

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 زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۸/۱؛ 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 پریوش مورد بررسی قرار گرفت تا تأثیر NO بر قرایندهای حیاتی این گیاه ارزیابی شود. از کالوس گیاه پریوش سوسپانسیون سلولی تهیه و پس از تیمار با غلظت ۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی مول از سدیم نیتروپروساید به مدت ۱، ۳، ۶ روز، توانایی حیات توسط رنگ آمیزی تریپان بلو و رنگ سنجی MTT بررسی شد. علاوه بر توانایی حیات از سوسپانسیون سلولی برای بررسی مرفلوژی و از بافت کالوس برای بررسی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداسیون لبیدی 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 مرفلوژی سدیم نیتروپروساید باعث تغییر فرم هندسی و اندازه هسته سلول و آشتفتگی در کروماتین شد. همچنین سیتوپلاسم نیز دچار تغییرات مرفلوژیک 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 لبید 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 پریوش گردد، اگرچه فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی به دنبال تنش ایجاد شده افزایش یافت اما پاسخگوی نیاز گیاه برای جبران آسیب‌های واردہ نبود.

واژه‌های کلیدی: کالوس پریوش، توانایی زیستی، آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، پراکسیداسیون لبیدی، نیتریک اکسید.

مقدمه:

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 (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 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. گلданها با محلول هوگلنند 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 ۰.۵٪ 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 ۱-۰/۵ 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 غشاء‌یی و ماکرومولکول‌های بیولوژیکی سمی می‌باشند (Liu *et al.*, 2006; Winner *et al.*, 1985; Willekens *et al.*, 1994). 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 لیوفیل، 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 متabolیت‌های نهایی نیتریت (NO_2^-) و نیترات (NO_3^-) واکنش دهد (Wendehennea *et al.*, 2001). واکنش NO 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^- 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 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 توانایی زیستی و تغییرات مرفوولوژیک از قبیل تراکم کروماتین و کاهش 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

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 ۵۰ 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 فلوروستنت هوخت (1mg/ml) و آکریدین اورنژ (1mg/ml) استفاده شد. سوسپانسیون سلولی حاوی سدیم نیتروپروسايد با غلظت‌های 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 هوخت 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

گرم در لیتر)، عناصر ماکرو و میکرو و ترکیب هورمونی Kin (با غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر) و ۴۰ 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 مرتبأ 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 مرفوژی بعد از زیر کشت سوم استفاده شدند (Saifullah, 2011).

بررسی حیات سلولی به کمک تریپان بلو: برای این منظور ۸۰۰۰ سلول، در هر ویال پلیت ۲۴ خانه اضافه شد. محیط سوسپانسیون حاوی سدیم نیتروپروسايد در غلظت‌های ۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ 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 مدت 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 نوبار 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.

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

بررسی حیات سلولی بر پایه‌ی رنگ سنجی (MTT): تعداد ۸۰۰۰ سلول به هر ویال پلیت ۲۴ خانه اضافه و محیط سوسپانسیون حاوی سدیم نیتروپروسايد در غلظت‌های ۰، ۱۰،

ضریب خاموشی معادل $36 \text{ mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ محسبه و بر حسب یک واحد(میکرومول پراکسید هیدروژن مصرف شده در دقیقه) بر میلی گرم پروتئین بیان گردید (Cakmak and Marschner, 1992).
سنجهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD): در این روش به ۲ میلی لیتر بافر فسفات پتابسیم ۵۰ میلی مولار (pH=7) که حاوی ۱۹ میلی گرم متیونین، ۶۱ میلی گرم نیتروبلوترازولیوم، ۷۹ میلی گرم ریبوفلاوین و ۳/۳ میلی گرم EDTA بود ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه شد. واکنش با قرار دادن نمونه‌ها در مقابله نور (۵۰۰ LUX) شروع و پس از ۱۰ دقیقه بلافتاصله 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 می‌شود. میزان فعالیت آنزیم بر حسب یک واحد در دقیقه به ازای میلی گرم پروتئین محسبه گردید (Giannopolitis et al., 1977).

سنجهش 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 ۴۰۰۰ rpm 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 تیوباربیوتیک اسید را در حمام آب گرم در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرارداده و به مدت ۱۵ دقیقه در بین 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. غلاظت کمپلکس تیوباربیوتیک-مالوندی آلدئید با استفاده از ضریب خاموشی $26/6 \text{ mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ محسبه شد و بصورت میکرومول بر گرم وزن خشک بافت کالوس گزارش شد (Metwally et al., 2003).

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 پتابسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=7) استخراج شد. ترکیب حاصل در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و از محلول شفاف رویی که حاوی عصاره آنزیمی بود جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز (POX)، سوپراکسید دیسموتاز (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 $R^2=0.996$ محسبه 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 پتابسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=7)، ۵۰ میکرولیتر گایاکول ۲۰ میلی مولار، ۵۰ میکرولیتر ۳۷% H_2O_2 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 $26/6 \text{ mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ محسبه و بر حسب یک واحد(میکرومول تراگایاکول تولید شده در دقیقه) بر میلی گرم پروتئین بیان گردید (Polle et al., 1994).

سنجهش 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 ۳۷% H_2O_2 و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. میزان فعالیت آنزیم توسط اسپکتروفوتومتر (مدل T80+ شرکت PG کشور انگلستان) قرائت و با استفاده از

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 سلول‌های تحت تیمار شدن، 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 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 آشفته‌تر 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 (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 مرفولوژی سیتوپلاسم نیز در سلول‌های تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میلی مولار بیشتر بود.

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

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 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 نیتروپروساید 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.

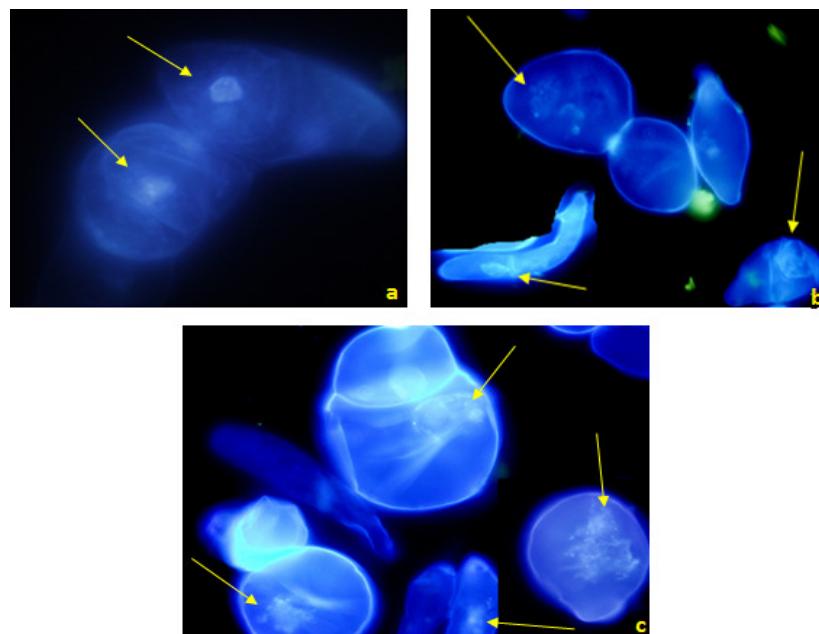
مقایسه میانگین تعداد سلول‌های زنده به روش رنگ سنجی MTT نیز نشان داد که تیمار سلول‌های کالوس گیاه پریوش با سدیم نیتروپروساید باعث کاهش معنی‌دار توانایی زیستی این سلول‌ها شد ($P<0.05$) (جدول ۱)، از طرفی نیز آنالیز داده‌ها به روشن ANOVA دو طرفه وابستگی کاهش توانایی زیستی به اثر متقابل غلظت و زمان را نشان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

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.

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

مقادیر به صورت mean±SD می‌باشد، میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار است (one-way ANOVA).

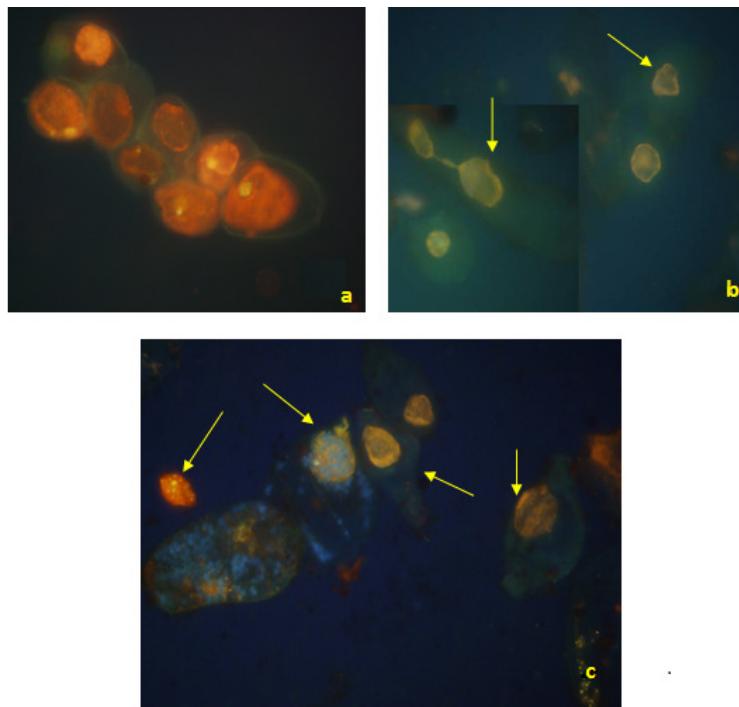
(Duncan test, p<0.05)



شکل ۱- رنگ‌آمیزی سلول‌ها در کشت سلولی تهیه شده از کالوس گیاه پریوش با رنگ فلوروستن هوخست پس از شش روز نتش. (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 مساوکی آنها را نشان می‌دهد (بزرگ نمایی $\times 40$).

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

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



شکل ۲- رنگ آمیزی سلول‌ها در کشت سلولی تهیه شده از کالوس گیاه پریوش با رنگ فلوروستن آکریدین اورنژ پس از شش روز تنش. (a) سلول‌های گروه کنترل، حاشیه سیتوپلاسم صاف و یکنواخت است. (b) سلول‌های تیمار شده با ۱۰۰ میلی مolar سدیم نیتروپروساید، پیکان‌ها چروکیدگی سیتوپلاسم را نشان می‌دهد. (c) سلول‌های تیمار شده با ۲۰۰ میلی مolar سدیم نیتروپروساید، پیکان‌ها پارگی سیتوپلاسم و عدم حضور محدوده سیتوپلاسمی را نشان می‌دهد (بزرگ نمایی $\times 200$).

جدول ۲- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیدیسموتاز ($\text{unit min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$), 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 پریوش شش روز پس از تیمار با سدیم نیتروپروساید (۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی مolar).

مالوندی‌آلدئید ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$)	پراکسیداز ($\text{unit min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	کاتالاز ($\text{unit min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	سوپراکسیدیسموتاز ($\text{unit min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	غلظت سدیم نیتروپروساید (mM)
۸/۱۱ ^a \pm ۶/۷۲	۰/۲۹ ^a \pm ۰/۰۵	۰/۹۶ ^a \pm ۰/۰۵	۳۲/۸۱ ^a \pm ۱۲/۰۵	۰
۲۱/۰۴ ^b \pm ۲/۹۴	۰/۶۷ ^b \pm ۰/۱۱۵	۱/۶۳ ^b \pm ۰/۰۹	۵۱/۰۲ ^b \pm ۵/۹۱	۱۰۰
۳۵/۹۴ ^c \pm ۴/۲۲	۱/۱۱ ^c \pm ۰/۱۱۰	۲/۰۲ ^c \pm ۰/۲۰	۷۲/۹۷ ^c \pm ۵/۰۲	۲۰۰

مقادیر بصورت mean \pm SD می‌باشد، میانگین‌ها با کد حروفی 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 پریوش تیمار شده با سدیم نیتروپروساید در مقایسه با نمونه کنترل نشان داد که SNP دارای اثر معنی دار ($P<0.05$) بر فعالیت این آنزیم می‌باشد (جدول ۲). میزان فعالیت آنزیم

سدیم نیتروپروساید افزایش معنی دار ($P<0.001$) 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 میلی مolar به حداقل رسید (جدول ۲).

(Grant and Loake, 2000). از طرفی مشخص شده است که H_2O_2 داخل سلولی به تهایی قادر به بروز پاسخ سلولی نمی‌باشد 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 می‌گردد (Durner *et al.*, 1998) مطالعات انجام شده توسط Zottini (همکاران ۲۰۰۲) نشان داد که با گذشت ۴۸ ساعت میزان مرگ سلولی در سلول‌های هویج تحت تاثیر غلظت $M\text{m}^{-1}$ سدیم نیتروپرساید نسبت به همین تیمار با گذشت ۲۴ ساعت با افزایش همراه بود (Zottini, 2002). در پژوهش حاضر غلظت‌های مختلف سدیم نیتروپرساید (۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار) جهت انجام مطالعه استفاده شد و تاثیر غلظت‌های مختلف سدیم نیتروپرساید 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 (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 (۱۰٪) می‌رسد. اما در گروه دوم در همان روز اول تیمار با افت شدید توانایی زیستی همراه بوده و

پراکسیداز در هر دو گروه تیمار شده با ذرهای 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 حداقل‌تر فعالیت را دارا می‌باشد (جدول ۲).

اثر SNP بر میزان پراکسیداسیون لیپید: آنالیز آماری داده‌های حاصل از اندازه‌گیری مقدار مالوندی‌آلدئید در کالوس گیاه پریوش نشان داد که اثر سدیم نیتروپرساید بر مقدار مالوندی‌آلدئید نسبت به نمونه کنترل معنی‌دار ($P<0.05$) است (جدول ۲). 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 تشنهای غیرزیستی و زیستی دخالت دارد (Qiao and Fan, 2008; Tan *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2011). سدیم نیتروپرساید (SNP) یکی از تولید کنندهای 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 غشاها 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

گیاه نی (Reed) تیمار شده با پلی اتیلن گلیکول انجام دادند به این نتیجه دست یافته 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 تنفس 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 دی‌آلدئید در کالوس گیاه پریوش 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 خشی کننده رادیکال آزاد مانند سوپر اکسیدیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز می‌تواند رادیکال‌های آزاد را حذف و اثر تخریبی آنها را کمتر یا حتی از بین ببرند. در مطالعه حاضر افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی فوق الذکر مشاهده شد. آنزیم‌های آنتی اکسیدانی کاتالاز و سوپر اکسیدیسموتاز به عنوان مهمترین عامل آنتی اکسیدانی مطرح هستند (Scandalios *et al.*, 1984) تنفس‌های مختلف محیطی منجر به افزایش تولید ROS می‌شوند و SOD در تحمل گیاهان نسبت به این تنفس‌ها 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 آنتی اکسیدانی است که

این افت با شبیه 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 مرفلولژیک نشان داد که تغییر در مرفلولژی هسته و سیتوپلاسم مانند باز شدن کروماتین، تغییر فرم هندسی و ایجاد حاشیه مساوکی شکل و همچنین چروکیدگی و تخریب کامل سیتوپلاسم در سلول‌های تحت تیمار با سدیم نیتروپروساید رخ می‌دهد. تنفس‌های زیستی و غیر زیستی می‌توانند در گیاهان مرگ برنامه ریزی شده را القاء نمایند، از مشخصه‌های مهم مرگ برنامه ریزی شده سلولی بروز تغییرات مرفلولژی در هسته و سیتوپلاسم سلول‌های تحت تنفس می‌باشد. با توجه به تغییرات مشاهده شده در سلول‌های تحت تیمار احتماً 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 تنفس 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 مالون دی‌آلدئید در کالوس گیاه پریوش پرداخته شد. بر اساس نتایج بدست آمده با افزایش غلظت سدیم نیتروپروساید میزان مالون دی‌آلدئید 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

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) و همکاران (۲۰۰۷) که بر روی ریشه خیار انجام شد مشخص شد که استفاده از نیتریک اکسید خارجی در طی دوره ۴ و ۸ روزه منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT پس از تیمار چهار روزه گشت. اما پس از گذشت هشت روز مشاهده شد که فعالیت آنزیم سوپراکسیدیسموتاز با کاهش همراه بود اما فعالیت دو آنزیم دیگر هم چنان روند رو به افزایش را نشان می‌داد (Shi *et al.*, 2007) 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) Manesium 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 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 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 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.
- Kokane, 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., Tsafaris, A. S., Chandee, J. M. and Skadsten, R. W. (1984) Expression of the developmentally regulated catalase (Cat) genes in maize. *Developmental Genetics* 4:281-293.