نشریهٔ پژوهش‌های حبوبات ایران
جلد۷ شمارهٔ۱، صفحهٔ ۱۰۴-۹۳، نیمهٔ اول ۱۳۹۵

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 7, No. 1, 2016, p. 93-104

تأثیر دمای شبانه و نیتریک‌اکساید بر برخی ویژگی‌های فیزیو–بیوشیمیایی گیاه نخود

معصومه فرجی[۱] و نادر چاپارزاده[۲*]

۱ و ۲- به‌ترتیب، کارشناس‌ارشد و عضو هیئت علمی (دانشیار) گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۱/۱۷

چکیده

تنش‌های محیطی از جمله دماهای پایین باعث کاهش تولید و کیفیت محصولات زراعی می‌شوند. نیتریک‌اکساید به‌عنوان یکی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نقش مهمی در کاهش اثرات سوء ناشی از تنش‌ها برعهده دارد. در این پژوهش تغییرات صفات فیزیو-بیوشیمیایی گیاه نخود تحت تیمار نیتریک‌اکساید و دمای شبانه موردبررسی قرار گرفت. وزن‌تَر بخش‌های هوایی و ریشه‌ها و ترکیباتی مانند پرولین، قندهای محلول و نامحلول، آسکوربات و فعالیت آنزیم‌های آسکوربات‌پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز سنجش شدند. نتایج نشان‌داد که اثر نیتریک‌اکساید بر وزن‌تَر بخش‌های هوایی و محتوای پرولین، قندهای محلول و فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز معنی‌دار بود. تغییر دما بر وزن‌تَر ریشه، محتوای پرولین، قندهای محلول و نامحلول، آسکوربات، فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز تأثیر معنی‌دار داشت. برهم‌کنش نیتریک‌اکساید و دما بر وزن‌تَر ریشه و بخش‌های هوایی، محتوای پرولین، قندهای محلول و فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز تأثیر معنی‌داری را نشان داد. چنین ارزیابی می‌شود که متابولیسم نخود به دمای شبانه وابسته بوده و تیمار نیتریک‌اکساید الگوی تغییرات متابولیکی را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

کلمات کلیدی: سرما، متابولیسم، نخود، نیتریک‌اکساید

مقدمه

کشت حبوبات به‌دلیل اهمیت فراوان آن‌ها در تغذیه انسان و دام در سال‌های اخیر توسعه چشمگیر یافته است. به‌خاطر همزیستی ریشه حبوبات با باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن هوا، کشت این گیاهان نقش مهمی در افزایش حاصلخیزی خاک داشته و به‌همین علت در تناوب با سایر گیاهان زراعی کشت می‌شوند (Namvar *et al*., 2011). دانه نخود دارای مقدار قابل‌توجهی پروتئین و همچنین عناصر ضروری مانند کلسیم، فسفر، آهن و ویتامین‌هایی نظیر نیاسین و ریبوفلاوین می‌باشد (Akhar *et al*., 2011). کیفیت پایین محصول نخود عمدتاً به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نسبت‌داده می‌شود. در سال‌های اخیر برای افزایش مقدار و ارتقاء کیفیت محصول تحت تنش‌های غیرزیستی، کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی همچون نیتریک‌اکساید (Nitric Oxide, NO) موردتوجه قرارگرفته است (Chohan *et al*., 2012). NO یک مولکول فعال زیستی است که نقش مهمی در پاسخ به انواع تنش‌های دمایی، خشکی، علف‌کش‌ها، سمیت فلزات سنگین و... ایفاء می‌کند (Liu *et al*., 2011). NO با بالابردن ظرفیت توان دفاعی می‌تواند گیاهان را در برابر شرایط نامساعد محیطی محافظت نماید. در تجربه‌های آزمایشگاهی از سدیم‌نیتروپروساید به‌عنوان ترکیب آزادکننده نیتریک‌اکساید استفاده می شود (Ruelland & Zachowski, 2010). دماهای پایین همانند دیگر تنش‌های محیطی موجب کاهش تولید محصولات زراعی می‌شوند. در واقع دماهای پایین تغییرات متعددی را در فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی و هموستازی گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهان موجب می‌گردند. پیش‌تیمار با نیتریک‌اکساید می‌تواند فعالیت آنزیم‌های جاروب‌کننده گونه‌های فعال اکسیژن را القاء و یا بیان بعضی از ژن‌های مربوط به تنش اکسیداتیو را افزایش دهد (Palmieri *et al*., 2008). گزارش‌هایی از نقش نیتریک‌اکساید در تحمل تنش دمایی در دست است (Siddiqui *et al*., 2010). باتوجه به این‌که کاهش دما به‌ویژه در مقاطع حساس رشد و نموی گیاه، باعث کاهش تولید و کیفیت محصول می‌گردد، بنابراین در این مطالعه سعی‌شده اثرات پیش‌تیمار NO بر برخی تغییرات فیزیو-بیوشیمیایی که به موازات افت دمای شبانه در گیاه نخود رخ می‌دهد، آشکار گردد. تنها با

* **نویسندهٔ مسئول:** نشانی: تبریز کیلومتر ۳۵ جاده مراغه دانشگاه شهید مدنی آذربایجان ، گروه زیست شناسی، دکتر چاپارزاده، صندوق پستی ۱۶۱-۵۳۷۱۴،
همراه: ۰۹۱۴۴۱۱۰۶۶۸، nchapar@azaruniv.ac.ir

شناخت دقیق فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی دخیل در حساسیت و یا مقاومت گیاهان به دماهای پایین، می‌توان نسبت به ارائه راهکار و تفسیر در مورد سایر گیاهان اقدام کرد.

مواد و روش‌ها

کشت گیاهان: بذور سالم نخود (*Cicer arietinum* L.) رقم ILC482 با هیپوکلریت سدیم یک‌درصد ضدعفونی و با آب‌مقطر شستشو داده شدند. جوانه‌زنی بذرها بر روی کاغذ صافی مرطوب به‌مدت چهارروز صورت گرفت. سپس دانه‌رست‌ها به گلدان‌های حاوی پرلیت انتقال‌یافته و به‌مدت ۱۰روز در شرایط کنترل‌شده با تناوب نوری ۱۴ساعت نور و ۱۰ساعت تاریکی نگهداری شدند. در این‌مدت گلدان‌ها به‌طور یک‌روزدرمیان با آب‌مقطر و محلول غذایی هوگلند تغذیه شدند. گلدان‌های حاوی دانه‌رست‌های ۱۰روزه به دو گروه تقسیم گردیدند: گروه اول با محلول هوگلند بدون سدیم نیتروپروساید و گروه دوم با محلول هوگلند حاوی۰/۱ میلی‌مولار سدیم‌نیتروپروساید (به‌عنوان دهندهٔ NO) به‌صورت یک‌روزدرمیان تا روز شانزدهم تیمار شدند. گلدان‌های مذکور از روز شانزدهم به‌مدت سه‌شبانه‌روز متوالی تحت تیمارهای دمایی روز/شب به‌صورت ۲۵/۲۵، ۱۵/۲۵ و ۵/۲۵ سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌ها، ۴۸ساعت پس از اعمال آخرین‌تیمار برداشت و برای آنالیزهای بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفتند.

اندازه‌گیری وزن‌تَر ریشه و بخش‌های هوایی: وزن‌تَر ریشه‌ها و بخش‌های هوایی با ترازوی حساس توزین شد.

اندازه‌گیری پرولین: بافت برگی‌تَر با سولفوسالیسیلیک‌اسید سه‌درصد همگن و سانتریفیوژ گردید. عصارهٔ رویی با معرف نین‌هیدرین و اسیداستیک مخلوط و در حمام آب‌جوش قرار داده‌شد. پس از توقف واکنش در آب‌یخ و افزودن تولوئن، میزان جذب نوری فاز رنگی در طول موج ۵۲۰nm تعیین و مقدار پرولین برحسب میکرومول بر گرم وزن‌تَر گزارش گردید (Bates *et al.*, 1973).

اندازه‌گیری محتوای قندهای محلول: بافت برگی‌تَر با اتانول ۸۰درصد همگن و بعد از قراردادن در حمام آب‌جوش سانتریفیوژ گردید. جهت رسوب کلوئیدهای محلول، به مایعِ رویی استات‌سرب اشباع اضافه و سانتریفیوژ گردید. سپس به مایعِ رویی حاصل، سدیم‌هیدروژن‌فسفات اضافه و دوباره سانتریفیوژ گردید و با آب‌مقطر به‌حجم رسانده شد. جهت سنجش قندهای محلول کل، عصارهٔ رویی با محلول آنترون مخلوط و در حمام آب‌جوش قرار داده‌شد. پس از توقف واکنش در آب‌یخ میزان جذب در طول موج ۶۲۵ nm اندازه‌گیری شد. مقدار قند در هر نمونه بااستفاده از منحنی استاندارد گلوکز خالص تعیین و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن‌تَر گزارش گردید (Somogyi *et al.*, 1952).

اندازه‌گیری محتوای قندهای نامحلول: رسوب حاصل از سنجش قندهای محلول با HCl نیم‌نرمال مخلوط و در حمام آب‌جوش قرار داده‌شد. پس از سانتریفیوژ، مایعِ رویی حاصل با NaOH نیم‌نرمال، تیتر و در نهایت با آب‌مقطر به حجم رسانده شد. جهت سنجش قندهای نامحلول از عصارهٔ رویی برای واکنش با آنترون همانند قندهای محلول استفاده و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن‌تَر گزارش گردید.

اندازه‌گیری آسکوربات: بافت برگی‌تَر با تری‌کلرواستیک‌اسید ۶درصد همگن و سانتریفیوژ گردید. مایعِ رویی با محلول حاوی بافرفسفات‌سدیم (۲۰۰میلی‌مولار و pH=۷/۴)، آب‌مقطر دوبارتقطیر، تری‌کلرواستیک‌اسید ۲/۵٪، اسیدفسفریک ۸/۴درصد و ۲و۲ بی‌پیریدین ۰/۸درصد مخلوط شد. سپس به آرامی کلریدآهن ۰/۳درصد اضافه و بعد از قرارگیری در حمام آب با دمای ۴۲درجه سانتی‌گراد، میزان جذب در ۵۲۵nm اندازه‌گیری شد. در نهایت مقدار آسکوربات بر حسب میکرومول بر گرم وزن‌تَر گزارش گردید (Chaparzadeh *et al.*, 2004).

استخراج و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها: بافت برگی‌تَر در دمای۴درجه سانتی‌گراد با بافرفسفات‌سدیم (۱۰۰ mM و ۷/۵ = pH) حاوی (۰/۱ mM EDTA) و پلی‌وینیل‌پیرولیدون (یک‌درصد) همگن و سانتریفیوژ گردید. از محلولِ رویی جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات‌پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز استفاده شد.

جهت سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز، مایعِ رویی با دو بافر واکنشی که یکی حاوی آسکوربات ۲۵۰ µM و بافرفسفات‌سدیم (۵۰mM و pH=۷) و (۰/۵ mM EDTA) و دیگری حاوی آب‌اُکسیژنه ۱/۵ mM و بافرفسفات‌سدیم (۵۰mM و pH=۷) بود، مخلوط گردید. میزان جذب در ۲۹۰ nm اندازه‌گیری و فعالیت آنزیمی بااستفاده از ضریب‌تصحیح ۲/۸ $mM^{-1}cm^{-1}$ به‌صورت واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین گزارش شد (Cho *et al.*, 2012).

جهت سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز، مقداری مایعِ رویی با بافر واکنشی (۱۰۰ mM و pH = ۶/۸) حاوی پیروگالل ۲۰ mM مخلوط گردید. تغییر جذب در ۴۲۰nm دقیقه اندازه‌گیری و فعالیت آنزیمی به‌صورت جذب بر میلی‌گرم پروتئین گزارش گردید (Simaei *et al.*, 2011).

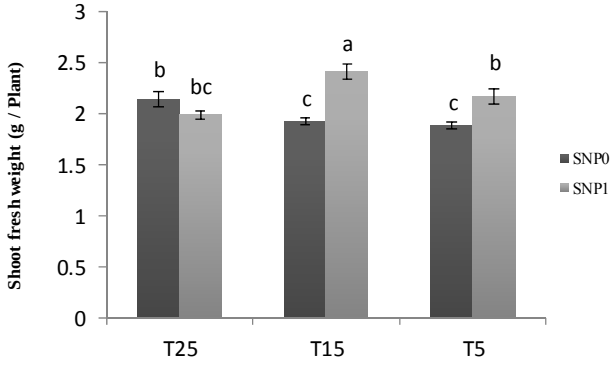
تجزیه و تحلیل آماری

برای انجام تجزیه‌های آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه۱۶ و Excel استفاده گردید. آزمایش با چهار تکرار انجام شد. مقایسه میانگین‌ها (± خطای معیار) با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج‌درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

وزن‌تَر ریشه و بخش‌های هوایی

نتایج حاصل از جدول تجزیه‌واریانس نشان‌داد که اثر کلی دما روی وزن‌تَر بخش‌های هوایی تـأثیر معنـی‌دار نداشـت. اثـر NO و برهم‌کنش آن با دما بر وزن‌تَر بخش‌های هوایی معنی‌دار بود (جدول۱). در واقع با کاهش دما و در غیـاب NO از میـزان وزن‌تَر بخش‌های هوایی کاسته شـد، در حضـور NO بیشـترین مقدار وزن‌تَر بخـش‌هـای هـوایی در دمـای ۱۵درجـه مشـاهده گردید (شکل۱). عامل NO بر وزن‌تَر ریشه تأثیری نداشـت. اثـر دما و برهم‌کنش NO و دما بر روی وزن‌تَر ریشه معنـی‌دار بـود (جـدول۱). در حضـور NO، بیشـینه مقـدار وزن‌تَـر ریشـه در دماهـای ۲۵ و ۱۵درجـه و کمینـه مقـدار در دمـای ۵درجـه مشاهده شد. در نبود NO کمترین مقدار وزن‌تَر ریشـه متعلـق به دمای ۱۵درجه بود (شکل۲). هرگونهٔ گیاهی دمای خاصی را برای رشدونمو بهینهٔ خود لازم دارد. دماهای پـایین، بـر رشـد، بقاء، تولیدمثل و توزیع گیاهان اثر می‌گذارند. کاهش رشد، یک پاسخ عمومی گیاهان تحت تنش برای فـایق‌آمـدن بـه شـرایط ناگوار محسوب می‌شود. درواقـع کـاهش رشـد بـا کـاهش وزن نشان‌داده می‌شود. مهار رشد تحت تنش سرما در گیاه بـرنج بـا کاهش زیست‌توده گزارش‌شده است (Aghaee *et al*., 2011). این کاهش ممکـن اسـت بـه‌علـت محـدودشـدن جـذب آب و موادغذایی توسط ریشه‌ها باشد. همچنین کاهش دما به‌علت اثر منفی روی آسیمیلاسیون(CO_2 (Assimilation باعث کـاهش فتوسنتزخالص و محدودشدن فرآیندهای شیمیایی می‌گردد که به‌نوبهٔ خود از طریق کاهش تقسیم سلولی و طویل‌شدن سـلول نهایتاً منجربه کاهش رشـد گیـاه مـی‌شـود (Aghaee *et al*., 2011). اثر تنظیمی NO بر روی رشد ممکن اسـت بـه غلظـت NO و برهم‌کنش آن با گونه‌های فعال اکسیژن ارتبـاط داشـته باشد. NO با تأثیر بر سیالیت لایه لیپیدی غشاء سلولی و سپس شل‌شدگی دیواره سلولی می‌تواند توسعه سلول را تسریع نمایـد (Leshem & Haramaty, 1996). در واقع افزایش رشد گیـاه در غلظت پایین NO به‌وسیله کاهش سطح چوبی‌شدن دیـواره سلولی و تسریع توسعه سلول اتفاق می‌افتد. سـطح بـالای NO ممکن است با ایجاد تنش اکسـیداتیو غشـاء، دیـواره سـلولی را تخریب و باعث مهار رشد گیـاه گـردد (Wang *et al*., 2010). باتوجه به نتایج این تحقیق، چنین استنباط می‌شود کـه دمـای ۱۵درجـــه ســـانتی‌گـــراد و غلظـــت ۰/۱ میلـــی‌مـــولار سدیم‌نیتروپروسـاید حالـت مطلـوب رشـد گیـاه نخـود در ایـن آزمایش باشد. تصور می‌شود NO با اثرات چنـدجانبـه خـود، از جمله تسریع توسـعه سـلولی(احتمالاً بـا تـأثیر بـر چربـی‌هـای غشایی) با اثرات منفی کاهش دما، از جمله کاهش رشد مقابلـه می‌کند.

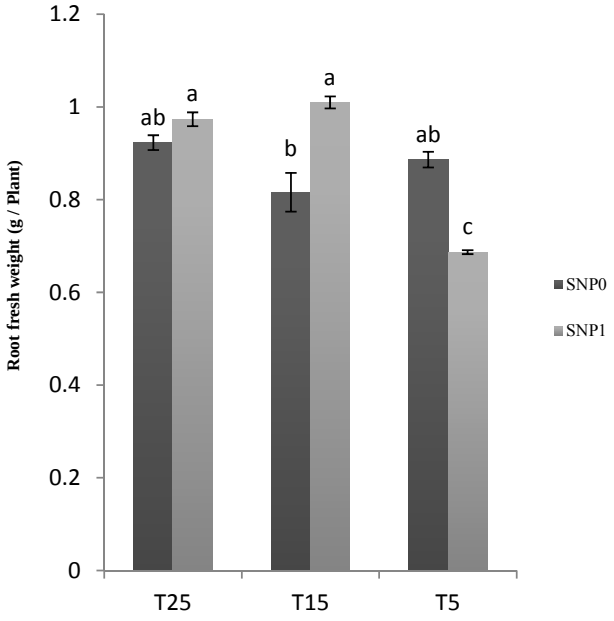


شکل۱- اثر نیتریک‌اکساید و دما بر وزن تر بخش هوایی

T5، T15 و T25، به‌ترتیب دماهای شبانه ۵، ۱۵و ۲۵درجه سانتی‌گراد و SNP0 و SNP1 به‌ترتیب سدیم‌نیتروپروساید صفر و ۰/۱ میلی‌مولار را نشان می‌دهند. حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

Fig.1. The effect of nitric oxide and temperature on shoot fresh weight

The common letters indicate non-significant at 5% level of probability. T5, T15 and T25 indicate night temperatures at 5, 15 and 25, respectively. SNP0 and SNP1 indicate sodium nitroprusside at 0 and 0.1 millimolar, respectively.



شکل۲- اثر نیتریک‌اکساید و دما بر وزن تر ریشه

T5، T15 و T25، به‌ترتیب دماهای شبانه ۵، ۱۵و ۲۵درجه سانتی‌گراد و SNP0 و SNP1 به‌ترتیب سدیم‌نیتروپروساید صفر و ۰/۱ میلی‌مولار را نشان می‌دهند. حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

Fig.2. The effect of nitric oxide and temperature on root fresh weight

The common letters indicate non-significant at 5% level of probability. T5, T15 and T25 indicate night temperatures at 5, 15 and 25, respectively. SNP0 and SNP1 indicate sodium nitroprusside at 0 and 0.1 millimolar, respectively.

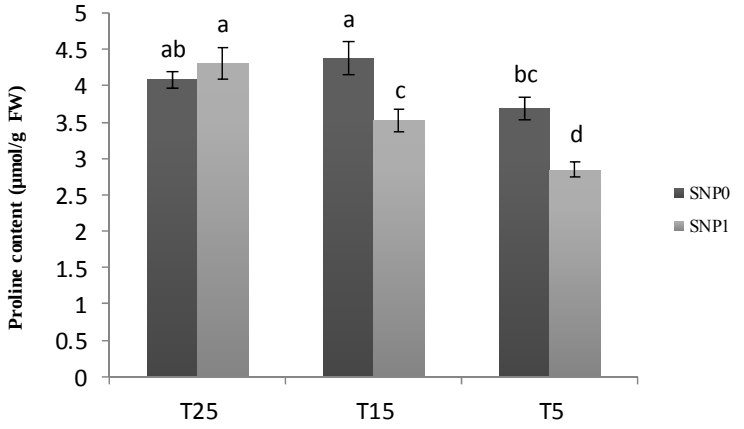
پرولین

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس نشان‌داد که اثر دما و NO و نیز برهم‌کنش بین آن‌ها بر روی محتوای پرولین معنی‌دار بود (جدول۱). کاهش دما در حضور NO باعث کاهش معنی‌دار در محتوای پرولین گردید، به‌طوری‌که کمترین مقدار پرولین در دمای ۵درجه مشاهده شد. در عدم حضور NO بیشترین مقدار پرولین به دمای ۱۵درجه اختصاص یافت (شکل۳). گیاهان پرولین را در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی انباشته می‌کنند. نقش پرولین درونی تحت تنش اکسیداتیو، پایدارکردن کمپلکس‌های پروتئینی، تنظیم pH سیتوزولی و یا به‌عنوان یک جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد (Hayat *et al*., 2012). سطح بالای پرولین در گیاهان سرمادیده تنها دلالت بر تحمل سرمایی نیست، بلکه می‌تواند نشانگر آسیب سرمایی هم باشد. بنابراین انباشتگی پرولین در شرایط خاص دارای معانی مختلفی است (Aghaee *et al*., 2011). افزایش محتوای پرولین در گیاه گوجه‌فرنگی تحت تنش‌شوری بااستفاده از NO گزارش‌شده است (Hayat *et al*., 2012). همچنین بسته به‌نوع ژنوتیپ هم افزایش و هم کاهش پرولین در گیاه پنبه تحت تنش سرما مشاهده‌شده است (Azymi *et al*., 2012). پرولین توانایی کاهش آسیب سرمایی را در گیاهان حساس به سرما دارد (Theocharis *et al*., 2012). در گیاهان سطح پرولین به عملکرد آنزیم‌های بیوسنتزی و تجزیه‌کننده بستگی دارد. در شرایط تنش میزان رونویسی ژن‌های مسیر بیوسنتزی پرولین افزایش می‌یابد (Hare *et al*., 1999). در آزمایش حاضر احتمالاً NO به‌همراه کاهش دما به‌عنوان علامتی برای کاهش فعالیت آنزیم‌های سنتزکننده و یا افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده عمل می‌نماید.

قندهای محلول و نامحلول

اثر دما و NO و نیز برهم‌کنش بین آن‌ها بر محتوای قندهای محلول معنی‌دار بود (جدول۱). کاهش دما در حضور یا عدم‌حضور NO، موجب افزایش معنی‌دار میزان قندهای محلول بافت‌ها گردید (شکل۴). دما بر محتوای قندهای نامحلول مؤثر بود، ولی NO و برهم‌کنش NO و دما بر محتوای قندهای

نـامحلول تـأثیری نداشـت (جـدول۱). چگـونگی تغییـرات در محتوای قندهای نامحلول همانند قندهای محلول بود (شکل۵).



شکل۳- اثر نیتریک‌اکساید و دما بر محتوای پرولین

T5، T15 و T25، به‌ترتیب دماهای شبانه ۵، ۱۵و ۲۵درجه سانتی‌گراد و SNP0 و SNP1 به‌ترتیب سدیم‌نیتروپروساید صفر و ۰/۱ میلی‌مولار را نشان می‌دهند. حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

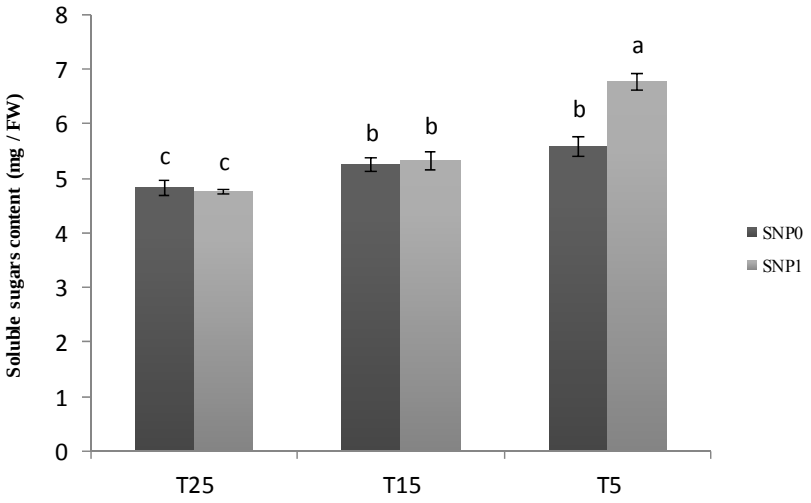
Fig. 3. The effect of nitric oxide and temperature on proline contents

The common letters indicate non-significant at 5% level of probability. T5, T15 and T25 indicate night temperatures at 5, 15 and 25, respectively. SNP0 and SNP1 indicate sodium nitroprusside at 0 and 0.1 millimolar, respectively.

متابولیسم کربوهیدرات‌ها یک مسیر مهم در به‌دام‌انداختن انرژی فتوسنتزی و تأمین‌کننـده کـربن مـوردنیـاز گیـاه اسـت. به‌طورکلی دماهای پایین، جابه‌جـایی محصـولات فتوسـنتزی و متابولیسم کربوهیدرات‌ها را تحت تـأثیر قـرار مـی‌دهنـد. بـرای مثال، تغییرات در عوامل محیطی مانند دما، نور، آب و... منجربه کاهش معنی‌داری در بازده فتوسنتزی در بافت‌های منبع شده و بنابراین تأمین قندهای محلـول بـه بافـت‌هـای مقصـد کـاهش می‌یابد. تحت تنش و نیز در ژنوتیپ‌های مختلـف، غلظـت‌هـای قندی و تخصیص بین منبـع-مقصـد در انـدام‌هـای مختلـف از الگوی یکسانی پیروی نمی‌کنند. مثلاً دماهای پـایین، خشـکی، شوری باعث افزایش غلظت قندهای محلول شـده، درحـالی‌کـه تابش نـور، فلـزات‌سـنگین، کمبـود مـوادغـذایی و اُزن غلظـت قندهای محلول را کاهش مـی‌دهنـد(Strand *et al*.,1999 & Gill *et al*., 2001). متابولیسم قنـدها فرآینـدی پویـا اسـت و نوسانات قنـدها مـی‌توانـد بـه‌علـت تغییـرات در آسمیلاسـیون دی‌اکسیدکربن و روابط مبدأ-مقصد و فعالیت آنزیم‌های دخیـل باشد. مسیرهای علامتی قندها با مسـیرهای تنشـی بـه‌منظـور تنظیم متابولیسم با هم‌دیگر تعامل دارند. قندهای تولیدشده در طی فتوسنتز برای بیوسنتز پلی‌سـاکاریدهای نشاسـته و سـلولز مورداستفاده قرار می‌گیرنـد (Rosa *et al*., 2009). در دماهـای پایین کاهش تنفس می‌تواند نقش مهمی را در افـزایش غلظـت کربوهیدرات‌ها داشته باشد. علت تجمع قندهای محلول در طی تـنش، تجزیـه قنـدهای نـامحلول (نشاسـته) مـی‌باشـد کـه بدین‌طریق پتانسیل اسمزی حفظ‌شده و خطـر دهیدراتاسـیون کاهش می‌یابد. بنابراین قندهای محلول به‌عنوان حفاظت‌کننـده سرمایی عمل می‌کننـد (Windt & Hasselt, 1999). کـاهش میـزان قنـدهای محلـول در گیاهـان نخـود تحـت تیمـار NO گزارش‌شده است (Ganjewala *et al*., 2008)؛ ولی در تجربـهٔ حاضر چنین‌نتیجه‌ای تأیید نگردید و از طرفی در *Matricaria chamomilla* باعـث افـزایش محتـوای قنـدها شـده اسـت (Kovacik *et al*., 2010). باتوجـه بـه نتـایج بـه‌دسـت‌آمـده، می‌توان چنین ارزیابی کرد که کاهش دمای شبانه بـا تـأثیر بـر متابولیسم، موجب انباشتگی قندها جهـت حفاظـت بافـت‌هـا از آسیب‌های احتمالی می‌گردد.

آسکوربات

NO و نیز برهم‌کنش NO و دما بـر محتـوای آسـکوربات تأثیری نداشت ولی اثر دما معنی‌دار بود (جدول ۱). کاهش دما باعث افزایش محتوای آسکوربات شـد، بـه‌طـوری‌کـه بیشـترین مقدار در دمای ۵درجـه و کمتـرین مقـدار در دمـای ۲۵درجـه مشاهده گردید (شکل۶).

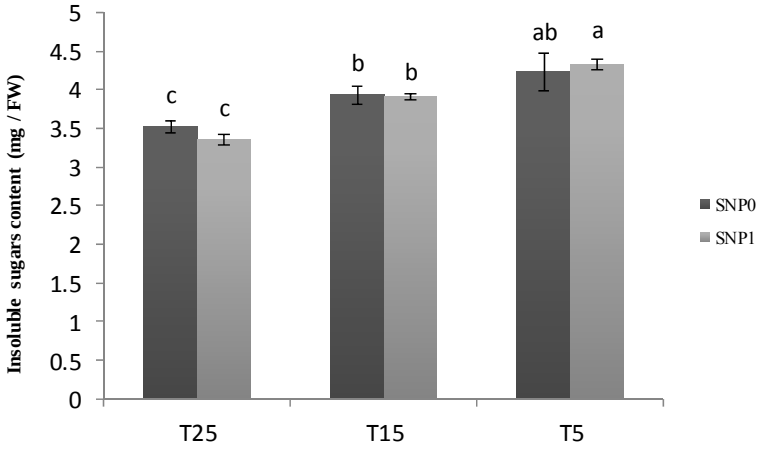


شکل۴- اثر نیتریک‌اکساید و دما بر قندهای محلول

T5، T15 و T25، به‌ترتیب دماهای شبانه ۵، ۱۵و ۲۵درجه سانتی‌گراد و SNP0 وSNP1 به‌ترتیب سدیم‌نیتروپروساید صفر و۰/۱ میلی‌مولار را نشان می‌دهند. حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

Fig. 4. The effect of nitric oxide and temperature on soluble sugars

The common letters indicate non-significant at 5% level of probability. T5, T15 and T25 indicate night temperatures at 5, 15 and 25, respectively. SNP0 and SNP1 indicate sodium nitroprusside at 0 and 0.1 millimolar, respectively.



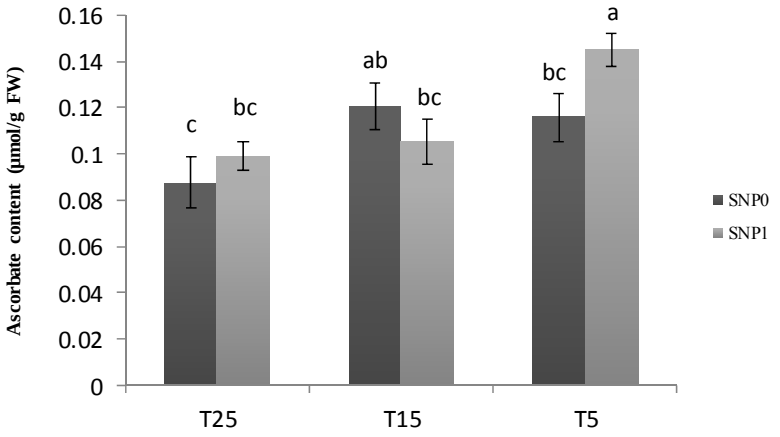
شکل۵- اثر نیتریک‌اکساید و دما بر قندهای نامحلول

T5، T15 و T25، به‌ترتیب دماهای شبانه ۵، ۱۵و ۲۵درجه سانتی‌گراد و SNP0 وSNP1 به‌ترتیب سدیم‌نیتروپروساید صفر و۰/۱ میلی‌مولار را نشان می‌دهند. حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

Fig. 5. The effect of nitric oxide and temperature on insoluble sugars

The common letters indicate non-significant at 5% level of probability. T5, T15 and T25 indicate night temperatures at 5, 15 and 25, respectively. SNP0 and SNP1 indicate sodium nitroprusside at 0 and 0.1 millimolar, respectively.

آسکوربات مولکول کوچک و آنتی‌اکسیدانت محلول در آب است که به‌عنوان یک سوبسترای اصلی در مسیر چرخه‌ای سم‌زدایی آنزیمی هیدروژن‌پراکسید مورداستفاده قرار می‌گیرد. آسکوربات برای تنظیم فتوسنتز، توسعه سلولی، طویل‌شدن ریشه و در برخی واکنش‌های آنزیمی ضروری است. آسکوربات از طریق دخالت در تولید گلوتاتیون احیاء در چرخه آسکوربات‌گلوتاتیون، گونه‌های فعال اکسیژن را از بین برده و بدین‌ترتیب توانایی گیاهان را در مقابل عوامل تنش‌زا تقویت می‌کند (Shah *et al*., 2011). بنابراین افزایش مقدار آسکوربات در دماهای پایین را می‌بایست برای حفاظت گیاهان از تنش القاشده ارزیابی نمود.



شکل۶- اثر نیتریک‌اکساید و دما بر محتوای آسکوربات

T5، T15 و T25، به‌ترتیب دماهای شبانه ۵، ۱۵و ۲۵درجه سانتی‌گراد و SNP0 و SNP1 به‌ترتیب سدیم‌نیتروپروساید صفر و ۰/۱ میلی‌مولار را نشان می‌دهند. حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

Fig. 6. The effect of nitric oxide and temperature on ascorbate contents

The common letters indicate non-significant at 5% level of probability. T5, T15 and T25 indicate night temperatures at 5, 15 and 25, respectively. SNP0 and SNP1 indicate sodium nitroprusside at 0 and 0.1 millimolar, respectively.

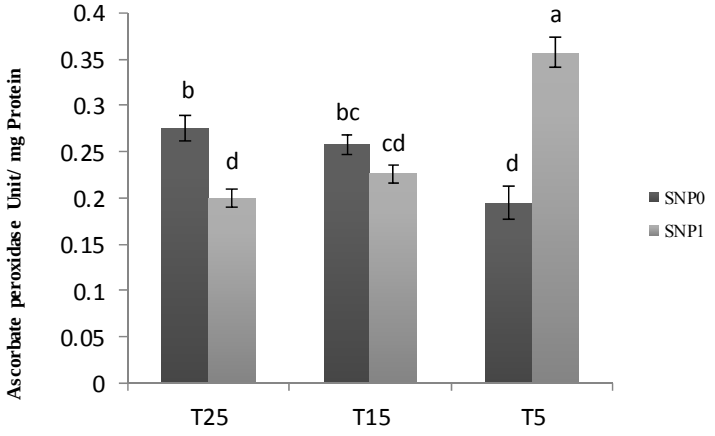
فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز

بر اساس داده‌های آنالیز واریانس، اثر کلی NO بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز معنی‌دار نشد، ولی اثر دما و نیز برهم‌کنش NO و دما بر فعالیت این آنزیم معنی‌دار بود(جدول۱). بیشترین مقدار فعالیت آنزیم در حضور NO در دمای ۵درجه و در غیاب آن در دمای ۲۵درجه می‌باشد (شکل۷). آسکوربات‌پراکسیدازها عمدتاً در گیاهان‌عالی، جلبک‌ها و بعضی سیانوباکترها وجود دارند. بیان ژن‌های آسکوربات‌پراکسیداز می‌تواند به‌وسیله عواملی مانند شوری، تابش UV، حمله پاتوژنی و دماهای بالا و پایین القاء شود (Dabrowska *et al*., 2007). افزایش بیان آسکوربات‌پراکسیداز سیتوزولی در گوجه‌فرنگی و در گیاه ذرت تحت تنش سرما گزارش شده است (Wang *et al*., 2005). آسکوربات‌پراکسیدازها به‌وسیله آسکوربات به‌عنوان دهنده الکترون و با احیاء H_2O_2 به آب، به‌طور مستقیم در جاروب‌کردن گونه‌های فعال اکسیژن دخالت دارند. گزارش‌شده است که آسکوربات‌پراکسیدازِ پراکسی‌زومی در پاسخ به انواع تنش‌های اکسیداتیوی مانند سرما، گرما، نور انباشته می‌شود (Murgia *et al*., 2004). در این مطالعه، در دمای پایین تیمار NO موجب افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز شده است که احتمالاً به‌علت توانایی گیاه در حفاظت پروتئین‌های آنزیمی در دمای پایین می‌باشد. در واقع، ارتباط بین فعالیت و بیان ژن آسکوربات‌پراکسیداز در کنار سایر عوامل مؤثر در تحمل، موجب بروز چنین پاسخی شده است (شکل۷).

فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس نشان‌داد که اثر NO و دما بر فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز معنی‌دار بود. برهم‌کنش NO و دما بر فعالیت آن تأثیری نداشت (جدول۱). در تمام دماهای مذکور، NO فعالیت آنزیم را افزایش داد، ولی بیشترین فعالیت

آنزیم مربوط به دمای ۱۵درجه و کمترین فعالیت آن مربوط به دمای ۲۵درجه بود (شکل۸).

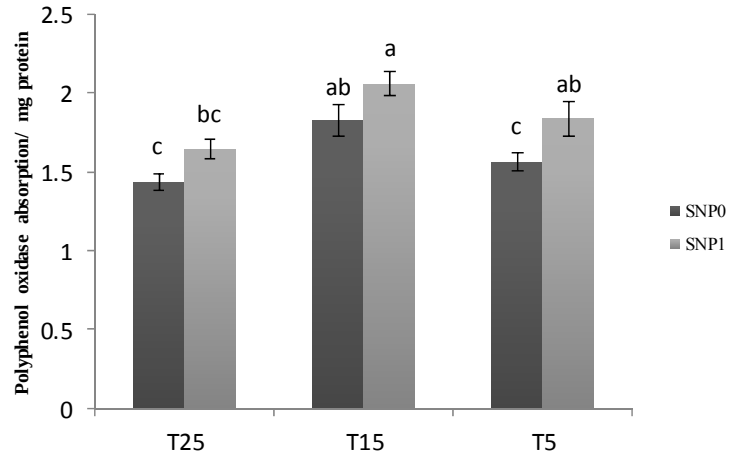


شکل۷- اثر نیتریک‌اکساید و دما بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز

T5، T15 و T25، به‌ترتیب دماهای شبانه ۵، ۱۵و ۲۵درجه سانتی‌گراد و SNP0 و SNP1 به‌ترتیب سدیم‌نیتروپروساید صفر و ۰/۱ میلی‌مولار را نشان می‌دهند.
حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

Fig. 7. The effect of nitric oxide and temperature on Ascorbate peroxidase

The common letters indicate non-significant at 5% level of probability. T5, T15 and T25 indicate night temperatures at 5, 15 and 25, respectively. SNP0 and SNP1 indicate sodium nitroprusside at 0 and 0.1 millimolar, respectively.



شکل۸- اثر نیتریک‌اکساید و دما بر فعالیت پلی فنل اکسیداز

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است

T_5، T_{15}وT_{25} به ترتیب دماهای شبانه ۵، ۱۵و ۲۵درجه سانتی‌گراد و SNP_0 و SNP_1 به ترتیب سدیم نیتروپروسایدصفر و۰/۱ میلی‌مولار را نشان می دهند.

Fig. 8. The effect of nitric oxide and temperature on Polyphenol oxidase

The common letters indicate non-significant at 5% level of probability. T5, T15 and T25 indicate night temperatures at 5, 15 and 25, respectively. SNP0 and SNP1 indicate sodium nitroprusside at 0 and 0.1 millimolar, respectively.

در گیاه کاهو در تیمارهای دمایی شبانه‌روزی مختلف بیشینه‌فعالیت آنزیم در ۲۰/۱۳ (شب/روز) گزارش‌شده است (Chon *et al*., 2012). چنین ارزیابی شده است که، دماهای پایین موجب افزایش فعالیت این آنزیم شده و توان آنتی‌اکسیداتیو افزایش می‌یابد (Boo *et al*., 2011). ازطرف دیگر در هندوانه دمای ۱۵درجه سانتی‌گراد با ایجاد تنش

سرمایی موجب کاهش فعالیت آنزیم نسبت به دماهای بالاتر می‌شود (Rivero *et al*., 2001). پلی‌فنل‌اکسیدازها یا تیروزینازها، آنزیم‌های حاوی مس هستند که اکسیداسیون ترکیبات‌فنلی به کوئینون‌ها را کاتالیز می‌کنند. همچنین پلی‌فنل‌اکسیداز در تولید گونه‌های فعال اکسیژن نقش دارد (Mayer, 2006). پلی‌فنل‌اکسیدازها در اکثر گیاهان‌عالی یافت می‌شوند و مسئول قهوه‌ای‌شدن یا رسیدن میوه‌ها و سبزیجات می‌باشند. می‌توان چنین ارزیابی کرد که NO با فعال‌سازی آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز یا ممانعت از تخریب آن می‌تواند دلایلی برای افزایش فعالیت این آنزیم در مطالعه حاضر باشد. علاوه بر آن NO می‌تواند با تأثیر بر فعالیت فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، سوبسترای لازم برای پلی‌فنل‌اکسیدازها را فراهم نموده و بدین‌طریق فعالیت آن‌ها را در سطح بالایی نگه دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان‌داد که کاهش دمای شبانه بر روی برخی نشانگرهای بیوشیمیایی تأثیر معنی‌دار می‌گذارد. این تغییرات در ریشه و بخش‌هوایی الگوی یکسانی را نشان ندادند. در دماهای پایین شبانه، تیمار نیتریک‌اکساید با تأثیر بر آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی (آسکوربات) و آنزیمی (آسکوربات‌پراکسیداز) از تأثیر منفی کاهش دما بر رشد گیاه نخود جلوگیری می‌کنند.

سپاسگزاری

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

منابع

1. Aghaee, A., Moradi, F., Zare-Maivan, H., Zarinkamar,F., Irandoost, H. P., and Sharifi, P. 2011. Physiological responses of two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes to chilling stress at seedling stage. African Journal of Biotechnology 10(39): 7617-7621.
2. Akhar, F. K., Bagheri, A., Moshtaghi, N., and Nezami, A. 2011. The effect of gamma radiation on freezing tolerance of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) at in vitro culture. Journal of Biological and Environmental Sciences 5: 63-70.
3. Azymi, S., Sofalian, O., Jahanbakhsh, G.S., and Khomari, S. 2012. Effect of chilling stress on soluble protein, sugar and proline accumulation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) genotypes. International Journal of Agriculture and Crop Sciences 4(12): 825-830.
4. Bates, L.S., Waldren, R.P., and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of proline for water stress studies. Plant Soil 39: 205-207.
5. Boo, H.O., Heo, B.G., Gorinstein, S., and Chon, S.U. 2011.Positive effects of temperature and growth conditions on enzymatic and antioxidant status in lettuce plants. Plant Science 181: 479-484.
6. 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.
7. Cho, S.C., Chao, Y.Y., Hong, C.Y., and Kao, C.H. 2012. The role of hydrogen peroxide in cadmium-inhibited root growth of rice seedling. Plant Growth Regulation 66: 27-35.
8. Chohan, A., Parmar, U., and Raina, S. K. 2012. Effect of sodium nitroprusside on morphological characters under chilling stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Journal of Environmental Biology 33: 695-698.
9. Chon, S.U., Boo, H.O., Heo ,B.G., and Gorinstein, S. 2012. Anthocyanin content and the activities of polyphenol oxidase, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in lettuce cultivars. International Journal of Food Sciences and Nutrition 63(1): 45-48.
10. Dabrowska, G., Kata, A., Goc, A., Szechynska-Hebda, M., and Skrzypek, E. 2007. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 49(1): 7-17.
11. Ganjewala, D., Boba, S., and Raghavendra, A.S. 2008. Sodium nitroprusside affects the level of anthocyanin and flavonol glycosides in pea (*Pisum sativum* L. cv. Arkel) leaves. Acta Biologica Szegediensis 52(2): 301-305.
12. Gill, P.K., Sharma, A.D., Singh, P., and Bhullar, S.S. 2001. Effect of various abiotic stresses on the growth soluble sugar and water relations of sorghum seedlings grown in light and darkness. Bulgarian Journal of Plant Physiology 27: 72-84.
13. Hare, P.D., Cress, W.A., and Staden, V. 1999. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. Journal of Experimental Botany 50: 413-434.

14. Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M.N., Wani, A.S., Pichtel, J., and Ahmad, A. 2012. Role of proline under changing environments. Plant Signaling and Behavior 7(11): 1456-1466.
15. Hayat, S., Yadav, S., Wani, A.S., Irfan, M., Alyemini, M.N., and Ahmad, A. 2012. Impact of sodium nitroprusside on nitrate reductase, proline content, and antioxidant system in tomato under salinity stress. Horticulture, Environment and Biotechnology 53(5): 362-367.
16. Kovacik, J., Grz, J., Klejdus, B., Stork, F., Marchiosi, R., and Ferrarese-Filho, O. 2010. Lignification and related parameters in copper-exposed *Matricaria chamomilla* roots: role of H_2O_2 and NO in this process. Plant Science 179: 383-389.
17. 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.
18. Mayer, A.M. 2006. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? Phytochemistry 67: 2318-2331.
19. Murgia, I., Tarantino, D., Vannini, C., Bracale, M., Carravieri, S., and Soave C. 2004. *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidalascorbate peroxidase show increased resistance to Paraquat induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. The Plant Journal 38: 940-953.
20. Namvar, A., Sharif, R. S., and Khandan, T. 2011. Growth analysis and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in relation to organic and inorganic nitrogen fertilization. Ekologija 57: 97-108.
21. Palmieri, M.C., Sell, S, Huang, X., Scherf, M., Werner, T., Durner, J., and Lindermayer, C. 2008. Nitric oxide-responsive genes and promoters in *Arabidopsis thaliana*: a bioinformatics approach. Journal of Experimental Botany 59:177-186.
22. Rivero, R.M., Ruiz, J.M., Garcıa, P.C., Lopez-Lefebre, L.R., Sanchez, E., and Romero, L. 2001. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. Plant Science 160: 315-321.
23. Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González, J.A., Hilal, M., and Prado, F.E. 2009. Soluble sugars: metabolism, sensing and abiotic stress: a complex network in the life of plants. Plant Signaling and Behavior 4: 388-393.
24. Ruelland, E., and Zachowski, A. 2010. How plants sense temperature. Environmental and Experimental Botany 69: 225-232.
25. Shah, F., Huang, J., Cui, K., Nie, L., Shah, T., Wu, W., Wang, K., Khan, Z.H., Zhu, L., and Chen, C. 2011. Physiological and biochemical changes in rice associated with high night temperature stress and their amelioration by exogenous application of ascorbic acid (vitamin C). Australian Journal Crop Science 5(13): 1810-1816.
26. 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(3): 447-455.
27. Simaei, M., Khavari-Nejad, R.A., Saadatmand, S., Bernard, F., and Fahimi, H. 2011. Effects of salicylic acid and nitric oxide on antioxidant capacity and proline accumulation in *Glycine max* L. treated with NaCl salinity. African Journal of Agricultural Research 6: 3775-3782.
28. Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. Journal of Biological Chemistry 195: 19-23.
29. Strand, A., Hurry, V., Henkes, S., Huner, N., Gustafsson, P., Gardestrom, P., and Stitt, M. 1999. Acclimation of *Arabidopsis* leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose biosynthesis pathway. Plant Physiology 119: 1387-1397.
30. Theocharis, A., Clement, C., and Barka, E.A. 2012. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. Planta 235(6): 1091-1105.
31. Wang, H., Zhang, S., Zhang, W., Wei, C., and Wang, P. 2010.Effects of nitric oxide on the growth and antioxidant response of submerged plants *Hydrilla verticillata* (Lf) Royle. African Journal of Biotechnology 9: 7470-7476.
32. Wang, Y., Wisniewski, M., Meilan, R., Cui, M., Webb, R., and Fuchigami, L. 2005. Overexpression of cytosolic ascorbate peroxidase in tomato confers tolerance to chilling and salt stress. Journal of the American Society for Horticultural Science 130(2): 167-173.
33. Windt, C.W., and Hasselt, P.R. 1999.Development of frost tolerance in winter wheat as modulated by differential root and shoot temperature. Plant Biology 1: 573-580.

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 7, No. 1, 2016, p. 93-104

The effects of night temperature and nitric oxide on some physio-biochemical characters of Pea plants

Faraji[1], M. & Chaparzadeh[2*], N.

1&2. Respectively, MSc. & Associate professor, Department of Biology, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

Received: 1 November 2014
Accepted: 6 April 2015

Introduction

Plant responses to environmental stress have a central role in agricultural production. Responses results from events occurring at all levels of the organization, from biochemical reactions in cells to whole plant physiology. Many plants are injured when exposed to low non-freezing temperatures. However, data on the effects of night temperatures are scarce. On the other hand, nitric oxide (NO), as a plant growth regulator, has an important role in ameliorating stress induced damage in plants. Therefore, the aim of this work was to evaluate the role of NO during low temperature nights. In this research the changes in some physio-biochemical characters of Pea plants under NO and night temperature treatments were studied.

Materials and Methods

The fresh weights of roots and shoots, the contents of proline, soluble and insoluble sugars, ascorbic acid, and the activities of ascorbate peroxidase and polyphenol oxidase were evaluated. Seeds of chickpea, *Cicer arietinum* L. ILC482 variety were surface sterilized in sodium hypochlorite solution 1%, rinsed with sterilized water and germinated on moist filter papers in the dark for four days. Seedlings were transferred to plastic pots containing half-strength Hoagland solution, and were placed at 14 h photoperiod. Plants aged 14 days were randomly subdivided into two groups. One group received half-strength Hoagland solution (control) and another group was subjected half-strength Hoagland solution containing NO (0.1mM) for two days. Then, plants divided into three groups and, for 3 days, were subjected to 25/25, 25/15 and 25/5 ºC (day/night) regimes. After two days, shoots and roots were weighted for recording fresh weights. For assay of proline content, aliquots of fresh tissues were homogenized in 3% sulphosalicylic and centrifuged. Free proline contents were quantified using ninhydrin reagent and expressed as µmol/g FW. The total soluble sugars were determined by anthrone reaction at 625 nm in an 80% hot ethanol extract and expressed as mg/g FW. Later insoluble sugars were extracted from residues with HCl and determined by Anthrone reaction. In assay of ascorbate contents, 6% trichloroacetic acid extracted leaf tissues were mixed with 2,2-dipiridil. Then, for reduction of Fe^{3+} to Fe^{2+} by ascorbic acid mixture was incubated at 42 ºC and the absorbance values were recorded at 525 nm. Data expressed as µmol/g FW. For Enzyme assays, aliquots of fresh leaves were ground in cold extraction 100 mM phosphate buffers (pH 7.5) at 0-4 °C. After centrifugation of homogenates, enzymes assays were performed in the supernatant at 25 °C. Ascorbate peroxidase activity was measured by following the oxidation of ascorbate at290 nm. The Activity of Polyphenol oxidase in presence of pyrogallol was determined by measuring the increase in absorbance at 420 nm. The experiment was arranged in a completely randomized design with four replicates. The data were statistically analyzed by using Duncan's multiple range test to separate the means at $p \leq 0.05$.

* **Corresponding Author:** nchapar@azaruniv.ac.ir, Mobile: +98 9144110668

Results and Discussion

The fresh weights of roots and shoots, the contents of proline, soluble and insoluble sugars, ascorbic acid, and the activities of ascorbate peroxidase and polyphenol oxidase were evaluated. The results showed that nitric oxide pretreatment had a significant effect on the fresh weight of shoots, proline and soluble sugars contents, and polyphenol oxidase activity. Changes of night temperature were effective on all of the examined factors except shoots fresh weights. Interaction between nitric oxide and the temperature had a significant effect on fresh weights of roots and shoots, proline and soluble sugars contents, and ascorbate peroxidase activity. Data showed that maximum growth of plants occurred at 15 °C night temperature in the presence of NO. Proline contents of leaves were significantly decreased by falling night temperatures. NO treatments led to more reduction in proline under low night temperatures. In higher plants, proline is normally accumulated in response to stress factors. Night temperature reduction and NO treatment, probably, can act as signal for decreasing proline biosynthetic enzymes activities or for increasing proline degradative enzymes activities. Both soluble and insoluble sugars were increased significantly by falling night temperatures, and NO treatments had a positive effect. We can assume that falling of night temperatures can affect tissues metabolism, for preventing of damages, by accumulation of sugars. Falling of night temperatures increased ascorbate contents of leaves. Generally, ascorbate has antioxidative properties and high levels of foliar ascorbate can offer tolerance to plants under unfavorable conditions. Ascorbate peroxidase plays an important role in the metabolism of H_2O_2 in higher plants. In this study, falling of night temperatures led to decrease in the enzyme activity. However, enzyme activity increased significantly with the NO treatment at 5 °C. Ascorbate peroxidase activity is directly involved in the protection of plant cells against unfavorable environmental conditions.

Conclusion

In conclusion, falling night temperatures can significantly affect some biochemical markers of plants. The changes in roots and shoots are not showing the same patterns. Under low night temperatures, NO treatment can induce non enzymatic (ascorbate) and enzymatic (ascorbate peroxidase) defense systems for overcoming the deleterious effects of low temperature.

Key words: Low temperature, Metabolism, Nitric oxide, Pea plant