نقش پیش تیمار نیتریک اکساید در پاسخ های آنتی اکسیدانی گیاه نخود (*Cicer arietinum* L.) هنگام کاهش دمای شبانه

نادر چاپارزاده[1و2*]، معصومه فرجی[1]، محمد پاژنگ[1] و علیرضا محمدپور[1]

[1] گروه زیست شناسی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران و [2] گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان شورپسند، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۳/۰۳/۰۲، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۰۸/۱۷)

چکیده:

نیتریک اکساید به عنوان مولکول گازی فعال نقش مهمی در پاسخ به انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی گیاهان دارد. دماهای پایین یکی از عوامل محدود کننده بقاء، تولیدمثل و توزیع جغرافیایی گیاهان در بیشتر مناطق دنیا محسوب می‌شود. دماهای پایین با تغییرات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و تغییرات مولکولی منجر به تنش اکسیداتیو می‌گردند. در این پژوهش اثرات پیش تیمار ۰/۱ میلی مولار سدیم نیتروپروساید (به عنوان دهنده نیتریک اکساید) بر گیاه نخود به هنگام کاهش دمای شبانه (۲۵ و ۱۵ و ۵ درجه سانتی‌گراد) مطالعه شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار جهت سنجش ترکیباتی مانند محتوای هیدروژن پراکساید، شاخص پراکسیداسیون چربی‌ها، ترکیبات فنلی محلول و نا محلول، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز انجام شد. نتایج نشان داد که اثر نیتریک اکساید بر محتوای هیدروژن پراکساید، ترکیبات فنلی محلول و نا محلول و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل معنی‌دار بود ولی بر شاخص پراکسیداسیون چربی‌ها، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز معنی‌دار نبود. تغییر دما بر کلیه صفات مذکور تأثیر معنی‌داری داشت. برهم‌کنش سدیم نیتروپروساید و دما بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز معنی‌دار بود، ولی بر محتوای هیدروژن پراکساید، شاخص پراکسیداسیون چربی‌ها، ترکیبات فنلی محلول و نامحلول و فعالیت آنزیم پراکسیداز معنی‌دار نبود.

کلمات کلیدی: دمای پایین، گونه‌های فعال اکسیژن، نخود، نیتریک اکساید

مقدمه:

انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن در بافت‌های گیاهی می‌شوند. انباشتگی گونه‌های فعال اکسیژن در بافت‌ها باعث آسیب به پروتئین‌ها، چربی‌ها، کربوهیدرات‌ها و DNA شده و در نهایت منجر به آسیب اکسیداتیو می‌گردند (Gill and Tuteja, 2010). گیاهان سیستم های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی برای جاروب شدن گونه‌های فعال اکسیژن را در طول تکامل به دست آورده‌اند. نیتریک اکساید (Nitric Oxide) یک گونه فعال نیتروژنی است که به علت ویژگی‌های خاص(رادیکال آزاد، اندازه کوچک، عمر کوتاه و قابلیت انتشار بالا از عرض غشاءهای زیستی) در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی گیاهان مانند رشد و نمو، جوانه‌زنی، بلوغ و پیری، حرکت روزنه‌ها و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی دخالت می‌کند (Liu *et al*, 2011). نیتریک اکساید با گونه‌های فعال اکسیژن، گروه‌های تیول‌ها و پروتئین‌ها واکنش می‌دهد. آن می‌تواند با توجه به غلظت و محل اثر بر

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: nchapar@azaruniv.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.10.0]

روی سلول ها اثر حفاظتی یا سمی داشته باشد (Lamattina *et al.*, 2003). اهمیت این مولکول در تحمل به برخی تنش‌های محیطی (Siddiqui *et al.*, 2010) به ویژه تنش یخبندان (Neill *et al.*, 2003) شناخته شده است. نیتریک اکساید با تقویت سیستم دفاعی، توان گیاهان را برای سازش با شرایط ناگوار محیطی افزایش می‌دهد. از طرفی، در طبیعت دمای محیط با تغییر فصول و شبانه روز دچار نوسان شده و می‌تواند اثرات نامطلوب روی فرآیندهای رویشی و زایشی گیاه داشته باشد (Ruelland and Zachowski, 2010). دماهای پایین با تغییر در فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی هموستازی گونه‌های فعال اکسیژن را متاثر می‌سازند (Siddiqui *et al.*, 2010). گیاهان زراعی یکساله بعد از کاشت در بهار ممکن است کاهش دمای شبانه را تجربه کنند. محتوای پروتئینی بالا، وجود فیبرها و کلسترول کم دانه نخود را منبع خوب غذایی برای انسان ساخته است (Thakare *et al.*, 2012). نخود گیاهی یکساله و بوته‌ای شکل با شاخه‌های وسیع از جمله گیاهان زراعی است که بعد از فصل زمستان در مناطق سردسیر کاشته شده و در مراحلی از رشد تحت تأثیر سرما قرار می‌گیرد (Dasgupta *et al.*, 2011). با توجه به اینکه خسارت ناشی از افت دما به ویژه در مراحل حساس رشد و نمو، باعث کاهش در تولید و کیفیت محصول می‌گردد، بنابراین در این تحقیق سعی شده برخی تغییرات فیزیولوژیکی حاصل از کاهش دمای شبانه در گیاه نخود بررسی و نقش نیتریک اکساید در بهبود احتمالی اثرات سوء حاصل از کاهش دما در اثر تولید گونه های فعال اکسیژن مورد کاوش قرار گیرد.

مواد و روش‌ها:

بذور سالم نخود (*Cicer arietinum* L.) از نوع رقم ILC482 انتخاب و با هیپوکلریت سدیم ۱٪ ضدعفونی و با آب مقطر شستشو داده شدند. جوانه‌زنی بذرها بر روی کاغذ صافی مرطوب به مدت چهار روز صورت گرفت. سپس آنها به گلدان‌های حاوی پرلیت انتقال یافته و به مدت ۱۰ روز در شرایط نوری تنظیم شده ١٤ ساعت نور و ۱۰ ساعت تاریکی، جریان فوتون فتوسنتزی ۲۵۰ میکرومول برمتر مربع در ثانیه، رطوبت ٤٥-۳۵ درصد و دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط کنترل شده نگهداری گردیده و به طور یک روز در میان با آب مقطر و محلول غذایی هوگلند تغذیه شدند. گلدان‌های حاوی دانه‌رست‌های ۱۰ روزه به دو گروه تقسیم گردیدند: گروه اول با محلول هوگلند بدون سدیم نیتروپروساید (SNP0) و گروه دوم با محلول هوگلند حاوی ۰/۱ میلی‌مولار سدیم نیتروپروساید (SNP1)به صورت یک روز در میان تا روز شانزدهم تیمار شدند. گلدان‌های مذکور از روز شانزدهم به مدت سه روز متوالی تحت تیمار دمایی روز/ شب به صورت ۲۵/۲۵ – ۱۵/۲۵ – ۵/۲۵ سانتی گراد قرار گرفتند. نمونه‌ها ٤٨ ساعت بعد برداشت و برای آنالیزهای بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفتند.

اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن (H_2O_2): بافت برگی‌تر در بافر فسفات پتاسیم (۵۰ میلی‌مول و pH=٦/٥) همگن گردیده و سپس سانتریفوژ شد. عصاره رویی با تیتانیوم کلراید ۱٪ مخلوط و دوباره سانتریفوژ گردید. میزان جذب مایع رویی در طول موج ٤١٠ نانومتر تعیین و محتوای H_2O_2 با استفاده از ضریب تصحیح ۰/۲۸ $\mu M^{-1}\ cm^{-1}$ محاسبه و بر حسب µmol g^{-1} وزن تر گزارش شد (Jana and Chaudhuri, 1981).

اندازه گیری شاخص پراکسیداسیون چربی‌ها: اندازه گیری شاخص پراکسیداسیون چربی‌ها از روی غلظت مواد واکنش دهنده با تیوباربیتوریک اسید Thiobarbituric acid reacting (substances, TBARS) صورت گرفت. بافت برگی‌تر در تری‌کلرواستیک‌اسید ۰/۱٪ همگن و سانتریفوژ گردید. به محلول رویی، تری‌کلرواستیک‌اسید ۲۰٪ حاوی تیوباربیتوریک اسید ۰/۵٪ اضافه و در حمام آب جوش قرار داده شد. واکنش در آب یخ متوقف گردیده و پس از سانتریفوژ دوم میزان جذب نوری در طول موج ٦۰۰ و ۵۳۲ نانومتر تعیین شد. پس از کسر جذب غیرویژه در٦۰۰ نانومتر، محتوای TBARS با ضریب تصحیح ۱۵۵ $mM^{-1}\ cm^{-1}$ محاسبه و بر حسب µmol/g وزن تر گزارش گردید (Heath and Pacher, 1968).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.10.0]

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی محلول و متصل به استرهای دیواره: بافت برگی‌تر با متانول ۵۰٪ همگن و پس از نگهداری درحمام آب با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد، سانتریفوژ گردید. به مایع رویی حاصل، معرف فولین و کربنات سدیم ۲۰٪ اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. میزان جذب نوری آن در طول موج ۷۲۵ نانومتر تعیین و مقدار فنول‌ها بر حسب mg/g وزن تر گزارش گردید. جهت سنجش ترکیبات فنلی متصل به استرهای دیواره، رسوب حاصل با NaOH ۰/۵ نرمال مخلوط گردید. پس از ۲٤ ساعت نگهداری در دمای آزمایشگاه، HCl ۲ نرمال اضافه شد. بعد از انجام سانتریفوژ، مقادیری از محلول رویی برداشته شده و به طور دقیق تمام مراحل سنجش ترکیبات فنلی محلول تکرار گردید. داده‌ها بر حسب mg/g وزن‌تر گزارش شد (Julkunen, 1985).

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: بافت برگی‌تر با متانول خالص همگن و سپس سانتریفوژ گردید. مایع رویی حاصل با معرف ۱،۱ دی فنیل۲- پیکریل هیدرازیل (DPPH) مخلوط و بعد از ۳۰ دقیقه قرارگیری در دمای آزمایشگاه، میزان جذب در ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه ظرفیت آنتی اکسیدانی از رابطه زیر استفاده و نتیجه بر حسب درصد گزارش گردید (Hasan *et al*, 2009).

ظرفیت آنتی اکسیدانی (%) = [(AC – AS) / AC] × 100

AC = جذب کنترل و AS = جذب نمونه

استخراج و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها: بافت برگی‌تر در دمای ٤ درجه با بافر فسفات سدیم (۱۰۰ mM و pH = ۷/۵) حاوی EDTA (۰/۱ mM) و پلی‌وینیل پلی پیرولیدون (۱٪) همگن و سانتریفوژ گردید. از محلول رویی جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز استفاده شد (Chaparzadeh *et al*, 2004).

جهت سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX)، مقدار مشخصی مایع رویی با بافر (۵۰ mM و pH = ۷/۵) حاوی ٤۰ mM گایاکول و ۲۰ mM آب اکسیژنه مخلوط گردید. با تعیین میزان جذب در ٤۷۰ نانومتر و استفاده از ضریب تصحیح ٦/۳۹ mM^{-1} cm^{-1} فعالیت آن به صورت واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین گزارش شد (Krizek *et al.*, 1998).

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، مقداری مایع رویی با بافر فسفات سدیم (۱۰۰ mM و pH = ۷/۵) حاوی ۳ mM EDTA، متیونین ۲۰۰ mM، نیترو-بلوتترازولیوم کلراید ۲/۲۵ mM، کربنات سدیم ۱/۵ M و آب مقطر مخلوط گردید. در تاریکی به نمونه‌ها ریبوفلاوین ٦۰ µM اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در معرض نور سفید قرار گرفتند. در نهایت میزان جذب در ۵٦۰ نانومتر اندازه‌گیری و یک واحد فعالیت آنزیمی به صورتی تعریف شد که بتواند از احیای نوری نیتروبلوتترازولیمکلراید ۵۰٪ جلوگیری کند. (Dhindsa *et al.*, 1981).

تجزیه و تحلیل آماری: آزمایش با پیش تیمار نیتریک اکساید و دمای پایین با انجام ٤ تکرار صورت گرفت. برای انجام تجزیه‌های آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ١٦ و Excel استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید.

نتایج و بحث:

هیدروژن پراکسید: نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر نیتریک اکساید و کاهش دمای شبانه بر افزایش محتوای هیدروژن پراکسید بافت های برگی معنی‌دار بود. برهم‌کنش نیتریک اکساید و دما بر محتوای هیدروژن پراکسید تاثیری نداشت (جدول ۱). کاهش دما در حضور یا عدم حضور نیتریک اکساید موجب افزایش معنی دار میزان H_2O_2 بافت‌ها گردید (شکل ۱). H_2O_2 در کلروپلاست‌ها از طریق واکنش مهلر، در پراکسی‌زوم‌ها از طریق تنفس‌نوری و چرخه گلی‌اگزیلات، در میتوکندری‌ها در مسیر انتقال الکترون و در غشاء پلاسمایی توسط پراکسیدازها و NADPH اکسیدازها تولید می‌شود (Hung *et al.*, 2005). H_2O_2 به طور مستقیم توسط کاتالاز و یا به وسیله چرخه آسکوربات– گلوتاتیون تجزیه شده و به این ترتیب از آسیب سلولی جلوگیری می گردد (Hung *et al.*, 2005). در تایید این نتایج افزایش محتوای H_2O_2 در برگ‌های نخود تحت تیمار سدیم نیتروپروساید و در

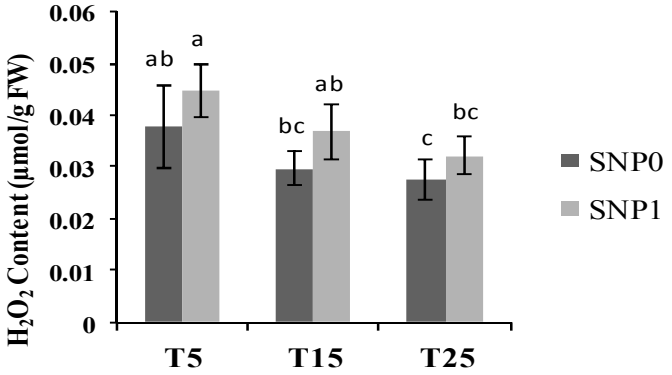
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.10.0]

جدول ١- تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی اندازه گیری شده

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)						
		پراکسیدهیدروژن	TBARS	ترکیبات فنلی محلول	ترکیبات فنلی متصل به دیواره	ظرفیت آنتی اکسیدانی کل	آنزیم پراکسیداز	آنزیم سوپر اکسیددیسموتاز
نیتریک اکساید	١	$٢/٢٧٠\times١٠^{-٤}$***	$٢/٩٣٨\times١٠^{-١٠}$ ns	٦٢١٤***	١٨٠٥/٩٠٩***	١٨/٩٤٨***	٠/٠٣١ns	$٢/١٩\times١٠^{-٥}$ns
دما	٢	$٢/٧٥٣\times١٠^{-٤}$***	$١/٨١١\times١٠^{-٤}$***	٤٨٤٨***	٤١٢/٥٩٩**	٢١/٧٠٢***	٢/٧٥١***	٠/٠٠١*
نیتریک اکساید × دما	٢	$٣/١٥٧\times١٠^{-٦}$ns	$٩/٥٦٩\times١٠^{-٧}$ns	٢٥٠ns	١٦٢/٩٨٧ns	٢٠/٠٢٧***	٠/٠٩٤ns	٠/٠٠١**
خطا	١٨	$٢/٦٦٦\times١٠^{-٥}$	$١/١١٠\times١٠^{-٥}$	٧٨/٦	٦٩/١٣٧	٠/٨٦٩	٠/٠٣٩	$١/٥٦\times١٠^{-٤}$
کل	٢٣							

***، ** و *** به ترتیب بیانگر معنی‌داری در سطح P= ٠/٠٥ و P= ٠/ ٠١ و P=٠/٠٠١ و ns بیانگر بی‌معنی‌بودن می‌باشند.**

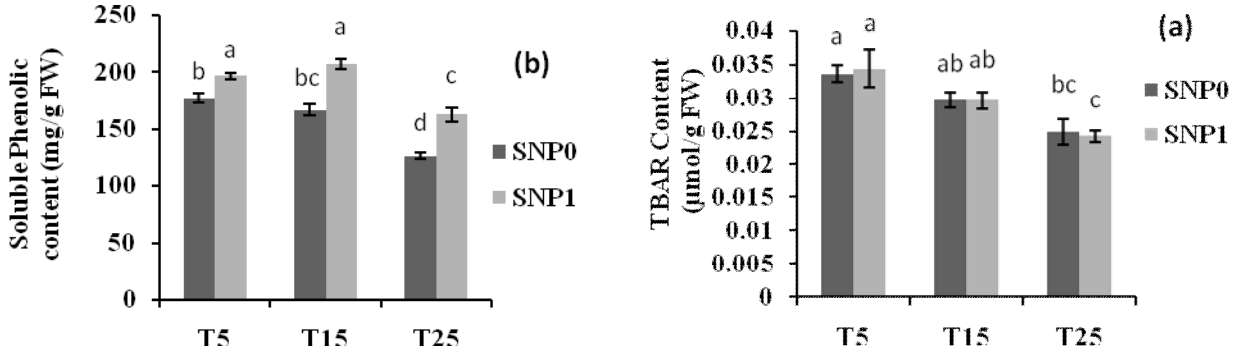


شکل١- اثر نیتریک اکساید و دما بر محتوای H_2O_2 برگ‌ها. داده‌ها میانگین ٤ تکرار ± SE و حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ٥ درصد است. (T5، T15 و T25 به ترتیب دمای شبانه به میزان ٥، ١٥ و ٢٥ درجه سانتیگراد).

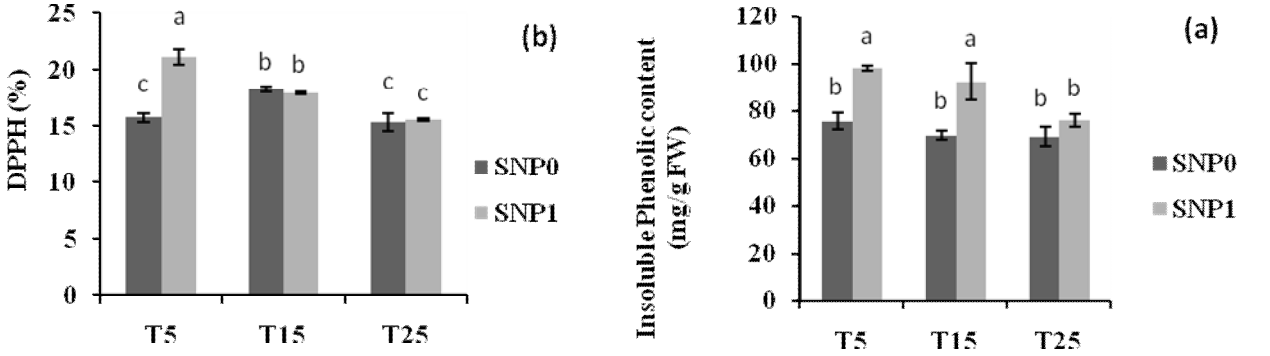
برگ‌های خیار تحت تنش سرما مشاهده شده است (Lee and Lee, 2000; Sheokand *et al.*, 2010). در مطالعه حاضر احتمال می‌رود که کاهش دما با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن از جمله آنیون سوپراکسید منجر به تشکیل H_2O_2 می‌شود. افزایش H_2O_2 در اثر کاهش دما را می توان به فعالیت کم آنزیم‌های تجزیه کننده H_2O_2 نیز نسبت داد. احتمال دارد سدیم نیتروپروساید در غلظت به کار رفته در این تجربه نیز به عنوان اکسیدان عمل نموده و با ایجاد تنش اکسیداتیو باعث افزایش H_2O_2 گردیده است.

شاخص پراکسیداسیون چربی‌ها: نیتریک اکساید و نیز برهم‌کنش بین نیتریک اکساید و دما بر مقدار TBARS بافت های برگی به عنوان شاخص پراکسیداسیون چربی‌ها تاثیری نداشت (جدول ١). کاهش دما موجب افزایش معنی دار پراکسیداسیون چربی‌ها شد. بدین معنی که بیشترین مقدار در دمای ٥ درجه و کمترین مقدار در دمای ٢٥ درجه قرار داشت (شکل ٢a). گزارشی مبنی بر نقش کاهش دهندگی نیتریک اکساید در پراکسیداسیون چربی‌ها وجود دارد (Singh *et al.*, 2014). غشاهای سلولی عمده‌ترین هدف آسیب سرمایی می‌باشند. با کاهش دما و تغییر نسبت اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع، چربی‌های موجود در غشاء سلول‌های گیاهی از حالت مایع- کریستالی به حالت جامد تبدیل می‌شوند. در سیالیت کم غشاءها اجزاء پروتئینی آنها نمی‌توانند عملکرد مناسب داشته باشند. تنش اکسیداتیو در دماهای پایین به وسیله گونه‌های فعال اکسیژن انجام می‌شود. مالون‌دی‌آلدئید (عمده ترین TBARS) محصول نهایی پراکسیداسیون چربی‌ها است و برای ارزیابی پراکسیداسیون چربی‌ها استفاده می‌شود

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.10.0]



شکل۲- اثر نیتریک اکساید و دما بر محتوای TBARS برگ‌ها (a) و محتوای ترکیبات فنلی محلول برگ‌ها(b). داده‌ها میانگین ٤ تکرار ± SE و حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است. (T5، T15 و T25 به ترتیب دمای شبانه به میزان ۵، ۱۵ و ۲۵ درجه سانتیگراد).

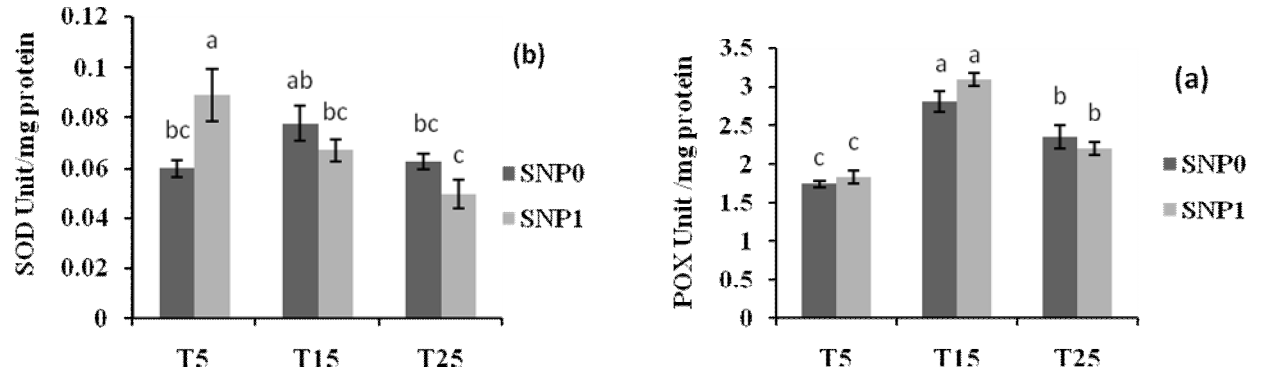


شکل۳- اثر نیتریک اکساید و دما بر محتوای ترکیبات فنلی متصل به دیواره های سلولی برگ ها(a) ظرفیت آنتی اکسیدانی کل برگ ها (b). داده‌ها میانگین ٤ تکرار ± SE و حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است. (T5، T15 و T25 به ترتیب دمای شبانه به میزان ۵، ۱۵ و ۲۵ درجه سانتیگراد).

(Zeng *et al.*, 2011). تصور می‌شود انباشتگی TBARS به وسیله تجزیه اکسیداتیو اسیدهای چرب غیراشباع، به ویژه لینولنیک اسید صورت گیرد که عمدتا در گلیکولیپیدهای تیلاکوئید قرار دارد (Yu *et al.*, 2013). گیاهان با به کارگیری سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی، غشاهای سلولی و اندامک‌ها را از آسیب‌های ایجاد شده به وسیله گونه‌های فعال اکسیژن محافظت می‌کنند (Lee and Lee, 2000). مطابق با نتایج حاضر در این مطالعه افزایش معنی‌دار محتوای TBARS در گیاه سویا تحت تنش سرما گزارش شده است (Toda *et al.*, 2011). گمان می‌رود که پراکسیداسیون چربی‌ها یک نشانگر وجود واکنش های رادیکال آزاد نا مطلوب در بافت‌ها است.

ترکیبات فنلی: نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول۱) نشان داد که نیتریک اکساید و کاهش دما موجب افزایش معنی‌دار محتوای ترکیبات فنلی محلول برگ ها شدند (شکل ۲b). برهم‌کنش بین نیتریک اکساید و دما بر محتوای ترکیبات فنلی تاثیری نداشت. روند تغییرات در محتوای ترکیبات فنلی متصل به استرهای دیواره مشابه فنل‌های محلول بود (جدول۱ و شکل ۳a). ترکیبات فنلی گروه بزرگ و متنوعی از متابولیت‌های ثانویه آروماتیک در گیاهان می‌باشند (Rispail *et al.*, 2005). تنش‌های غیر زیستی از جمله دماهای پایین با تغییرات مولکولی، بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی رشد و نمو گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهند. در تأیید این نتایج، افزایش سطح ترکیبات فنلی در برگ‌های گندم تحت تنش سرما نیز گزارش شده است (Koc *et al.*, 2010).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.10.0]



شکل٤- اثر نیتریک اکساید و دما بر فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ ها (a) و فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز برگ‌ها(b). داده‌ها میانگین ٤ تکرار ± SE و حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ٥ درصد است. (T5، T15 و T25 به ترتیب دمای شبانه به میزان ٥، ١٥ و ٢٥ درجه سانتیگراد).

سنتز و آزاد شدن فنل‌ها به وسیله عوامل مختلف زیستی و غیرزیستی القاء می‌شود. فنیل آلانین آمونیالیاز که فنیل آلانین را به سینامیک اسید تبدیل می‌کند از جمله آنزیم‌های مهم در مسیر بیوسنتز فنل‌ها می‌باشد که گمان می‌رود با کاهش دما، افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن به عنوان پیامی در افزایش فعالیت آنریم مذکور عمل نموده باشد. اشکال استر ترکیبات فنلی می‌توانند به عنوان سوبسترا برای پراکسیدازهای واکوئلی در سیستم پراکسیداز/ فنولیک/ آسکوربات استفاده شوند که از این طریق می‌توانند سلول‌ها را در برابر گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در طی تنش محافظت کنند (Weidner *et al*, 2009). پیش ساز اصلی برای سنتز فنل در بافت‌های گیاهی کربوهیدرات‌ها، به ویژه کربوهیدرات‌های محلول هستند. بنابراین کاهش در ترکیبات فنلی ممکن است به علت کاهش در کربوهیدرات‌های محلول در شرایط تنش باشد (Shallan *et al.*, 2012). تصور می‌شود که نیتریک اکساید به طور غیر مستقیم با تحت تأثیر قرار دادن متابولیسم کربوهیدرات‌ها، آنها را به سمت سنتز ترکیبات فنلی جهت افزایش تحمل گیاه نسبت به کاهش دما هدایت کند.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: اثر دما و نیتریک اکساید و نیز برهم‌کنش بین آنها بر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل معنی‌دار بود (جدول ١). بدین معنی که حضور نیتریک اکساید به همراه کاهش دما باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل گردید. در واقع بیشترین ظرفیت آنتی اکسیدانی در دمای ٥ درجه و در حضور نیتریک اکساید و کمترین ظرفیت آنتی اکسیدانی در دمای ٢٥ درجه (در حضور و یا عدم حضور نیتریک اکساید) مشاهده شد (شکل ٣b). DPPH یک رادیکال آزاد می‌باشد که فعالیت جاروب کنندگی آن وابسته به آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند گلوتاتیون، پلی‌فنل‌ها و فلاوونوئیدها است. نیتریک اکساید خارجی می‌تواند سنتز متابولیت‌های آنتی‌اکسیدان از جمله گلوتاتیون را القاء نماید. افزایش ظرفیت جاروب کننده DPPH با استفاده از سدیم نیتروپروساید در برگ‌های گیاه خیار تحت تنش کادمیوم گزارش شده است (Yu *et al.*, 2013). احتمال می‌رود نیتریک اکساید به طور غیر مستقیم با دخالت در القاء ژن‌های مسئول تولید آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل را افزایش می‌دهد.

فعالیت آنزیم پراکسیداز: تیمار با نیتریک اکساید و نیز برهم‌کنش بین نیتریک اکساید و دما بر فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ ها تاثیری نداشت ولی اثر دما معنی‌دار بود (جدول ١). بیشترین فعالیت آنزیم در دمای ١٥ درجه و کمترین آن در ٥ درجه مشاهده گردید (شکل ٤a). پراکسیداز پروتئین دارای هم است که از H_2O_2 برای اکسیداسیون مواد آلی و غیرآلی استفاده می‌کند. این آنزیم عمدتا در دیواره سلولی قرار داشته و دارای نقش‌های مختلفی از جمله جاروب کردن H_2O_2 می‌باشد (Mafakheri *et al.*, 2011). افزایش فعالیت پراکسیدازها در دانه‌رست‌های گیاه ذرت در اثر کاهش دما گزارش شده است (Prasad *et al.*, 1995). با توجه به کاهش فعالیت آنزیم

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.10.0]

پراکسیداز در دمای ۵ درجه و نیز افزایش غلظت پراکسید هیدروژن در دمای مذکور در این مطالعه و با در نظر گرفتن نقش اصلی آنزیم پراکسیداز در تجزیه پراکسید هیدروژن می-توان چنین ارزیابی کرد که دمای ۵ درجه، برای فعالیت آنزیم پراکسیداز دمای بهینه نبوده، بنابراین پراکسید هیدروژن توسط آنزیم تجزیه نشده و افزایش می‌یابد. می‌توان چنین استنباط کرد که تولید بیشتر پراکسید هیدروژن در دمای ۵ درجه باعث افزایش محتوای H_2O_2 و پراکسیداسیون چربی‌های غشاء های سلولی و اکسیداسیون پروتئین‌ها می‌شود. از طرف دیگر محدود شدن توان آنزیمی پراکسیداز می تواند با افزایش توان آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی مانند ترکیبات فنلی جبران گردد (شکل‌های ۲ و ۳).

فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز: نیتریک اکساید بر فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز بافت های برگی تاثیر معنی داری نداشت. اثر دما و نیز برهم‌کنش بین نیتریک اکساید و دما بر فعالیت این آنزیم معنی‌دار بود (جدول ۱). بیشترین فعالیت آنزیم در دمای ۵ درجه و در حضور نیتریک اکساید و کمترین فعالیت آنزیم در دمای ۲۵ درجه و در حضور نیتریک اکساید قرار داشت (شکل ٤b). سوپراکسیددیسموتاز جزء متالوآنزیم هایی است که سوپراکسید را به پراکسیدهیدروژن و اکسیژن تبدیل می کند. سوپراکسیددیسموتاز یکی از مهمترین آنزیم‌هایی است که در دفاع گیاهان بر علیه تنش اکسیداتیو مورد استفاده قرار می گیرد. آنزیم فوق در همه انواع سلول های گیاهی وجود دارد. این تحقیق بر فعالیت کل آنزیم سوپراکسیددیسموتاز متمرکز است در صورتیکه آنزیم دارای ایزوفرم های خاصی است. ممکن است تیمار سرمایی اثرات متفاوت بر روی ایزوفرم ها داشته باشند، به ویژه اینکه فعالیت آنزیم می تواند به سن و نوع بافت، و همین طور سطح تنش وابسته باشد (Chaparzadeh *et al.*, 2004). تحت تیمار نیتریک اکساید افزایش فعالیت سوپراکسیددیسموتاز در برگ‌های گیاه خیار تحت تنش سرما مشاهده شده است (Lee and Lee, 2000). پیشنهاد شده که نیتریک اکساید به وسیله تحت تأثیر قرار دادن سنتز پروتئین آنزیم، فعالیت سوپراکسیددیسموتاز را افزایش می دهد (Liu *et al.*, 2011). سیستم آنزیمی سوپراکسیددیسموتاز به وسیله محرک‌های محیطی و نموی در گیاهان در سطح بیان ژن به شدت تنظیم می‌شود (Jevremovic *et al.*, 2010). در تجربه حاضر بیشترین فعالیت آنزیم در دمای ۵ درجه در اثر القای نیتریک اکساید مشاهده شد. در تایید این نتایج افزایش مقدار mRNA سوپراکسیددیسموتاز تحت تیمار سرما در توتون مشاهده شده است (Kang and Saltveit, 2002). نقش نیتریک اکساید در کاهش تنش اکسیداتیو ممکن است بخشی به توانایی نیتریک اکساید در القاء آنزیم سوپراکسیددیسموتاز مربوط باشد. آنیون سوپراکسید بسیار سمی و واکنش‌پذیر است و قابلیت تبدیل به سایر گونه‌های سمی را نیز دارا می‌باشد. نیتریک اکساید با تسریع تبدیل آنیون سوپراکسید به پراکسید هیدروژن آن را از سمیت خارج می‌کند. از طرف دیگر اثرات مثبت القایی نیتریک اکساید روی آنزیم‌های آنتی اکسیدان دیگر نیز مانند آسکوربات پراکسیداز در شرایط تنش دیگر در دست است (Shi *et al.*, 2007).

نتیجه گیری:

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که دماهای شبانه پایین به عنوان تنش محیطی با تاثیر بر متابولیسم بافت های برگی گیاه نخود موجب تولید گونه های فعال اکسیژن شده و ایجاد تنش ثانویه اکسیداتیو می‌نمایند. طی این فرایند با پراکسیداسیون چربی ها یکپارچگی غشاهای سلولی آسیب می¬بیند. گیاه نخود جهت مقابله با تنش اکسیداتیو توان آنتی اکسیداتیو خود به ویژه توان آنتی اکسیداتیو غیر آنزیمی را افزایش می‌دهد. تیمار نیتریک اکساید در پژوهش حاضر اثر چندان مثبتی بر افزایش این توان نشان نداد، لذا بررسی غلظت های متفاوت از آن ضروری است.

سپاسگزاری:

نویسندگان از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید مدنی آذربایجان به سبب حمایت‌های مالی کمال تشکر را دارند.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.10.0]

منابع:

Chaparzadeh, N., D'Amico, M. L., Khavari-Nejad, R. A., Izzo, R. and Navari-Izzo, F. (2004) Antioxidative responses of *Calendula officinalis* L. under salinity conditions, Plant Physiology and Biochemistry 42: 695-701.

Dasgupta, S., Satvat, P. S. and Mahindrakar, A. B. (2011) Ability of *Cicer arietinum* (L.) for bioremoval of lead and chromium from soil. International Journal of Technology and Engineering System 2: 338-341.

Dhindsa, R. A., Plumb-Dhindsa, P. and Thorpe, T. A. (1981) Leaf senescence correlated with increased permeability and peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. Journal of Experimental Botany 126: 93-101.

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.

Hasan, S. R., Hossain, M. M., Akter, R., Jamila, M., Mazumder, M. E. H. and Rahman, S. (2009) DPPH free radical scavenging activity of some Bangladeshi medicinal plants. Journal of Medicinal Plants Research 3: 875-879.

Heath, R.L. and Pacher, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I: kineticks and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archive of Biochemistry and Biophysics 125:189-198.

Hung, S. H., Yu, C. W. and Lin, C. H. (2005) Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. Botanical Bulletin Academia Sinica 46: 1-10.

Jana, S. and Chaudhuri, M.A. (1981) Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging. Aquatic Botany 12: 345-354.

Jevremovic, S., Petric, M., Zivkovic, S., Trifunovic, M. and Subotic, A. (2010) Superoxide dismutase activity and isoenzyme profiles in bulbs of snake's head fritillary in response to cold treatment. Archives of Biological Sciences 62: 553-558.

Julkunen-Tiitto, R. (1985) Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. Journal of Agricultural and Food Chemistry 33: 213-217.

Kang, H. M. and Saltveit, M. E. (2002) Effect of chilling on antioxidant enzymes and DPPH-radical scavenging activity of high-and low-vigour cucumber seedling radicles. Plant, Cell & Environment 25: 1233-1238.

Koc, E., Islek, C. and Ustun, A. S. (2010) Effect of cold on protein, proline, phenolic compounds and chlorophyll content of two pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. Gazi University Journal of Science 23: 1-6.

Krizek, D. T., Britz, S. J. and Mirecki, R. M. (1998) Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. Newred fire lettuce. Physiologia Plantarum 103:1-7.

Lamattina, L., Garcia-Mata, C., Graziano, M. and Pagnussat, G. (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. Annual Review of Plant Biology 54: 109-136.

Lee, D. H. and Lee, C. B. (2000) Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. Plant Science 159: 75-85.

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.

Mafakheri, A., Siosemardeh, A., Bahramnejad, B., Struik, P.C. and Sohrabi, Y. (2011) Effect of drought stress and subsequent recovery on protein, carbohydrate contents, catalase and peroxidase activities in three chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars. Australian Journal of Crop Science 10: 1255-1260.

Neill, S. J., Desikan, R. and Hancock, J. T. (2003) Nitric oxide signaling in plants. New Phytologist 159: 11-35.

Prasad, T. K., Anderson, M. D. and Stewart, C. R. (1995) Localization and characterization of peroxidases in the mitochondria of chilling-acclimated maize seedlings. Plant physiology 108: 1597-1605.

Rispail, N., Morris, P. and Webb, K. J. (2005) Phenolic compounds: extraction and analysis. In: *Lotus japonicus* Handbook (eds. Marquez, A. J., Stougaard, J., Udvardi, M., Parniske, M., Spaink, H., Saalbach, G., Webb, K. J. and Chiurazzi, M.), Pp.349-354. Springer Publishing Co, New York USA.

Ruelland, E. and Zachowski, A. (2010) How plants sense temperature. Environmental and Experimental Botany 69: 225-232.

Singh N. B., Kavita Y. and Nimisha, A. (2014) Positive effects of nitric oxide on *Solanum lycopersicum*. Journal of Plant Interactions 9: 10-18.

Shallan, M. A., Hassan, H. M., Namich, A. A. and Ibrahim, A. A. (2012) Effect of sodium niroprusside, putrescine and glycine betaine on alleviation of drought stress in cotton plant. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences 12: 1252-1265.

Sheokand, S., Bhankar, V. and Sawhney, V. (2010) Ameliorative effect of exogenous nitric oxide on oxidative metabolism in NaCl treated chickpea plants. Brazilian Journal of Plant Physiology 22: 81-90.

Shi, Q., Ding, F., Wang, X. and Wei, M. (2007) Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. Plant Physiology and Biochemistry 45: 542-550.

Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H. and Basalah, M. O. (2010) Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. Protoplasma 248: 447-455.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.10.0]

(2009) Phenolic compounds and properties of antioxidants in grapevine roots (*Vitis vinifer*a L.) under low temperature stress followed by recovery. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 78: 279-286.

Yu, L., Gao, R., Shi, Q., Wang, X., Wei, M. and Yang, F. (2013) Exogenous application of sodium nitroprusside alleviated cadmium induced chlorosis, photosynthesis inhibition and oxidative stress in cucumber. Pakistan Journal of Botany 45: 813-819.

Zeng, C. L., Liu, L., Wang, B. R., Wu, X. M. and Zhou, Y. (2011) Physiological effects of exogenous nitric oxide on *Brassica juncea* seedlings under NaCl stress. Biologia Plantarum 55: 345-348.

Thakare, U., Patil, N. and Malpathak, N. (2012) Impact of soil oxygenation on seed quality of chickpea (*Cicer arietinum* Linn. *cv.*'vijay') under organic farming condition. Indian Journal of Natural Products and Resources 3: 73-78.

Toda, K., Takahashi, R., Iwashina, T. and Hajika, M. (2011) Difference in chilling-induced flavonoid profiles, antioxidant activity and chilling tolerance between soybean near-isogenic lines for the pubescence color gene. Journal of Plant Research 124: 173-182.

Weidner, S., Kordala, E., Brosowska-Arendt, W., Karamac, M., Kosinska, A. and Amarowicz, R.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.10.0]