

## مقاله پژوهشی

# بررسی پاسخ آنزیمی و بیان نسبی ژن‌های کاتالاز و پراکسیداز به تنش سرما در ژنوتیپ‌های ایرانی نخود

محمد رضا نظری<sup>۱</sup>، رضا معالی امیری<sup>۲\*</sup>، سیده‌ساناز رمضانپور<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۲- استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۳- استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

### چکیده

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله مهمترین راهکارهای دفاعی گیاهان در مهار گونه‌های اکسیژن فعال می‌باشند. در این مطالعه، به جهت یافتن دمای مناسب سازگاری به سرما در ژنوتیپ نخود دسی، دو دمای چهار و ۱۰ درجه سانتی‌گراد بررسی گردید. نتایج نشان دهنده پاسخ بهتر گیاهچه‌ها پس از سازگاری در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد بود. پس از آن پاسخ آنزیمی، بیان نسبی ژن‌های کاتالاز و پراکسیداز و برخی از شاخص‌های فیزیولوژیکی در دو ژنوتیپ نخود دسی و کابلی سنجیده شد. پایداری بیشتر غشاء، عدم افزایش معنی دار  $H_2O_2$  تحت تنش، افزایش بیشتر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در کنار بیان پایدارتر و بیشتر ژن‌های مزبور در ژنوتیپ جم نشان داد که ژنوتیپ جم بهتر توانست اثرات دمای پایین را تحمل نماید. افزایش میزان بیان ژن آسکوربات پراکسیداز در هر دو ژنوتیپ نشان داد که این آنزیم می‌تواند در برابر تنش سرما پاسخ نشان داده و کمبود کاتالاز را جبران نماید. به نظر می‌رسد که پاسخ به دمای سازگاری و تنش سرما می‌تواند در زمان کوتاهی پس از قرارگیری در شرایط تنش آغاز شده و این زمان کوتاه سازگاری می‌تواند برخی از گیاهان نخود را جهت تحمل به تنش‌های شدیدتر آماده سازد. واژگان کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان؛ بیان ژن؛ تنش سرما؛ سازگاری به سرما؛ نشأت الکترولیتی

### مقدمه

تنش سرما یکی از عوامل تغییر در رشد، نمو و عملکرد بسیاری از گیاهان زراعی از جمله نخود (*Cicer arietinum* L.) به عنوان یکی از لگوم‌های اصلی خوراکی است. گیاهان با راهکارهای

مختلفی به تنش و سازگاری پاسخ می‌دهند و با قرارگیری در معرض دماهای پایین بالای صفر درجه، تحمل تدریجی به دماهای پایین تر پیدا می‌کنند که به آن سازگاری به سرما گفته می‌شود (۱) و به طور کلی حاصل تغییر در بیان القا شده ژن‌ها است (۲). تنش سرما اعمال غشاءهای سلولی را بعنوان اولین جایگاه خسارت تحت تأثیر قرار می‌دهد. معالی امیری<sup>۱</sup> و همکاران (۳) تغییر خصوصیات غشای پلاسمایی سلول را عامل مهم تحمل به سرما در گیاهان بیان کردند.

\* رضا معالی امیری، PhD

استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

پست الکترونیکی: rmamiri@ut.ac.ir

تلفن همراه: ۰۹۱۳۴۱۹۰۱۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱/۳۰

آنزیمی و بیان نسبی ژن‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در کنار شاخص نشت الکترولیتی، در دوره زمانی اولیه پاسخ به سازگاری در ژنوتیپ نخود دسی ۴۳۲۲ و یک ژنوتیپ نخود کابلی (ژنوتیپ جم) مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### شرایط رشد گیاهان و اعمال تنش جهت مقایسه دماهای مختلف سازگاری

در این بخش از پژوهش ژنوتیپ دسی ۴۳۲۲، ژنوتیپ انتخابی ناحیه سرد کشور (اردبیل) که در آزمایشات مزرعه ای توسط مولفین، بیشترین عملکرد را در کشت پاییزه در بین ۲۹ ژنوتیپ از خود نشان داده بود (انتشار نیافته)، به جهت بررسی دمای مناسب سازگاری کوتاه مدت انتخاب گردید. بذور با هیپوکلریت سدیم تجاری ده درصد به مدت پنج دقیقه ضد عفونی شده و پس از شستشو با آب مقطر بر روی کاغذ صافی در ظروف پتری با رطوبت لازم قرار گرفتند. پتری‌ها در شرایط بدون نور و دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و پس از جوانه زنی، گیاهچه‌ها به گلدان منتقل شدند. گلدان‌ها در اتاقک رشد با نور ۲۰۰ میکرومول بر انیشتن و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ درصد قرار داده شدند. پس از سه هفته گیاهچه‌ها به دو قسمت تقسیم شدند، بخشی به دمای ۱۰ درجه و بخش دیگر به دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل و به مدت ۲۴ ساعت نگه داری شدند. پس از آن گیاهچه‌ها به دمای ۱۰- درجه منتقل و پس از ۱۵ دقیقه نمونه گیری انجام شد.

### مقایسه دو ژنوتیپ دسی و کابلی

در این بخش از پژوهش ژنوتیپ دسی ۴۳۲۲، و ژنوتیپ جم (از ژنوتیپ‌های زراعی محلی رایج در کشور (۱۴))، که بترتیب از کلکسیون بذر حبوبات بانک ژن گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران و موسسه تحقیقات کشاورزی دیم مراغه تهیه شدند تحت شرایط ذکر شده در بخش قبل نگه داری شدند. گیاهچه‌های سه هفته ای هر ژنوتیپ به دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. نمونه گیری برای سنجش بیان ژن و خصوصیات فیزیولوژیکی و

آسیب کمتر غشایی در برخی گیاهان نسبت به سایرین، می‌تواند مربوط به فعالیت مکانیسم‌های تحمل به سرما باشد که با فعالیت‌های اکسیداسیونی و خصوصیات و ترکیب غشاءهای سلولی در ارتباط است (۴). بنا بر این تحمل بیشتر در بعضی ژنوتیپ‌ها ممکن است در اثر پایداری خصوصیات فیزیکی و شیمیایی غشاء باشد. گزارش شده که اندازه گیری شاخص نشت الکترولیتی (ELI) می‌تواند حتی در مراحل ابتدایی تنش الگوی مناسبی از میزان تحمل به سرما نشان دهد (۴). هرچند به علت وجود برهمکنش‌های فراوان در مسیر پاسخ به تنش و سازگاری، شناخت عوامل تحمل امری دشوار است اما با این حال این گونه آزمایشات کمک بسزایی به درک راهکارهای تحمل می‌نماید. بررسی عوامل دخیل در خسارت سلولی نشان داده که یکی از عوامل اصلی مسبب خسارت، ایجاد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) است که منجر به تغییر عوامل دخیل در حفظ ترکیبات غشایی، ترکیبات ضد انجماد، آنتی‌اکسیدانها و فرایندهای متعدد دیگر می‌شود (۵). کاتالاز و پراکسیداز دو آنزیم مهم در مقابله با  $H_2O_2$  به عنوان یکی از ROS های اصلی می‌باشند. گزارش شده که پراکسیداز پس از کاتالاز در درجه دوم اهمیت در حذف  $H_2O_2$  نقش ایفا می‌کند (۶). تاکنون تحقیقات متعددی در خصوص تغییر فعالیت و بیان این دو ژن تحت تنش سرما مشاهده شده (۷ و ۸) اما اطلاعات در خصوص پاسخ این آنزیم‌ها تحت سازگاری کوتاه مدت محدود است. سازگاری کوتاه مدت<sup>۳</sup> پدیده ای است که گیاهان در طی رشد و نمو، قبل از رسیدن دما به سطوح پایین به طور معمول با آن برخورد می‌کنند. هرچند سازگاری بلند مدت پاسخ‌های وسیعی را در راستای تحمل راه اندازی می‌کند اما در بسیاری از موارد تغییرات دمایی در دوره های زمانی کوتاه انجام می‌گیرد و گیاهی قادر به ادامه حیات است که بتواند در این شرایط فرایندهای سازگاری را ایجاد کند (۹ و ۱۰). بنا بر این مطالعه پاسخ این آنزیم‌ها به سازگاری کوتاه مدت در نخود دسی که به صورت بالقوه می‌تواند به عنوان منابع غنی ژنتیکی در پژوهش‌های اصلاحی و زراعت مورد استفاده قرار گیرد (۱۱ و ۱۲ و ۱۳)، در کنار نخودهای کابلی که در سطوح وسیع در کشور ما کشت می‌شوند، می‌تواند به پیشبرد اهداف اصلاحی و افزایش عملکرد این گیاه کمک نماید. بنا بر این در این پژوهش، ابتدا اثر دو دمای مختلف سازگاری بر روی پاسخ به تنش سرمای ژنوتیپی از انواع نخود دسی (ژنوتیپ ۴۳۲۲) بررسی گردید. پس از انتخاب دمای مناسب، میزان فعالیت

2. Reactive oxygen species

3. Short cold acclimation

نمونه (براساس نتایج اسپکتروفتومتری محاسبه شدند) روی ژل ۱/۵٪ آگارز، الکتروفورز شد تا نسبت به کیفیت بالای آن اطمینان حاصل شود. پس از اطمینان از کیفیت RNA و مشاهده باندهای مربوط به RNA ریبوزومی s18 و s28، تیمار DNase برای تمامی نمونه‌ها بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز اعمال شد. بدین منظور دو میکروگرم RNA، یک میکرولیتر بافر، یک واحد (u) آنزیم DNase I و ۱۰ واحد (u) آنزیم RNase inhibitor مخلوط شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. سپس یک میکرولیتر EDTA به تیوب‌ها اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. تیوب‌ها جهت نگهداری، در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد قرار داده شدند.

#### ساخت cDNA

جهت ساخت cDNA، از روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز برای تمامی نمونه‌ها استفاده شد. اولین رشته‌ی cDNA با کمک آغازگر الیگو دی تی ساخته شد. مقدار ۵ میکرولیتر از RNA ای که با DNase تیمار گردیده بود، همراه با ۰/۵ میکروگرم آغازگر الیگودی تی مخلوط شد و حجم محلول با استفاده از آب DEPC به ۱۱ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد و پس از آن به سرعت روی یخ سرد گردید. سپس ۴ میکرولیتر بافر واکنش و ۲ میکرولیتر دی‌اکسی‌نوکلئوتری فسفات با غلظت ۱۰ میکرومول و ۲۰ واحد RNase inhibitor (u) به هر تیوب افزوده گردید و حجم محلول با آب DEPC به ۱۹ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. بعد از آن ۲۰۰ واحد (u) آنزیم Revert Aid M-Mulv به محلول فوق اضافه شد و پس از مخلوط نمودن به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس به منظور غیر فعال نمودن واکنش، تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند.

طراحی آغازگر برای کمیت سنجی با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز<sup>۶</sup> طراحی آغازگرها برای ژن‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و ژن

بیوشیمیایی، در فاصله‌های زمانی ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از شروع تنش از برگ‌های میانی گیاهان انجام شد. نمونه‌های کنترل از هر گیاه و برای هر تیمار زمانی به جهت بررسی بیان ژن، در همان لحظه‌ی نمونه‌گیری گیاهان تحت تنش، از گیاهان در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

#### استخراج RNA

به منظور استخراج RNA کل با روش بایوزول<sup>۴</sup> (فرژن پویش، ایران، تهران)، ۸۰ میلی گرم از بافت مورد نظر که با کمک هاون چینی استریل به خوبی در نیتروژن مایع کوبیده شده بود در یک میلی لیتر بافر قرار داده شد و پس از چند ثانیه ورتکس، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن افزوده شد و پس از چند ورتکس کوتاه، به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. تیوب‌های حاوی نمونه ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید، سپس فاز بالایی به تیوب‌های جدید منتقل شد و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد. پس از چند بار تکان دادن، تیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از آن تیوب‌ها ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی حذف و یک میلی لیتر اتانول ۷۰٪ اضافه شد. نمونه‌ها تکان داده شدند و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه و سرعت ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. مجدداً مایع رویی حذف شد و پس از خشک شدن الکل، رسوب RNA در ۵۰ میکرولیتر آب DEPC<sup>۵</sup> حل شد. غلظت RNA هر استخراج به کمک اسپکتروفتومتر تعیین گردید. جهت تعیین کمیت RNA، بخشی از RNA به نسبت ۱:۱۰۰ رقیق شده و با دستگاه اسپکتروفتومتر ارزیابی گردید، مقدار جذب نور در طول موجهای ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر از روی دستگاه خوانده شد و مقدار کل RNA بر حسب میکروگرم در میکرولیتر محاسبه شد. از آنجایی که OD<sub>۳۲۰</sub> میزان جذب زمینه و آلودگی‌های احتمالی را مشخص می‌کند بنا بر این از OD<sub>۲۶۰</sub> و OD<sub>۲۸۰</sub> کسر شد تا نتایج نزدیک‌تر به واقعیت باشند.

$$RNA_{(ng/\mu l)} = (OD_{260} - OD_{320}) \times \text{dilution factor} \times 4$$

$$\text{Yield} = OD_{(260-320)} / OD_{(280-320)}$$

همچنین جهت تعیین کیفیت RNA نیز مقدار ۵ میکروگرم از هر

4. Biozol

5. Diethylpyrocarbonate

6. Real-time PCR

جدول شماره ۱: ویژگی آغازگر ژن‌های کاتالاز (cat)، ژن اسکوربات پراکسیداز (apx) و ژن خانه دار اکتین (act) در کمیت سنجی نسبی سطوح RNA تحت تنش سرما

| شماره دسترسی | نام ژن | توالی  | طول محصول (جفت باز) |
|--------------|--------|--|---------------------|
| AJ131046.1   | cat    | 5'-TGCCCGCAGATGGATAGA-3'<br>5'-GGTTGGCGAGGACCTTAACT-3'                       | 161                 |
| AB024991     | apx    | 5'-CCTTTCCACCCCGGTAGAGAGGACAAGC-3'<br>5'-GACCACCGGACAAAGCAACAATATCTTGATCG-3' | 148                 |
| EU529707.1   | act    | 5'-CTACGAATTGCCTGATGGAC-3'<br>5'-CCTCCTGAAAGGACGATGTT-3'                     | 189                 |

وجود ندارد و به عبارتی یک در نظر گرفته می‌شود. بنا بر این بیان نسبی ژن‌ها با روش  $\Delta\Delta CT2$  - محاسبه گردید (۱۵) به این صورت که هر تیمار با گیاهان کنترل مربوط به زمان خود مقایسه گردید. جهت تجزیه‌ی داده‌ها از نرم افزار REST<sup>۷</sup> (۱۶) استفاده شد.

#### اندازه‌گیری تحمل به سرما براساس قابلیت نفوذپذیری غشاء سلولی گیاه

تحمل به سرما بر اساس شاخص نشت الکترولیتی<sup>۸</sup> بافت‌های خسارت دیده نخود بعد از تیمار سرما اندازه‌گیری شد. شرایط رشد در بالا توضیح داده شد. ابتدا نمونه‌گیری از گیاهان سازگار شده در دو دمای متفاوت ۱۰ و چهار درجه سانتیگراد که به دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند انجام شد و سپس نمونه‌گیری از برگ‌ها به ترتیب بعد از ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت سازگاری و پس از اعمال تنش انجماد در گیاهان سازگار شده انجام شد. نمونه‌های کنترل از نیز از گیاهان موجود در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. هشتاد میلی‌گرم برگ پس از برش افقی، به لوله آزمایش حاوی ده سی‌سی آب مقطر انتقال یافت. جهت جذب بهتر آب با استفاده از پمپ خلاء هوای درون محیط خارج شده و لوله‌های آزمایش به مدت سی دقیقه در دستگاه شیکر قرار گرفتند. سپس میزان نشت الکترولیتی نمونه‌ها (EC<sub>1</sub>) با استفاده از دستگاه EC متر (آلمان، Inolab) اندازه‌گیری شد. محتوی لوله آزمایش پس از قرار گرفتن در حمام آب گرم با

خانه دار اکتین<sup>۹</sup> با استفاده از نرم افزار پرایمر<sup>۳</sup> انجام شد. توالی، شماره دسترسی مورد استفاده در سایت NCBI و طول محصول آغازگر ژن اختصاصی و ژن خانه دار در جدول (۱) ارائه شده است.

#### انجام روش QRT-PCR<sup>۸</sup>

در این تحقیق از دستگاه iQ5 شرکت BioRAD و کیت حاوی رنگ فلورسنس SYBR BioPars (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) برای ارزیابی کمی استفاده گردید. ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط SYBR BioPars، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی پیشرو و پسرو با غلظت ۱۰ میکرومول، ۳ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۵ میکرولیتر نمونه cDNA مورد بررسی بود. برای هر واکنش ۳ تکرار در نظر گرفته شد. پس از آماده نمودن مخلوط واکنش پلیت مورد نظر به دستگاه iQ5 منتقل گردید و با شرایط زیر واکنش زنجیره ای پلی مرارز انجام شد: ۲ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ تکرار با چرخه‌های ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (دمای Tm آغازگر) و ۱۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. در ارزیابی الگوی بیان ژن‌ها از دو روش ارزیابی مطلق و ارزیابی نسبی می‌توان استفاده نمود. در ارزیابی مطلق، تعداد دقیق رونوشت هر ژن در تمامی تیمارها حتی تیمار کنترل نیز مشخص می‌شود. ولی در ارزیابی نسبی، میزان افزایش یا کاهش بیان ژن در هر تیمار نسبت به تیمار کنترل به صورت نسبت بیان می‌شود که در این حالت امکان اندازه‌گیری میزان بیان ژن در تیمار کنترل

7. Actin

8. Quantitative reverse transcript PCR

9. Relative Expression Software Tool

10. Electrolyte leakage

شد. مخلوط هموژن شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، با سرعت  $g \ 12000$ ، به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس  $0.5$  میلی لیتر از مایع رویی به  $0.5$  میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم  $10$  میلی مولار ( $PH \ 7.0$ ) افزوده شد، سپس یک میلی لیتر از یدید پتاسیم یک مولار به آن اضافه گردید و میزان جذب در طول موج  $390$  نانومتر اندازه گیری شد. محتوای  $H_2O_2$  با کمک منحنی استاندارد که با مقادیر مشخص  $H_2O_2$  رسم شده بود سنجیده شده و به صورت میکرو مول بر گرم برگ تر<sup>۱۶</sup> گزارش گردید (۲۱).

### نتایج و بحث

شاخص نشت الکترولیتی یکی از روش‌های کارآمد در سنجش میزان آسیب غشایی است (۲۲). در این پژوهش شاخص خسارت برگ (ELI) بعنوان یک معیار فیزیولوژیکی در تعیین اختلافات ژنوتیپ‌ها بر حسب میزان خسارت به غشاء سلولی در تنش کوتاه مدت سرما بکار گرفته شد (۳). آزمون  $f$  بر اساس نتایج ELI که پس از اعمال تنش در دمای  $10^-$  درجه سانتی‌گراد بعد از قرارگیری در دماهای سازگاری متفاوت محاسبه شد، اختلاف معنی داری بین تیمارهای سازگاری ۴ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد نشان داد ( $p \leq 0.01$ ). نتایج آزمایش نشان داد که میزان شاخص نشت الکترولیتی تحت تنش سرما در هر دو شرایط افزایش یافت که می‌توان آن را در اثر اختلافات غشای سلولی در اثر تنش از جمله افزایش میزان ROS قلمداد کرد (شکل ۱). میزان شاخص نشت الکترولیتی تحت تنش دمایی زیر صفر در ژنوتیپ ۴۳۲۲، پس از سازگاری در دمای  $10$  درجه سانتی‌گراد به  $43/85$  رسید در حالی که مقدار شاخص، پس از سازگاری در دمای چهار درجه بسیار بیشتر و حدود  $54/47$  بود. این نتایج تایید کننده راه اندازی بهتر مسیرهای سازگاری و آمادگی برای مقابله با تنش سرما در دمای  $10$  درجه سانتی‌گراد بود. این دما به عنوان دمای مناسب سازگاری در برخی از ژنوتیپ‌های کابلی گزارش گردیده بود (۱۲). بنا بر این دمای  $10$  درجه سانتی‌گراد جهت بررسی پاسخ دو ژنوتیپ نخود دسی و کابلی به سازگاری کوتاه مدت انتخاب گردید. در مرحله

دمای  $95$  درجه سانتی‌گراد، در دستگاه شیکر قرار گرفته و بلافاصله میزان هدایت الکترولیتی ( $EC_2$ ) تعیین شد و در نهایت مقدار شاخص خسارت براساس فرمول  $I=(EC_1/EC_2) \times 100$  محاسبه گردید (۱۷).

### استخراج عصاره آنزیمی

استخراج آنزیم محلول هر نمونه با کمک Tris-Hcl ( $PH \ 7/8$ ) حاوی  $10$  درصد گلیسرول، به عنوان بافر استخراج، از  $0.5$  گرم از نمونه‌های برگ گیاهچه‌های تحت آزمایش انجام شد. اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول استخراج شده با کمک منحنی استاندارد و اعلام غلظت‌های معین و سپس دریافت فرمول رگرسونی و انطباق با میزان جذب از طریق روش بردفورد<sup>۱۱</sup> (۱۸) انجام گرفت.

### فعالیت سنجی کاتالاز

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با روش جاندا<sup>۱۲</sup> و همکاران (۱۹) با اندکی تغییرات سنجیده شد به طوری که میزان کاهش  $H_2O_2$ ، در طول موج  $240$  نانومتر نشان داده شد. محیط واکنش حاوی  $3$  میلی لیتر بافر فسفات ( $PH \ 7.0$ )،  $5$  میکرولیتر  $H_2O_2$   $30$  درصد و  $50$  میکرولیتر از عصاره آنزیمی بود. داده‌ها به صورت میکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه شده در دقیقه در میلی گرم پروتئین<sup>۱۳</sup> گزارش شد.

### فعالیت سنجی آسکوربات پراکسیداز

مقدار فعالیت این آنزیم به کمک روش رانیری<sup>۱۴</sup> و همکاران (۲۰) سنجیده شد. محیط واکنش حاوی  $600$  میکرولیتر از EDTA  $0.1$  مولار و  $1500$  میکرولیتر بافر فسفات  $0.05$  مولار ( $PH \ 7.0$ )،  $400$  میکرولیتر آسکوربیک اسید  $0.5$  میلی مولار،  $400$  میکرولیتر  $H_2O_2$   $30$  درصد و  $100$  میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. سنجش مقدار فعالیت آنزیمی یک دقیقه پس از افزودن عصاره آنزیمی به محیط واکنش انجام شد و جذب در طی  $2$  دقیقه از واکنش، به عنوان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت میکرومول آسکوربات اکسید شده در دقیقه در میلی گرم پروتئین گزارش شد.

### سنجش محتوای پراکسید هیدروژن

محتوای  $H_2O_2$  برگ با کمک  $0.35$  گرم از بافت برگ انجام شد. ابتدا برگ‌ها در ازت مایع به صورت پودر خرد شد و سپس در حمام آب یخ با  $5$  میلی لیتر تری کلرو استیک اسید<sup>۱۵</sup>  $0.1$ ٪ کاملاً مخلوط

11. Bradford

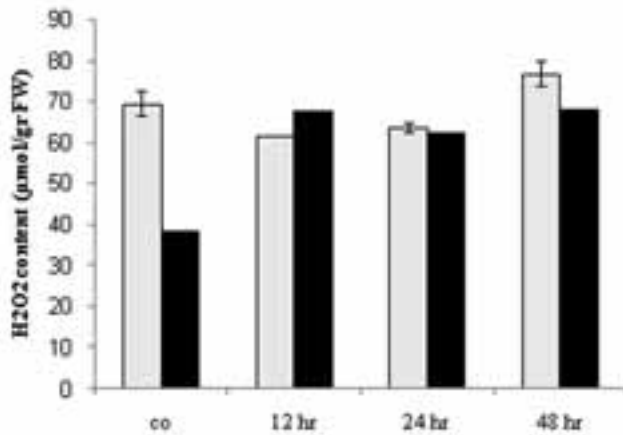
12. Janda

13. Micromol of  $H_2O_2$  decomposed per min mg protein

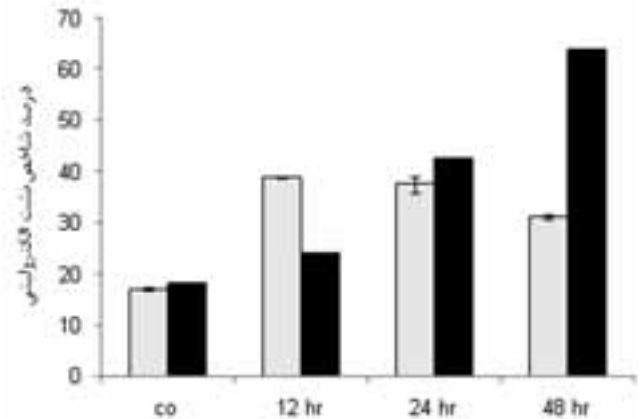
14. Ranieri

15. Trichloroacetic acid

16.  $\mu\text{mol g}^{-1}$  fresh weight



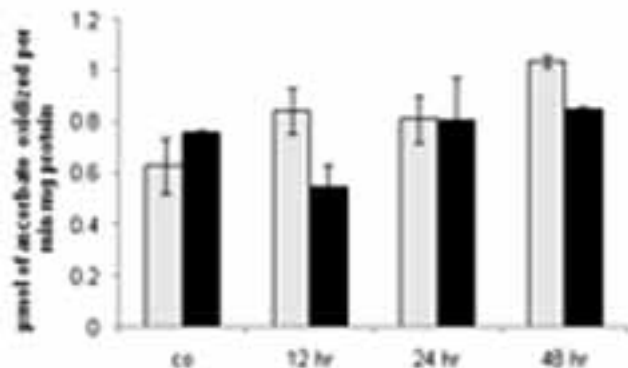
شکل ۲: سطوح پراکسید هیدروژن در طی ۴۸ ساعت قرارگیری در دمای سازگاری. ستون کنترل (CO) میزان شاخص در دمای ۲۳ درجه را و ستون‌های روشن و تیره به ترتیب ژنوتیپ جم و ۴۳۲۲ را نشان می‌دهد



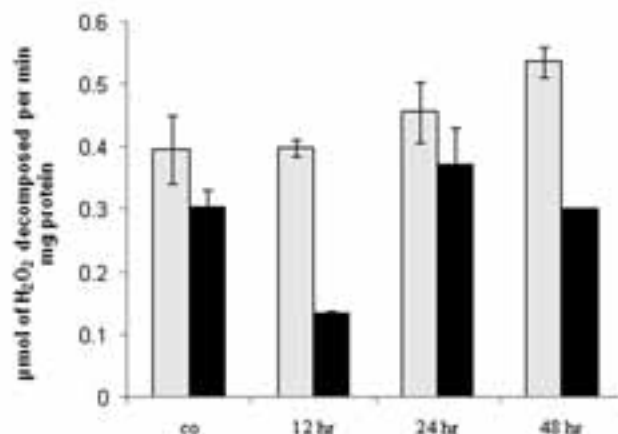
شکل ۱: شاخص نشت الکترولیتی در طی ۴۸ ساعت قرارگیری در دمای سازگاری. ستون کنترل (CO) میزان شاخص در دمای ۲۳ درجه و ستون‌های روشن و تیره به ترتیب ژنوتیپ جم و ۴۳۲۲ را نشان می‌دهد.

که سطوح اولیه  $H_2O_2$  در گونه های گیاهی و در ژنوتیپ های مختلف متفاوت است، این میزان از  $H_2O_2$  پایه، به عنوان خسارت محسوب نمی‌شود (۲۴) و دارای نقش اطلاع رسانی در جهت فعال سازی برخی از ژن‌ها و ارگانل‌ها است (۲۵). تنش سرما موجب تغییر در سطوح  $H_2O_2$  هر دو ژنوتیپ گردید که این تغییرات با افزایش  $H_2O_2$  در ۴۳۲۲ طی ۴۸ ساعت همراه بود، درحالی که پس از اعمال تنش ژنوتیپ جم سطوح  $H_2O_2$  را تا ساعت ۲۴ بعد از تنش کاهش داد و این میزان بعد از ۴۸ ساعت تقریباً با کنترل برابر باقی ماند (شکل ۲). این نتایج می‌تواند بیانگر فعال سازی موثر تر ساز و کارهای مقابله با ROS ها در ژنوتیپ جم باشد. نتایج سطوح مختلف  $H_2O_2$  در کنار میزان شاخص آسیب غشایی (ELI) نشان داد که ژنوتیپ جم بهتر از ۴۳۲۲ توانسته است اثرات تنش سرما را تحمل کند. تحقیقات گذشته نشان می‌دهد که آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز موثرتر از سایر آنزیم‌های آنتی اکسیدان می‌توانند سطوح  $H_2O_2$  را تحت تاثیر قرار دهند (۶). همانطور که شناخته شده ملکول‌های فعال در ساز و کارهای سلولی، پروتئین‌ها هستند و جنبه عملکردی آن‌ها بیشتر به فعالیت پروتئین‌های آنزیمی وابسته است تا به حضور پروتئین ها (۲۶)، بنا بر این در این مطالعه میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز سنجیده شد. نتایج نشان داد که دو ژنوتیپ پاسخی متفاوت نسبت به سرما نشان دادند. سطوح فعالیت کاتالاز در

بعدی آزمایش میزان فعالیت دو آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در کنار محتوای پراکسید هیدروژن و شاخص نشت الکترولیتی در هر دو ژنوتیپ دسی و کابلی در مدت ۴۸ ساعت اندازه گیری شد. در ساعات اولیه تنش (۱۲ ساعت بعد از شروع تنش) میزان شاخص نشت الکترولیتی در هر دو ژنوتیپ افزایش نشان داد اما با گذشت زمان تا ۲۴ ساعت بعد از تنش روند افزایش فقط در ژنوتیپ ۴۳۲۲ ادامه پیدا کرد در حالی که در ژنوتیپ جم پایداری غشاء حفظ شده و این شاخص تقریباً ثابت ماند. با طولانی تر شدن مدت زمان تنش، تفاوت در شاخص خسارت دو ژنوتیپ بروز بیشتری داشت و افزایش شدید ELI در ۴۳۲۲ و کاهش آن در جم مشاهده شد. این نتایج احتمالاً بیانگر فعال شدن ساز و کارهای تحمل در ژنوتیپ جم و به دنبال آن کاهش عوامل آسیب زا پس از شروع تنش می‌باشد. ROS ها یکی از مهمترین عوامل آسیب سلولی در خلال تنش می‌باشند که از آن جمله می‌توان به  $H_2O_2$  اشاره کرد. سطوح  $H_2O_2$  موجود در گیاه تحت تنش سرما از اهمیت زیادی برخوردار است زیرا علاوه بر اثرات سمی و مخرب، می‌تواند سبب تولید رادیکال هیدروکسیل (یک ROS فعالتر و مخرب تر) نیز شود (۲۳). بنا بر این در این آزمایش میزان سطوح نسبی  $H_2O_2$  در زمان‌های مختلف پس از شروع تنش اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که در شرایط دمای ایتیمم سطوح اولیه  $H_2O_2$  ژنوتیپ جم از ۴۳۲۲ بیشتر بود (شکل ۲). با توجه به این



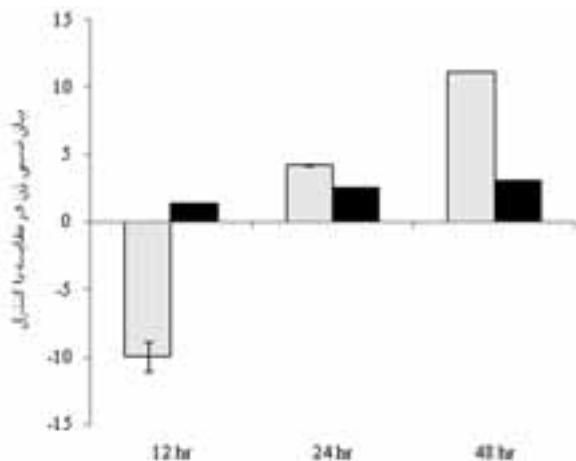
شکل ۴: میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در طی ۴۸ ساعت قرارگیری در دمای سازگاری. ستون کنترل (CO) میزان شاخص در دمای ۲۳ درجه را و ستون های روشن و تیره به ترتیب ژنوتیپ جم و ۴۳۲۲ را نشان می دهد



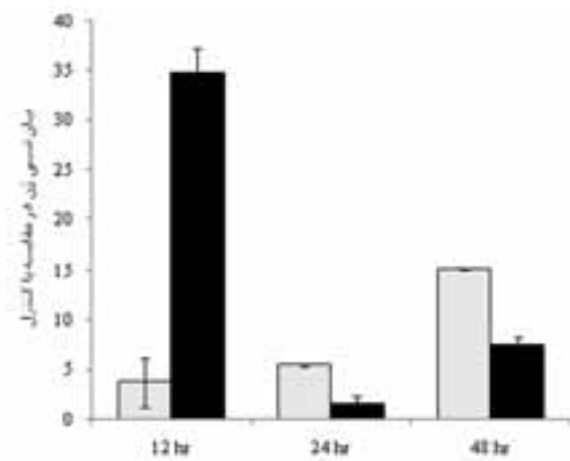
شکل ۳: میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در طی ۴۸ ساعت قرارگیری در دمای سازگاری. ستون کنترل (CO) میزان شاخص در دمای ۲۳ درجه را و ستون های روشن و تیره به ترتیب ژنوتیپ جم و ۴۳۲۲ را نشان می دهد

آنزیم های آنتی اکسیدان در پی تجمع رونوشت ژن رخ می دهد. به منظور مطالعه این موضوع، به بررسی بیان ژن های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز که در بخش قبل میزان فعالیت آن ها اندازه گیری شد پرداختیم. بیان نسبی ژن کاتالاز در طی ۴۸ ساعت تنش در هر دو ژنوتیپ نسبت به کنترل افزایش نشان داد اما این افزایش در جم روندی پایدار و صعودی داشت در حالی که ۴۳۲۲ روند مشخصی نداشت و بیشترین افزایش بیان در ساعت ۱۲ تنش رخ داده و با طولانی تر شدن تنش بیان نسبی کاهش یافت (شکل ۵). نتایج سنجش بیان ژن آسکوربات پراکسیداز نشان داد میزان بیان این ژن در ژنوتیپ جم در ساعت ۱۲ تنش نسبت به کنترل کاهش داشته اما بیان آن به تدریج تا ۴۸ ساعت بعد از شروع تنش افزایش یافت (شکل ۶). در ژنوتیپ ۴۳۲۲ بیان ژن آسکوربات پراکسیداز نسبت به کنترل افزایش نشان داد، هرچند این افزایش در ساعت ۴۸ تنش تفاوت چندانی با ساعت ۲۴ نداشت. مقایسه میزان سطوح نسبی رونوشت دو ژن مورد آزمایش در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد (شکل ۷) مشخص نمود که سطوح رونوشت هر دو ژن در ژنوتیپ جم به مراتب از ۴۳۲۲ بیشتر است (حدود ۱۱ برابر در مورد ژن کاتالاز  $p < 0.001$  و  $\geq 0.05$  در مورد ژن آسکوربات پراکسیداز  $p \geq 0.05$ ). با توجه به این که میزان کاتالاز موجود در سلول تاثیر مستقیم بر میزان رونویسی ژن های کاتالاز و پراکسیداز دارد (۲۷)، به نظر می رسد که میزان کافی فعالیت کاتالاز در ساعات اولیه تنش یکی از عوامل

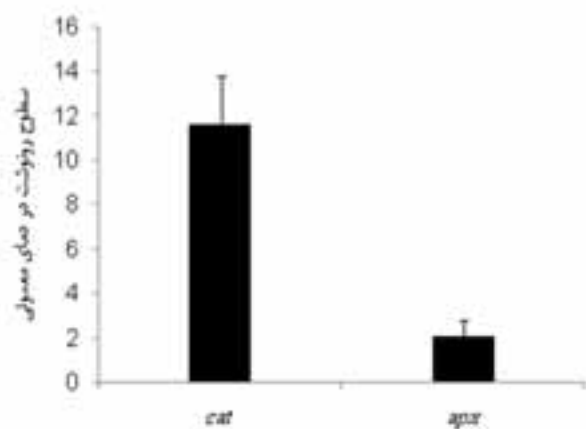
تمامی حالات در ژنوتیپ جم بیش از ۴۳۲۲ بود (شکل ۳). بعد از کاهش دما میزان فعالیت کاتالاز در جم تا ۱۲ ساعت پس از شروع تنش تغییری نشان نداد که ممکن است به دلیل کفایت میزان آنزیم های لازم برای رویارویی با ROS باشد. مقادیر کم  $H_2O_2$  موجود در بافت گیاهی نیز نشان دهنده وجود سازوکارهای مناسب جهت آمادگی ژنوتیپ جم برای رویارویی با تنش است. روند تغییر میزان فعالیت کاتالاز تا ۴۸ ساعت بعد از شروع تنش افزایش نشان داد در حالی که در ۴۳۲۲ روند پایداری دیده نشده و در ساعت ۱۲ بعد از تنش کمترین میزان فعالیت این آنزیم دیده شد و در سایر ساعات نیز افزایش معنی داری نداشت. در ژنوتیپ ۴۳۲۲ کمترین میزان فعالیت کاتالاز با بیشترین میزان تجمع  $H_2O_2$  هماهنگ بود. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز در ژنوتیپ جم تقریباً روندی افزایشی داشت هرچند این افزایش نسبت به کاتالاز کمتر بود (شکل ۴). اما در ۴۳۲۲ کمترین فعالیت آنزیم مجدداً در ساعت ۱۲ تنش مشاهده شد و در سایر ساعات افزایش چندانی نسبت به کنترل مشاهده نشد. افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در طی تنش می تواند بیانگر نیاز به آن ها در حذف ROS ها از جمله  $H_2O_2$  باشد. افزایش بیشتر این آنزیم ها در ژنوتیپ جم در مقایسه با ۴۳۲۲، همچنین بی نظمی مشاهده شده در فعالیت هر دو آنزیم در ژنوتیپ ۴۳۲۲ می تواند نشان دهنده آمادگی بیشتر ژنوتیپ جم نسبت به ۴۳۲۲ در رویارویی با تنش سرما باشد. در بسیاری موارد تجمع



شکل ۶: میزان بیان ژن آسکوربات پراکسیداز در طی ۴۸ ساعت قرارگیری در دمای سازگاری. ستون کنترل (CO) میزان شاخص در دمای ۲۳ درجه را و ستون‌های روشن و تیره به ترتیب ژنوتیپ جم و ۴۳۲۲ را نشان می‌دهد



شکل ۵: میزان بیان ژن کاتالاز در طی ۴۸ ساعت قرارگیری در دمای سازگاری. ستون کنترل (CO) میزان شاخص در دمای ۲۳ درجه را و ستون‌های روشن و تیره به ترتیب ژنوتیپ جم و ۴۳۲۲ را نشان می‌دهد



شکل ۷: مقایسه سطوح رونوشت دو ژن کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در دمای معمولی. ستون‌ها نشان دهنده سطوح رونوشت موجود در ژنوتیپ جم نسبت به ژنوتیپ ۴۳۲۲ می‌باشد.

به تنش اکسیداتیو (۲۹)، می‌توان به ظرافت این ارتباط در راستای تحمل به سرما پی برد. ویلکنز<sup>۱۷</sup> و همکاران (۳۰) گزارش کردند که کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز نقش مکمل در مقابله با H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> دارند به طوری که کاهش کاتالاز موجب تولید آسکوربات پراکسیداز می‌شود. در این مطالعه کاهش بیان اولیه آسکوربات پراکسیداز در ژنوتیپ جم و میزان کمتر افزایش بیان در ژنوتیپ ۴۳۲۲ مشاهده شد

رونویسی کمتر ژن‌های کاتالاز و پراکسیداز در ژنوتیپ جم بوده است. همانگونه که در شکل‌های ۳ و ۵ مشاهده می‌شود روند بیان ژن کاتالاز در ژنوتیپ جم شباهت زیادی با روند افزایش فعالیت این آنزیم دارد که نشان دهنده وجود نوعی ارتباط بین رونویسی و فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ جم است. اما نتایج، عدم وجود این ارتباط در ۴۳۲۲ را نمایان ساخت و بی‌نظمی در هر دو مورد فعالیت و بیان ژن کاتالاز مشاهده شد. ارتباط بین فعالیت و بیان ژن آسکوربات پراکسیداز نیز در ژنوتیپ جم بیشتر از ۴۳۲۲ بود به طوری که مشاهده شد بیشترین فعالیت با بیشترین میزان بیان همخوانی دارد. مقایسه این داده‌ها در کنار شاخص نشت الکترولیتی و سطوح H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> نشان داد که فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در کنار سایر عوامل دخیل در پاسخ تحمل گیاهان می‌تواند موجب بروز تحمل بیشتر ژنوتیپ جم در مقایسه با ۴۳۲۲ شده باشد. افزایش فعالیت و رونوشت هر دو ژن در ژنوتیپ جم که تحمل بیشتری به سرما نشان داد، بیانگر تحریک تولید متابولیت‌ها و پروتئین‌های دخیل در ساز و کارهای تحمل در راستای آماده‌سازی گیاه برای رویارویی با دماهای پایین‌تر علاوه بر بروز کمترین خسارت در دمای کنونی می‌باشد. افزایش بیان آسکوربات پراکسیداز در ساعات طولانی‌تر تنش می‌تواند نشان دهنده وجود رابطه مکمل بین کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز باشد (۲۸) که با توجه به گزارشات مربوط به اهمیت آسکوربات پراکسیداز در افزایش تحمل



و کارهای افزایش تحمل را در ژنوتیپ کابلی (جم) ایجاد کند، هرچند نتایج حاکی از افزایش میزان خسارت به موازات عدم پاسخ مناسب ژنوتیپ دسی (۴۳۲۲) در این شرایط بود. ژنوتیپ‌های مختلف نخود دسی ممکن است پاسخ‌هایی از حساسیت تا تحمل نشان دهند. همچنین تغییرات دمایی در مزرعه و آزمایشگاه پاسخ‌های متفاوتی را در گیاهان نشان می‌دهد. هرچند گزارشات آرایه شده حاکی از تحمل بیشتر ژنوتیپ‌های نخود دسی نسبت به کابلی بوده اما اغلب این مطالعات به مقایسه این دو نوع نخود در سطح مزرعه پرداخته است (۳۳). با توجه به این که شرایط مزرعه همانند شرایط کنترل شده آزمایشگاهی نیست و حوزه وسیع تغییرات و تنش‌های محیطی را داراست، مقایسه در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند پاسخ گیاهان را یک تنش خاص را دقیق تر نشان دهد (۳۴). در این پژوهش پایداری بیشتر غشاء، عدم افزایش معنی دار  $H_2O_2$  تحت تنش، افزایش بیشتر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در کنار بیان پایدارتر و بیشتر ژن‌های مزبور در ژنوتیپ جم همگی بیانگر تحمل بیشتر ژنوتیپ جم در شرایط و تیمارهای اجرا شده در این آزمایش است. این مطالعه نشان داد که پاسخ سریع به تنش سرما و حذف  $H_2O_2$  در گیاه نخود می‌تواند در مدت زمان کوتاهی پس از شروع تنش آغاز شود که این مدت کوتاه می‌تواند برخی از گیاهان را برای مقابله با اثرات تنش آماده کند. هرچند مطالعات بیشتر فیزیولوژیکی و ژنتیکی در سطوح مختلف گلخانه و مزرعه در تکمیل این نتایج ضروری بنظر می‌رسد.

که می‌تواند به دلیل کفایت میزان کاتالاز در مقابله با تنش اکسیداتیو باشد. هر چند فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ژنوتیپ جم در طی ۴۸ ساعت روند افزایشی داشته است اما در ژنوتیپ ۴۳۲۲ کاهش فعالیت آسکوربات پراکسیداز با افزایش فعالیت کاتالاز همراه گردیده است. با توجه به این که مطالعات قبلی مولفین نیز تایید کننده میزان تحمل بیشتر ژنوتیپ جم در مقایسه با ۴۳۲۲ در سطوح آزمایشگاهی بود، بنا بر این احتمالاً میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در کنار سایر عوامل موثر در تحمل موجب بروز چنین پاسخی شده است، که گزارشات قبلی در مورد ژن‌های سوکروز سینتاز، بتاگالاکتوزیداز و بتاگلوکوزیداز نیز تایید کننده همین تفسیر است (۳۱ و ۳۲). نتایج شاخص نشت الکترولیتی نشان داد که تنوعی در پاسخ ژنوتیپ‌ها به دمای پایین وجود دارد و این تنوع منعکس کننده ساز و کارهای متمایز درونی گیاه و احتمالاً تنوع در میزان فعالیت ژن‌ها باشد و با توجه به پاسخ‌های معنی دار ژنوتیپ‌ها در ELI، پاسخ‌های متفاوت تحمل به تنش سرما حتی در زمان کوتاه اعمال تنش سرما نیز قابل نتیجه گیری است (۳). بررسی بیان ژن‌های آنتی اکسیدان در کنار فعالیت آنزیمی آن‌ها، سطوح  $H_2O_2$  و میزان نشت الکترولیتی در دو ژنوتیپ جم و ۴۳۲۲، پاسخ‌های متفاوت دو گیاه نخود دسی و کابلی در مدت زمان کوتاه قرارگیری در معرض دمای پایین را نمایان ساخت به گونه ای که پاسخ ژنوتیپ جم که تحمل بیشتری در تنش دمای پایین نشان داده بود، به دقت از پاسخ ژنوتیپ ۴۳۲۲ متمایز گردید. این پژوهش نشان داد که دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد نیز می‌تواند ساز

## References

- Guo H, Gao S, Zhao F, et al. Effects of cold acclimation on several enzyme activities in euonymus radicans 'emerald & gold' and its relation to semi-lethal temperature. *Forestry Studies in China* 2004;6(1):10-17.
- Guy C. Molecular responses of plants to cold shock and cold acclimation. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1999;1:231-42.
- Maali-Amiri R, Goldenkova-Pavlova IV, Pchelkin VP, et al. Lipid fatty acid composition of potato plants transformed with the  $\Delta 12$ -desaturase gene from cyanobacterium. *Russian Journal of Plant Physiol* 2007;54:678-85.
- Nazari M, Maali Amiri R, Mehraban FH, et al. Change in antioxidant responses against oxidative damage in black chickpea following cold acclimation. *Russian Journal of Plant Physiology* 2012;59. (In press).
- Cao S, Bian X, Jiang S, et al. Cold treatment enhances lead resistance in Arabidopsis. *Acta Physiol Plant* 2010;32:19-25.
- Cook D, Fowler S, Fiehn O, et al. A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of Arabidopsis. *Plant Biology* 2004;101:15243-8.
- Yong Z, Hao-Ru T, Ya L. Variation in Antioxidant Enzyme Activities of Two Strawberry Cultivars with Short-term Low Temperature Stress. *World Journal of Agricultural Sciences* 2008;4(4):458-62.
- Yonghua Z, Raymond WMF, Shioh YW, et al. Transcript levels of antioxidative genes and oxygen radical scavenging enzyme activities in chilled zucchini

- squash in response to superatmospheric oxygen. *Postharvest Biology and Technology* 2008;47:151-8.
9. Kume S, Kobayashi F, Ishibashi M, et al. Differential and coordinated expression of Cbf and Cor/Lea genes during long-term cold acclimation in two wheat cultivars showing distinct levels of freezing tolerance. *Genes. Genet. Systems* 2005;80:185-97.
  10. Hannah MA, Heyer AG, Hincha DK. A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 2005;1: e26.
  11. Yadav SS, Kumar J, Yadav SK, et al. Evaluation of helicoverpa and drought resistance in desi and kabuli chickpea. *Plant Genetic Resources* 2006;4:198-203.
  12. Nayyara H, Bainsb TS, Kumara S. Chilling stressed chickpea seedlings: effect of coldacclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. *Environmental and Experimental Botany* 54 (2005) 275–285.
  13. Mantri NL, Ford R, Coram TE, et al. Transcriptional profiling of chickpea genes differentially regulated in response to high-salinity, cold and drought. *Bio Med Central Genomics* 2007;8, 303.
  14. Zaferanieh M, Nezami A, Parsa M, et al. Evaluation of fall sowing of cold tolerant chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasms under complementary irrigation in Mashhad condition: 2- Yield and yield components. *Journal of Iranian crop research* 2010;2:483-92. (in farsi).
  15. Pfaffl MW. 2007. Relative quantification in: Real-time PCR, Dorak MT (ed). Taylor and Francis Group, UK.
  16. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30:36-46.
  17. Popov VN, Orlova IV, Kipaikina NV, et al. The effect of tobacco plant transformation with a gene for acyl-lipid  $\Delta 9$ -desaturase from *Synechococcus vulcanus* on plant chilling tolerance. *Russian J Plant Physiol* 2005;52:664-8.
  18. Bradford MM. A dye binding assay for protein. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
  19. Janda T, Szalai G, Tari I, et al. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta* 1999;208:175-80.
  20. Ranieri A, Castagna A, Pacini J, et al. Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. *J Exp Bot* 2003;54:2529-40.
  21. Loreto F, Velikova V. Isoprene Production by Leave Protects the Photosynthetic Apparatus Against Ozone Damage, Aqueous Ozone Products, and Reduces Lipid Peroxidation of Cellular Membranes. *Plant Physiol.* 2001;127:1781-1787.
  22. Jing M, Ste'phane H, Marc V, et al. Effect of chilling on photosynthesis and antioxidant enzymes in *Hevea brasiliensis* Muell. *Arg Trees* 2009;23:863-74.
  23. Chen YZ, Patterson BD. The Effect of Chilling Temperature on the Level of Superoxide Dismutase, Catalase and Hydrogen Peroxide in Some Plant Leaves. *Acta Phytophysiol Sin* 1988;14:323-8.
  24. Hernandez J, Ferrer M, Jimenez A, et al. Anti-oxidant systems and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology* 2001;127:817-31.
  25. Prasad TK, Anderson MD, Martin BA, et al. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* 1994;6:65-74
  26. Pandey A, Chakraborty S, Datta A, et al. Proteomics approach to identify dehydration responsive nuclear proteins from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Mol Cell Proteomics* 2007;7:88-107.
  27. Morita S, Kaminaka H, Masumura T, et al. Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress; the involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signalling. *Plant Cell Physiol* 1999;40:417-22.
  28. Scebbba F, Sebastiani L, Vitagliano C. Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation. *Physiol Plant* 1998;104:747-52.
  29. Sato Y, Murakami T, Funatsuki H, et al. Heat shock-mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings. *J Exp Bot* 2001;52:145-51.
  30. Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, et al. Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C3 plants. *The EMBO Journal* 1997;16:4806-16.
  31. Nazari MR, Maali Amiri R, Ramezani SS. Quantitative assessment of gene expression pattern of sucrose synthase under cold stress condition in chickpea. *Genetic-novin* 2011. (In press) (In farsi).
  32. Nazari MR, Maali Amiri R, Ramezani SS. Quantitative assessment of gene expression pattern of beta galactosidase and beta glucosidase under cold stress condition in chickpea. *Genetic-novin* 2011;4:59-70.
  33. Nagar V, Chohan A, Raina SK. Comparative studies on morphological and biochemical characters of chickpea genotypes under chilling stress. *Journal of Environmental Biology* 2011;32:189-194.
  34. Mittler R, Blumwald E. Genetic Engineering for Modern Agriculture: Challenges and Perspectives. *Annu Rev Plant Biol* 2010;61:443-462.