Arshive of SID

ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶
صفحه ۲۸ - ۱۹

برخی تغییرات فیزیولوژیکی و مولکولی القاشده به‌وسیله نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید (TiO_2) تحت تنش سرما در نخود زراعی

Some physiological and molecular changes induced by TiO_2 nanoparticles in chickpea plants during cold stress

سعید امینی[۱]، رضا معالی امیری*[۱]، فاطمه سلطانی[۱]

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار، دانشجوی کارشناسی ارشد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

Amini S[1], Maali-Amiri R[*1], Soltani F[1]

1- PhD Student, Associate Professor, MSc Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rmamiri@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۶)

چکیده

در این آزمایش، برخی پاسخ‌های فیزیولوژیکی- مولکولی به تنش سرما ٤°C در دو ژنوتیپ متحمل (Sel96Th11439) و حساس (ILC533) نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) تحت تیمار پنج میلی‌گرم بر لیتر نانوذره تیتانیوم دی‌اکسید (TiO_2) بررسی شد. نتایج نشان داد تحت تنش سرما محتوای پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در گیاهان حساس در مقایسه با گیاهان متحمل به‌طور معنی-داری افزایش یافت. نانوذرات TiO_2 باعث کاهش معنی‌داری در محتوای H_2O_2 شده به طوری‌که ژنوتیپ‌های متحمل محتوای H_2O_2 پایین‌تری در مقایسه با ژنوتیپ‌های حساس نشان دادند. این کاهش اغلب با افزایش آنزیم آسکوربات پراکسیداز به‌منظور محافظت از تنش سرما در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس و همچنین در گیاهان تیمارشده با نانوذرات TiO_2 در مقایسه با گیاهان شاهد همراه بود که بیانگر افزایش درجه تحمل به سرما در اثر حفاظت از سلول در برابر گونه‌های اکسیژن فعال بود. درگیاهان تیمار شده با نانوذرات TiO_2 میزان بیان نسبی ژن‌های آسکوربات پراکسیداز، زنجیره *ATPase* کمپلکس بازآرایی کروماتین و چاپرونین-٦٠ نیز در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش نشان داد و این افزایش در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس محسوس‌تر بود. بنابراین پاسخ تحمل نخود به تنش سرما پس از استفاده از نانوذرات TiO_2، با افزایش بیان ژن‌های تنظیم‌کننده سطح رونویسی و حفاظتی و ژن‌های فعال در حذف گونه‌های اکسیژن فعال همراه بوده و به توانایی گیاه نخود برای بقا و یا بهبود خسارت سلولی آن طی تنش سرما کمک می‌کند و احتمالاً منجر به پایداری عملکرد تحت شرایط مزرعه خواهد شد.

واژه‌های کلیدی

آسکوربات پراکسیداز
بیان نسبی ژن
پاسخ‌های خسارت
تنش سرما
نانوذرات

www.SID.ir

Arshive of SID

مقدمه

رشد، نمو و بهره‌وری گیاهان، از جمله گیاه نخود (*Cicer arietinum* L.) درکشت پاییزه یا زمستانه تحت تاثیر تنش سرما محدود می‌شود. بنابراین اصلاح برای تحمل به تنش سرما یکی از گزینه‌های مهم در سازگاری، بهبود تولید و عملکرد گیاه نخود است (Heidarvand et al. 2011). تنش سرما مانند دیگر تنش‌های زنده و غیر زنده با تولید بیش‌از حد گونه‌های اکسیژن فعال[1] (ROS) باعث آسیب‌های شدید از جمله تخریب پروتئین‌ها، دناتوره‌شدن آنزیم‌ها و شکستن مولکول‌های اسید نوکلئیک (DNA و RNA) در سلول‌های گیاهی می‌شود. یکی از رویکردهای مهم در اصلاح برای تحمل به سرما بهبود پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه به تنش سرما، بدون ایجاد تغییرات ژنتیکی است. با توجه به خواص منحصر به فرد نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید (TiO_2)، این نانوذره دارای بیش‌ترین کاربرد در محصولات مختلف از جمله کرم‌های ضد آفتاب، محصولات غذایی، دارویی و در بخش‌های معینی از کشاورزی می باشند (Castiglione et al. 2014). پژوهش‌های پیشین نشان داده که استفاده از نانوذرات TiO_2 در غلظت‌های پایین در گیاه نخود طی تنش سرما، احتمالا تحریک‌کننده مسیرهای پیام‌رسانی خاصی بوده که تا حدوی به تنظیم تغییرات متابولیک در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از سرما منجر شده‌است (Hasanpour et al. 2015). هم-چنین تحقیقات گذشته نشان داده که نانوذرات TiO_2 سبب تغییر در وزن خشک، سنتز کلروفیل و برخی از ویژگی‌های متابولیسمی در موجودات فتوسنتز کننده شده‌است. این تغییرات غالباً با القای سامانه‌های دفاعی و کاهش قابل توجه در شاخص‌های خسارت همراه بوده است (Feizi et al. 2012; Singh etal. 2012). بر اساس این یافته‌ها پتانسیل بالایی برای توسعه دامنه استفاده از نانوذرات TiO_2 در بهبود ویژگی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی محصولات وجود دارد. با این وجود استفاده از نانوذرات (NP_S) در گیاهان نیازمند راهنمایی‌های تئوریک و تکنولوژیک مربوط به خواص نانوذرات و پاسخ‌های فیزیولوژیک و مولکولی مربوط به اعمال آن‌ها در هر گیاه است. زیرا نانوذرات می‌توانند اثرات منفی متنوعی نیز بر فرایندهای متابولیک داشته باشند (Khodakovskaya et al. 2012). از یک سو کاربرد نانوذرات TiO_2 فعالیت مکانیسم‌های دفاعی را در بعضی از موجودات بهبود می‌بخشد و از سوی دیگر اثراتی منفی مانند تجمع ROSها را ایجاد می‌کند (Hu et al. 2005; Li et al. 2012). بنابراین این اثرات ممکن است باعث محدودیت کاربرد گسترده نانوذرات TiO_2 در بخش کشاورزی شود. تحت تنش سرما میزان خسارت‌های سلولی (در اثر افزایش ROSها) افزایش می‌یابد. بنابراین، برای پشتیبانی از کاربرد نانوذرات TiO_2، باید نقش آن‌ها در طی تنش سرما بیشتر مورد مطالعه قرار بگیرد. در مطالعات قبلی برای اولین بار اثر نانوذرات TiO_2 بر محتوای شاخص آسیب دیدگی[2] (MDA) و شاخص هدایت الکترولیت[3] (ELI) در طی تنش سرما در ژنوتیپ‌های نخود ارزیابی شد (Mohammadi et al. 2013). نتایج نشان داد که غلظت پایین پنج میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات TiO_2 در طی تنش سرما در ژنوتیپ‌های نخود اثرات مضر و نامناسبی نداشته و حتی باعث کاهش محتوای MDA و ELI می‌شود. تصور می‌شد حضور نانوذرات TiO_2 در سلول‌ها در طی تنش سرما احتمالاً باعث القای مسیرهای انتقال سیگنالی شود که تا حدودی در تنظیم تغییرات متابولیک در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از تنش سرما نقش دارند. با این حال، در ژنوتیپ‌های مطالعه شده در مورد چنین پاسخ‌هایی که در رشد و دفاع از گیاه موثرند اطلاعاتی در دسترس نیست.

گیاهان برای دستیابی به پاسخ مناسب به تغییرات محیطی بیان بسیاری از ژن‌ها را تغییر می‌دهند، فرایندی که توسط زنجیره ATPase کمپلکس بازآریی کروماتین[4] میانجی‌گری می‌شود (Arnholdt-Schmitt. 2004). تصور می‌شود این آنزیم‌ها تنظیم‌کننده پیکربندی کروماتین به حالت باز (حالت فعال رونویسی) و یا بسته (ممانعت‌کننده از رونویسی) بوده (Harikrishnan et al. 2005) و با استفاده از تجزیه ATP باعث تغییر توپولوژی DNA در موقعیتی خاص می‌شوند (Tsukiyama. 2002). بنابراین این ژن‌ها نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌های

[1] Reactive oxygen species

[2] Malondialdehyde (MDA)

[3] Electrolyte leakage index

[4] Chromatin remodeling complex ATPase chain

www.SID.ir

Arshive of SID

یوکاریوتی خصوصا تحت تنش‌های محیطی ایفا می‌کنند (Vignali et al. 2000).

در گیاهان، چاپرونین‌ها با حفاظت از ساختار پروتئین‌ها نقش تعیین‌کننده‌ای در حفظ سلامت سلول تحت تنش‌های محیطی دارند (Alves et al. 2011). کلروپلاست اندامکی است که بیشترین میزان تولید ROS و در نتیجه بیشترین آسیب پروتئینی در طی تنش سرما در آن مشاهده شده‌است (Hunner et al. 1993). بنابراین بیان ژن چاپرونین ٦٠[1] تحت تنش سرما جهت کارایی مناسب آنزیم روبیسکو که نقش مهمی در انجام فتوسنتز و تولید انرژی برای سنتز متابولیت‌های اولیه و ثانویه در پاسخ به تنش‌های محیطی دارد ضروری می‌باشد.

تحت تنش‌های محیطی تولید فراوان گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) یکی از عوامل مهم موثر در خسارت گیاهان بوده (Gill and Tuteja 2010) که سلول با تغییر وضعیت ترکیبات غشایی، پروتئین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و بسیاری از متابولیت‌های دیگر به آن پاسخ می‌دهد (Cao et al. 2010; Heidarvand and Maali-Amiri. 2013). آسکوربات پراکسیداز (APX)[2] آنزیمی مهم در مقابله با H_2O_2 به عنوان یکی از ROSهای مخرب سلولی است (Kazemi-Shahandashti et al. 2013; Kang and Saltveit. 2002). تغییر در فعالیت و بیان نسبی این ژن تحت تنش سرما می‌تواند اطلاعات مفیدی در زمینه القا سامانه‌های دفاعی گیاه در سطح رونویسی و ترجمه ارائه کند.

هدف از این پژوهش، مطالعه شاخص‌های خسارت سلولی مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، فعالیت و بیان نسبی ژن *APX* وبیان نسبی ژن‌های *Chromatin Remodeling Complex-ATPase* و *Chapronin-60* تحت تنش سرما در دو ژنوتیپ نخود (ژنوتیپ متحمل Sel94Th11439 و ژنوتیپ حساس ILC533) تیمار شده با نانوذرات TiO_2 است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، از دو ژنوتیپ نخود کابلی Sel96Th11439 (متحمل به سرما) و ILC533 (حساس به سرما) که از موسسه تحقیقات کشاورزی دیم ایران (مراغه، آذربایجان شرقی) تهیه شده بودند، استفاده شد. بذور با هیپوکلریت سدیم ده درصد به مدت ده دقیقه ضدعفونی شده و پس از شستشو با آب‌مقطر بر روی کاغذ صافی در پتری‌دیش با رطوبت لازم که با ١٠ میلی‌لیتر محلول نانوذرات TiO_2 با غلظت پنج میلی‌گرم بر لیتر تیمار شده بودند، قرار گرفت. پتری‌دیش‌ها در شرایط بدون نور و دمای ˚C ٢٣ به مدت ٧٢ ساعت قرار گرفتند و پس از جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها به گلدان‌ها انتقال یافت. انتقال غیرمستقیم گیاهان به خاک به دلیل اهمیت سبز شدن یکنواخت آن‌ها و اجرای دقیق تیمارهای آزمایش در نمونه‌ها بود. گلدان‌ها در اتاقک رشد آزمایشگاه گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران با نور ٢٠٠ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه و شرایط نوری ١٦ ساعت روز و ٨ ساعت شب و دمای ˚C ٢٣ و رطوبت نسبی ٧٥ درصد قرار داده شد. محلول‌پاشی نانو-ذره به گیاهچه‌ها به‌صورت اسپری در دوازدهمین و شانزدهمین روز (گیاهچه دارای پنج شاخه) در شرایط اتاقک رشد انجام شد. همچنین گیاهان شاهد هر تیمار با آب‌مقطر محلول‌پاشی شدند. پودر نانوذره TiO_2 از شرکت پاک فن گستر تهران (تهیه‌شده از گروه Nanoyo سنگاپور) تهیه شد. بررسی‌ها با استفاده از میکروسکوپ SEM (Scanning electron microscope) نشان داد که اندازه نانوذره ٤٠–٧ نانومتر بود. هم‌چنین بررسی خصوصیات کریستالی نانوذره TiO_2 با استفاده از XRD (X-ray diffraction) نشان داد که تنها فرم آناتاز (Anatase) در آن‌ها وجود داشت (Mohammadi et al. 2013). خلوص این پودر بیش از ٩٩ درصد بود. سوسپانسیون پنج میلی‌گرم بر لیتر نانوذره TiO_2 در آب دوبار تقطیر شده از طریق ٣٠–٢٠ دقیقه اولتراسونیکیشن (kHz ٣٨، W ١٢٠) تهیه شد. جهت بررسی پاسخ‌های گیاهی به تنش سرما، در روز بیست و یکم گیاهچه‌های محلول‌پاشی شده و شاهد که دارای ٢٠ سانتی‌متر طول و حداقل پنج شاخه با طول ٨–٥ سانتی‌متر بودند، به اتاقک رشد با دمای ˚C ٤ (آروین تجهیز، اصفهان، ایران) منتقل شدند و نمونه‌گیری در روز اول (٢٤ ساعت) پس از شروع تنش سرما (جهت بررسی پاسخ‌های زودهنگام گیاه) و روز ششم پس از شروع تنش (جهت بررسی پاسخ‌های دیرهنگام گیاه) از هر دو گروه گیاه انجام شد. نمونه‌گیری از گیاهچه‌ها در اتاقک رشد با دمای ˚C ٢٣ نیز انجام

[1] *Chaperonin-60*
[2] Ascorbate peroxidase

www.SID.ir

Arshive of SID

گرفت. بنابراین در این پژوهش اثر نانوذره TiO_2 در سه نوع تیمار دمایی (شامل گیاهان کنترل، روز اول تنش سرما ٤°C و روز ششم تنش سرما ٤°C) و در دو ژنوتیپ متحمل (Sel96Th11439) و حساس (ILC533) (در نمونه‌های اسپری‌شده و کنترل) نخود کابلی و در مجموع ۱۲ نمونه در سه تکرار به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج آنزیم محلول هر نمونه با استفاده از Tris-Hcl (۷/۸ pH) حاوی ۱۰ درصد گلیسرول (بافر استخراج) از ۰/۵ گرم از نمونه‌های برگی گیاهچه‌های تحت شرایط آزمایش انجام شد. سنجش میزان پروتئین محلول استخراج شده با کمک منحنی استاندارد و تعیین غلظت‌های معین و سپس دریافت روابط رگرسیونی و انطباق با میزان جذب با روش بردفورد[1] انجام شد (Bradford.1976). میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با روش (Ranieri et al. 2003) در دمای ۲۵°C سنجش شد. محیط واکنش حاوی۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۵۰۰ میکرولیتر EDTA ۰/۱ مولار، ۱۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۵ میلی‌مولار (۷/۰ pH) و ٤۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد بود. میزان فعالیت آنزیمی بر اساس میکرومول آسکوربات اکسایش‌یافته در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۹۰ nm اندازه‌گیری‌شد.

به‌منظور استخراج و سنجش فعالیت پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ۰/۳۵ گرم نمونه تازه گیاهی با نیتروژن مایع در هاون چینی به پودر تبدیل شد. پودر تهیه شده به فالکون ۱۵ میلی‌لیتری انتقال یافت و سپس ۵ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید یک درصد (محلول در حمام یخ) به تیوب اضافه شد و تیوب‌ها تا یکنواخت‌شدن نمونه‌ها در حمام یخ قرار داده شد. تیوب حاوی نمونه یکنواخت شده به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ٤°C با سرعت $g \times$ ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی به یک تیوب جدید حاوی یک میلی‌لیتر محلول یک مولار یدید پتاسیم و ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار افزوده شد و پس از چندبار وارونه کردن تیوب در محیط تاریک برای یکنواخت نمودن محتوای آن، مقدار جذب هر نمونه در طول موج ۳۹۰ nm اندازه‌گیری شد (Loreto and Velikova 2001).

استخراج RNA کل سلولی توسط روش بایازول[2] (فرژن پویش، تهران، ایران) از ۸۰ میلی‌گرم نمونه‌های بافت برگی خرده شده به کمک ازت مایع در هاون چینی استریل انجام گرفت. کیفیت RNA استخراج شده توسط الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد تعیین شد. تشکیل دو باند RNA ریبوزومی 18S و 28S بر روی ژل، کیفیت بالای RNA تخلیص شده را تایید کرد. برای بررسی کمی میزان غلظت RNA از دستگاه نانودراپ در طول موج ۲٦۰nm استفاده شد. در مرحله بعد RNA استخراج شده با آنزیم DNaseI براساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز تیمار شد. دو میکروگرم RNA، یک میکرولیتر بافر، یک واحد (u) آنزیم DNaseI و ۱۰ واحد (u) آنزیم RNase inhibitor، مخلوط و با افزودن آب DEPC حجم محلول به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۳۰ دقیقه دردمای ۳۷°C قرار گرفتند. سپس یک میکرولیتر EDTA به تیوب‌ها اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٦۵°C قرار داده شدند. تیوب‌ها در دمای ۸۰°C- نگه‌داری شدند. پنج میکرولیتر RNA تیمار شده با DNase با کمک آغازگر الیگو دی‌تی[3] (۱ پیکومول) (۲۰-۱۸ نوکلئوتید) مخلوط شد و حجم محلول با استفاده از آب DEPC به ۱۱ میکرولیتر رسانده شد. این مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰°C قرار گرفت و پس از آن روی یخ سرد شد. سپس ٤ میکرولیتر بافر واکنش و ۲ میکرولیتر دی‌اکسی نوکلئوتری فسفات[4] با غلظت ۱۰ میکرومول و ۲۰ واحد آنزیم RNase inhibitor به هر تیوب اضافه و حجم محلول با آب DEPC به ۱۹ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷°C قرار داده شد. بعد از آن، ۲۰۰ واحد (u) آنزیم RevertAid M-Mulv به این محلول افزوده شده و پس از مخلوط کردن به مدت یک ساعت در دمای ٤۲°C قرار دادهشد. سپس برای غیرفعال کردن واکنش، تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰°C قرار گرفتند. به‌منظور تایید سنتز cDNA از روش تکثیر ژن خانه‌دار (*Actin1*) بر روی cDNA ساخته شده (پس از رقیق‌سازی و رساندن غلظت cDNA سنتز شده به ۲۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر) توسط PCR و الکتروفورز آن برروی ژل یک

[1] Bradford

[2] Biozol
[3] Oligo dt
[4] Deoxynucleothriphosphate

www.SID.ir

Arshive of SID

درصد آگارز استفاده شد که اندازه باند مشاهده شده با اندازه ژن خانه‌دار مطابقت داشت. غلظت cDNA سنتز شده ۱۲۴۵ نانوگرم بر میکرولیتر بود. طراحی آغازگر برای ژن‌های آسکوربات پراکسیداز (*APX*)، کمپلکس بازآرایی کروماتین (*Crc*) و چاپرونین-۶۰ (*Cpn-60*) که EST آن‌ها در گیاه نخود تحت تیمار نانوذره TiO_2 و تنش سرما در آزمایشگاه ژنومیکس گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران به روش cDNA-AFLP جداسازی شده (Amini et al. 2017) و هم‌چنین ژن خانه‌دار *Actin-1* با استفاده از نرم‌افزار Primer3 انجام گرفت. در جدول ۱ توالی آغازگرهای ژن‌های اختصاصی و ژن خانه‌دار ارایه شده است. مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر کیت حاوی رنگ فلورسنت Evagreen، ۳ میکرولیتر آب مقطر استریل، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی پیشرو و پسرو با غلظت ۱۰ میکرومول و ۵ میکرولیتر نمونه cDNA ساخته شده بود. برای هر واکنش دو تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکی استفاده شد. پس از آماده کردن مخلوط واکنش، پلیت موردنظر به دستگاه iQ5 منتقل شد و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به صورت دو دقیقه در دمای ۹۴°C و ۳۵ تکرار با چرخه‌های ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵°C، ۱۰ ثانیه در دمای ۶۰°C (دمای اتصال آغازگر) و ۱۰ ثانیه در دمای ۷۲°C انجام شد. بیان نسبی ژن‌ها با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. کلیه تیمارها با گیاهان کنترل زمان خودش مقایسه شد. جهت تجزیه داده‌ها از نرم‌افزار REST[1] استفاده شد (Pfaffl et al. 2002).

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت‌های معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی تحت اثر نانوذرات TiO_2 از نظر صفات مورد بررسی وجود داشت که دلالت بر وجود تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌ها و نیز واکنش متفاوت ژنوتیپ‌ها تحت تیمارهای دمایی داشت. سازوکار تحمل گیاهان تحت تیمار با نانوذرات TiO_2 تاکنون ناشناخته مانده با این وجود امروزه تنظیم میزان ROS (در این مطالعه محتوای H_2O_2) احتمالاً می‌تواند برخی از مکانیسم‌های تحمل به تنش سرما را در گیاه نخود مشخص کند.

[1] Relative expression software tool

جدول ۱- توالی‌های آغازگر استفاده شده در واکنش زنجیرهای پلیمراز در زمان واقعی (qPCR)

Accession number	Gene	Protein	Sequence (5′→3′)	T_m (°C)	Amplicon length (bp)
XM_004502430	*Ca.APX*	Ascorbate peroxidase	F: ATGGCATGATGCTGGTACTTA R:GTCTTTGATTGGCTGGAGAAGT	60	156
XM_004505990	*Ca.cpn-60*	Chaperonin-60	F:GAATGGTGAATGGGAGGTTG R: TCAACCACAATGGCCTGTGTGG	61	159
XM_004508250	*Ca.Crc*ATPase	Chromatin remodeling complex ATPase	F: CCCTCATTCGGCTTGTAGAG R: AACTGCTTCCGCTTCTTCAG	62	157
EU529707.1	*CaActin 1*	Actin 1	F: CTACGAATTGCCTGATGGAC R: CCTCCTGAAAGGACGATGTT	62	189

جدول ۲- نتایج آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه شاخص‌های آسیب: میزان فعالیت APX (میکرومول آسکوربات اکسیدشده بر میلی‌گرم در دقیقه پروتئین) و محتوای هیدروژن پراکساید (H_2O_2) (میکرومول برگرم وزن‌تر)

پارامتر	۲۳°C		۱ روز پس از تنش سرما		۶ روز پس از تنش سرما	
	شاهد	تیمار با TiO_2	شاهد	تیمار با TiO_2	شاهد	تیمار با TiO_2
			Sel11439			
APX	۳۰/۶۱ ± ۱/۲۰^{bcd}	۳۳/۶۷ ± ۱/۰۷^{bc}	۲۳/۴۹ ± ۰/۴۰^{e}	۲۵/۱۱ ± ۱/۲^{de}	۲۹/۶۶ ± ۱/۰۳^{cde}	۴۲/۶۹ ± ۶/۲۰^{a}
H_2O_2	۷۴/۳۴ ± ۵/۷۹^{b}	۶۱/۳۵ ± ۴/۲۴^{c}	۸۵/۲۸ ± ۲/۱۰^{b}	۶۷/۸۴ ±۱/۷۵^{bc}	۷۰/۹۶ ±۱/۴۷^{bc}	۴۲/۹۱ ± ۶/۹۴^{d}
			ILC533			
APX	۳۶/۵۶ ± ۳/۳۸^{b}	۲۵/۳۳ ± ۱/۰۸^{de}	۲۷/۶۵ ± ۲/۸۷^{cde}	۲۷/۹۷ ± ۲/۵۲^{cde}	۲۹/۷۶±۰/۷۰^{cde}	۳۲/۶۶ ± ۰/۲۹^{bc}
H_2O_2	۸۱/۰۱ ± ۶/۶۵^{bc}	۸۲/۷۹ ± ۳/۹۷^{bc}	۱۱۱/۴۵ ± ۱۰/۰۴^{a}	۸۵/۰۱ ± ۸/۵۰^{b}	۱۱۹/۷۰ ± ۱۳/۸۴^{a}	۹۹/۸۰ ± ۷/۲۵^{b}

حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

www.SID.ir

Arshive of SID

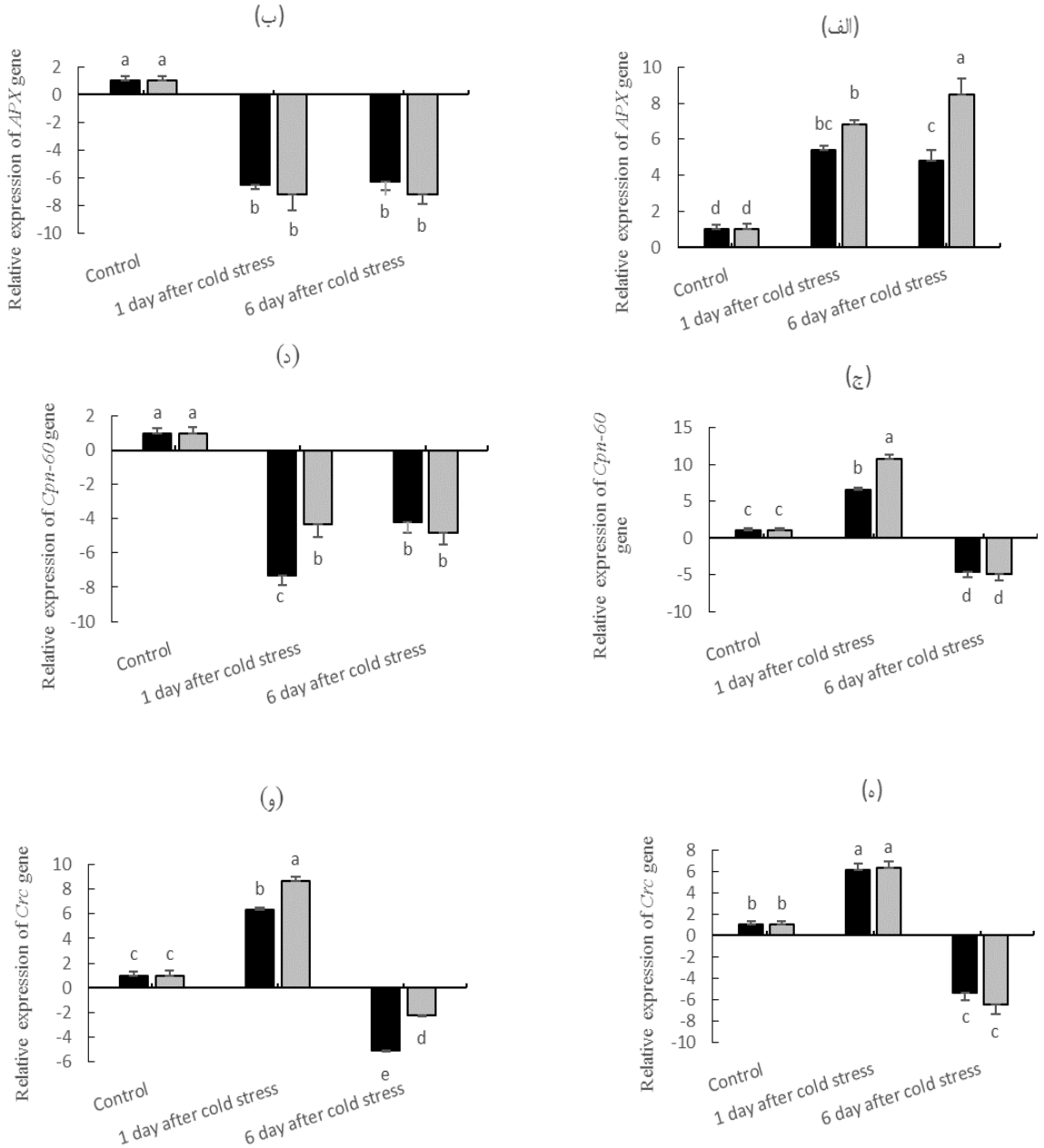
همچنین میزان H_2O_2 می‌تواند نشان دهنده درجه آسیب ایجاد شده توسط تنش سرما نیز باشد (Prasad et al. 1994; Heidarvand and Maali-Amiri. 2011). در دمای ۲۳°C، تجمع H_2O_2 به طور معنی‌داری تنها در گیاهان متحمل تیمارشده با نانوذرات TiO_2 در مقایسه با گیاهان شاهد کاهش یافت (۱۷/۵ درصد). در روز ششم تنش سرما گیاهان متحمل تیمارشده با نانوذرات TiO_2 کاهش معنی‌داری در محتوای H_2O_2 در مقایسه با دمای ۲۳°C نشان دادند (به‌تقریب ۲۳ درصد) درحالی‌که در گیاهان شاهد محتوای H_2O_2 تغییر معنی‌داری نداشت (جدول ۲). در همین شرایط محتوای H_2O_2 در گیاهان حساس تیمار شده با نانوذرات TiO_2، در مقایسه با دمای ۲۳°C تغییری نکرده در حالی‌که در گیاهان شاهد افزایش (به‌تقریب ۳۸ درصد) یافت (جدول ۲). بیش‌ترین اثر نانوذرات TiO_2 بر محتوای H_2O_2 در ژنوتیپ متحمل مشاهده شد به‌طوری که محتوای H_2O_2 به میزان کمتری نسبت به گیاهان شاهد در دمای ۲۳°C رسید (جدول ۲). بنابراین تحت تنش سرما، نانوذرات TiO_2 تنها مانع از افزایش محتوای H_2O_2 در ژنوتیپ حساس شد. این نتایج با نتایج مطالعه انجام شده بر روی گیاه اسفناج که نشان داده در گیاهان تیمار شده با نانوذرات TiO_2 میزان تجمع ROS کاهش می‌یابد، مطابقت دارد (Lei et al. 2008). نتایج تجزیه میزان H_2O_2 نشان داد که درجه پاسخ به نانوذرات TiO_2 می‌تواند وابسته به نوع ژنوتیپ در شرایط دمای طبیعی و تنش سرما متفاوت باشد که ظرفیت ژنتیکی ژرم‌پلاسم نخود را در پاسخ به شرایط محیطی نشان می‌دهد. بنابراین بررسی شاخص خسارت سلولی از یک طرف ممکن است به‌عنوان نشانگری آگاهی‌بخش در ارزیابی اثرات نانوذرات TiO_2 در سلول‌های گیاهی مفید باشد و از طرف دیگر نشان می‌دهد که غلظت‌های پایین نانوذره (۵ mg/L) نه تنها سبب القا تنش اکسیداتیو نشده بلکه با کاهش میزان ROSها، از خسارت سلولی جلوگیری می‌کند.

در بسیاری موارد افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان سلولی تحت تاثیر تنش‌های محیطی که جهت حذف ROSها در سلول رخ می‌دهد در پی تجمع رونوشت ژن‌های آن اتفاق می‌افتد (Kazemi-Shahandashti et al. 2013). به‌منظور مطالعه این موضوع میزان بیان نسبی ژن آسکوربات پراکسیداز (*APX*) بررسی شد. نتایج بررسی بیان نسبی ژن *APX* نشان داد که تحت تنش سرما بیان این ژن در ژنوتیپ حساس، کاهش و در ژنوتیپ متحمل افزایش یافت، طوری‌که این افزایش در گیاهان تیمار شده با نانوذرات TiO_2 چشمگیر بود (شکل ۱). در پاسخ به تنش اکسیداتیو القا شده توسط سرما، ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شامل *APX*، *SOD*، *CAT*، *GPX* و *PPO* با حذف ROSها در هوموستازی سلول ایفای نقش می‌کنند (Kazemi-Shahandashti et al. 2013). افزایش میزان رونوشت ژن *APX* نشان دهنده این است که گیاهان از آسیب‌های سلولی (نتایج H_2O_2) تنش سرما جلوگیری کرده و تحت این شرایط گیاهان تیمارشده با نانوذرات TiO_2، به‌طور مؤثرتری چنین فعالیتی را انجام می‌دهند. نکته جالب آن است که در ژنوتیپ متحمل تحت تنش و تیمار نانوذره بیان ژن *APX* هم در پاسخ زودهنگام (تا ۶/۸ برابر) و هم در پاسخ دیر هنگام (تا ۸/۵ برابر) افزایش معنی‌داری در مقایسه با دمای ۲۳°C نشان داد که بیانگر نقش القایی نانوذره TiO_2 در فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه می‌باشد (شکل ۱). جهت تایید نتایج رونوشت ژن *APX*، فعالیت آنزیم APX نیز تحت تیمارهای آزمایشی بررسی شد. تحت تنش سرما فعالیت آنزیم APX در ژنوتیپ متحمل هم در مقایسه با شرایط دمای ۲۳°C (به‌تقریب ۲۷ درصد) و هم در مقایسه با ژنوتیپ حساس (به‌تقریب ۳۱ درصد) افزایش معنی‌داری داشت و این افزایش در گیاهان تیمار شده با نانوذره در مقایسه با گیاهان شاهد چشمگیر بود (شکل ۱).

بالاترین میزان فعالیت آنزیم APX در ژنوتیپ متحمل تیمارشده با نانوذره شش روز پس از تنش سرما مشاهده شد، همان شرایطی که میزان خسارت سلولی به کمترین میزان خود رسید (جدول ۲). چنین نتایجی حتی با مشاهده میزان فعالیت این آنزیم در گیاهان متحمل تیمارشده با نانوذره در مقایسه با گیاهان شاهد قابل انتظار بود. بنابراین افزایش فعالیت و رونوشت ژن *APX* در ژنوتیپ متحمل که تحمل بیشتری به سرما نشان داد، بیانگر تحریک فعالیت ژنوم در سطح رونویسی و پس از رونویسی در راستای آماده‌سازی گیاه برای رویارویی با دماهای پایین‌تر به‌موازات بروز کمترین خسارت می‌باشد.

www.SID.ir

Arshive of SID



شکل ۱- الگوی بیان ژن‌های آسکوربات پراکسیداز (*APX*)، کمپلکس بازآرایی کروماتین (*Crc*) و چاپرونین-۶۰ *Cpn-60* در ژنوتیپ‌های متحمل Sel96Th11439 (الف، ج، ه) و حساس ILC533 (ب، د، و) گیاهان کنترل (ستون سیاه) و گیاهان تیمارشده با نانوذرات TiO_2 (ستون خاکستری) نخود تحت تیمارهای دمایی آزمایش شامل شرایط کنترل (23°C)، روز اول و روز ششم تنش سرما (۴°C).

چنین نتایجی بیانگر فعالیت‌های هماهنگ بین آنزیم APX و میزان رونویسی ژن *APX* در گیاه نخود مخصوصا تحت اثر تیمار نانوذرات TiO_2 نیز می‌باشد و می‌تواند به‌طور متمایزی درجه تحمل به تنش سرما را در ژنوتیپ‌های متحمل و حساس نشان دهد.

گزارش‌های قبلی نیز سنتز هماهنگ رونوشت‌های ژنی را با فعالیت *APX* تحت تنش‌های محیطی در گیاهان متفاوت نشان می‌دهند (Cook et al. 2004; Yong et al. 2008; Zheng et al. 2008; Kazemi-Shahandashti et al. 2013).

به‌نظر می‌رسد که نوسانات در فراوانی رونوشت ژن همراه با فعالیت آنزیمی آن با تغییرات میزان ROS مرتبط باشد. در

www.SID.ir

Arshive of SID

برنامه‌ریزی مجدد سلولی تحت شرایط محیطی جدید، تغییر الگوی رونوشت ژن‌ها ویژگی منحصر به فرد گیاهان بوده که به وسیله تنظیم‌کننده‌های ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی القا می‌شود. آرایش مجدد کروماتین (وابسته و غیر وابسته به ATP) تغییری دینامیک در معماری کروماتین است که به پروتئین‌های تنظیمی ماشین رونویسی اجازه دسترسی به DNA ژنومی را داده به‌طوری‌که بیان ژن را تنظیم می‌کند (Yang et al. 2015). در روز اول تنش سرما بیان ژن کمپلکس بازآرایی کروماتین در هر دو ژنوتیپ در تیمارهای شاهد و تیمار شده با نانوذرات TiO_2 در مقایسه با دمای معمولی تا ۸/۷ برابر افزایش یافت، به‌طوری‌که این افزایش در گیاهان تیمارشده با نانوذرات TiO_2 بیش‌تر بود (شکل ۱). این افزایش بیان نشان می‌دهد که تغییر فعالیت ژن‌ها به‌عنوان رویکرد اساسی و پایه در مقابله با اثرات نامطلوب تنش مطرح شده و یکی از راهکارهای تقویت قدرت دفاعی گیاه تلقی می‌شود که در نهایت منجر به کاهش میزان خسارت‌های سلولی در روز ششم تنش سرما در گیاهان متحمل مخصوصاً گیاهان تیمارشده با نانوذره می‌شود. با این وجود، در روز ششم تنش سرما چنین پاسخی در میزان رونوشت این ژن مشاهده نشد به‌طوری‌که میزان بیان این ژن تا ٦/٥ برابر کاهش یافت (شکل ۱). به‌دلیل نقش این ژن در تغییر موقعیت نوکلئوزوم‌ها و جدا شدن هیستون‌ها از DNA و یا تسهیل تبادل هیستون‌ها که با همکاری ژن‌های متعددی انجام می‌شود (Harikrishnan et al. 2005)، تغییر بیان آن احتمالا بخشی از پاسخ‌های اولیه گیاه نخود تحت تنش سرما محسوب شده که بر حسب ظرفیت ژنتیکی ژنوتیپ‌ها می‌تواند باعث تغییرات فنوتیپی (تایید شده با میزان خسارت‌ها) متنوع در گیاه شود. تحقیقات نشان داده که در شرایط تنش، رشد طبیعی گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس که در آن‌ها ژن *AtCHR12* تشدیدشده[1] دچار کاهش می‌شود، اما در تراریخته‌هایی که ژن *AtCHR12* حذف‌شده[2]، رشد گیاه در شرایط تنش کمتر تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Mlynarova et al. 2007). چنین تغییراتی سهم عمده‌ای در سازگاری به سرما در اثر برنامه‌ریزی مجدد بیان ژن‌ها و هوموستازی سلولی ایفا می‌کند زیرا با صرفه‌جویی در مصرف انرژی، متابولیت‌های دفاعی تولید خواهند شد (Amini et al. 2017).

نتایج نشان داد که در ژنوتیپ متحمل، بیان نسبی چاپرون مولکولی *Ca. chaperonin-60* در روز اول تنش سرما در مقایسه با دمای معمولی تا ۱۰/۸ برابر افزایش یافت (شکل ۱). این توالی رمزکننده زیرواحد آلفا چاپرونین ٦٠ متصل شونده به زیر واحد بزرگ روبیسکو در گیاه نخود است. محصول این خانواده پروتئینی، در ممانعت از تجمع برگشت‌ناپذیر پروتئین‌های غیرطبیعی در شرایط طبیعی و تنش ایفای نقش کرده و با مصرف ATP در متصل کردن زیرواحدهای روبیسکو نقش دارد (Timperio et al. 2008). مطالعات نشان داده که محصول ژن‌های چاپرونین در گیاهان در تنظیم متابولیسم پروتئین‌ها نقش دارند به طوری‌که محصولات این خانواده ژنی به‌عنوان اولین گروه از پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تغییرات دمایی شناسایی‌شده‌اند (Kotak et al. 2007). کاهش بیان نسبی این ژن در روز ششم در ژنوتیپ متحمل (تا ٤/٩ برابر کاهش) می‌تواند در اثر خسارت تنش سرما یا در اثر سازگاری به سرما و عدم نیاز به القای بیان این ژن باشد (شکل ۱). با توجه به کاهش معنی‌دار میزان H_2O_2 در روز ششم تنش سرما مخصوصاً گیاهان تیمارشده با نانوذرات TiO_2 که همراه با افزایش بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاهش یافته فرضیه دوم تایید می‌شود. بنابراین چاپرونین‌ها با حفاظت از ساختار پروتئین‌ها نقش تعیین کننده‌ای در تحمل به تنش از طریق افزایش ظرفیت فتوسنتزی دارند زیرا فعالیت فتوسنتزی با تولیدATP می‌تواند در تولید متابولیت‌های اولیه و ثانویه موثر در تنش سرما شرکت کرده و درنهایت به افزایش درجه تحمل بیانجامد، مکانیسم‌هایی که در اثر ضعف سیستم فتوسنتزی در گیاه حساس مشاهده نمی‌شود (شکل ۱).

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که نانوذرات TiO_2 نه تنها ممکن است توسط گیاه نخود جذب شوند، بلکه زمانی‌که گیاهان در معرض تنش سرما قرار می‌گیرند القا کننده اثرات مثبت بر سلول می باشند. تحت تنش سرما، نانوذرات TiO_2، ROSهای بین سلولی (H_2O_2) را که مسئول تنش‌های اکسیداتیو می‌باشند، در فرایند سلولی وابسته به زمان کاهش می‌دهند. جالب است که این سازوکارها اغلب به طور متمایز در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل

[1] Overexpression
[2] Knock out

www.SID.ir

Arshive of SID

فعالیت کرده که نشان‌دهنده وجود ظرفیت ژنتیکی گیاه نخود جهت افزایش تحمل سرما می‌باشد. القای متمایز فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان تیمارشده با نانوذرات TiO_2 احتمالا باعث کاهش محتوای H_2O_2 شده و میزان تحمل به سرما در گیاه نخود حساس و متحمل را افزایش داده است. تصور می‌شود که سلول‌ها خواستار ایجاد هوموستازی جدید در انرژی و متابولیت برای سازگاری به تنش سرما باشند. این را می‌توان از افزایش فعالیت ژن‌های کمپلکس بازآرایی کروماتین و فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (مانند APX) به شکلی هماهنگ در سطوح رونویسی و ترجمه مشاهده کرد، که احتمالاً به منظور اطمینان از توانایی گیاهان برای زنده ماندن یا بهبود در طول تنش سرما ایجاد می‌شود. این پاسخ‌ها با کاهش میزان خسارت سلولی (H_2O_2) همراه بودند. چنین پاسخ‌های متمایزی ممکن است به عنوان شاخص ایده آل در مطالعه اثرات نانوذرات TiO_2 تحت تنش سرما درنظر گرفته شود.

نتایج نشان داد که نانوذرات TiO_2 با القای برخی از پاسخ‌های سلولی در طول دوره تنش سرما باعث کاهش خسارت سلولی و ارتقای سطح تحمل در گیاه نخود شد. این یافته‌ها که گیاه نخود تیمارشده با نانوذرات TiO_2، در اثر کاهش میزان خسارت‌های سلولی تحمل بیشتری به تنش سرما دارد، ممکن است به توانایی گیاه نخود برای بقا و یا بهبود آن طی تنش سرما بیانجامد و کاربرد جدیدی برای نانوذرات TiO_2 در کشاورزی پیشنهاد کند، که منجر به پایداری عملکرد در مزرعه شود. تحقیقات گذشته نیز نشان داده‌اند که نانوذرات TiO_2 سبب سنتز کلروفیل، تغییر در وزن خشک، عملکرد و برخی از ویژگی‌های متابولیسمی موجودات فتوسنتز کننده شده که این تغییرات غالباً همراه با القای سامانه‌های دفاعی و کاهش قابل توجه در شاخص‌های خسارت بوده است (Feizi et al. 2012; Singh et al. 2012; Mohammadi et al. 2013). با این وجود، با توجه به چالش‌های بهداشتی و زیست محیطی، اثرات کاربرد نانوذرات TiO_2، بر عملکرد و کیفیت نخود باید به‌طور کامل مورد مطالعه قرار گیرد.

منابع

Alves M, Moes S, Jenö P, Pinheiro C, Passarinho J, Ricardo CP (2011) The analysis of *Lupinus albus* root proteome revealed cytoskeleton altered features due to long-term boron deficiency. Journal of Proteomics 74:1351-1363.

Arnholdt-Schmitt B (2004) Stress-induced cell reprogramming. A role for global genome regulation?. Plant Physiology 136: 2579-2586.

Amini S, Maali-Amiri R, Mohammadi R, Kazemi-Shahandashti SS (2017). cDNA-AFLP analysis of transcripts induced in chickpea plants by TiO_2 nanoparticles during cold stress. Plant Physiology and Biochemistry 111:39-49.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72: 248-254.

Cao S, Bian X, Jiang S, Chen Z, Jian H, Sun Z (2010) Cold treatment enhances lead resistance in Arabidopsis. Acta Physiologiae Plantarum 32:19-25.

Castiglione MR, Giorgetti L, Cremonini R, Bottega S, Spanò C (2014) Impact of TiO_2 nanoparticles on *Vicia narbonensis* L.: potential toxicity effects. Protoplasma 251:1471-1479.

Cook D, Fowler S, Fiehn O, Thomashow MF (2004) A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101:15243-15248.

Feizi H, Moghaddam PR, Shahtahmassebi N, Fotovat A (2012) Impact of bulk and nanosized titanium dioxide (TiO_2) on wheat seed germination and seedling growth. Biological Trace Element Research 146:101-106.

Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48:909-930.

Harikrishnan KN, Chow MZ, Baker EK, Pal S, Bassal S, Brasacchio D, El-Osta A (2005) Brahma links the SWI/SNF chromatin-remodeling complex with MeCP2-dependent transcriptional silencing. Nature Genetics 37:254-264.

Hasanpour H, Maali-Amir R, Zeinali H (2015) Effect of TiO_2 nanoparticles on metabolic limitations to photosynthesis under cold in chickpea. Russian Journal of Plant Physiology 62: 779-787.

Heidarvand L, Amiri RM, Naghavi MR, Farayedi Y, Sadeghzadeh B, Alizadeh KH (2011) Physiological and morphological characteristics of chickpea accessions under low temperature stress. Russian Journal of Plant Physiology 58:157-163.

Heidarvand L, Maali-Amiri R (2013) Physio-biochemical and proteome analysis of chickpea in early phases of cold stress. Journal of Plant Physiology 170:459-469.

Hu X, Jiang M, Zhang A, Lu J (2005) Abscisic acid-induced apoplastic H_2O_2 accumulation up-regulates the

www.SID.ir

Arshive of SID

activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. Planta 223:57-68.

Huner JV, Lindqvist OV, Könönen H (1988) Comparison of morphology and edible tissues of two important commercial crayfishes, the noble crayfish, Astacus astacus Linné, and the red swamp crayfish, Procambarus clarkii (Girard) (Decapoda, Astacidae and Cambaridae). Aquaculture 68:45-57.

Kang HM, Saltveit ME (2002) Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid. Physiologia Plantarum 115:571-576.

Kazemi-Shahandashti SS, Maali-Amiri R, Zeinali H, Khazaei M, Talei A, Ramezanpour SS (2013) Effect of short-term cold stress on oxidative damage and transcript accumulation of defense-related genes in chickpea seedlings. Journal of Plant Physiology 171:1106-1116.

Khodakovskaya MV, de Silva K, Biris AS, Dervishi E, Villagarcia H (2012) Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. ACS Nano 6:2128-2135.

Kotak S, Larkindale J, Lee U, von Koskull-Döring P, Vierling E, Scharf KD (2007) Complexity of the heat stress response in plants. Current Opinion in Plant Biology 10:310-316.

Lei Z, Mingyu S, Xiao W, Chao L, Chunxiang Q, Liang C, Fashui H (2008) Antioxidant stress is promoted by nano-anatase in spinach chloroplasts under UV-B radiation. Biological Trace Element Research 121:69-79.

Li FM, Zhao W, Li YY, Tian ZJ, Wang ZY (2012) Toxic effects of nano-TiO_2 on Gymnodinium breve. Environmental Science 33:233-238.

Loreto F, Velikova V (2001) Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. Plant Physiology 127:1781-1787.

Mlynárová L, Nap JP, Bisseling T (2007) The SWI/SNF chromatin-remodeling gene AtCHR12 mediates temporary growth arrest in *Arabidopsis thaliana* upon perceiving environmental stress. Plant Journal 51:874-885.

Mohammadi R, Maali-Amiri R, Abbasi A (2013) Effect of TiO_2 nanoparticles on chickpea response to cold stress. Biological Trace Element Research 152:403-410.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Research 30:e36-e36.

Prasad TK, Anderson MD, Martin BA, Stewart CR (1994) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. Plant Cell 6:65-74.

Ranieri A, Castagna A, Pacini J, Baldan B, Sodi AM, Soldatini GF (2003) Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. Journal of Experimental Botany 54:2529-2540.

Singh D, Kumar S, Singh SC, Lal B, Singh NB (2012) Applications of liquid assisted pulsed laser ablation synthesized TiO_2 nanoparticles on germination, growth and biochemical parameters of *Brassica oleracea* var. Capitata. Science of Advanced Materials 4:522-531.

Timperio AM, Egidi MG, Zolla L (2008) Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). Journal of Proteomics 71:391-411.

Tsukiyama T (2002) The in vivo functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. Nature Reviews Molecular Cell Biology 3:422-429.

Vignali M, Hassan AH, Neely KE, Workman JL (2000) ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. Molecular and Cellular Biology 20:1899-1910.

Yang S, Li C, Zhao L, Gao S, Lu J, Zhao M, Yang C (2015) The Arabidopsis SWI2/SNF2 chromatin remodeling ATPase BRAHMA targets directly to PINs and is required for root stem cell niche maintenance. Plant Cell 27:1670-1680.

Yong Z, Hao-Ru T, Ya L (2008) Variation in antioxidant enzyme activities of two strawberry cultivars with short-term low temperature stress. World Journal of Agricultural Sciences 4:458-62.

Zheng Y, Fung RW, Wang SY, Wang CY (2008) Transcript levels of antioxidative genes and oxygen radical scavenging enzyme activities in chilled zucchini squash in response to super atmospheric oxygen. Postharvest Biology and Technology 47:151-158.

www.SID.ir