بررسی توان زیستی و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در کشت سلولی گیاه پریوش (*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 توانائی زیستی در کشت سلولی، پراکسیداسیون سلولی و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز در کالوس گیاه پریوش مورد بررسی قرار گرفت تا تاثیر NO بر قرآیندهای حیاتی این گیاه ارزیابی شود. از کالوس گیاه پریوش 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، توانائی 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 آشفتگی 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 می تواند منجر به آسیب غشا سلولی و در نتیجه کاهش توانایی زیستی سلول‌های کالوس گیاه پریوش گردد، اگرچه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به دنبال تنش ایجاد شده افزایش یافت اما پاسخگوی نیاز گیاه برای جبران آسیب‌های وارده نبود.

واژه‌های کلیدی: کالوس پریوش، توانایی زیستی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پراکسیداسیون لیپیدی، نیتریک اکسید.

مقدمه:

گیاه پریوش یک گیاه دارویی مهم است که حاوی ۱۳۰ نوع آلکالوئید و هم‌چنین ترکیبات فنلی بوده (Kokate and Purohit, 2007) و دارای فعالیت ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد دیابت، ضد سرطان و ضد ویروس می‌باشد (Starling, 1976). لذا از اهمیت اقتصادی ویژه‌ای نیز برخودار است. آلودگی‌های هوا و دیگر تنش‌های محیطی که گیاهان با آنها مواجه هستند، منجر به تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: m_abnosi@araku.ac.ir

(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 شیمیائی 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 ($O_2^{\cdot}$)، 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 نیتریت (NO_2^-) و نیترات (NO_3^-) واکنش دهد (Wendehennea *et al*., 2001). واکنش $NO^{\cdot}$ با O_2 تولید پراکسی‌نیتریت ($ONOO^-$) 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 $HO^{\cdot}$ 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 $NO^{\cdot}$ 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 بیوشیمیائی شده است. مطالعات پیشین نشان داد که تیمار سلول‌های هویج با غلظت ۱ میلی مولار سدیم نیتروپروساید به مدت ۲۴ ساعت باعث کاهش توانائی زیستی و تغییرات مرفولوژیک از قبیل تراکم کروماتین وکاهش اندازه هسته بوده است (Zottini *et al*., 2002)، از طرفی تیمار کالوس پریوش با غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی مولار به مدت ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ روز باعث مهار رشد سلول و افزایش تولید کاتارانتین 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 پریوش در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) تحت تاثیر 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 پریوش (*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 ۲±۲۸ درجه سانتیگراد و در شب ۲±۲۵ 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 ۰/۵-۱ 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

گرم در لیتر) ، عناصر ماکرو و میکرو و ترکیب هورمونی Kin (با غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر) و ۲و۴ دی کلروفنوکسی 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 سلول ها در مورد هر غلظت در زمان‌های ۱، ۳ و ۶ روز محاسبه گردید.

$$\text{درصد توانایی زیستی} = \frac{\text{تعداد سلول زنده}}{\text{تعداد کل سلول‌ها}} \times ۱۰۰$$

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 توانائی 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 مجددا 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 ۱۰۰میلی‌مولار (pH=7) استخراج شد. ترکیب حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰rpm سانتیریفیوژ 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 کروموژن اندازه گیری شد. در این روش ۳ میلی‌لیتر 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 اسپکتروفتومتر (مدل +T80 شرکت PG کشور انگلستان) اندازه گیری و در نهایت فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از ضریب خاموشی معادل 26/6 $mmol^{-1}\ cm^{-1}$ محاسبه و بر حسب یک واحد(میکرومول تتراگایاکول تولید شده در دقیقه) بر میلی گرم پروتئین بیان گردید (Polle *et al*., 1994).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز(CAT): فعالیت آنزیم CAT با روش اسپکتروفتومتری 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 اسپکتروفتومتر (مدل +T80 شرکت PG کشور انگلستان) قرائت و با استفاده از ضریب خاموشی معادل 36 $mmol^{-1}cm^{-1}$ محاسبه و برحسب یک واحد(میکرومول پراکسید هیدروژن مصرف شده در دقیقه) بر میلی‌گرم 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 (۵۰۰۰ LUX) شروع و پس از ۱۰ دقیقه بلافاصله جذب نمونه‌ها در ۵۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (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 تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیوتیک 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 تیوباربیوتیک اسید برای صفر کردن دستگاه استفاده می‌شود. غلظت کمپلکس تیوباربیتوریک-مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از ضریب خاموشی $mmol^{-1}\ cm^{-1}$ ε۱۵۵= 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 پریوش 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 معنی‌دار داشت ($P<0.05$). از طرفی در تیمار ۳ روزه غلظت ۵۰ میلی مولار نسبت به غلظت ۱۰ میلی مولار تغییر معنی‌داری 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 روز 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 پریوش با سدیم نیتروپروساید باعث کاهش معنی‌دار توانائی زیستی این سلول‌ها شد ($P<0.05$) (جدول ۱)، از طرفی نیز آنالیز داده‌ها به روش ANOVA دو طرفه وابستگی کاهش توانائی زیستی به اثر متقابل غلظت و زمان را نشان داد (داده ها 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 معنی‌داری 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.

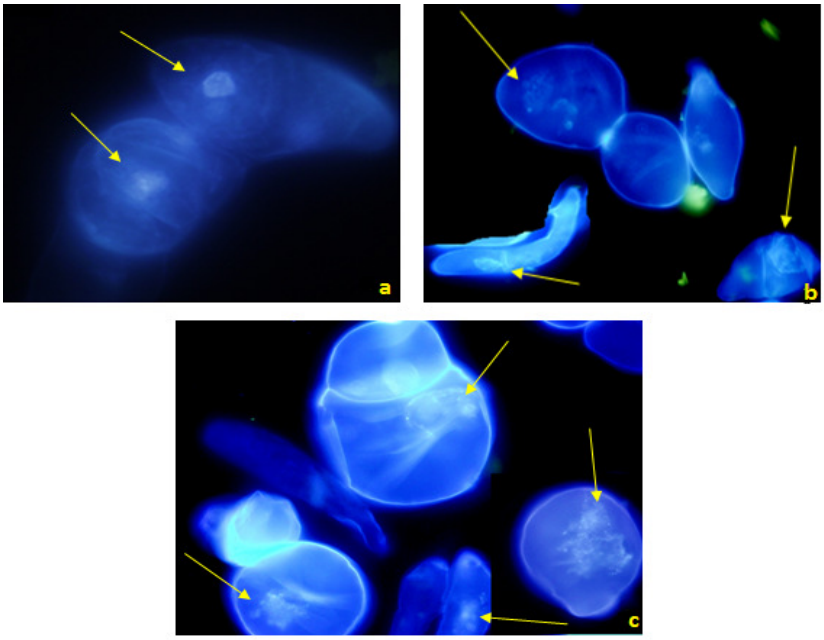
بررسی مورفولوژی سلول‌ها: رنگ آمیزی فلوروسنت سلول‌های کنترل با هوخست نشان داد که هسته در کشت سلولی تهیه شده از کالوس گیاه پریوش به صورت کروی و غشاء آن به صورت یکنواخت بدون هیچگونه زائده‌ای می‌باشد. این در حالی است که تیمار سلول‌ها با ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار سدیم نیتروپروساید باعث تغییر فرم هندسی هسته سلول از کروی به بیضی و ایجاد زائده‌هائی 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 آشفتگی 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 (شکل۲). 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 مرفولوژی 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 میلی‌مولار سدیم نیتروپروساید موجب افزایش معنی‌دار ($P<0.001$) فعالیت این آنزیم نسبت به نمونه

جدول ۱- مقایسه میانگین درصد توانایی زیستی سلول‌های کالوس گیاه پریوش (*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.

	روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو			روش رنگ سنجی MTT.		
دز(mM)	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

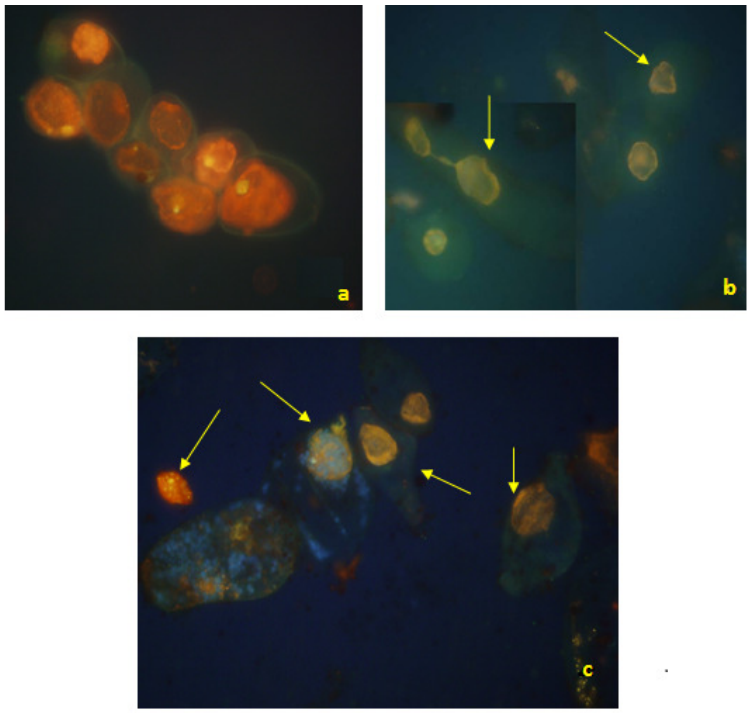
مقادیر به صورت mean±SD می‌باشد، میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار است (one-way ANOVA, Duncan test, p<0.05)



شکل ۱- رنگ آمیزی سلول‌ها در کشت سلولی تهیه شده از کالوس گیاه پریوش با رنگ فلوروسنت هوخست پس از شش روز تنش. (a) سلول‌های گروه کنترل پیکان‌ها هسته سلول نرمال را نشان می دهد. (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 مسواکی آنها را نشان می‌دهد (بزرگ نمایی ۴۰x).

کنترل شده است. داده‌های جدول مقایسه میانگین نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز وابسته به غلظت است و این آنزیم در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار دارای حداکثر فعالیت بود (جدول۲).

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 پریوش است (جدول ۳). در کالوس تیمار شده با دزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار



شکل۲- رنگ آمیزی سلول‌ها در کشت سلولی تهیه شده از کالوس گیاه پریوش 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 سوپراکسیددیسموتاز(unit mg^{-1} protein)، پراکسیداز(unit min^{-1} mg^{-1} protein)، کاتالاز (unit min^{-1} mg^{-1} protein) و محتوی مالوندی‌آلدئید(µmol g^{-1}FW) کالوس گیاه پریوش شش روز پس از تیمار با سدیم نیتروپروساید(۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی‌مولار).

غلظت سدیم نیتروپروساید (mM)	سوپراکسیددیسموتاز (unit min^{-1} mg^{-1} protein)	کاتالاز (unit min^{-1} mg^{-1} protein)	پراکسیداز (unit min^{-1} mg^{-1} protein)	مالوندی‌آلدئید (µmol g^{-1}FW)
۰	۳۲/۸۱ ^{a} ±۱۲/۰۵	۰/۹۶ ^{a} ±۰/۰۵	۰/۲۹ ^{a} ±۰/۰۰۵	۸/۱۱ ^{a} ±۶/۷۲
۱۰۰	۵۱/۰۲ ^{b} ±۵/۹۱	۱/۶۳ ^{b} ±۰/۰۹	۰/۶۷ ^{b} ±۰/۱۱۵	۲۱/۵۴ ^{b} ±۲/۹۴
۲۰۰	۷۲/۹۷ ^{c} ±۵/۵۲	۲/۰۲ ^{c} ±۰/۲۰	۱/۱۱ ^{c} ±۰/۱۱۰	۳۵/۹۴ ^{c} ±۴/۲۲

مقادیر بصورت mean±SD میباشد، میانگین ها با کد حرفهای متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی دار است (one-way ANOVA, Duncan test, p<0.05).

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 (جدول۲).

اثر SNP بر آنزیم پراکسیداز: آنالیز داده‌های حاصل از اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در کالوس گیاه پریوش 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 (جدول۲). میزان فعالیت آنزیم

پراکسیداز در هر دو گروه تیمار شده با دزهای ۱۰۰ ($P<0.05$) و ۲۰۰ ($P<0.001$) میلی‌مولار افزایش معنی‌داری را نسبت به نمونه کنترل نشان می‌دهد. داده‌های حاصل نشان دهنده وابسته بودن فعالیت این آنزیم نسبت به غلظت است و این آنزیم در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار حداکثر فعالیت را دارا می‌باشد (جدول۲).

اثر SNP بر میزان پراکسیداسیون لیپید: آنالیز آماری داده‌های حاصل از اندازه‌گیری مقدار مالون‌دی‌آلدئید در کالوس گیاه پریوش نشان داد که اثر سدیم نیتروپروساید بر مقدار مالون‌دی‌آلدئید نسبت به نمونه کنترل معنی‌دار ($P<0.05$) است (جدول۲). هم‌چنین مقایسه میانگین محتوی مالون‌دی‌آلدئید در کالوس گیاه پریوش حاکی از افزایش معنی‌دار ($P<0.001$) وابسته به غلظت مالون‌دی‌آلدئید می‌باشد، به طوری که این افزایش در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار به بیشترین مقدار خود رسیده است.

بحث:

مولکول نیتریک اکسید (NO) یکی از مولکول‌هایی است که می‌تواند به عنوان تنظیم کننده در متابولیسم رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) عمل کند (Hung and Kao, 2003). هم‌چنین بسیاری از آزمایشات نشان داد که NO در انتقال سیگنال‌های گیاهی (Neill *et al*., 2003; Hayat *et al*., 2010) و در واکنش با تنش‌های غیرزیستی و زیستی دخالت دارد (Qiao and Fan, 2008; Tan *et al*., 2008; Liu *et al*., 2011). سدیم نیتروپروساید (SNP) یکی از تولید کننده‌های مهم نیتریک اکسید (NO) است (Butler and Megson, 2002) که به ازاء هر ۰/۵ میلی‌مول بر لیتر قادر به تولید حدود ۲ میکرومول بر لیتر رادیکال NO می‌باشد (Haihua *et al*., 2002). تولید بالای رادیکال‌های آزاد در سلول‌های گیاهی منجر به تخریب ترکیبات سلولی از جمله پروتئین‌ها و غشاهای لیپیدی و اسیدهای نوکلئیک شد (Xu *et al*., 2011) و به دنبال آن تنش اکسیداتیو ایجاد می‌شود (Fu and Zhang, 2000). در گیاهان، NO به عنوان یک مولکول مهم در بسیاری از عملکردهای فیزیولوژیکی از جمله فرآیندهای رشد و نمو تا پاسخ‌های دفاعی و سلولی (Durner and Klessig, 1999) که باعث بروز عکس‌العمل‌های حساس می‌شوند، نقش دارد (Grant and Loake, 2000). از طرفی مشخص شده است که H_2O_2 داخل سلولی به تنهایی قادر به بروز پاسخ سلولی نمی‌باشد و ممکن است درکنار 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 می‌گردد (Durner *et al*., 1998) مطالعات انجام شده توسط Zottini و همکاران (۲۰۰۲) نشان داد که با گذشت ۴۸ ساعت میزان مرگ سلولی در سلول‌های هویج تحت تاثیر غلظت ۱mM سدیم نیتروپروساید نسبت به همین تیمار با گذشت ۲۴ ساعت با افزایش همراه بود (Zottini, 2002). در پژوهش حاظر غلظت‌های مختلف سدیم نیتروپروساید (۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌مولار) جهت انجام مطالعه استفاده شد و تاثیر غلظت‌های مختلف سدیم نیتروپروساید در سه بازه زمانی یک، سه و شش روز بر توانایی زیستی سلول‌های کالوس گیاه پریوش مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از تست رنگ‌آمیزی تریپان بلو نشان داد که تیمار یک روزه در غلظت ۱۰ میلی‌مولار نسبت به نمونه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت این در حالی بود که در همین غلظت طی روزهای سه و شش روز کاهش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل قابل مشاهده بود. از طرفی در تیمار سه روزه غلظت ۵۰ میلی‌مولار نسبت به غلظت ۱۰ میلی‌مولار تفاوت معنی‌داری نداشت اما همین غلظت در تیمار شش روزه نسبت به غلظت ۱۰ میلی‌مولار با کاهش معنی‌داری 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 غلظت‌های مختلف Methyl viologen به عنوان عامل تولید رادیکال آزاد اکسیژن تیمار شدند، مشاهده شد که در گروه اول با گذشت زمان توانایی حیات کاهش می‌یابد به طوری که در روز پنجم پس از تیمار توانایی حیات به کمترین درصد (زیر ۱۰٪) می‌رسد. 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 مسواکی شکل و همچنین چروکیدگی و تخریب کامل سیتوپلاسم در سلول‌های تحت تیمار با سدیم نیتروپروساید رخ می دهد. 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 پریوش 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 رادیکال های آزاد یا کم شدن میزان یا فعالیت پاک کننده ها 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 پریوش پرداخته شد. بر اساس نتایج بدست آمده با افزایش غلظت سدیم نیتروپروساید میزان مالون‌دی‌آلدئید که شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء است نیز افزایش یافت. لذا می توان گفت که افزایش تولید مولکول NO باعث القاء استرس اکسیداتیو در سلول‌های تحت تیمار با سدیم نیتروپروساید می شود. 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 پریوش شد.

هم‌چنین در گیاهان روش‌های متفاوتی برای مقابله با اثر اکسیداتیو رادیکال های آزاد یافت می شود که از آن جمله می توان به روش های غیر آنزیمی و آنزیمی اشاره کرد. در روش آنزیمی، گیاه با استفاده از آنزیم‌های خنثی کننده رادیکال آزاد مانند سوپر اکسیددیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز می‌توانند رادیکال‌های آزاد را حذف و اثر تخریبی آنها را کمتر یا حتی از بین ببرند. در مطالعه حاضر افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم های آنتی‌اکسیدانی فوق الذکر مشاهده شد. آنزیم‌های آنتی اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز 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

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 ۴۰µM 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 ۴۰µM 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 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 می تواند 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 سلول ها 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.

منابع:

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) Manesium deficiency and high light inensity enhance activities of superoxide dismutase, ascrobate 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. 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.

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 SO_2 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 catharantine 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 opposite. 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 inabiotic 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 SO_2 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 biotransfermation 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.