افزایش پراکسیدهیدروژن و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در سلول‌های خشخاش ایرانی تیمار شده با متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید

علی اصغر عسکری[۱]، ناصر زارع[۲*]، رسول اصغری زکریا[۳]، سعید خماری[۴]

تاریخ دریافت: ۹٤/۰۸/۱۳
تاریخ تصویب: ۹۵/۱۲/۰۸

چکیده

سالیسیلیک اسید و جاسمونات‌ها از تنظیم کننده های رشدی هستند که در مکانیسم‌های دفاعی گیاهان در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی و تولید متابولیت‌های ثانویه نقش مهمی دارند. در این تحقیق تأثیر متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر میزان پراکسیدهیدروژن، پرولین و پروتئین کل و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان مورد بررسی قرار گرفت. کشت سوسپانسیون سلولی خشخاش ایرانی در محیط MS مایع حاوی ۲,۴-D، کینتین و آسکوربیک اسید انجام گردید. سلول‌ها تحت تأثیر تیمار های متیل جاسمونات (۱۰۰ میکرومولار) و سالیسیلیک اسید (۷۵ میلی-گرم بر لیتر) قرار گرفتند و در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸ و ۱۴۴ ساعت پس از اعمال تیمار بررسی شدند. نتایج نشان داد pH محیط کشت در اثر اعمال هر دو تیمار افزایش یافت. تیمارهای محرک، زنده مانی سلولی و رشد سلول ها را نسبت به شاهد کاهش دادند و این کاهش در روز ششم بعد از اعمال تیمار بیشتر بود. مقدار پراکسیدهیدروژن در تمام دوره‌های زمانی

۱-کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
*۲- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل (نویسنده مسئول zarenasser@yahoo.com)
۳- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
٤- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

مورد ارزیابی در سلول‌های تیمار شده با متیل جاسمونات در مقایسه با سالیسیلیک اسید و شاهد بیشتر بود. مقدار پرولین و پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت. حداکثر فعالیت آنزیم کاتالاز در ۴۸ ساعت پس از تیمار سلول‌ها با سالیسیلیک اسید مشاهده شد ولی، بیشترین فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در ۱۴۴ ساعت پس از تیمار با متیل جاسمونات بدست آمد.

واژه های کلیدی: سالیسیلیک اسید، کشت سلولی، متیل جاسمونات، محرک، Papaver bracteatum.

مقدمه

بسیاری از گیاهان عالی منبع اصلی ترکیبات طبیعی بوده و به عنوان دارو، مواد شیمیایی، طعم دهنده، افزودنی-های غذایی و آفت کش استفاده می شوند (Goossens et al., 2003). خشخاش ایرانی(*Papaver bracteatum* Lindl). گیاهی دیپلوئید (14x=2=n2) و مقاوم به خشکی است. این گونه بومی آسیا بوده و در مناطق خشک و دامنه های سنگلاخی، در ارتفاعات ۲۵۰۰-۱۲۰۰ متری از سطح دریا رشد می کند. خشخاش ایرانی آلکالوئید مورفینی تبائین را تولید می کند که به صورت شیمیایی به کدئین تبدیل می شود زیرا فعالیت آنزیمی لازم برای دمتیله کردن آن به کدئین و مورفین را ندارد (Milo et al., 1987). حفاظت پایدار و بهره برداری منطقی از تنوع زیستی باید در اولویت تحقیقات برای مواد شیمیایی مشتق شده از گیاهان جدید باشد. در جستجو برای جایگزین کردن تولید ترکیبات مطلوب دارویی از گیاهان رشد کرده در طبیعت، دستاوردهای بیوتکنولوژی به ویژه کشت بافت، به عنوان یک پتانسیل برای تولید صنعتی متابولیت های گیاهی مورد استفاده قرار می گیرد. علاوه براین، امکان استفاده از کشت های سلولی گیاه برای تبدیل زیستی (Biotransformation) ترکیبات طبیعی نیز گزارش شده است (Phillipson, 1990; Ravishankar and Rao, 2004).

ترکیباتی نظیر متیل جاسمونات، مولکول های ترارسان علامتی بسیار مهمی می باشند که در مسیرهای پیا رسانی پاسخ های دفاعی علیه آسیب های مکانیکی و حمله حشرات و پاتوژن ها و همچنین القای تولید و تجمع متابولیت های ثانویه نقش مهمی را ایفا

می‌کنند (Pozo et al., 2004; Fritz et al., 2010). سالیسیلیک اسید (SA) نیز یک تنظیم کننده رشدی گیاهی از گروه ترکیبات فنلی است که نقش کلیدی در ترارسانی علامتی گیاه تحت تنش‌های زیستی و غیر زیستی ایفا می‌کند. این هورمون گیاهی در کنترل القای بیان ژن های مرتبط با بیماری زایی (PR) در طی پاسخ های دفاعی گیاه نقش مهمی داشته و در بسیاری از فرایندهای فیزولوژیکی مرتبط با رشد نمو گیاهان دارای اثرات تحریکی است (Metraux, 2001). سنتز سریع این ترکیبات چه در گیاه کامل و چه در کشت های سلولی تأیید شده و نشان داده شده که علاوه بر القای واکنش های دفاعی، به افزایش تولید متابولیت های ثانویه نیز منجر می-گردد (Zhao et al., 2005). کاربرد متیل‌جاسمونات باعث افزایش تولید مولکول های فعال اکسیژن در کشت سوسپانسیون سلول های *Taxus chinensis* شده است (Wang and Wu, 2005). Mur و همکاران (2006) نشان دادند که غلظت‌های پایین متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید در تقویت بیان ژنهای درگیر در ترارسانی علامتی متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و مرگ سلولی ریزنمونه های آرابیدوپسیس و تنباکو اثرات هم‌افزایی (Synergistic) دارند.

انواع مختلفی از تنش‌های غیرزیستی و زیستی از قبیل تنش خشکی، شوری و دمایی و حمله عوامل بیماری‌زا باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در گیاهان می‌شوند. در مواجهه با ROS ها، گیاهان مکانیسم های حفاظتی متنوعی مانند غیرآنزیمی (آسکوربات، گلوتاتیون، توکوفرول، کارتنوئید ها) و آنزیم های آنتی اکسیدان را برای حفظ غلظت ROS ها زیر سطح خسارت به کار می برند. سیستم دفاعی آنتی اکسیدان شامل آنزیم هایی نظیر سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POX) می باشد(Nazari et al., 2012; Tripathy and Oelmuller, 2012). عدم تعادل بین تولید و سمیت‌زدایی توسط سیستم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی فوق با عث تولید و تجمع بیش از حد ROS ها و در نتیجه بروز تنش اکسیداتیو و آسیب به مولکول‌های DNA، پروتئین و چربی‌ها شده و در نهایت منجر به مرگ سلول می‌شود. از طرف دیگر، ROS ها در سطوح پایین و غیر سمی به‌عنوان مولکول‌های علامتی در بسیاری از فرایندهای رشد و نموی، پاسخ‌های دفاعی گیاهان به تنش های زیستی و غیرزیستی، سازگاری به شرایط جدید و همچنین مرگ برنامه‌ریزی سلول‌ها درگیر هستند. به طوری‌که ROS ها در سلول منجر به فعال شدن مسیرهای ترارسانی علامتی اختصاصی شده که سبب تنظیم بیان ژن، تغییر در سنتز و فعالیت های پروتئین می شود و در نهایت سلول

را برای سازگاری به شرایط جدید آماده می کند. برای عملکرد ROS ها به عنوان مولکول‌های علامتی لازم است سطوح غیرسمی آن ها از طریق تعادل بین تولید ROS و سمیت زدایی آن حفظ شود(Baxter et al., 2013; Kazemi et al., 2013; Heidarvand and Maali-Amiri, 2014) . بنابراین، در این تحقیق تأثیر متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر میزان پراکسید هیدروژن و پرولین و هم چنین فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در سلول‌های خشخاش ایرانی بررسی می شود.

مواد و روش ها

۱- القای تولید کالوس و راه اندازی کشت سلولی

بذور گیاه Lindl *Papaver bracteatum* از بانک ژن مؤسسه تحقیقات مراتع و جنگل های کشور تهیه گردید. ضدعفونی بذور گیاه Lindl *P. bracteatum*.از طریق غوطه ورسازی آن ها در اتانول ۷۰ درصد و هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد انجام گرفت. بذور ضدعفونی شده پس از سه بار شستشو با آب مقطر استریل، روی محیط کشت جامد MS (Murashige and Skoog, 1962) بدون هورمون کشت شدند. پس از گذشت حدود دو هفته از کشت بذور، به منظور تولید کالوس، ریزنمونه های هیپوکوتیل و کوتیلدون تهیه و روی محیط کشت جامد MS حاوی هورمون های D-۲,٤ و کینتین به ترتیب با غلظت های ۱ و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر کشت شدند. کشت ها در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۰ درجه سانتی گراد و دوره نوری ۱٦ ساعت زیر نور فلئورسنت و شدت نوری ۱۵۰۰-۱۰۰۰ لوکس نگهداری شدند. کالوس ها هر دو هفته یکبار واکشت شدند. حدود ۱۵۰-۱۰۰ mg از توده های کالوس ترد و نرم به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت MS مایع حاوی یک میلی گرم بر لیتر D-۲,٤ ۰/۱ میلی گرم بر لیتر کینتین و ۱۵ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید منتقل شده و روی شیکر با ۱۲۰ دور در دقیقه و شرایط دمایی ۲±۲۵ درجه سانتی گراد و دوره نوری ۱٦ ساعت روشنایی لامپ فلئورسنت (شدت نور ۱۵۰۰-۱۰۰۰ لوکس) قرار داده شدند. پس از استقرار کشت سوسپانسیون، کشت ها هر دو هفته یکبار واکشت شدند.

۲-تیمار سلول ها با متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید

۱۰ روز پس از واکشت، تیمارهای ۷۵ میلی گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک و ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات به کشت‌های سوسپانسیون سلولی اعمال گردید. نمونه برداری از سلول ها در زمان های ۱۲، ۲٤، ۳٦، ٤۸ و ۱٤٤ساعت پس از اعمال تیمار انجام شد و pH محیط کشت، درصد زنده مانی، وزن خشک سلولی، مقدار پراکسید هیدروژن، پرولین و

پروتئین کل درون سلولی و فعالیت آنزیم های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز اندازه گیری شدند. با توجه به اینکه پاسخ سلول‌ها به عوامل پیرامونی تحت تاثیر مراحل رشدی و شرایط رشدی سلول‌ها قرار می‌گیرد، در این تحقیق همه کشت‌های سوسپانسیون مورد استفاده برای اعمال تیمارها از نظر خصوصیات رشدی یکسان بوده و در مرحله رشدی یکسانی قرار داشتند.

۲-۱- اندازه‌گیری pH محیط کشت

pH محیط کشت با استفاده از دستگاه pH-متر (Metrohm, Swiss) اندازه گیری شد.

۲-۲- تعیین وزن و زنده مانی سلولی

به منظور اندازه‌گیری وزن سلولی، سلول ها با استفاده از کاغذ صافی و قیف بوخنر تحت شرایط خلأ از محیط کشت جدا شده و پس از خشک شدن توزین شدند. برای اندازه گیری زنده مانی سلولی، مقادیر یکسان از سلول ها با محلول بافر فسفات سدیم یک مولار با pH=۷/۵ شستشو داده شدند. سپس محلول MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) به سلول ها اضافه شده و پس از چهار ساعت در شرایط تاریکی و دمای ۲۸ درجه سانتی گراد، MTT حذف شد و بافر SDS به سلول ها اضافه گردید. سلول ها از طریق سانتریفیوژ با ۳۵۰۰ g رسوب داده شدند و جذب نوری محلول رویی با دستگاه اسپکتروفتومتری (Smart Spec, Bio-Rad, USA) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید. درصد زنده مانی سلولی از طریق فرمول زیر محاسبه شد (Sitta, 2013).

۲-۳- اندازه گیری پراکسید هیدروژن

اندازه گیری میزان پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به روش Loreto و Velikova (۲۰۰۱) انجام گرفت. برای این منظور، ۰/۳ گرم سلول تر گیاهی در ۳ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) یک درصد هموژن گردید. سپس، نمونه ها به لوله های سانتریفیوژ منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی گراد با ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. روی ۰/۷۵ میلی لیتر از محلول شناور، ۰/۷۵ میلی لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی مولار (pH=۷) و ۱/۵ میلی لیتر یدید پتاسیم یک مولار اضافه شد. منحنی استاندارد نمونه ها در محدوده ۲ تا ۱۰ میلی مولار تهیه و جذب نوری آن ها نیز در طول موج ۳۹۰ نانومتر اندازه گیری شد و برای تعیین محتوای H_2O_2 سلولی استفاده گردید. در نهایت غلظت پراکسید هیدروژن به صورت میکرومولار در گرم وزن تر گیاهی محاسبه گردید.

۲-٤- اندازه‌گیری پرولین

اندازه‌گیری مقدار پرولین نمونه های سلولی با استفاده از روش Bates و همکاران (1973) انجام گرفت. بدین منظور ۰/۱ گرم سلول تر گیاهی در ۱۰ میلی لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳/۳% ساییده و با سرعت 4000 rpm در دمای ٤ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. به ۲ میلی لیتر از عصاره حاصل، ۲ میلی لیتر معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال خالص افزوده شد. لوله‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و سپس به آب یخ منتقل شدند. مخلوط واکنش پس از اضافه شدن ٤ میلی لیتر تولوئن به شدت ورتکس شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت، تا دو فاز آن از هم جدا شوند. فاز بالایی با دقت جدا و مقدار جذب در دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ٥۲۰ نانومتر قرائت شد. با استفاده از محلول های استاندارد و رابطه ی رگرسیون بین غلظت و مقدار جذب در ٥۲۰ نانومتر، غلظت پرولین برای هر نمونه بر حسب میکروگرم پرولین در هر گرم وزن تر گیاهی محاسبه گردید.

۲-٥- تهیه عصاره پروتئینی و سنجش فعالیت آنزیمی

برای سنجش فعالیت برخی آنزیم های آنتی اکسیدان در سلول ها، تهیه عصاره آنزیمی انجام گرفت. برای استخراج عصاره آنزیمی، ۰/٥ گرم از سلول های تر در هاون حاوی ٥ میلی لیتر بافر تریس-HCl ۰/۱ نرمال و ۱۰ درصد گلیسرول در یک بستر یخی هموژن گردیده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی گراد با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سنجش پروتئین‌های محلول با استفاده از روش Bradford (1976) انجام گرفت. برای این منظور از پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) در غلظت‌های ٥، ۱۰، ۲۰، ٤۰ و ۸۰ میلی گرم بر لیتر برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و میزان جذب نور در نمونه های استاندارد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٥۹٥ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت. معادله خط رگرسیونی با استفاده از داده های بدست آمده محاسبه و منحنی استاندارد ترسیم گردید. سپس اعداد حاصل از قرائت نمونه ها در طول موج ٥۹٥ نانومتر در معادله خط رگرسیونی قرار داده شده و سرانجام مقدار پروتئین کل نمونه ها محاسبه گردید.

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (EC ۱,۱۱,۱,٦) از روش Aebi و همکاران (1984) استفاده شد. این روش بر پایه تجزیه پراکسیدهیدروژن توسط آنزیم کاتالاز استوار است. مخلوط واکنش شامل ۳ میلی لیتر بافر فسفات ٥۰ میلی مولار، ۱۰ میکرولیتر پراکسید

هیدروژن ۱۵ میلیمولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره سلولی بود. پس از اضافه کردن عصاره سلولی، تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری (Smart Spec, Bio-Rad, USA) اندازه گیری شد. سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز (EC ۱,۱۱,۱) به روش Chance و Maehly (1955) انجام شد که بر پایه تشکیل تتراگایاکول از گایاکول در حضور پراکسید هیدروژن و گایاکول (به عنوان الکترون دهنده) استوار است. مخلوط واکنش شامل ۳ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار، ۳ میکرولیتر گایاکول ۲۰ میلی-مولار، ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره سلولی بود. پس از اضافه کردن عصاره سلولی، تغییرات جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری (Smart Spec, Bio-Rad, USA) اندازه گیری شد.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (EC ۱,۱۵,۱,۱) نیز به روش Giannopolitis و Ries (1977) اندازه-گیری شد. محلول واکنش شامل ۱۳ میلی مولار متیونین، ۷۵ میکرو مولار نیتروبلوتترازولیوم کلراید (NBT)، ۲ میکرو-مولار ریبوفلاوین، ۵۰ میلی مولار بافر فسفات و صفر تا ۵۰ میکرو لیتر عصاره سلولی بود. در این روش رادیکال‌های سوپراکسید موجب احیای نوری NBT به NBTH2 آبی رنگ در حضور نور می‌شوند. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز باعث توقف این واکنش و در نتیجه مهار تولید رنگ آبی می‌شود. واکنش با روشن کردن لامپ فلئورسنت شروع گردید. محلول واکنش به مدت ۱۰ دقیقه زیر دو لامپ فلئورسنت ۱۵ وات با ارتفاع ۲۰ سانتی متر قرار داده شد و با خاموش-کردن لامپ ها واکنش خاتمه یافت. جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر (Smart Spec, Bio-Rad, USA) اندازه گیری شد. یک واحد فعالیت SOD مقدار آنزیم لازم برای ۵۰ درصد ممانعت از احیا فتوشیمیایی نیتروبلوتترازولیوم کلراید در نظر گرفته شد.

۳-طرح آزمایشی و تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. آزمون نرمال بودن و تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزارهای SAS و SPSS انجام گرفت. برای مقایسه میانگین داده-ها از آزمون چند دامنه ای دانکن (DMRT) استفاده شد.

نتایج

رشد و زنده مانی سلول ها

بر اساس تجزیه واریانس داده ها، pH محیط کشت، وزن خشک و زنده مانی سلولی به طور معنی داری تحت تأثیر تیمار محرک، زمان پس از اعمال تیمار و اثر متقابل بین

آنها قرار گرفتند (جدول ۱). همان طوری که در جدول ۲ ملاحظه می شود، در تیمارهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید در اغلب زمان های پس از اعمال تیمار، pH محیط کشت در مقایسه با شاهد به طور معنی داری (در سطح احتمال ۱%) افزایش یافت. علاوه‌براین، با افزایش زمان نیز pH محیط کشت افزایش نشان داد. افزایش pH محیط کشت در تیمار متیل جاسمونات نسبت به اسید سالیسیلیک بیشتر بوده و بیشترین مقدار pH در ٦ روز پس از تیمار متیل‌جاسمونات مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۱: تجزیه واریانس اثر تیمارهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر شاخص های رشدی و فیزیولوژیکی کشت سوسپانسیون سلولی خشخاش ایرانی

		میانگین مربعات								
منابع تغییر	درجه آزادی	*pH*	وزن خشک	درصد زنده مانی	پراکسید هیدروژن	پرولین	پروتئین کل	کاتالاز	پراکسیداز	سوپر اکسید دیسموتاز
محرک (*A*)	۲	۴/۸**	۰/۱ **	۲۵۸۶۰/۳۳**	۷/۲۷**	۳/۳۸**	۲۹۶/۴۴**	۰/۲۷۷ **	۰/۰۰۲ **	۰/۰۲ **
زمان پس از اعمال تیمار (*B*)	۴	۳/۳**	۰/۰۰۵**	۳۳۷/۴۶**	۴/۳۱**	۰/۰۹۲**	۷۷/۸۶**	۰/۰۰۲ **	۰/۰۰۰۸**	۰/۰۰۲**
A×*B*	۸	۰/۲۴**	۰/۰۰۴**	۴۲۲/۹۸**	۱/۰۹**	۰/۰۰۷**	۵/۶۸**	۰/۰۰۰۵**	۰/۰۰۰۲**	۰/۰۰۰۳**
خطا	۳۰	۰/۰۰۴	۰/۰۰۰۲	۱/۴۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۱	۰/۱۷	۰/۰۰۰۰۰۵	۰/۰۰۰۰۰۴	۰/۰۰۰۰۲
ضریب تغییرات٪		۱/۳۲	۴/۵۴	۲/۶۱	۲/۷	۱/۹۵	۵/۱۴	۱/۱۹	۱۰/۰۶	۶/۹۴

^{ns}، * و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد

جدول ۲: تأثیر تیمار متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر pH محیط کشت و رشد سوسپانسیون سلولی خشخاش ایرانی

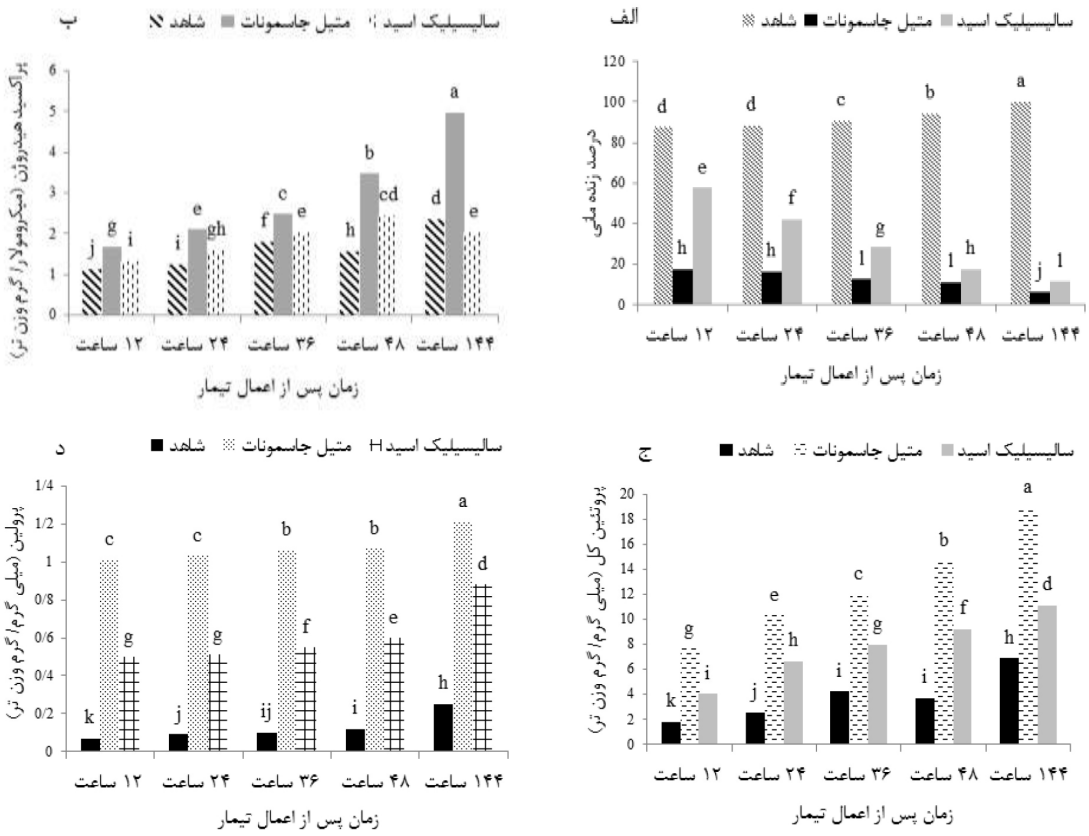
تیمار محرک	زمان پس از اعمال تیمار (ساعت)	*pH* محیط کشت	وزن خشک (میلی‌گرم)
شاهد	۱۲	۳/۱۶^{l}	۰/۳۵۳^{d}
شاهد	۲۴	۳/۷۶^{k}	۰/۳۶^{cd}
شاهد	۳۶	۴/۲۴^{i}	۰/۳۷^{bc}
شاهد	۴۸	۴/۷۲^{g}	۰/۳۹^{ab}
شاهد	۱۴۴	۵/۵۳^{b}	۰/۴۰۱^{a}
متیل جاسمونات	۱۲	۵/۰۵^{e}	۰/۲۷^{f}
متیل جاسمونات	۲۴	۵/۱۰۶^{e}	۰/۲۴۳^{hi}
متیل جاسمونات	۳۶	۵/۲۹^{d}	۰/۲۲۳^{ij}

متیل جاسمونات	۴۸	۵/۴۴^{bc}	۰/۲^{k}
متیل جاسمونات	۱۴۴	۶/۰۳^{a}	۰/۱۳^{l}
سالیسیلیک اسید	۱۲	۴/۰۸^{j}	۰/۳۱^{e}
سالیسیلیک اسید	۲۴	۴/۲۱^{i}	۰/۲۸۸^{f}
سالیسیلیک اسید	۳۶	۴/۴۸^{h}	۰/۲۶۷^{fg}
سالیسیلیک اسید	۴۸	۴/۸۹^{f}	۰/۲۴۶^{gh}
سالیسیلیک اسید	۱۴۴	۵/۳۸^{cd}	۰/۲۱^{jk}

تیمارهای محرک، زنده مانی سلولی و رشد سلول ها (وزن خشک سلولی) را نسبت به شاهد به طور معنی داری (در سطح احتمال ۱%) کاهش دادند. علاوه براین، کاهش زنده‌مانی و وزن خشک سلولی در تیمار متیل جاسمونات در مقایسه با تیمار سالیسیلیک اسید شدیدتر بود. به طوری که، کمترین وزن خشک سلولی در روز ششم بعد از اعمال تیمار متیل جاسمونات مشاهده شد (شکل ۱- الف و جدول ۲). در تیمار شاهد با افزایش زمان، درصد زنده مانی و وزن خشک سلولی بیشتر شده ولی در تیمارهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید (با افزایش زمان اعمال تیمار) کاهش یافته است. به نظر می رسد اعمال تیمارهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید سبب کاهش زنده مانی و تقسیم سلولی گردیده و در نتیجه، با وقوع پدیده مرگ سلولی، کاهش وزن سلولی اتفاق افتاده است.

میزان پراکسیدهیدروژن (H_2O_2)

اثر تیمارهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید روی میزان پراکسیدهیدروژن معنی داری بود (جدول ۱). بیشترین میزان پراکسیدهیدروژن در همه زمان‌های پس از اعمال تیمار، در تیمار متیل جاسمونات با میانگین ٤/٩٨ میکرومولار در گرم وزن تر مشاهده شد که به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد با میانگین ۲/۳۷ و سالیسیلیک اسید با میانگین ۲/۰٤ است. در تیمار سالیسیلیک اسید نیز مقدار پراکسیدهیدروژن در همه زمان‌های پس از اعمال تیمار (به غیر از روز ششم پس از اعمال تیمار) در مقایسه با تیمار شاهد به طور معنی‌داری بیشتر بود (شکل ۱- ب). در همه تیمارها، با افزایش زمان میزان H_2O_2 افزایش یافت. بر طبق نتایج تحقیق، به نظر می رسد که تولید بیشتر پراکسیدهیدروژن در تیمار متیل جاسمونات نسبت به سایر تیمارها باعث کاهش بیشتر زنده مانی سلول ها در این تیمار شده است.



شکل ۱: تأثیر متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر زنده مانی سلولی (الف)، میزان پراکسید هیدروژن (ب)، پروتئین کل (ج) و پرولین سلولی (د) در سلول‌های خشخاش ایرانی

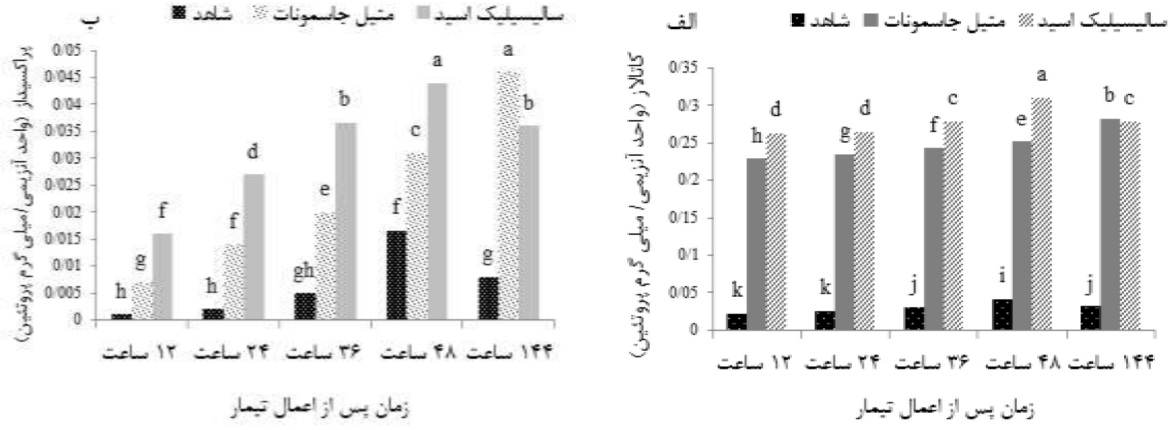
مقدار پروتئین کل سلولی و پرولین

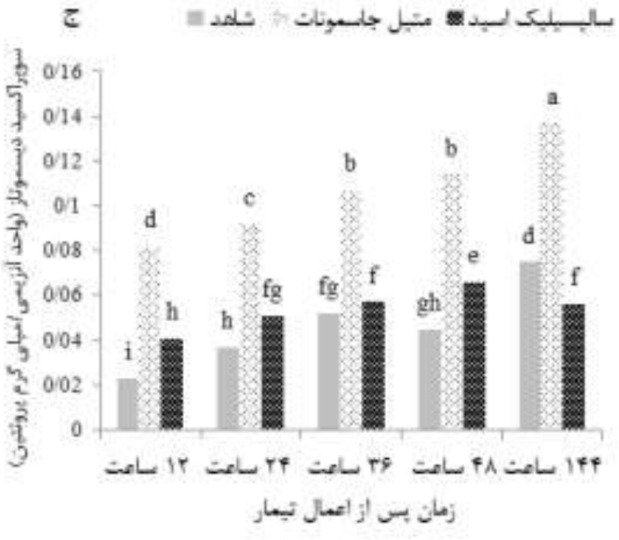
بر اساس جدول تجزیه واریانس، بین تیمارهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید از نظر مقدار پروتئین کل و پرولین درون سلولی اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۱% وجود داشت (جدول ۱). اعمال تیمارهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید باعث افزایش معنی دار (در سطح احتمال ۵%) مقدار پروتئین کل و پرولین درون سلولی نسبت به سلول های شاهد شد. با افزایش زمان پس از اعمال تیمار نیز مقدار پرولین و پروتئین کل درون سلولی افزایش نشان داد. علاوه براین، مقدار پروتئین کل و پرولین در تیمار متیل جاسمونات در تمام بازه های زمانی بیشتر از تیمار سالیسیلیک اسید بود (شکل ۱- ج و د).

فعالیت آنزیم های آنتی‌اکسیدان

بر اساس تجزیه واریانس داده ها، تیمار های محرک، زمان های بعد از اعمال تیمار

و اثر متقابل بین آن ها به طور معنی داری فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز را در سطح احتمال ۱% تحت تأثیر قرار دادند (جدول ۱). فعالیت هرسه آنزیم در اثر تیمار متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید در مقایسه با شاهد افزایش یافت. با این‌حال، افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در سلول‌های تیمار شده با سالیسیلیک اسید بیشتر از متیل جاسمونات بود، ولی فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در سلول‌های تیمار شده با متیل‌جاسمونات بیشتر از سالیسیلیک اسید افزایش نشان داد (شکل ۲- الف، ب و ج). حداکثر فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار سالیسیلیک اسید، ٤٨ ساعت پس از اعمال تیمار و سپس در متیل جاسمونات، شش روز پس از اعمال تیمار بدست آمد (شکل ۲- الف). فعالیت آنزیم پراکسیداز در اثر اعمال تیمارهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید با افزایش زمان پس از اعمال تیمار در مقایسه با شاهد افزایش چشمگیری داشته و بیشترین فعالیت این آنزیم در در روز ششم پس از اعمال متیل جاسمونات مشاهده شد. تیمار سالیسیلیک اسید نیز در مقایسه با شاهد سبب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز شده و بیشترین فعالیت آن ٤٨ ساعت پس از اعمال تیمار مشاهده شده است (شکل ۲- ب). تیمارهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید در اکثر بازه های زمانی نسبت به سلول های شاهد سبب افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز شدند. تیمار متیل جاسمونات (با میانگین ۰/۱۳۷) در مقایسه با سالیسیلیک اسید (با میانگین ۰/۰٦٦) با افزایش بازه های زمانی تأثیر بیشتری بر فعالیت این آنزیم داشت. به طوری که در روز ششم پس از اعمال تیمار بیشترین فعالیت این آنزیم مشاهده گردید (شکل ۲- ج).





شکل ۲: تأثیر تیمار های متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر آنزیم های کاتالاز (الف)، پراکسیداز (ب) و سوپراکسیددیسموتاز (ج) در کشت سوسپانسیون سلولی خشخاش ایرانی

بحث

pH محیط کشت در تیمارهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید نسبت به شاهد بیشتر بوده و با گذشت زمان افزیش یافته است (جدول ۲). شیب پروتونی برای بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند جذب یون، انتقال املاح و رشد دیواره سلولی اهمیت دارد (Sanders and Bethke, 2000). تغییرات گذرا در غلظت های درون و برون سلولی H+ ناشی از دپولاریزاسیون یا هیپرپولاریزاسیون غشای سلولی در پاسخ به تغییرات محیطی می باشد (Johannes, 2001). تنش های ناشی از قلیایی شدن محیط کشت می تواند به عنوان یک روش مهم برای شناسایی واکنش های سریع مرتبط با تنش های پیام رسانی علامتی استفاده شود (Schaller and Oecking, 1999). زیرا، متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید مولکول های ترارسان علامتی می باشند که در سلول‌های گیاهی تولید شده و نقش بسیار مهمی در پاسخ های دفاعی گیاه و در نتیجه تولید و انباشت متابولیت های ثانویه ایفا می کنند که تولید و ترشح برخی از متابولیت‌های ثانویه می‌تواند منجر به تغییر در pH محیط کشت سلولی گردد (Pozo et al., 2004; Zhao et al., 2005). علاوه‌براین، pH محیط کشت در تیمارهای متیل جاسمونات در مقیسه با تیمار سالیسیلیک اسید بیشتر بوده (جدول ۲) که این اختلاف را می‌توان به اسیدی بودن سالیسیلک اسد نسبت داد.

در تحقیق حاضر، اعمال تیمارهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید سبب کاهش

زنده مانی (شکل ۱- الف) و تقسیم سلولی خشخاش ایرانی شده و در نتیجه، با وقوع پدیده مرگ سلولی، کاهش وزن سلولی (جدول ۲) اتفاق افتاده است. Swiatek و همکاران (۲۰۰٤) نشان داده‌اند که جاسمونیک اسید در غلظت های ۱۰۰ میکرومولار رشد سلولی، تقسیم میتوز و همانند سازی DNA را در کالوس توتون مهار کرده و سلول ها را در مرحله 1G متوقف می کند. هم چنین، در بررسی تأثیر متیل جاسمونات، امواج فراصوت و دی بوتیل فتالات در کشت سوسپانسیون سلولی فندق مشخص شد که در حالت انفرادی متیل جاسمونات بیشترین تأثیر بر روی کاهش زنده مانی سلول ها را داشته است (Rezaei et al., 2011). نشان داده شده که سالیسیلیک اسید مانع انتقال الکترون در میتوکندری شده و در نهایت منجر به کاهش تولید ATP می شود (Xie and Chen, 1999). کاهش سطح ATP در تیمار سالیسیلیک اسید با افزایش ROS هایی نظیر پراکسید هیدروژن نیز مرتبط است (Rezaei et al., 2013). مسیرهای علامت دهی سالیسیلیک اسید در سیستم دفاعی گیاهان در دو دهه گذشته به طور گسترده ای مورد بررسی قرار گرفته، اما مطالعات در مورد نقش آن در متابولیسم ثانویه محدود است (Zhang et al., 2013). در بررسی تأثیر سالیسیلیک اسید بر القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی در کلون سلول های سرطانی بیان کردند که غلظت ۱۰ میکرومولار از سالیسیلیک اسید باعث افزایش ٤ برابری غلظت پراکسیدهیدروژن شده که ممکن است به این دلیل باشد که سالیسیلیک اسید می تواند منجر به کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز به عنوان تجزیه کننده پراکسیدهیدروژن باشد (Zitta et al., 2012).

در تحقیق حاضر در سلول‌های خشخاش ایرانی نیز میزان پراکسیدهیدروژن در اثر تیمار با متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید به طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد افزایش یافته است. علاوه‌براین، تولید و تجمع پراکسیدهیدروژن در سلول‌های تیمار شده با متیل‌جاسمونات نسبت به سالیسیلیک اسید بیشتر بود (شکل ۱- ب). Hao و همکاران (2014) در بررسی تأثیر سالیسیلیک اسید بر تجمع رزمارینیک اسید در کشت سوسپانسیون سلولی *Salvia miltiorrhiza* گزارش کردند که مقدار پراکسیدهیدروژن از شروع اعمال تیمار افزایش یافته و بعد از دوره زمانی ۲ ساعت پس از اعمال تیمار مقدار آن کاهش یافته است. گونه های ROS از جمله پراکسیدهیدروژن از عوامل مهم در تنش اکسیداتیو بوده که به طور قابل توجهی رشد سلول و متابولیسم ثانویه را تحت تأثیر قرار می دهد. گزارش شده است که متیل جاسمونات سبب افزایش تولید پراکسید هیدروژن در کشت های تعلیقی سرخدار می شود (Wang and Wu, 2005).

پدیده تجمع پرولین تحت تنش های آبی (Hare et al., 1998)، شوری (Munns, 2005) دمای پایین (Naidu et al., 1991)، فلزات سنگین (Bassi and Sharma, 1993) و غیره شناخته شده است. علاوه بر نقش پرولین به عنوان اسمولیت در تنظیم اسمزی، در پایداری ساختارهای زیرسلولی (غشاها و پروتئین ها)، جاروب کننده ترکیبات آزاد رادیکالی عمل می کند (Ashraf and Foolad, 2007). در تحقیق حاضر نیز میزان پرولین و پروتئین کل در سلول‌های خشخاش ایرانی تیمار شده با سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. جاسمونیک اسید و متیل‌جاسمونات نیز مولکول‌های پیام‌رسان مهمی هستند که در بیان ژن و پاسخ گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش ایفا می‌کنند (Sudha and Ravishankar, 2002). تیمار نوک ساقه موز با متیل جاسمونات باعث افزایش تجمع پرولین می گردد که ممکن است یک استراتژی تطبیق گیاه تحت شرایط تنش باشد (Abdelgawad et Mahmoodal ., 2014). و همکاران (2012) در بررسی اثر تیمار متیل جاسمونات در گیاه سویا تحت تنش خشکی اعلام کردند که مقدار پرولین در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش یافته و افزایش مقدار پرولین سبب افزایش تحمل به تنش آبی شده است. Chao و همکاران (2008) در بررسی تیمارهای متیل جاسمونات و عصاره مخمر بر روی کشت سوسپانسیون *Eschscholtzia californica* بیان کردند که متیل –جاسمونات و عصاره مخمر مسیرهای پیام رسانی علامتی مختلفی را تحریک کرده و این مسیرها سبب افزایش محصولات متابولیکی و بیان پروتئین در سلول‌های *E. californica* شده است. Tan و همکاران (2008) گزارش کردند که استفاده از تیمارهای سالیسیلیک اسید در گیاه گندم سبب افزایش مقدار پرولین و محتوی قند شده است. علاوه براین، Mauch و همکاران (2001) گزارش کردند که سالیسیلیک اسید مرگ برنامه ریزی شده سلولی را کنترل می کند.

گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در مسیرهای انتقال پیام در سلول نقش داشته ولی تجمع بیش از حد آن باعث اختلال در فرایندهای فیزیولوژیکی و متابولیکی سلول شده و در نهایت باعث مرگ سلولی می‌شود (Gill and Tuteja, 2010). فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز در سلول‌های خشخاش ایرانی تیمار شده با متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید نسبت به سلول‌های شاهد (بدون تیمار) افزایش یافته است (شکل‌های ۳- الف، ب و ج). این افزایش در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان منجر به کاهش تجمع ROS ها و در نتیجه محافظت سلول‌ها در برابر تنش اکسیداتیو

می‌شود. Nafie و همکاران (2011) با بکارگیری جاسمونیک اسید در کشت سوسپانسیون خربزه بیان کردند که فعالیت آنزیم پراکسیداز در اثر اعمال تیمار افزایش یافته است. Gill و Tuteja (2010) بیان کردند که آنزیم سوپراکسیددیسموتاز رادیکال های آزاد تولید شده را به پراکسیدهیدروژن تبدیل کرده و سپس آنزیم های آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در کلروپلاست پراکسیدهیدروژن را به آب تبدیل می کنند. Saisavoey و همکاران (2014) در بررسی اثر متیل جاسمونات بر فعالیت های آنزیمی و تجمع ایزوفلاونوئید در کشت سوسپانسیون *Pueraria mirifica* بیان کرد، غلظت یک میکروگرم بر میلی لیتر متیل جاسمونات سبب افزایش ٥٦ درصدی فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز شش روز پس از اعمال تیمار می شود و غلظت های بالای یک میکروگرم بر میلی لیتر نیز سبب تنش های اکسیداتیو و تولید و تجمع ROS ها می شوند. Norastehnia و Asghari (2006) بیان کردند که متیل جاسمونات در تنش های اکسیداتیو از طریق افزایش فعالیت کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز نقش مهمی در مسیرهای ترارسانی علامتی دارند. به گفته ایشان، مسیرهای ترارسانی علامتی توسط متیل جاسمونات در ۵۰ میکرومولار شروع و در غلظت های بالای ۱۰۰ میکرومولار مهار می شود. Dong و همکاران (2010) در بررسی تأثیر سالیسیلیک اسید بر کشت های سلولی *Salvia miltiorrhiza* بیان کردند که در تیمار سالیسیلیک اسید فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز به سرعت افزایش می یابد که نشان دهنده عکس العمل سلول ها برای محافظت در برابر تنش های احتمالی وارده به آن از طریق تحریک سیستم های آنتی اکسیدانی است.

نتیجه گیری

در این تحقیق تأثیر متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر میزان پراکسیدهیدروژن، پرولین و پروتئین کل و فعالیت آنزیم-های آنتی اکسیدان مورد بررسی قرار گرفت. مقدار پراکسیدهیدروژن در تیمار متیل جاسمونات در مقایسه با تیمارهای سالیسیلیک اسید و نمونه های شاهد بیشتر بود و با افزایش زمان پس از اعمال تیمار میزان آن نیز افزایش یافت. در سلول‌های خشخاش ایرانی تیمارشده با متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک میزان پرولین و هم چنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان افزایش یافته و در محافظت سلول در برابر تنش‌اکسیداتیو ناشی از تولید و تجمع ROS ها نقش ایفا می‌کنند. حداکثر فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار سالیسیلیک اسید، ٤٨ ساعت پس از اعمال تیمار مشاهده شد. فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در سلول‌های تیمار شده با متیل جاسمونات در مقایسه با سالیسیلیک اسید افزایش بیشتری نشان داد.

منابع

Abdelgawad, Z.A., Khalafaallah, A.A. and Abdallah, M.M. (2014) Impact of methyl jasmonate on antioxidant activity and some biochemical aspects of maize plant grown under water stress condition. Agricultural Sciences 5: 1077-1088.

Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. Methods in Enzymology 105: 121-126.

Ashraf, M. and Foolad, M.R. (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany 59: 206-216.

Bassi, R. and Sharma, S.S. (1993) Changes in proline content accompanying the uptake of zinc and copper minor. Annals of Botany 72:151-154.

Bates, L.S., Waldren, R.P., and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline in water-stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.

Baxter, A., Mittler, R., and Suzuki, N. (2014) ROS as key players in plant stress signaling. Journal of Experimental Botany 65: 1229-1240.

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

Chance, B. and Maehly, A.C. (1955) Assay of catalases and peroxidases. Methods in Enzymology 11: 764-755.

Chao, H.Y., Rhee, H.S., Yoon, S.Y. and Park, J.M. (2008) Differential induction of protein expression and benzophenanthridine alkaloid accumulation in *Eschscholtzia californica* suspension culture by methyl jasmonate and yeast extract. Journal of Microbiology and Biotechnology 18(2): 255-262.

Dong, J., Wan, G., and Liang, Z. (2010) Accumulation of salicylic acid induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. Journal of Biotechnology 148: 99-104.

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

Fritz, V.A., Justen, V.L., Bode, A.M., Schuster, T. and Wang, M. (2010) Glucosinolate enhancement in cabbage induced by jasmonic acid application. HortScience 45: 1188-1191.

Giannopolitis, C.N. and Ries, S.K. (1977) Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. Plant Physiology 59: 309-314.

Gill,S. S., and Tuteja, N. (2010). Reactive Oxygen Species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology Biochemistry 48: 909-930.

Goossens, A., Hakkinen, S., Laakso, I., Seppanen-Laakso, T., Biondi, S., De sutter, V., Lammertyn, F., Nuutila, A., Soderlund, H. and Zabeau, M. (2003) A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) 100: 8595-8600.

Hare, PD., Cress, W.A. and Van Staden, J. (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. Plant, Cell and Environment 21: 535-553.

Heidarvand, L. and Maali-Amiri, R. (2013) Physio-biochemical and proteome analysis of chickpea in early phases of cold stress. Journal of Plant Physiology 170(5): 459-69.

Johannes, E., Collings, D.A., Rink, J.C. and Allen, N.S. (2001) Cytoplasmic pH dynamics in maize pulvinal cells induced by gravity vector changes. Plant Physiology 127:119-130.

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

Kazemi Shahandashti, S.S., Maali Amiri, R. and Zeinali, H. (2013) Change in membrane fatty acid compositions and cold-induced responses in chickpea. Molecular Biology Reports 40(2): 893-903.

Loreto, F. and Velikova, V. (2001) Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. Plant Physiology 127: 1781-

1787.

Mahmood, M., Bidabadi, S.S., Ghobadi, C. and Gray, D.J. (2012) Effect of methyl jasmonate treatments on alleviation of polyethylene glycol-mediated water stress in banana shoot tip cultures. Plant Growth Regulation 68: 161-169.

Mauch, F., Mauch-Mani, B., Gaille, C., Kull, B., Haas, D., and Reimmann, C. (2001) Manipulation of salicylate content in *Arabidopsis thaliana* by the expression of an engineered bacterial salicylate synthase. The Plant Journal 25: 67-77.

Metraux, J. P. (2001) Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. Eurpean Journal of Plant Pathology 107: 13-18.

Milo, J., Alvy, A., Palevitch, D. and Ladizinsky, G. (1987) Thebaine content and yield in induced tetraploid and triploid plants of papaver bracteatum Lindl. Euphytica 36: 361-367.

Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. The New Phytologist 167: 645-663.

Mur, L.A., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O. and Wasternack, C. (2006) The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. Plant Physiology 140: 249–262.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum Journal 15: 473-497.

Nafie, E., Hathout, T. and Al Mokadem, A. (2011) Jasmonic acid elicits oxidative defense and detoxification systems in *Cucumis melo* L. cells. Brazilian Journal of Plant Physiology 23(2): 161-174.

Naidu, B.P., Paleg, L.G., Aspinall, D., Jennings, A.C. and Jones, G.P. (1991) Amino acid and glycine betaine accumulation in coldstressed wheat seedlings. Phytochemistry 30: 407-409.

Nazari, M.R., Habibpour Mehraban, F. and Maali Amiri, R. (2012) Change in antioxidant responses against oxidative damage in black chickpea following cold acclimation. Russian Journal of Plant Physiology 59(2): 183-89.

Norastehnia, A. and Nojavan-Asghari, M. (2006) Effect of methyl jasmonate on the

enzymatic antioxidant defense system in maize seedling subjected to paraquat. Asian Journal of Plant Sciences 5: 17-23.

Phillipson, J. D. 1990. Plants as source of valuable products. Pp: 1-21. in: B. V. Charlwood and M. J. C. Rhodes (eds). Secondary Products from Plant tissue culture. Oxford, Clarendon Press.

Polle. A. (2001) Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate peroxidase-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. Plant Physiology 126(1): 445-62.

Pozo, M. J., Van Loon, L.C. and Pieterse, C.M.J. (2004) Jasmonates-signals in plantmicrobe interactions. Plant Growth Regulation 23: 211-222.

Ravishankar, G. A. and Rao, S. R. (2004) Biotechnological production of phyto-pharmaceuticals. The Journal of Biochemistry Molecular Biology & Biophysics 4: 73-102.

Rezaei, A., Ghanati, F., and Behmanesh, M. (2011) Increased taxol production and release by methyl jasmonate, ultrasound, and dibutyl phthalate in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cell culture. Iranian Journal of Plant Biology 7: 55-72.

Rezaei, A., Ghanati, F., Behmanesh, M., Safari, M. and Sharafi. M. (2013) Synergistic accumulative effect of salicylic acid and dibutyl phthalate on paclitaxel production in *Corylus avellana* cell culture. Journal of Stress Physiology and Biochemistry 9: 157-168.

Saisavoey, T., Thongchul, N., Sangvanich, P. and Aphichart, K. (2014) Effect of methyl jasmonate on isoflavonoid accumulation and antioxidant enzymes in *Pueraria mirifica* cell suspension culture. Journal of Medicinal Plant Research 8(9): 401-407.

Sanders, D. and Bethke, P. (2000) Membrane transport. Pp: 110-158. in: B.B. Buchanan., W. Gruissem and R.L. Jones (eds). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists.

Schaller, A. and Oecking, C. (1999) Modulation of plasma membrane H+-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. The Plant Cell 11: 263–272.

Sitta Sittampalam, G. (2013) Assay Guidance Manual. in: Riss. T.L., Moravec. R.A., Niles. A.L., Benink. H.A., Worzella. T.L., Minor. L., Storts D., and Reid. Y., Cell Viability Assays. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

Sudha, G. and Ravishankar, G.A. (2002) Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. Plant Cell Tissue and Organ Culture 71: 181-212.

Swiatek, A., Van Dongen, W., Esmans, E. L. and Van Onckelen, H. A. (2004) Metabolic fate of jasmonates in tobacco Bright Yellow-2 cells. Plant Physiology 135: 161-172.

Tan, J., Zhao, H., Hong, J., Han, Y., Li, H. and Zhao, W. (2008) Effects of exogenous nitric oxide on photo_ synthesis, antioxidant capacity and proline accumu_lation in wheat seedlings subjected to osmotic stress. World Journal of Agricultural Sciences 4: 307-313.

Tripathy, B.C. and Oelmuller, R. (2012) Reactive oxygen species generation and signaling in plants. Plant Signaling and Behavior 7: 1621-1633.

Wang, J.W, and Wu, J.Y. (2005) Nitric oxide is involved in methyl jasmonate-induced defense responses and secondary metabolism activities of *Taxus* cells. Plant and Cell Physiology 46(6): 923-30.

Hao, W., Guo, H., Zhang, J., Hu, G., Yao, Y. and Dong, J. (2014) Hydrogen peroxide is involved in salicylic acid-Elicited rosmarinic acid production in Salvia miltiorrhiza cell cultures. The Scientific World Journal, Article ID 843764.

Xie, Z. and Chen, Z. (1999) Salicylic acid induces rapid inhibition of mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation in tobacco cells. Plant Physiology 120: 217-226.

Zhang, L., and 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 and Cell Physiology 49(7): 1092- 1111.

Zhang, R.Q., Zhu, H.H., Zhao, H.Q and Yao, Q. (2013) Arbuscular mycorrhizal fungal inoculation increases phenolic synthesis in clover roots via hydrogen peroxide, salicylic acid and nitric oxide signaling pathways. Journal of Plant Physiology 170: 74-79.

Zhao, J., Lawrence, C.D. and Verpoorte, R. (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances 23: 283-233.

Zitta, K., Meybohm, P. and Bein. B. (2012) Salicylic acid induces apoptosis in colon carcinoma cells grown in-vitro: influence of oxygen and salicylic acid concentration. Experimental Cell Research 318: 828-834.