

بررسی توان زیستی و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در کشت سلولی گیاه پریش (*Catharanthus roseus* L.) تحت تأثیر غلظت‌های مختلف سدیم نیتروپروساید

راضیه اهار، محمدحسین آبنوسی*، مجید مهدیه و محمدرضا امیرجانی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۸/۰۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۳/۱۸)

چکیده:

ملکول NO (نیتریک اکسید) دارای خاصیت انتقال پیام در گیاه می‌باشد، لذا اثر نیتروپروساید به عنوان عامل تولید کننده این ملکول بر توانایی زیستی در کشت سلولی، پراکسیداسیون سلولی و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز در کالوس گیاه پریش مورد بررسی قرار گرفت تا تأثیر NO بر قرایندهای حیاتی این گیاه ارزیابی شود. از کالوس گیاه پریش سوسپانسیون سلولی تهیه و پس از تیمار با غلظت ۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌مول از سدیم نیتروپروساید به مدت ۱، ۳، ۶ روز، توانایی حیات توسط رنگ آمیزی تریپان بلو و رنگ سنجی MTT بررسی شد. علاوه بر توانای حیات از سوسپانسیون سلولی برای بررسی مرفولوژی و از بافت کالوس برای بررسی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداسیون لیپیدی بعد از تیمار با ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار به مدت شش روز قرار گرفتند. داده‌ها توسط ANOVA یک طرفه و تست دانکن آنالیز و $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد. مقایسه داده‌های تریپان بلو و MTT نشان دهنده تفاوت معنی دار ($p < 0.05$) میانگین توانایی زیستی این سلول‌ها به صورت وابسته به غلظت غلظت در مقایسه با کنترل بود. از نظر مرفولوژی سدیم نیتروپروساید باعث تغییر فرم هندسی و اندازه هسته سلول و آشفستگی در کروماتین شد. همچنین سیتوپلاسم نیز دچار تغییرات مورفولوژیک بارزی از قبیل چروکیدگی و تغییر در حاشیه سیتوپلاسم سلول تیمار شده نسبت به گروه کنترل شد. از طرفی نیز فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه در پاسخ به تنش اکسیداتیوی افزایش معنی دار ($p < 0.05$) نشان داد. میزان مالون دی آلدئید به عنوان محصول پراکسیداسیون لیپید نیز با افزایش معنی دار همراه بود. سدیم نیتروپروساید به عنوان دهنده NO می‌تواند منجر به آسیب غشا سلولی و در نتیجه کاهش توانایی زیستی سلول‌های کالوس گیاه پریش گردد، اگرچه فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی به دنبال تنش ایجاد شده افزایش یافت اما پاسخگوی نیاز گیاه برای جبران آسیب‌های وارده نبود.

واژه‌های کلیدی: کالوس پریش، توانایی زیستی، آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، پراکسیداسیون لیپیدی، نیتریک اکسید.

مقدمه:

ضد قارچی، ضد دیابت، ضد سرطان و ضد ویروس می‌باشد

(Starling, 1976). لذا از اهمیت اقتصادی ویژه‌ای نیز برخوردار است. آلودگی‌های هوا و دیگر تنش‌های محیطی که گیاهان با آنها مواجه هستند، منجر به تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن

گیاه پریش یک گیاه دارویی مهم است که حاوی ۱۳۰ نوع آلکالوئید و همچنین ترکیبات فنلی بوده (Kokate and Purohit, 2007) و دارای فعالیت ضد میکروبی،

تولید کاتاراتین شده است (Xu et al., 2004). همچنین گزارش شده است که غلظت ۴۰ میکرومولار به مدت ۴ هفته باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پروکسیداز و افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز در کالوس گیاه سیب زمینی شده است (Xu et al., 2009).

با توجه به عملکرد NO در انتقال پیام داخل سلولی و عملکرد اکسیداتیو آن، در این پژوهش گیاه پرپوش در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) تحت تأثیر سدیم نیتروپروساید (SNP) به عنوان عامل تولیدکننده رادیکال آزاد NO قرار گرفت تا با بررسی توانایی زیستی در کشت سلولی و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در کالوس این گیاه میزان تأثیر پذیری و پاسخ سلولی به تیمار خارجی مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها:

تهیه مواد گیاهی و محیط کشت: بذر رقم صورتی پرپوش (*Catharanthus roseus*) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. بذرهای استریل شده به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر خیسانده و سپس در گلدان‌های حاوی پرلیت با فاصله مناسب کاشته شدند. گلدان‌ها با محلول هوگلند ۱/۲ آبیاری و در اتاق کشت با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور ۱۶۰۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. دمای محیط در روز 28 ± 2 درجه سانتیگراد و در شب 25 ± 2 درجه سانتیگراد و رطوبت محیط بین ۳۰ تا ۴۰٪ حفظ شد. بعد از شش هفته برگ‌ها از قسمت رأسی گیاه، به عنوان ریز نمونه جدا و ریز نمونه‌ها برای ضد عفونی سطحی، در زیر هود درون محلول هیپوکلرید سدیم ۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند، سپس چندین مرتبه با آب مقطر اتوکلاو شده شستشو و به مدت ۱۰ دقیقه در اتانول ۷۰٪ نیز قرار گرفتند. مجدد قطعات چندین مرتبه با آب اتوکلاو شده شستشو و سپس قطعات به طول ۵/۱-۱ سانتی‌متر بر روی محیط کشت MS حاوی ساکارز با غلظت ۳۰ گرم در لیتر به عنوان منبع کربن، ویتامین‌ها شامل تیامین (با غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر)، پیرودوکسین (با غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر) نیکوتین (با غلظت ۰/۵ میلی

(ROS) می‌شوند که برای سیستم‌های غشایی و ماکرومولکول‌های بیولوژیکی سمی می‌باشند (Liu et al., 2006; Winner et al., 1985; Willekens et al., 1994). ROS باعث آسیب به پروتئین‌ها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و DNA شده و نهایتاً منجر به تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود (Gill and Tuteja 2010). در میان ترکیبات شیمیایی نیتریک اکسید (NO) گاز کوچک لیپوفیل، نسبتاً ناپایدار با قدرت انتشار بالا، و یک مولکول فعال زیستی است که در همه جا حضور دارد (Hayat et al., 2010) در سیستم زیستی رادیکال NO به طور سریع با اکسیژن اتمسفر، آنیون سوپراکسید (O_2^-)، و فلزات انتقالی واکنش می‌دهد. واکنش NO با O_2 منجر به تولید ترکیب NOx (شامل NO_2 و N_2O_3 و N_2O_4) می‌شود که می‌تواند با گروه‌های آمین، تیول یا هیدروکسیل برای تشکیل متابولیت‌های نهایی نیتريت (NO_2^-) و نیترات (NO_3^-) واکنش دهد (Wendehenne et al., 2001). واکنش NO با O_2 تولید پراکسی نیتريت ($ONOO^-$) می‌کند که یک اکسیدان قوی بوده و در صدمه سلول نقش مهمی دارد. در pH فیزیولوژیکی $ONOO^-$ سریعاً با گروه اسید نیترو (HNO_2) جایگزین می‌شود که بسته به نوع ترکیب آن، به سرعت به NO_3^- و یا به رادیکال‌های به شدت واکنش پذیر هیدروکسیل $HO^\bullet$ تبدیل می‌شود. NO همچنین می‌تواند با فلزات انتقالی مانند آهن ترکیب شده و تشکیل کمپلکس آهن-نیتروزیل دهد. این فرآیند ساختار و عملکرد پروتئین‌ها را تغییر می‌دهد؛ به عنوان مثال $NO^\bullet$ منجر به فعال سازی گوانیلات سیکلاز محلول و جلوگیری از عمل اکونیتاز می‌شود (Hayat et al., 2010).

تیمار سلول و کالوس گیاهان با سدیم نیتروپروساید (SNP) به عنوان عامل تولید کننده NO باعث بروز برخی اختلالات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی شده است. مطالعات پیشین نشان داد که تیمار سلول‌های هویج با غلظت ۱ میلی مولار سدیم نیتروپروساید به مدت ۲۴ ساعت باعث کاهش توانایی زیستی و تغییرات مرفولوژیک از قبیل تراکم کروماتین و کاهش اندازه هسته بوده است (Zottini et al., 2002)، از طرفی تیمار کالوس پرپوش با غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی مولار به مدت ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ روز باعث مهار رشد سلول و افزایش

گرم در لیتر)، عناصر ماکرو و میکرو و ترکیب هورمونی Kin (با غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر) و ۴ و ۲ دی کلروفونوکسی استیک اسید (2,4-D) (با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر) قرار گرفتند (Saifullah, 2011). این قطعات نهایتاً در اتاق کشت با دمای ۲۵-۲۷ درجه سلسیوس نگهداری گردید تا کالوس تولید شود، از کالوس پس از زیر کشت سوم برای تیمار دهی استفاده شد که مدت زمان هر زیر کشت نیز سه هفته بود.

کشت سوسپانسیون سلولی: کالوس‌ها در محیط کشت مایع MS فاقد آگار قرار گرفته و روی شیکر با دور ۱۰۰rpm در ۲۵ درجه سانتی گراد در تاریکی انکوبه شد. نمونه‌ها مرتباً به صورت روزانه با میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند تا از تشکیل سلول اطمینان حاصل شود. سلول‌ها هر هفته یکبار با محیط کشت تازه به صورت ۱:۱ رقیق و زیر کشت شدند، نهایتاً سلول‌های تکثیر شده برای بررسی توان زیستی و مرفولوژی بعد از زیر کشت سوم استفاده شدند (Saifullah, 2011).

بررسی حیات سلولی به کمک تریپان بلو: برای این منظور ۸۰۰۰۰ سلول، در هر ویال پلیت ۲۴ خانه اضافه شد. محیط سوسپانسیون حاوی سدیم نیتروپروساید در غلظت‌های ۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌مول به ترتیب به هر خانه‌ی پلیت ۲۴ خانه اضافه و پلیت‌ها به انکوباتور شیکردار منتقل شد (کلیه آزمون‌ها با سه تکرار انجام شد). بعد از سپری شدن ۱، ۳ و ۶ روز محلول رویی هر خانه خارج و به نسبت ۱:۱ تریپان بلو ۰/۴ در صد به هر خانه اضافه و پلیت به مدت ۲ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه شد. سپس با استفاده از لام نئوبار سلول‌های آبی (رنگ سلول‌های مرده) و سلول‌های بی رنگ (سلول‌های زنده) شمارش شد. با استفاده از فرمول زیر، در صد حیات سلول‌ها در مورد هر غلظت در زمان‌های ۱، ۳ و ۶ روز محاسبه گردید.

$$\text{تعداد سلول زنده} \times 100 = \frac{\text{تعداد توانایی زیستی}}{\text{تعداد کل سلول‌ها}}$$

بررسی حیات سلولی بر پایه‌ی رنگ سنجی (MTT): تعداد ۸۰۰۰۰ سلول به هر ویال پلیت ۲۴ خانه اضافه و محیط سوسپانسیون حاوی سدیم نیتروپروساید در غلظت‌های ۰، ۱۰،

۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌مول بر لیتر با سه تکرار به ترتیب به هر خانه‌ی پلیت ۲۴ خانه اضافه شد. بعد از سپری شدن ۱، ۳ و ۶ روز چاهک‌ها با بافر فسفات نمکی شستشو و به هر چاهک ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات نمکی و ۵۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه گردید. بعد از سپری شدن این مدت محیط رویی هر چاهک تخلیه و به منظور حل شدن بلورهای فورمازان ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به آنها اضافه و به مدت نیم ساعت در دمای اتاق و تاریکی قرار داده شد. سپس محتوی هر چاهک از پلیت ۲۴ خانه به لوله‌های اپندورف منتقل و در دور ۱۰۰۰۰rpm سانترفوژ گردید. نمونه‌ها به چاهک‌های مشخص از یک پلیت ۹۶ چاهکی منتقل و جذب آنها در طول موج ۵۰۵ نانومتر با استفاده از ELISA-reader (شرکت SCO GmbH کشور آلمان) خوانده شد. داده‌ها به صورت درصد توانایی زیستی سلول‌های تیمار شده نسبت به کنترل بیان شد.

بر اساس آزمون‌های تریپان بلو و MTT داده‌های نزدیک به LD50 و LD75 که بیانگر میزان ۵۰ و ۷۵ درصد کشته در اثر تیمار با غلظت مشخص است معین و در بررسی‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی تغییرات مورفولوژیکی: جهت بررسی تغییرات مورفولوژیکی هسته و سیتوپلاسمی به ترتیب از رنگ‌های فلوروسنت هوخست (1mg/ml) و آکریدین اورنژ (1mg/ml) استفاده شد. سوسپانسیون سلولی حاوی سدیم نیتروپروساید با غلظت‌های ۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مول بر لیتر و با سه تکرار به ترتیب به هر خانه‌ی پلیت ۲۴ خانه اضافه شد. بعد از سپری شدن شش روز، محیط رویی در خانه‌های پلیت ۲۴ خانه تخلیه و سلول‌ها توسط PBS شسته شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات و ۱۰ میکرولیتر محلول هوخست به چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه اضافه و به مدت ۳ دقیقه انکوبه شد. سلول‌ها مجدداً با بافر PBS شسته و جهت بررسی تغییرات مورفولوژیکی هسته، نمونه‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنس المپوس (PX41) مجهز به دوربین (DP71) بررسی و عکس برداری شد. جهت بررسی مورفولوژی سیتوپلاسم، رنگ آمیزی

سلول‌ها مطابق مراحل فوق الذکر توسط محلول آکریدین اورانژ به مدت ۲ دقیقه انجام و توسط میکروسکوپ فلوروسنس بررسی و عکس برداری شد.

استخراج عصاره آنزیمی: میزان ۰/۵ گرم از بافت کالوس با استفاده از نیتروژن مایع سائیده و توسط ۱ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=7) استخراج شد. ترکیب حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد و از محلول شفاف رویی که حاوی عصاره آنزیمی بود جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز (POX)، سوپراکسیددیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) استفاده شد. میزان پروتئین کل نمونه‌ها توسط روش لاوری تعیین و پس از رسم منحنی استاندارد با استفاده از BSA توسط فرمول خطی $y=0.885x+0.084$ و $R^2=0.996$ محاسبه گردید.

بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX): فعالیت آنزیم POX با استفاده از گایاکول به عنوان کروموزن اندازه گیری شد. در این روش ۳ میلی لیتر محلول بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=7)، ۵۰ میکرولیتر گایاکول ۲۰ میلی مولار، ۵۰ میکرولیتر H_2O_2 37% و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به عنوان مخلوط واکنش تهیه شد. افزایش جذب به دلیل اکسیداسیون گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه توسط اسپکتروفوتومتر (مدل T80+ شرکت PG کشور انگلستان) اندازه گیری و در نهایت فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از ضریب خاموشی معادل $26/6 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ محاسبه و بر حسب یک واحد (میکرومول تترایاکول تولید شده در دقیقه) بر میلی گرم پروتئین بیان گردید (Polle et al., 1994).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): فعالیت آنزیم CAT با روش اسپکتروفوتومتری و براساس کاهش جذب H_2O_2 به مدت ۵ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۲ میلی لیتر بافر فسفات ۲۵ میلی مولار (pH=7)، ۱۰۰ میکرولیتر H_2O_2 37% و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. میزان فعالیت آنزیم توسط اسپکتروفوتومتر (مدل T80+ شرکت PG کشور انگلستان) قرائت و با استفاده از

ضریب خاموشی معادل $36 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ محاسبه و بر حسب یک واحد (میکرومول پراکسید هیدروژن مصرف شده در دقیقه) بر میلی گرم پروتئین بیان گردید (Cakmak and Marschner, 1992).

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD): در این روش به ۲ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH=7) که حاوی ۱۹ میلی گرم متیونین، ۶۱ میلی گرم نیتروبلوتترازولیوم، ۷۹ میلی گرم ریبوفلاوین و ۳/۳ میلی گرم EDTA بود ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه شد. واکنش با قرار دادن نمونه‌ها در مقابل نور (LUX ۵۰۰۰) شروع و پس از ۱۰ دقیقه بلافاصله جذب نمونه‌ها در ۵۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر (مدل T80+ شرکت PG کشور انگلستان) خوانده شد. یک واحد فعالیت آنزیمی معادل مقداری از آنزیم است که موجب ۵۰ درصد ممانعت احیای NBT در ۵۶۰ نانومتر می شود. میزان فعالیت آنزیم بر حسب یک واحد در دقیقه به ازای میلی گرم پروتئین محاسبه گردید (Giannopolitis et al., 1977).

سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدها: برای اندازه گیری میزان پراکسیداسیون لیپید از روش Zoha (1980) با اندکی تغییرات استفاده شد. بدین منظور ۰/۵ گرم از بافت را با ۴ میلی لیتر از محلول تری کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد در هاون چینی سائیده و عصاره در دور ۴۰۰۰rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۲ میلی لیتر از محلول رویی و ۲ میلی لیتر از محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد تیوباریتیک اسید را در حمام آب گرم در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرارداده و به مدت ۱۵ دقیقه در یخ قرار گرفت تا سرد شود. جذب محلول در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و از جذب خوانده شده در طول موج ۵۳۲ نانومتر کم شد. از تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد تیوباریتیک اسید برای صفر کردن دستگاه استفاده می شود. غلظت کمپلکس تیوباریتوریک-مالون دی آلدهید با استفاده از ضریب خاموشی $\text{mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ۶۱۵۵ محاسبه شد و بصورت میکرومول بر گرم وزن خشک بافت کالوس گزارش شد (Metwally et al., 2003).

تجزیه و تحلیل آماری: در این طرح تجربی داده‌ها پس از سه تکرار مورد تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS-16 و ANOVA یک طرفه قرار گرفتند. میانگین شاخص‌های اندازه گیری شده با استفاده از آزمون دانکن گروه بندی و $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج:

اثر SNP بر توانایی زیستی: مقایسه داده‌های بدست آمده از مطالعه میانگین سلول‌های زنده گیاه پرپوش تیمار شده با سدیم نیتروپروساید و گروه کنترل توسط روش رنگ آمیزی تریپان بلو مشخص کرد که تفاوت میانگین درصد سلول‌های زنده در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف معنی دار ($P < 0.05$) بود. این روند کاهشی بصورتی بود که در تیمارهای یک روزه غلظت ۱۰ میلی مولار نسبت به کنترل تغییر معنی داری نشان نداد ($P > 0.05$) در صورتی که در تیمارهای ۳ و ۶ روزه غلظت ۱۰ میلی مولار نسبت به کنترل کاهش معنی دار داشت ($P < 0.05$). از طرفی در تیمار ۳ روزه غلظت ۵۰ میلی مولار نسبت به غلظت ۱۰ میلی مولار تغییر معنی داری نشان نداد ($P > 0.05$) ولی همین غلظت در تیمار ۶ روزه نسبت به غلظت ۱۰ میلی مولار کاهش معنی دار ($P < 0.05$) داشت (جدول ۱). میزان LD50 سدیم نیترو پروساید بر اساس روش رنگ آمیزی تریپان بلو در تیمارهای ۱، ۳ و ۶ روزه به ترتیب ۲۵۰، ۲۰۰ و ۵۰ میلی مولار بود، از طرفی میزان LD75 تنها در تیمارهای ۶ روزه مشاهده شد که معادل غلظت ۲۰۰ میلی مولار بود. لذا برای ادامه بررسی‌ها تیمار ۶ روزه با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار انتخاب شد.

مقایسه میانگین تعداد سلول‌های زنده به روش رنگ سنجی MTT نیز نشان داد که تیمار سلول‌های کالوس گیاه پرپوش با سدیم نیتروپروساید باعث کاهش معنی دار توانایی زیستی این سلول‌ها شد ($P < 0.05$) (جدول ۱)، از طرفی نیز آنالیز داده‌ها به روش ANOVA دو طرفه وابستگی کاهش توانایی زیستی به اثر متقابل غلظت و زمان را نشان داد (داده‌ها نشان داده نشده است).

با توجه به نتایج بدست آمده از آزمون رنگ آمیزی تریپان بلو و رنگ سنجی MTT مشخص شد که کلیه غلظت‌ها نسبت به یکدیگر تفاوت معنی داری دارند. لذا برای ادامه بررسی‌ها دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار و مدت زمان ۶ روز انتخاب شد. انتخاب این غلظت‌ها به دلیل نزدیکی آنها با غلظت‌های LD50 و LD75 بود که به ترتیب باعث مرگ ۵۰ و ۷۵ درصد سلول‌های تحت تیمار شدند، از طرفی با توجه به اینکه مدت زمان شش روز در این مطالعه بیشترین زمان تیمار بود، این زمان برای ادامه تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی مورفولوژی سلول‌ها: رنگ آمیزی فلوروسنت سلول‌های کنترل با هوخست نشان داد که هسته در کشت سلولی تهیه شده از کالوس گیاه پرپوش به صورت کروی و غشاء آن به صورت یکنواخت بدون هیچگونه زائده‌ای می‌باشد. این در حالی است که تیمار سلول‌ها با ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار سدیم نیتروپروساید باعث تغییر فرم هندسی هسته سلول از کروی به بیضی و ایجاد زائده‌هایی در هسته شد ضمناً اندازه هسته نیز در مقایسه با سلول‌های کنترل بزرگتر و کروماتین آشفته تر بود (شکل ۱). این تغییرات در غلظت ۲۰۰ میلی مولار چشمگیرتر بود (شکل ۱) که منجر به ایجاد پارگی و آشفتنی بیشتری در کروماتین شده بود. سلول‌های تیمار شده با سدیم نیتروپروساید با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار از نظر سیتوپلاسمی نیز دچار تغییرات مورفولوژیک بارزی از قبیل چروکیدگی و تغییر در حاشیه سیتوپلاسم سلول تیمار شده نسبت به گروه کنترل شد (شکل ۲). لازم بذکر است که حاشیه سیتوپلاسمی در سلول‌های گروه کنترل کاملاً صاف و یکدست بود در صورتی که این حاشیه‌ها در سلول‌های تیمار شده با ایجاد زائده و از هم پاشیدگی سیتوپلاسمی همراه بود. تغییر در مورفولوژی سیتوپلاسم نیز در سلول‌های تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میلی مولار بیشتر بود.

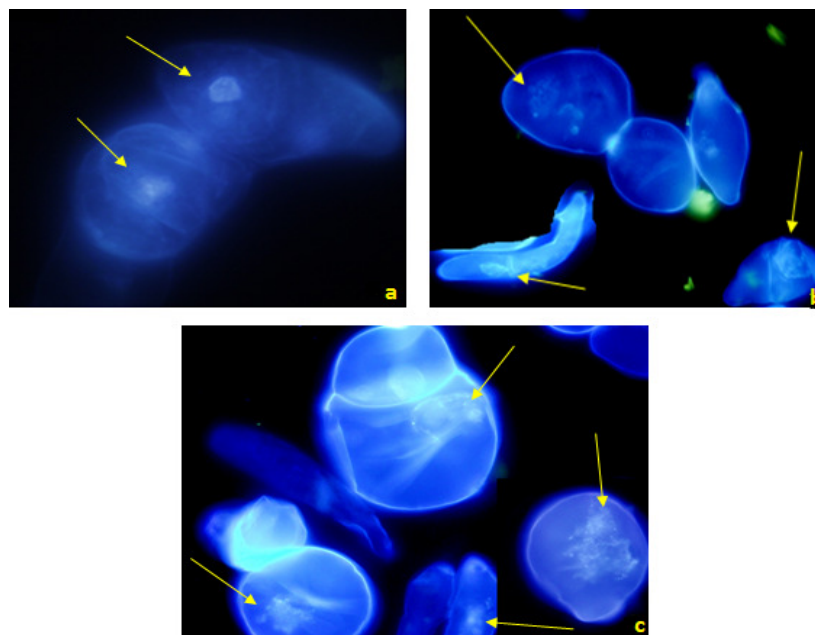
اثر SNP بر آنزیم سوپراکسیددیسموتاز: مقایسه میانگین فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز نشان داد که تیمار با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار سدیم نیتروپروساید موجب افزایش معنی دار ($P < 0.001$) فعالیت این آنزیم نسبت به نمونه

جدول ۱- مقایسه میانگین درصد توانایی زیستی سلول‌های کالوس گیاه پرپوش (*Catharanthus roseus*) در گروه‌های تیمار شده با دزهای مختلف سدیم نیتروپروساید پس از گذشت یک، سه و شش روز به روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو و روش رنگ سنجی MTT.

دز (mM)	روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو			روش رنگ سنجی MTT		
	۱ روزه	۳ روزه	۶ روزه	۱ روزه	۳ روزه	۶ روزه
۰	۹۱/۷۲ ^a ± ۲/۱۹	۹۲/۰۹ ^a ± ۱/۲۳	۹۲/۸۸ ^a ± ۰/۷۷	۹۱/۲۲ ^a ± ۷/۸۰	۹۱/۴۰ ^a ± ۸/۷۷	۹۰/۴۷ ^a ± ۸/۴۴
۱۰	۸۸/۸۰ ^{ab} ± ۲/۶۵	۷۹/۹۵ ^b ± ۴/۰۲	۷۸/۷۲ ^b ± ۳/۹۷	۸۶/۰۳ ^{ab} ± ۲/۲۴	۷۹/۷۲ ^b ± ۳/۹۰	۶۶/۹۶ ^b ± ۱۰/۷۱
۵۰	۷۸/۸۲ ^{bc} ± ۳/۷۱	۷۴/۳۲ ^b ± ۲/۰۱	۴۸/۱۰ ^c ± ۲/۲۱	۷۷/۱۸ ^b ± ۴/۰۱	۶۵/۶۳ ^c ± ۷/۵۹	۳۹/۸۷ ^c ± ۴/۲۲
۱۰۰	۶۹/۹۱ ^{cd} ± ۸/۳۰	۶۸/۰۷ ^c ± ۱/۱۹	۳۹/۳۵ ^{cd} ± ۶/۶۳	۶۲/۵۷ ^c ± ۲/۲۰	۴۸/۴۴ ^d ± ۶/۱۸	۲۶/۲۹ ^d ± ۶/۵۳
۱۵۰	۶۱/۲۹ ^{de} ± ۱۰/۲۴	۵۶/۵۱ ^d ± ۰/۸۶	۳۸/۰۵ ^d ± ۶/۳۵	۵۳/۷۹ ^c ± ۹/۷۰	۳۵/۰۴ ^e ± ۶/۱۸	۱۲/۴۹ ^e ± ۶/۷۳
۲۰۰	۵۹/۳۱ ^e ± ۳/۷۲	۴۷/۴۱ ^e ± ۷/۸۳	۱۵/۰۷ ^e ± ۴/۶۶	۳۶/۲۵ ^d ± ۳/۹۵	۲۳/۷۰ ^{ef} ± ۶/۷۵	۹/۲۲ ^e ± ۲/۸۷
۲۵۰	۴۸/۸۱ ^f ± ۴/۳۸	۳۷/۰۴ ^f ± ۱/۸۳	۱۱/۶۸ ^e ± ۲/۹۴	۳۰/۱۱ ^d ± ۶/۵۸	۱۵/۸۰ ^f ± ۵/۲۸	۵/۰۵ ^e ± ۱/۸۵

مقادیر به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ می‌باشد، میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار است (one-way ANOVA,)

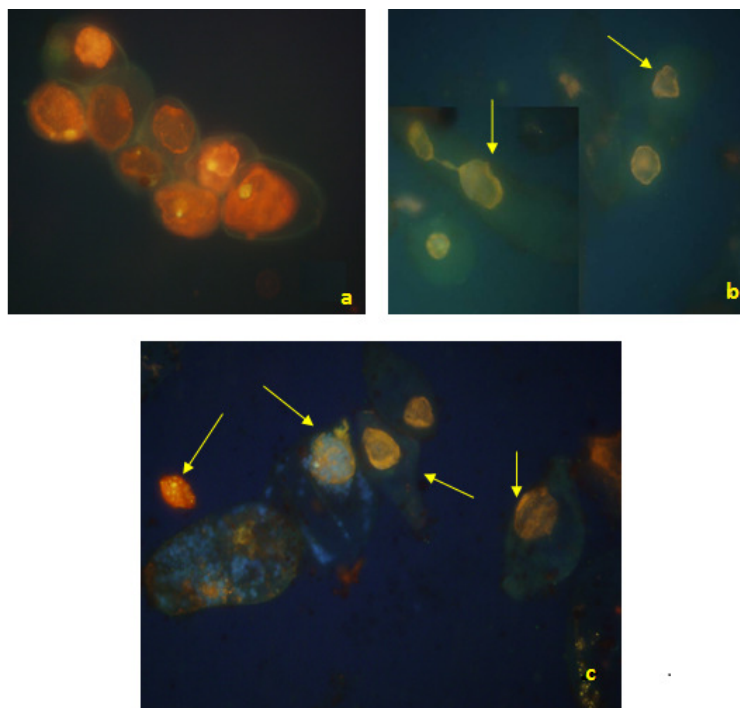
(Duncan test, $p < 0.05$)



شکل ۱- رنگ‌آمیزی سلول‌ها در کشت سلولی تهیه شده از کالوس گیاه پرپوش با رنگ فلوروسنت هوکست پس از شش روز تنش. (a) سلول‌های گروه کنترل پیکان‌ها هسته سلول نرمال را نشان می‌دهد. (b) سلول‌های تیمار شده با ۱۰۰ میلی‌مولار سدیم نیتروپروساید، پیکان‌ها تغییر شکل و متلاشی شدن هسته را نشان می‌دهد. (c) سلول‌های تیمار شده با ۲۰۰ میلی‌مولار سدیم نیتروپروساید، پیکان‌ها تغییر شکل هسته و حاشیه مساوی آنها را نشان می‌دهد (بزرگ نمایی ۴۰x).

اثر SNP بر آنزیم کاتالاز: بررسی نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها حاکی از اثر معنی‌دار ($P < 0.05$) سدیم نیتروپروساید بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز کالوس گیاه پرپوش است (جدول ۳). در کالوس تیمار شده با دزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار

کنترل شده است. داده‌های جدول مقایسه میانگین نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز وابسته به غلظت است و این آنزیم در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار دارای حداکثر فعالیت بود (جدول ۲).



شکل ۲- رنگ آمیزی سلول‌ها در کشت سلولی تهیه شده از کالوس گیاه پریش با رنگ فلوروسنت آکریدین اورنژ پس از شش روز تنش. (a) سلول‌های گروه کنترل، حاشیه سیتوپلاسم صاف و یکنواخت است. (b) سلول‌های تیمار شده با ۱۰۰ میلی مولار سدیم نیتروپروساید، پیکان‌ها چروکیدگی سیتوپلاسم را نشان می‌دهد. (c) سلول‌های تیمار شده با ۲۰۰ میلی مولار سدیم نیتروپروساید، پیکان‌ها پارگی سیتوپلاسم و عدم حضور محدوده سیتوپلاسمی را نشان می‌دهد (بزرگ نمایی ۲۰x).

جدول ۲- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز ($\text{unit mg}^{-1} \text{protein}$)، پراکسیداز ($\text{unit min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)، کاتالاز ($\text{unit min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$) و محتوی مالون‌دی‌آلدئید ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$) کالوس گیاه پریش شش روز پس از تیمار با سدیم نیتروپروساید (۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی‌مولار).

غلظت سدیم نیتروپروساید (mM)	سوپراکسید دیسموتاز ($\text{unit min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)	کاتالاز ($\text{unit min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)	پراکسیداز ($\text{unit min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)	مالون‌دی‌آلدئید ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$)
۰	$32/81^a \pm 12/05$	$0/96^a \pm 0/05$	$0/29^a \pm 0/005$	$8/11^a \pm 6/72$
۱۰۰	$51/02^b \pm 5/91$	$1/63^b \pm 0/09$	$0/67^b \pm 0/115$	$21/54^b \pm 2/94$
۲۰۰	$72/97^c \pm 5/52$	$2/02^c \pm 0/20$	$1/11^c \pm 0/110$	$35/94^c \pm 4/22$

مقادیر بصورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ می‌باشد، میانگین‌ها با کد حرفهای متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی دار است (one-way ANOVA, Duncan test, $p < 0.05$).

اثر SNP بر آنزیم پراکسیداز: آنالیز داده‌های حاصل از اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در کالوس گیاه پریش تیمار شده با سدیم نیتروپروساید در مقایسه با نمونه کنترل نشان داد که SNP دارای اثر معنی‌دار ($P < 0.05$) بر فعالیت این آنزیم می‌باشد (جدول ۲). میزان فعالیت آنزیم

سدیم نیتروپروساید افزایش معنی‌دار ($P < 0.001$) فعالیت این آنزیم نسبت به نمونه کنترل قابل مشاهده است. مقایسه میانگین‌های حاصل نشان دهنده ارتباط وابسته به غلظت فعالیت این آنزیم می‌باشد و این میزان در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار به حداکثر رسید (جدول ۲).

پراکسیداز در هر دو گروه تیمار شده با دزهای ۱۰۰ ($P < 0.05$) و ۲۰۰ ($P < 0.001$) میلی مولار افزایش معنی داری را نسبت به نمونه کنترل نشان می دهد. داده های حاصل نشان دهنده وابسته بودن فعالیت این آنزیم نسبت به غلظت است و این آنزیم در غلظت ۲۰۰ میلی مولار حداکثر فعالیت را دارا می باشد (جدول ۲).

اثر SNP بر میزان پراکسیداسیون لیپید: آنالیز آماری داده های حاصل از اندازه گیری مقدار مالون دی آلدئید در کالوس گیاه پریش نشان داد که اثر سدیم نیتروپروساید بر مقدار مالون دی آلدئید نسبت به نمونه کنترل معنی دار ($P < 0.05$) است (جدول ۲). هم چنین مقایسه میانگین محتوی مالون دی آلدئید در کالوس گیاه پریش حاکی از افزایش معنی دار ($P < 0.001$) وابسته به غلظت مالون دی آلدئید می باشد، به طوری که این افزایش در غلظت ۲۰۰ میلی مولار به بیشترین مقدار خود رسیده است.

بحث:

مولکول نیتریک اکسید (NO) یکی از مولکول هایی است که می تواند به عنوان تنظیم کننده در متابولیسم رادیکال های آزاد اکسیژن (ROS) عمل کند (Hung and Kao, 2003). هم چنین بسیاری از آزمایشات نشان داد که NO در انتقال سیگنال های گیاهی (Neill et al., 2003; Hayat et al., 2010) و در واکنش با تنش های غیرزیستی و زیستی دخالت دارد (Qiao and Fan, 2008; Tan et al., 2008; Liu et al., 2011). سدیم نیتروپروساید (SNP) یکی از تولید کننده های مهم نیتریک اکسید (NO) است (Butler and Megson, 2002) که به ازاء هر ۵/۰ میلی مول بر لیتر قادر به تولید حدود ۲ میکرومول بر لیتر رادیکال NO می باشد (Haihua et al., 2002). تولید بالای رادیکال های آزاد در سلول های گیاهی منجر به تخریب ترکیبات سلولی از جمله پروتئین ها و غشاهای لیپیدی و اسیدهای نوکلئیک شد (Xu et al., 2011) و به دنبال آن تنش اکسیداتیو ایجاد می شود (Fu and Zhang, 2000). در گیاهان، NO به عنوان یک مولکول مهم در بسیاری از عملکردهای فیزیولوژیکی از جمله فرآیندهای رشد و نمو تا پاسخ های دفاعی و سلولی (Durner and Klessig, 1999) که باعث بروز عکس العمل های حساس می شوند، نقش دارد

(Grant and Loake, 2000). از طرفی مشخص شده است که H_2O_2 داخل سلولی به تنهایی قادر به بروز پاسخ سلولی نمی باشد و ممکن است در کنار فاکتورهای دیگر منجر به بروز مرگ سلولی شود (Delledonne et al., 2001) در چندین آزمایش در حوزه گیاهان و کشت سلولی مشخص شده که رادیکال NO یکی از عوامل تقویت کننده عملکرد H_2O_2 است، در حقیقت به دنبال بروز پاسخ سلولی، NO باعث افزایش مرگ سلولی القا شده توسط H_2O_2 می گردد (Durner et al., 1998) مطالعات انجام شده توسط Zottini و همکاران (۲۰۰۲) نشان داد که با گذشت ۴۸ ساعت میزان مرگ سلولی در سلول های هویج تحت تاثیر غلظت ۱ mM سدیم نیتروپروساید نسبت به همین تیمار با گذشت ۲۴ ساعت با افزایش همراه بود (Zottini, 2002). در پژوهش حاضر غلظت های مختلف سدیم نیتروپروساید (۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی مولار) جهت انجام مطالعه استفاده شد و تاثیر غلظت های مختلف سدیم نیتروپروساید در سه بازه زمانی یک، سه و شش روز بر توانایی زیستی سلول های کالوس گیاه پریش مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از تست رنگ آمیزی تریپان بلو نشان داد که تیمار یک روزه در غلظت ۱۰ میلی مولار نسبت به نمونه کنترل تفاوت معنی داری نداشت این در حالی بود که در همین غلظت طی روزهای سه و شش روز کاهش معنی دار نسبت به گروه کنترل قابل مشاهده بود. از طرفی در تیمار سه روزه غلظت ۵۰ میلی مولار نسبت به غلظت ۱۰ میلی مولار تفاوت معنی داری نداشت اما همین غلظت در تیمار شش روزه نسبت به غلظت ۱۰ میلی مولار با کاهش معنی داری مواجه بود. در تحقیق دیگری که توسط Fadzillah و همکاران (۲۰۰۶) بر روی کالوس گیاه *Centella asiatica* انجام شد دو گروه سلول در نظر گرفته شدند که هر دو در شرایط یکسان با غلظت های مختلف Methyl viologen عنوان عامل تولید رادیکال آزاد اکسیژن تیمار شدند، مشاهده شد که در گروه اول با گذشت زمان توانایی حیات کاهش می یابد به طوری که در روز پنجم پس از تیمار توانایی حیات به کمترین درصد (زیر ۱۰٪) می رسد. اما در گروه دوم در همان روز اول تیمار با افت شدید توانایی زیستی همراه بوده و

این افت با شیب بسیار کم تا روز پنجم ادامه می‌یابد (Fadzillah *et al.*, 2006). این مطالعه و مطالعات انجام شده نشان داد که با توجه به نوع گونه گیاهی و هم چنین نوع و غلظت تیمار اعمال شده سلول‌های گیاهی قادر است پاسخ‌های سلولی متفاوت با دامنه متفاوت را اعمال کند. از طرفی مطالعات مرفولوژیک نشان داد که تغییر در مرفولوژی هسته و سیتوپلاسم مانند باز شدن کروماتین، تغییر فرم هندسی و ایجاد حاشیه مساکی شکل و همچنین چروکیدگی و تخریب کامل سیتوپلاسم در سلول‌های تحت تیمار با سدیم نیتروپروساید رخ می‌دهد. تنش‌های زیستی و غیر زیستی می‌توانند در گیاهان مرگ برنامه ریزی شده را القاء نمایند، از مشخصه‌های مهم مرگ برنامه ریزی شده سلولی بروز تغییرات مرفولوژی در هسته و سیتوپلاسم سلول‌های تحت تنش می‌باشد. با توجه به تغییرات مشاهده شده در سلول‌های تحت تیمار احتمالاً کاهش وابسته به غلظت توانائی زیستی سلول‌های کالوس گیاه پرپوش تیمار شده با سدیم نیتروپروساید در اثر القاء مرگ برنامه ریزی شده می‌باشد. البته اعمال نظر قطعی نوع مرگ سلولی نیاز مند انجام تحقیقات بیشتر می‌باشد که توسط این تیم تحقیقاتی پیشنهاد می‌گردد.

در شرایط رشد طبیعی بین تولید و پاکسازی رادیکال‌های آزاد در سلول‌های گیاهی تعادل وجود دارد که با ایجاد تنش این تعادل با افزایش رادیکال‌های آزاد یا کم شدن میزان یا فعالیت پاک کننده‌ها در سلول بهم می‌خورد (Fu and Zhang, 2000). از آنجا که سرعت پراکسیداسیون لیپید (MDA) می‌تواند نشان‌دهنده تحمل یا حساسیت گیاهان نسبت به استرس‌های اکسیداتیو باشد (Wang *et al.*, 2009)، در ادامه این پژوهش به بررسی میزان مالون‌دی‌آلدئید در کالوس گیاه پرپوش پرداخته شد. بر اساس نتایج بدست آمده با افزایش غلظت سدیم نیتروپروساید میزان مالون‌دی‌آلدئید که شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء است نیز افزایش یافت. لذا می‌توان گفت که افزایش تولید مولکول NO باعث القاء استرس اکسیداتیو در سلول‌های تحت تیمار با سدیم نیتروپروساید می‌شود. طی مطالعاتی که Zhao و همکاران (۲۰۰۸) بر روی دو اکوتیپ از

گیاه نی (Reed) تیمار شده با پلی اتیلن گلیکول انجام دادند به این نتیجه دست یافتند که اثر نیتریک اکسید بر هر کدام از اکوتیپ‌ها دارای اثرات متفاوتی بود به طوری که در اکوتیپ Dune Reed اثر معنی‌داری در محتوی مالون‌دی‌آلدئید مشاهده نشد اما در اکوتیپ Swamp Reed این تفاوت معنی‌دار بود (Zhao *et al.*, 2008). مطالعاتی توسط Shi و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد آنها مشاهده کردند که اعمال تیمار نیتریک اکسید خارجی بر ریشه این گیاه تحت تنش اسمزی در دو بازه زمانی ۴ و ۸ روزه منجر به کاهش معنی‌دار در میزان مالون‌دی‌آلدئید شد (Shi *et al.*, 2007). البته دیده شده که غلظت پایین NO می‌تواند در حذف ROS و جلوگیری از تولید O_2^- و H_2O_2 و در نتیجه کاهش MAD موثر باشد. با توجه به نتایج بدست آمده از تحقیقات مختلف می‌توان نتیجه گرفت که غلظت نیتریک اکسید می‌تواند باعث بروز پاسخ‌های متفاوتی در گیاهان مختلف شود، اگرچه در مطالعه حاضر افزایش غلظت نیتروپروساید و بدنبال آن افزایش میزان NO خارج سلولی باعث افزایش معنی‌دار مالون دی آلدئید در کالوس گیاه پرپوش شد.

هم‌چنین در گیاهان روش‌های متفاوتی برای مقابله با اثر اکسیداتیو رادیکال‌های آزاد یافت می‌شود که از آن جمله می‌توان به روش‌های غیر آنزیمی و آنزیمی اشاره کرد. در روش آنزیمی، گیاه با استفاده از آنزیم‌های خنثی کننده رادیکال آزاد مانند سوپر اکسیددیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز می‌تواند رادیکال‌های آزاد را حذف و اثر تخریبی آنها را کمتر یا حتی از بین ببرد. در مطالعه حاضر افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی فوق‌الذکر مشاهده شد. آنزیم‌های آنتی اکسیدانی کاتالاز و سوپر اکسیددیسموتاز به عنوان مهمترین عامل آنتی اکسیدانی مطرح هستند (Scandalios *et al.*, 1984). تنش‌های مختلف محیطی منجر به افزایش تولید ROS می‌شوند و SOD در تحمل گیاهان نسبت به این تنش‌ها و فراهم کردن اولین مکانیسم‌های مقاومت به اثرات سمی سطوح بالای ROS با اهمیت و دارای نقش ویژه‌ای می‌باشد (Gill and Tuteja, 2010). هم‌چنین کاتالاز نیز از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است که

وابسته به غلظت بوده و در غلظت‌ها و شرایط محیطی مختلف دارای اثرات فیزیولوژیکی متفاوتی است (Shi *et al.*, 2007) از طرفی نیز افزایش وابسته به غلظت در فعالیت آنزیم‌های مورد بررسی در این طرح می‌تواند به دلیل این باشد که غلظت‌های به کار رفته عموماً در جهت افزایش فعالیت بوده و ممکن است غلظت‌های کمتر نیتروپروساید باعث بروز روندهای متفاوت با نتایج این پژوهش شود.

نتیجه‌گیری کلی:

در تحقیق حاضر، با افزایش میزان غلظت سدیم نیتروپروساید، توانائی زیستی سلول‌های کالوس گیاه پریوش تحت تیمار کاهش یافت. دلیل این کاهش می‌تواند افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء باشد که این خود نشان دهنده ارتباط مستقیم بین پراکسیداسیون لیپیدی و تولید ROSها می‌باشد. به دنبال افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و ایجاد صدمه در غشاء سلول، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی نیز مشاهده شد. اگر چه افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در جهت کاهش اثر مخرب سدیم نیتروپروساید عامل تولید رادیکال NO بوده است ولی این اثر نتوانست از مرگ و میر سلول‌ها جلوگیری کند.

تشکر و قدردانی:

در پایان جا دارد از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اراک تشکر و قدردانی شود که با ارائه کمک مالی امکان انجام تحقیق حاضر در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد را ممکن نمود.

در غلظت‌های پایین ROS فعال نمی‌شود ولی در غلظت‌های زیاد ROS که نشان دهنده شرایط سخت و زیاد تنش است فعالیت می‌کند (Gill and Tuteja, 2010). این آنزیم به طور طبیعی مسئول از بین بردن پراکسید هیدروژن تولید شده در شرایط فیزیولوژیک است، از طرفی نیز فعالیت آنزیم پراکسیداز با توجه به گونه گیاهی و نوع تنش متفاوت بود (Gill and Tuteja, 2010). طبق آزمایشات انجام شده توسط Shi و همکاران (۲۰۰۷) که بر روی ریشه خیار انجام شد مشخص شد که استفاده از نیتریک اکسید خارجی در طی دو دوره ۴ و ۸ روزه منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و POX پس از تیمار چهار روزه گشت. اما پس از گذشت هشت روز مشاهده شد که فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز با کاهش همراه بود اما فعالیت دو آنزیم دیگر هم چنان روند رو به افزایش را نشان می‌داد (Shi *et al.*, 2007). Xu و همکاران (۲۰۰۹) در آزمایشات خود که حاصل تاثیر غلظت‌های مختلف سدیم نیتروپروساید بر کالوس گیاه سیب زمینی بود بدین صورت بیان داشتند که میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تا غلظت $40\mu\text{M}$ با افزایش همراه بود و در غلظت‌های بعدی با کاهش در فعالیت این آنزیم مواجه شدند. از طرفی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز تا غلظت $40\mu\text{M}$ روند نزولی را داشت که از این غلظت به بعد با افزایش در فعالیت این آنزیم روبرو شدند (Xu *et al.*, 2009). با توجه به نتایج بدست آمده طی آزمایشات مختلف می‌توان چنین نتیجه گرفت که اثر متفاوت غلظت‌های SNP ممکن است به علت دوگانگی اثر NO باشد، زیرا عملکرد NO

منابع:

- Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 98: 13454-13459.
- Durner, J. and Klessig, D. F. (1999) Nitric oxide as a signal in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 369-374.
- Durner, J., Wendehenne, D. and Klessig, D. F. (1998) Defence gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95: 10328-10333.
- Fadzillah, N. M., Yusuf, N. and Mahmood, M. (2006) Paraquat (Methyl viologen) toxicity in centella asiatica callus cultures. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 29:57-66.
- Butler, A. R. and Megson, I. L. (2002) Non-heme iron nitrosyls in biology. *Chemical Reviews* 102: 1155-1165.
- Cakmak, I. and Marschner, H. (1992) Manganese deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiology* 98: 1222-1227.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A. and Lamb, C. (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediate in the plant hypersensitive disease resistance response.

- Shi, Q., Ding, F., Wang, X. and Wei, M. (2007) Exogenous nitric oxide protects cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 542-550.
- Starling, D. (1976) Two ultra structurally distinct tubulin para crystals induced, approaches to the treatment of PTSD (1995). *Journal of Cell Science* 20: 79-89.
- Tan, J., Zhao, H., Hoang, J., Han, Y., Li, H. and Zhao, W. (2008) Effects of exogenous nitric oxide on photosynthesis, antioxidant capacity and proline accumulation in wheat seedlings subjected to osmotic stress. *Agricultural Sciences* 4: 307-313.
- Wang, W. B., Kim, Y. H., Lee, H. S., Kim, K. Y., Deng, X. P. and Kwak, S. S. (2009) Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. *Plant Physiology Biochemistry* 47:570-577
- Wendehennea, D., Pugina, A., Klessigb, D. F. and Durnerc, J. (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Plant Science* 6: 177-183.
- Willekens, H., Camp, W. V., Montagu, M. V., Inze, D., Langebartels, C. and Sandermann, H. J. (1994) Ozone, sulfur dioxide, and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* L. *Plant Physiology* 106: 1007-1014 .
- Winner, M. A., Mooney, H. A., Williams, K. and Von, T. (1985) Measuring and assessing SO₂ effect on photosynthesis and plant growth. *Tropical Ecology* 19: 156.
- Xu, H. W., Lu, Y., Tong, S. Y. and Song, F. B. (2011) Lipid peroxidation, antioxidant enzyme activity and osmotic adjustment changes in husk leaves of maize in black soils region of northeast china. *Agricultural Research* 6: 3098-3102.
- Xu, M., Dong, J. and Zhu, M. (2004) Effect of nitric oxide on catharanthine production and growth of *Catharanthus roseus* suspension cells. *Biotechnology and Bioengineering* 89: 367-371.
- Xu, J., Yin, H., Wang, W., Mi, Q. and Lin, X. (2009) Effects of sodium nitroprusside on callus induction and shoot regeneration in micropropagated *Dioscorea opposita*. *Plant Growth Regulator* 59:279-285.
- Zhao, L., He, J., Wang, X. and Zhang, L. (2008) Nitric oxide protects against polyethylene glycol-induced oxidative damage in two ecotypes of reed suspension cultures. *Journal of Plant Physiology* 165: 182-191.
- Zottini, M., Formentin, E., Scattolin, M., Carimi, F., Schiavo, F. L. and Terzi, M. (2002) Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality in vivo. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 515: 75-78.
- Fu, J., Huang, B. and Zhang, G. (2000) Physiological and biochemical change during seed filling in relation to leaf senescence in soybean. *Biologia Plantarum* 4: 545-548.
- Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutases: 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 and Biochemistry* 48: 909-930
- Grant, J. J. and Loake, G. J. (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signalling in disease resistance. *Plant Physiology* 124: 21-29.
- Haihua, H., Wenbiao, S., Maobing, Y. and Langlai, X. (2002) Protective effects of nitric oxide on salt stress-induced oxidative damage to wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Chinese Science Bulletin* 47: 677-681.
- Hayat, S., Hasan, S. A., Mori, M., Fariduddin, Q. and Ahmad, A. (2010) Nitric oxide: chemistry, biosynthesis, and physiological role. In: *Nitric Oxide in Plant Physiology*, (ed. Hayat, S., Mori, M., Pichtel, J. and Ahmad A.) Pp.1-16. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim.
- Hung, K. T. and Kao, C. H. (2003) Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid. *Plant Physiology* 160: 871-879.
- Kokate, C.K. and Purohit, A. P. (2007) *Text Book of Pharmacognosy*. 37th Ed., 484-87
- Liu, X., Wang, L., Liu, L., Guo, Y. and Ren, H. (2011) Alleviating effect of exogenous nitric oxide in cucumber seedling against chilling stress. *African Journal of Biotechnology* 10: 4380-4386.
- Liu, N., Peng, C., Lin, Z., Lin, G., Zhang, L. and Pan, X. (2006) Changes in photosystem II activity and life reflectance features of several subtropical woody plants under simulated SO₂ treatment. *Integrative Plant Biology* 48: 1274-1286.
- Metwally, A., Finkemeier, I., Georgi, M. and Dietz, K. (2003) Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiology* 132: 272-281.
- Neill, S. J., Desikan, R. and Hancock, J. T. (2003) Nitric oxide signaling in plants. *New Phytologist* 159: 11-35.
- Polle, A., Otter, T. and Seifert, F. (1994) Apoplastic peroxidases and lignification in needles of norway spruce (*Picea Abies* L.). *Plant Physiology* 106: 53-56.
- Qiao, W. and Fan, L. (2008) Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stresses. *Integrative Plant Biology* 50(10): 1238-1246.
- Saifullah, S. K. (2011) Callus induction and cell suspension culture production of *catharanthus roseus* for biotransformation studies of caryophyllene oxide. *Pakistan Journal of Botany* 43:473-467.
- Scandalios, J. G., Tsaftaris, A. S., Chandlee, J. M. and Skadsen, R. W. (1984) Expression of the developmentally regulated catalase (Cat) genes in maize. *Developmental Genetics* 4:281-293.