

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

نادر چاپارزاده<sup>۱\*</sup>، معصومه فرجی<sup>۱</sup>، محمد پازنگ<sup>۱</sup> و علیرضا محمدپور<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست شناسی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران و <sup>۲</sup> 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 تنش های زیستی و غیرزیستی گیاهان دارد. دماهای پایین یکی از عوامل محدود کننده بقاء، تولیدمثل و توزیع جغرافیایی گیاهان در بیشتر مناطق دنیا محسوب می شود. دماهای پایین با تغییرات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و تغییرات مولکولی منجر به تنش اکسیداتیو می گردند. 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 سانتی گراد) مطالعه شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار جهت سنجش ترکیباتی مانند محتوای هیدروژن پراکساید، شاخص پراکسیداسیون چربی ها، ترکیبات فنلی محلول و نا محلول، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و فعالیت آنزیم های 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 معنی دار بود ولی بر شاخص پراکسیداسیون چربی ها، فعالیت آنزیم های پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز معنی دار نبود. تغییر دما بر کلیه صفات مذکور تأثیر معنی داری داشت. برهم کنش سدیم نیتروپروساید و دما بر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز معنی دار بود، ولی بر محتوای هیدروژن پراکساید، شاخص پراکسیداسیون چربی ها، ترکیبات فنلی محلول و نامحلول و فعالیت آنزیم پراکسیداز معنی دار نبود.

کلمات کلیدی: دمای پایین، گونه های فعال اکسیژن، نخود، نیتریک اکساید

### مقدمه:

نیتریک اکساید (Nitric Oxide) یک گونه فعال نیتروژنی است که به علت ویژگی های خاص (رادیکال آزاد، اندازه کوچک، عمر کوتاه و قابلیت انتشار بالا از عرض غشاء های زیستی) در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی گیاهان مانند رشد و نمو، جوانه زنی، بلوغ و پیری، حرکت روزنه ها و مرگ برنامه ریزی شده سلولی دخالت می کند (Liu et al, 2011). نیتریک اکساید با گونه های فعال اکسیژن، گروه های تیول ها و پروتئین ها واکنش می دهد. آن می تواند با توجه به غلظت و محل اثر بر

انواع تنش های زیستی و غیرزیستی منجر به تولید گونه های فعال اکسیژن در بافت های گیاهی می شوند. انباشتگی گونه های فعال اکسیژن در بافت ها باعث آسیب به پروتئین ها، چربی ها، کربوهیدرات ها و DNA شده و در نهایت منجر به آسیب اکسیداتیو می گردند (Gill and Tuteja, 2010). گیاهان سیستم های آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی برای جاروب شدن گونه های فعال اکسیژن را در طول تکامل به دست آورده اند.

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 گونه‌های 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 ۱۴ ساعت نور و ۱۰ ساعت تاریکی،

جریان فوتون فتوستنتزی ۲۵۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه، رطوبت ۴۵-۳۵ درصد و دمای  $25 \pm 1$  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 نیتروپروپوساید (SNP0) و گروه دوم با محلول هوگلند حاوی ۰/۱ میلی‌مولار سدیم نیتروپروپوساید (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 سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌ها ۴۸ ساعت بعد برداشت و برای آنالیزهای بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفتند.

**اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ):** بافت برگ‌تری در بافر فسفات پتاسیم (۵۰ میلی‌مول و  $pH=7.5$ ) همگن گردیده و سپس سانتریفوژ شد. عصاره رویی با تیتانیوم کلراید ۱٪ مخلوط و دوباره سانتریفوژ گردید. میزان جذب مایع رویی در طول موج ۴۱۰ نانومتر تعیین و محتوای  $H_2O_2$  با استفاده از ضریب تصحیح  $0.28 \mu M^{-1} cm^{-1}$  محاسبه و بر حسب  $\mu mol g^{-1}$  وزن تر گزارش شد (Jana and Chaudhuri, 1981).

**اندازه‌گیری شاخص پراکسیداسیون چربی‌ها:** اندازه‌گیری شاخص پراکسیداسیون چربی‌ها از روی غلظت مواد واکنش دهنده با تیوباربیتوریک اسید Thiobarbituric acid reacting substances, TBARS) صورت گرفت. بافت برگ‌تری در تری‌کلرواستیک اسید ۰/۱٪ همگن و سانتریفوژ گردید. به محلول رویی، تری‌کلرواستیک اسید 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 ۶۰۰ و ۵۳۲ نانومتر تعیین شد. پس از کسر جذب غیرویزه در ۶۰۰ نانومتر، محتوای TBARS با ضریب تصحیح  $155 mm^{-1} cm^{-1}$  محاسبه و بر حسب  $\mu mol/g$  وزن تر گزارش گردید (Heath and Pacher, 1968).

میلی گرم 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-بلوترتروزولیوم کلراید ۲/۲۵ mM، کربنات سدیم ۱/۵ M و آب مقطر مخلوط گردید. در تاریکی به نمونه‌ها ریبوفلاوین  $\mu\text{M}$  ۶۰ اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در معرض نور سفید قرار گرفتند. در نهایت میزان جذب در ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری و یک واحد فعالیت آنزیمی به صورتی تعریف شد که بتواند از احیای نوری نیتروبلوترتروزولیمکلراید ۵۰٪ جلوگیری کند. (Dhindsa et al., 1981).

**تجزیه و تحلیل آماری:** آزمایش با پیش تیمار نیتریک اکساید و دمای پایین با انجام ۴ تکرار صورت گرفت. برای انجام تجزیه‌های آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ 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 برگ می‌دار بود. برهم‌کنش نیتریک اکساید و دما بر محتوای هیدروژن پراکسید تأثیری نداشت (جدول ۱). کاهش دما در حضور یا عدم حضور نیتریک اکساید موجب افزایش معنی دار میزان  $\text{H}_2\text{O}_2$  بافت‌ها گردید (شکل ۱).  $\text{H}_2\text{O}_2$  در کلروپلاست‌ها از طریق واکنش مهلر، در پراکسی‌زوم‌ها از طریق تنفس نوری و چرخه گلی‌اگزالات، در میتوکندری‌ها در مسیر انتقال الکترون و در غشاء پلاسمایی توسط پراکسیدازها و NADPH اکسیدازها تولید می‌شود (Hung et al., 2005).  $\text{H}_2\text{O}_2$  به طور مستقیم توسط کاتالاز و یا به وسیله چرخه آسکوربات-گلوتاتیون تجزیه شده و به این ترتیب از آسیب سلولی جلوگیری می‌گردد (Hung et al., 2005). در تایید این نتایج افزایش محتوای  $\text{H}_2\text{O}_2$  در برگ‌های نخود تحت تیمار سدیم نیتروپروساید و در

### اندازه‌گیری ترکیبات فنلی محلول و متصل به استرهای

**دیواره:** بافت برگ‌تری با متانول ۵۰٪ همگن و پس از نگهداری در حمام آب با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ 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 ۲۴ ساعت نگهداری در دمای آزمایشگاه، ۲ HCl نرمال اضافه شد. بعد از انجام سانتریفیوژ، مقادیری از محلول رویی برداشته شده و به طور دقیق تمام مراحل سنجش ترکیبات فنلی محلول تکرار گردید. داده‌ها بر حسب mg/g وزن تر گزارش شد (Julkunen, 1985).

### اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: بافت برگ‌تری با

متانول خالص همگن و سپس سانتریفیوژ گردید. مایع رویی حاصل با معرف ۱،۱ دی فنیل ۲- 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).

$$\text{ظرفیت آنتی اکسیدانی (\%)} = [(AC - AS) / AC] \times 100$$

AC = جذب کنترل و AS = جذب نمونه

### استخراج و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها: بافت برگ‌تری در

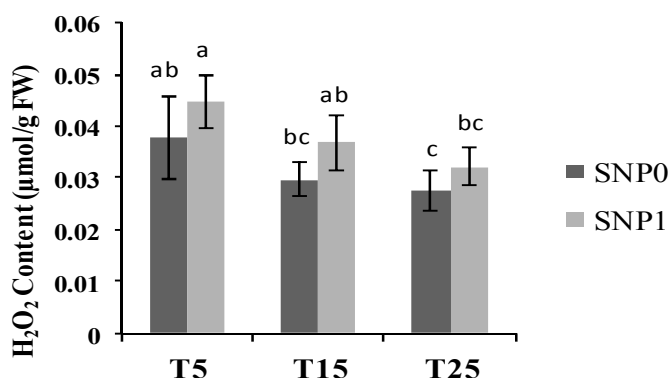
دمای ۴ درجه با بافر فسفات سدیم (۱۰۰ mM و pH = ۷/۵) حاوی EDTA (۰/۱ mM) و پلی‌وینیل پلی‌پیرولیدون (۰/۱٪) همگن و سانتریفیوژ گردید. از محلول رویی جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز استفاده شد (Chaparzadeh et al, 2004).

جهت سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX)، مقدار مشخصی مایع رویی با بافر (۵۰ mM و pH = ۷/۵) حاوی ۴۰ mM گایاکول و ۲۰ mM آب اکسیژنه مخلوط گردید. با تعیین میزان جذب در ۴۷۰ نانومتر و استفاده از ضریب تصحیح  $6/39 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  فعالیت آن به صورت واحد آنزیمی بر

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی اندازه گیری شده

میانگین مربعات (MS)							پراکسید هیدروژن	تغییر
آنزیم سوپر	آنزیم	ظرفیت آنتی	ترکیبات فنلی	ترکیبات	TBARS	آزیم		
اکسید دیسموتاز	پراکسیداز	اکسیدانی کل	متصل به دیواره	فنلی محلول				
$2/19 \times 10^{-5} ns$	$0/031 ns$	$18/948 ***$	$1805/909 ***$	$6214 ***$	$2/938 \times 10^{-10} ns$	$2/270 \times 10^{-4} ***$	۱	نیتریک اکساید
$0/001 *$	$2/751 ***$	$21/702 ***$	$412/599 **$	$4848 ***$	$1/811 \times 10^{-4} ***$	$2/753 \times 10^{-4} ***$	۲	دما
$0/001 **$	$0/094 ns$	$20/027 ***$	$162/987 ns$	$250 ns$	$9/569 \times 10^{-6} ns$	$3/157 \times 10^{-6} ns$	۲	نیتریک اکساید x دما
$1/56 \times 10^{-4}$	$0/039$	$0/869$	$69/137$	$78/6$	$1/110 \times 10^{-5}$	$2/666 \times 10^{-5}$	۱۸	خطا
							۲۳	کل

\*\*\*، \*\*، \* به ترتیب بیانگر معنی داری در سطح  $P = 0/05$  و  $P = 0/01$  و  $P = 0/001$  و ns بیانگر بی معنی بودن می باشد.

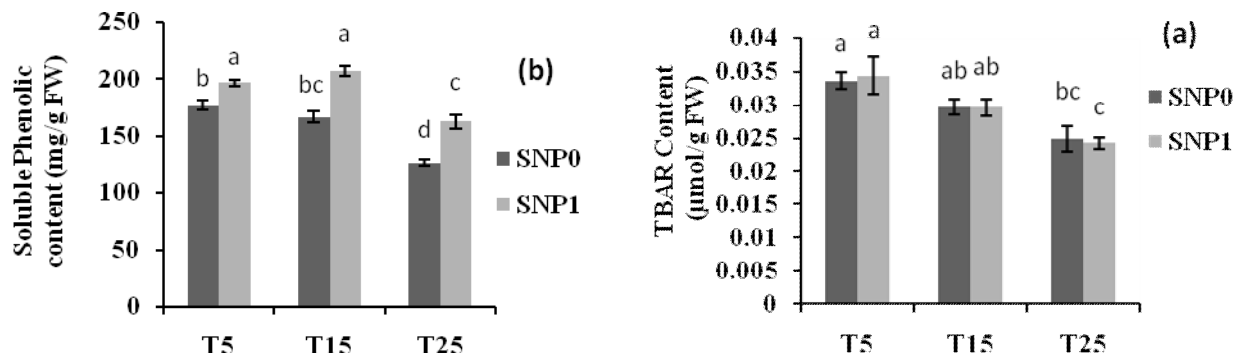


شکل ۱- اثر نیتریک اکساید و دما بر محتوای H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> برگ ها. داده ها میانگین ۴ تکرار  $\pm$  SE و حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است. (T5، T15 و T25 به ترتیب دمای شبانه به میزان ۵، ۱۵ و ۲۵ درجه سانتیگراد).

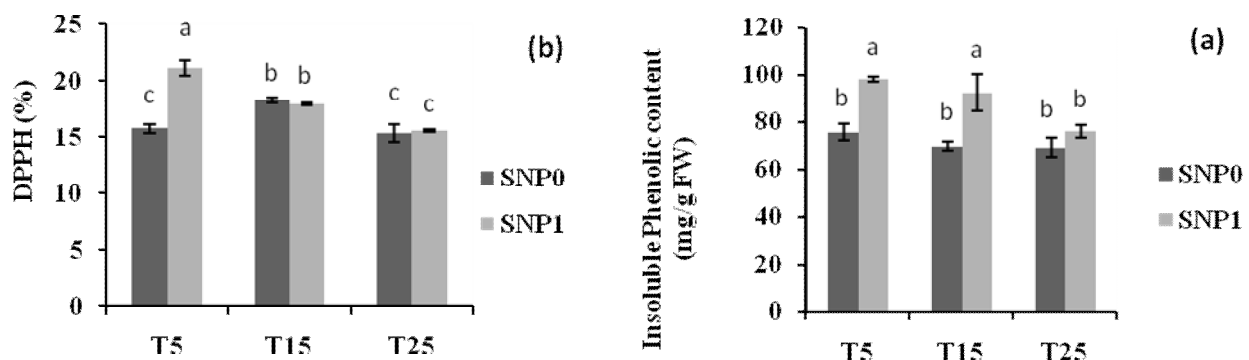
پراکسیداسیون چربی ها شد. بدین معنی که بیشترین مقدار در دمای ۵ درجه و کمترین مقدار در دمای ۲۵ درجه قرار داشت (شکل ۲a). گزارشی مبنی بر نقش کاهش دهندگی نیتریک اکساید در پراکسیداسیون چربی ها وجود دارد (Singh *et al.*, 2014). غشاهای سلولی عمده ترین هدف آسیب سرمای می باشند. با کاهش دما و تغییر نسبت اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع، چربی های موجود در غشاء سلول های گیاهی از حالت مایع- کریستالی به حالت جامد تبدیل می شوند. در سیالیت کم غشاءها اجزاء پروتئینی آنها نمی توانند عملکرد مناسب داشته باشند. تنش اکسیداتیو در دماهای پایین به وسیله گونه های فعال اکسیژن انجام می شود. مالون دی آلدئید (عمده ترین TBARS) محصول نهایی پراکسیداسیون چربی ها است و برای ارزیابی پراکسیداسیون چربی ها استفاده می شود

برگ های خیار تحت تنش سرما مشاهده شده است (Lee and Lee, 2000; Sheokand *et al.*, 2010). در مطالعه حاضر احتمال می رود که کاهش دما با افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن از جمله آنیون سوپراکسید منجر به تشکیل H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> می شود. افزایش H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در اثر کاهش دما می توان به فعالیت کم آنزیم های تجزیه کننده H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> گردیده است.

**شاخص پراکسیداسیون چربی ها:** نیتریک اکساید و نیز برهم کنش بین نیتریک اکساید و دما بر مقدار TBARS بافت های برگگی به عنوان شاخص پراکسیداسیون چربی ها تأثیری نداشت (جدول ۱). کاهش دما موجب افزایش معنی دار



شکل ۲- اثر نیتریک اکساید و دما بر محتوای TBARS برگ‌ها (a) و محتوای ترکیبات فنلی محلول برگ‌ها (b). داده‌ها میانگین  $\pm$  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).

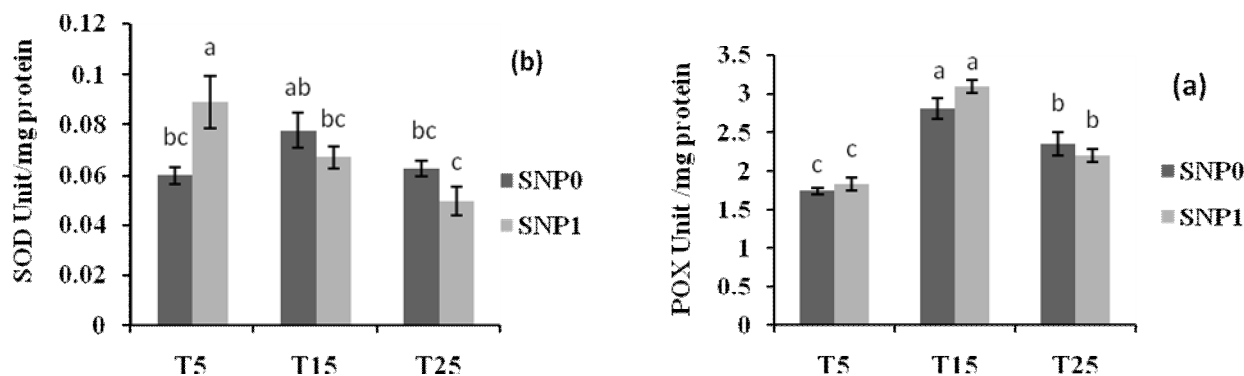


شکل ۳- اثر نیتریک اکساید و دما بر محتوای ترکیبات فنلی متصل به دیواره های سلولی برگ‌ها (a) ظرفیت آنتی اکسیدانی کل برگ‌ها (b). داده‌ها میانگین  $\pm$  SE و حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است. (T5, T15 و T25 به ترتیب دمای شبانه به میزان ۵، ۱۵ و ۲۵ درجه سانتیگراد).

(جدول ۱) نشان داد که نیتریک اکساید و کاهش دما موجب افزایش معنی‌دار محتوای ترکیبات فنلی محلول برگ‌ها شدند (شکل ۲b). برهم‌کنش بین نیتریک اکساید و دما بر محتوای ترکیبات فنلی تأثیری نداشت. روند تغییرات در محتوای ترکیبات فنلی متصل به استرهای دیواره مشابه فنل‌های محلول بود (جدول ۱ و شکل ۳a). ترکیبات فنلی گروه بزرگ و متنوعی از متابولیت‌های ثانویه آروماتیک در گیاهان می‌باشند (Rispaïl *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).

(Zeng *et al.*, 2011). تصور می‌شود انباشتگی TBARS به وسیله تجزیه اکسیداتیو اسیدهای چرب غیراشباع، به ویژه لینولینیک اسید صورت گیرد که عمدتاً 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 واکنش‌های رادیکال آزاد نا مطلوب در بافت‌ها است.

**ترکیبات فنلی:** نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس



شکل ۴- اثر نیتریک اکساید و دما بر فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ ها (a) و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز برگ ها (b). داده‌ها میانگین ۴ تکرار  $\pm$  SE و حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است. T5، T15 و T25 به ترتیب دمای شبانه به میزان ۵، ۱۵ و ۲۵ درجه سانتیگراد.

حضور نیتریک اکساید و کمترین ظرفیت آنتی اکسیدانی در دمای ۲۵ درجه (در حضور و یا عدم حضور نیتریک اکساید) مشاهده شد (شکل ۳b). DPPH یک رادیکال آزاد می‌باشد که فعالیت جاروب کنندگی آن وابسته به آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند گلوکاتیون، پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدها است. نیتریک اکساید خارجی می‌تواند سنتز متابولیت‌های آنتی‌اکسیدان از جمله گلوکاتیون 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 برگ‌ها تأثیری نداشت ولی اثر دما معنی دار بود (جدول ۱). بیشترین فعالیت آنزیم در دمای ۱۵ درجه و کمترین آن در ۵ درجه مشاهده گردید (شکل ۴a). پراکسیداز پروتئین دارای هم است که از  $H_2O_2$  برای اکسیداسیون مواد آلی و غیرآلی استفاده می‌کند. این آنزیم عمدتاً 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

سنتز و آزاد شدن فنل‌ها به وسیله عوامل مختلف زیستی و غیرزیستی القاء می‌شود. فنیل آلانین آمونیا لایز 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 آنزیم مذکور عمل نموده باشد. اشکال استر ترکیبات فنلی می‌توانند به عنوان سوبسترا برای پراکسیدازهای واکنشی 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 آنتی‌اکسیدانی کل معنی دار بود (جدول ۱). بدین معنی که حضور نیتریک اکساید به همراه کاهش دما باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل گردید. در واقع بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در دمای ۵ درجه و در

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 برگ 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 می‌بیند. 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.

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 می‌توان 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 می‌تواند 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 برگ 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 ۲b). سوپراکسیددیسموتاز جزء متالوآنزیم هایی است که سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن تبدیل می‌کند. سوپراکسیددیسموتاز یکی از مهمترین آنزیم‌هایی است که در دفاع گیاهان بر علیه تنش اکسیداتیو مورد استفاده قرار می‌گیرد. 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 می‌تواند 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 تاثیر قرار دادن سنتز پروتئین آنزیم، فعالیت سوپراکسیددیسموتاز را افزایش می‌

- 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 nitroprusside, 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.
- 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: kinetics 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.



- (2009) Phenolic compounds and properties of antioxidants in grapevine roots (*Vitis vinifera* 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.