., Ernst, W. H. O. 1991. Increased resistance to copper-induced damage of the root plasma membrane in copper tolerant *Silene cucubalus*. Physiol Plant. 82: 523- 528.

16- Foyer, C. H., Lopez-Delgado, H., Dat, J. F. and Scott, I. M. 1997. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling. Physiologia Plantarum. 100: 241- 254.

17- Franco, R., Schoneveld, O., Georgakilas, G. A. 2008. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. Cancer Letters. 266: 6- 11.

18- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z., Rahmat. A. 2010. Antioxidant activities, total henolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). Molecules. 15(6): 4324- 33.

19- Jaleel, C. A., Gopi, B., Sankar, P., Manivannan, A., Kishorekumar, R. S. and Panneers, L. 2007. Studies on germination, seedling vigour, lipid peroxidation and proline metabolism in *Catharanthus roseus* seedling under salt stress. South African Journal of Botany. 73(2): 190-195.

20- Jung, S. 2004. Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. Journal of Plant physiology and Biochemistry. 42: 231-255.

21- Horbowicz, M., Chrzanowski, G., Koczkodaj, D., Mitrus, J. 2011. The effect of methyl jasmonate vapors on concentration of phenolic compounds in seedlings of commom buckwheat (*Fagopyrume sculentum* Moench). Acta Societiatis Botanicorum Poloniae. 80 (1): 5- 9.

22- Karabal, F., Yücel, M., Oktem, H. A. 2003. Antioxidant responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity. Plant Science. 164: 925- 933.

23- Katsuhara, M., Otsuka, T. and Ezaki, B. 2005. Salt stress-induced lipid peroxidation is reduced by glutathione S-transferase, but this reduction of lipid peroxides is not enough for a recovery of root growth in *Arabidopsis*. Plant Sciences. 169(2): 369- 373.

24- Kovacik, J., Backor, M., Strnad, M. and Repcak, M. 2009. Salicylic acid induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. Plant Cell Report. 28: 135-143.

25- Kumari, G. J., Reddy, A. M., Naik, S. T., Kumar, S. G., Prasanthi, J., Sriranganayakulu, G., Reddy, P. C. and Sudhakar, C. 2006. Jasmonic acid induced changes in protein pattern, antioxidative enzyme activities and peroxidase isozymes in peanut seedlings. Biologia Plantarum. 50: 219-226.

26- Michalak, A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. Polish J. of Environ. Stud. 15(4): 523- 530.

27- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R. and Van Beek, T. A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chemistry. 85: 231- 237.

28- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., Van Breusegem, F. 2011. ROS signaling: the new wave? Trends Plant Sci. 16: 300- 309

29- Monsef-Esfahani, H. R., Hajiaghaee, R., Shahverdi, A. R., Khorramizadeh, M. R. and Amini, M. 2010. Flavonoids, cinnamic acid and phenyl propanoid from aerial parts of *Scrophularia striata*. Pharmaceutical Biology. 48(3): 333- 336.

30- Pandolfini, T., Gabbrielli, R., Comparini, C. 1992. Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L.. Plant and Cell Environment. 15: 719- 725.

31- Pinot, F., Benveniste, I., Salaün, J., Durst, F. 1998. Methyl jasmonate induces lauric acid γ-hydroxylase activity and accumulation of CYP94A1 transcripts but does not affect epoxide hydrolase activities in *Vicia sativa* seedlings. Plant Physiol. 118: 1481- 1486.

32- Plazek, A., Zur, I. 2003. Cold-induced plant resistance to necrotrophic pathogens and antioxidant enzyme activities and cell membrane permeability. Plant Science. 164: 1019-1028.

33- Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, S. C. and Yamasaki, H. 2002. Plant phenolics antioxidant and pro oxidant activity: Phenolics-induced oxidative damage mediated by metal in plants. Toxicology. 177: 67- 80.

34- Sirvent, T. M., and Gibson, D. M. 2002. Induction of hypericin and hyperfolin in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. Physiol. Mol. Plant Path.60: 311- 320.

35- Sofo, A., Dichio, B., Xiloyannis, C. and Masia, A. 2004. Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondealdehyde content during rewatering in *olive* tree. Plant Sciences. 166(2): 293- 302.

36- Stroinski, A., and Kozlowska, M. 1997. Cadmium induced oxidative stress in potato tuber. Acta Sco. Bot. Pol. 66: 189- 195.

37- Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated been plants protective role of exogenous polyamines. Plant Sci. 151: 59– 66.

38- Verma, S., Dubey, R. S. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant Sci. 164: 645- 655.

39- Wang, S. Y. 1999. Methyl Jasmonate reduces water stress in strawberry. Journal of Plant Growth Regulation. 18: 127- 134.

40- Zhang, L., Xing, D. 2008. Methyl jasmonate induces production of reactive oxygen species and alterations in mitochondrial dynamics that precede photosynthetic dysfunction and subsequent cell death. Plant Cell Physiol. 49(7): 1092- 1111.

41- Zhao, J., Davis, L. C., Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnolgy Advance. 23: 283- 333.

42- Zhou, R., Li, Y., Yan, L., Xie, J. 2011. Effect of edible coatings on enzymes, cell-membrane integrity, and cell-wall constituents in relation to brittleness and firmness of Huanghua pears (*Pyrus pyrifolia* Nakai, cv. Huanghua) during storage. Food Chemistry. 124: 569- 575.

Effect of methyl jasmonate on antioxidant enzyme activities, phenolic and flavonoid compounds in *Scrophularia striata* cell culture

Khanpour- Ardestani N.[1], Sharifi M.[1] and Behmanesh M.[2]

[1] Plant Biology Dept., Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

[2] Genetics Dept., Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Effects of 0.1 mM MeJA as an elicitor on the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) and contents of phenolics and flavonoids during 4, 8, 12, 24, 48 and 72 hours in *Scrophularia striata* cell culture were studied. Decrease in SOD activity was observed during first 12- hours after 0.1 mM MeJA treatment and then its activity increased. POD activity 12 hours after treatment and activity of CAT enzyme in 0.1mM MJ treated samples significantly increased comparing with the control. To study MeJA mechanism, H_2O_2 content and lipid peroxidation were investigated. H_2O_2 content increased 8 hours after treatment with MeJA while lipid peroxidation didn't significantly change. The amount of total phenols in the control and treated cells showed a slow increase in levels of phenolic compounds and 0.1 mM MeJA significantly increased total phenolic compoundes in *S. striata* cell cultures 48 and 72 hours after treatment. Also, flavonoids content in the treated cells, 24 hours after treatment was significantly more than the first 12 hours. Increase in antioxidant capacity and phenolics and flavonoids contents after elicitation is in accordance with decrease in oxidative stress index.

Key words: Antioxidant, Flavonoids, Methyl jasmonate, Phenolic compounds, *Scrophularia striata.*