

بررسی برخی پارامترهای مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مولکولی جهش یافته‌های حساس به سرما گیاه آرابیدوپسیس تالیانا

زهرا قراری¹، رمضانعلی خاوری نژاد²، رضا شکسته بند³، فرزانه نجفی^{4*}، محمد نبیونی⁴

1- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران

2- استاد، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران

3- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

4- استادیار، دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی، تهران

* تهران، کدپستی 31979-37551

f_najafi@yahoo.com

(دریافت مقاله: 91/8/21 پذیرش مقاله: 94/10/6)

چکیده- بسیاری از گیاهان نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری وقتی در معرض تیمار سرما ($2-15^{\circ}\text{C}$) قرار می‌گیرند آسیب می‌بینند. گیاه آرابیدوپسیس تالیانا گیاه مقاوم به سرما است و بنابراین یک مدل گیاهی خوب به منظور تشخیص ویژگی‌های مقاومت به تیمار سرما می‌باشد. برای تعیین این که آیا بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز مس/روی 2 (CSD2) ظرفیت به دام اندازی سوپراکسید و احتمالاً قدرت ادامه حیات جهش یافته‌های حساس به تنش متوسط سرما گیاه آرابیدوپسیس تالیانا را افزایش خواهد داد یا نه و نیز تعیین نقش سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر پلی فنل اکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز در ظهور فنوتیپ‌های متمایز تحت تنش متوسط سرما در این گیاه، 4 جهش یافته کلاس 1 (*chs1-1*، *chs1-2*، *chs2-1* و *chs2-2*) تحت تیمارهای دمایی 4 (تنش شدید سرما)، 13 (تنش متوسط سرما) و 23 (شاهد) درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و سنجه‌های مربوطه انجام شد. نتایج نشان داد که ژن (CSD2) در هیچ یک از جهش یافته‌ها بیان نداشت، در صورتی که در گیاه نوع وحشی تحت تنش متوسط سرما و تنش شدید سرما بیان داشته است. افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز نیز نقش حفاظتی این آنزیم‌ها را در دفاع از گیاه تحت دماهای پایین نشان می‌دهد. افزایش فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز تحت تنش متوسط سرما می‌تواند نقش آن را در ظهور فنوتیپ کلروز در جهش یافته‌ها تحت تنش متوسط سرما نشان دهد. عدم بیان ژن CSD2 در جهش یافته‌ها احتمالاً به دلیل جهش در ژن‌های CHS می‌باشد، در نتیجه احتمالاً بر اثر جهش مذکور بیان این ژن‌ها نیز تحت تأثیر قرار گرفته است.

کلیدواژگان: آرابیدوپسیس تالیانا، تنش متوسط سرما، سوپراکسید دیسموتاز مس/روی، پلی فنل اکسیداز، پراکسیداز.

1- مقدمه

دمای پایین یکی از مهم‌ترین فاکتورهای محیطی است که بطور برجسته رشد، تکوین، زیست و توزیع جغرافیایی گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد [1]. با وجود اینکه بیشتر گونه‌های گیاهی نواحی معتدل می‌توانند نسبت به سرما سازش یافته و با قرار گرفتن در معرض دماهای یخبندان زنده بمانند، گیاهان نواحی گرمسیری و نیمه-گرمسیری زمانی که در معرض دماهای غیر یخبندان صفر تا 15 درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرند به شدت آسیب می‌بینند [2-4]. نشانه‌های تنش متوسط سرما اغلب توقف رشد، پژمردگی، کلروز، نکروز و در نهایت مرگ گیاه می‌باشد [4-6]. تحت شرایط رشد طبیعی، تولید انواع فعال اکسیژن (ROS) در سلول‌ها پایین می‌باشد، اما تحت شرایط تنشی زیستی و غیرزیستی نظیر سرما افزایش می‌یابد. این افزایش بسیاری از عملکردهای سلولی را از طریق آسیب به اسیدهای نوکلئیک، اکسیداسیون پروتئین‌ها و پراکسیداسیون لیپید تحت تأثیر قرار می‌دهد [7]. گیاهان سیستم‌های دفاعی تکامل یافته‌ای را در مقابل انواع فعال اکسیژن تولید می‌کنند که شامل هر دو سازوکارهای آنزیمی و غیرآنزیمی می‌باشند [8]. سوپراکسید دیسموتازها (SODs) اولین خط از دفاع سلولی را در برابر ROS تشکیل می‌دهند. این‌ها بطور آنزیمی و بسیار سریع سوپراکسید (O_2^-) و آب (H_2O) را به پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و اکسیژن مولکولی (O_2) تبدیل می‌کنند [9]. سوپراکسید دیسموتازها براساس کوفکتورهای فلزی‌شان به سه گروه مشخص تقسیم می‌شوند: سوپراکسید دیسموتاز آهن (FeSOD)، سوپراکسید دیسموتاز منگنز (MnSOD) و سوپراکسید دیسموتاز مس-روی (Cu/ZnSOD). سه تا از ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز مس-روی در ژنوم *آرابیدوپسیس تالیانا* رمزسازی می‌شوند (CSD1، CSD2 و CSD3) [10]. CSD1، CSD2 و CSD3 به ترتیب درون اندامک‌های

سیتوپلاسم، کلروپلاست و پراکسیزوم قرار گرفته‌اند [10]. پراکسیدازها یک گروه از آنزیم‌های اکسیدورداکتاز (Oxidoreductase) هستند که انتقال الکترون به پراکسیدها را کاتالیز می‌کنند [11]. یکی از انواع پراکسیداز در درون دیواره سلولی قرار گرفته است [12] و یکی از آنزیم‌های مهم کنترل‌کننده رشد و تکوین گیاه می‌باشد. آنزیم پراکسیداز در فرایندهای متنوع سلولی نظیر لیگنینی شدن دیواره‌های سلولی [13]، اکسیداسیون فنول‌ها [14]، مقاومت به تنش شوری [15] و محافظت بافت‌ها از زخم و آلودگی به وسیله میکروارگانیزم‌های پاتوژن شرکت می‌کند [16، 17]. تحقیقات نشان داده است که تنش دمایی تولید ترکیبات فنولی نظیر فلاونوئیدها و فنیل پروپانوئیدها را القا می‌کند [18]. ترکیبات فنولی در برگ‌ها به وسیله پراکسیداز و به طور اولیه توسط پلی فنل اکسیداز به کینون‌ها اکسید می‌گردند [19] که تحت تنش اکسیداتیو به عنوان عاملی پاسخ‌گو در برابر تولید انواع فعال اکسیژن به کار می‌رود [20]. آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز در قهوه‌ای شدن آنزیمی نقش دارند [21]. تعادل بین تولید انواع فعال اکسیژن و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تعیین‌کننده آسیب به گیاه و یا علامت دهی اکسیداتیو می‌باشد [22].

آرابیدوپسیس تالیانا بطور طبیعی ویژگی مقاومت به سرما را دارد، در حالی که چندین جهش یافته از این گیاه فنوتیپ حساس به سرما (chilling sensitive mutants) را نشان می‌دهند. این جهش یافته‌ها بر اساس فنوتیپ‌های مشخصی که پس از سه روز قرار گرفتن در معرض تنش متوسط سرما نشان می‌دهند به 4 گروه تقسیم می‌شوند: کلاس 1 (*chs1-3*) این جهش یافته‌ها زرد و پژمرده شده و در نهایت می‌میرند، برگ‌های بالغ جهش یافته‌های کلاس 2 (*chs4*) نیز پس از تیمار زرد و پژمرده شده و سپس می‌میرند اما برگ‌های جوان‌تر تحت تأثیر قرار نمی‌گیرند. در کلاس 3 (*chs5-6*) بر روی برگ‌ها لکه‌های

آرابیدوپسیس در اروپا European Arabidopsis Stock (Centre (NASC) تهیه شدند (جدول 1). بذرهای خاک (Scotts-Sierra Horticultural Products Metro-Mix Co., Marysville, OH) در گلدانها کشت شدند و در اتاقکهای کشت (GC-300TLH) در دمای 23 درجه سانتیگراد تحت ریتیم شبانه روزی 16 ساعت روشنایی/8 ساعت تاریکی و رطوبت 75% نگهداری شدند. گیاهان شدت نور 350 مول در ثانیه بر متر مربع را از طریق 8 لامپ که هر کدام 7000 لوکس پراکنش داشتند دریافت می کردند. یک سوم گیاهان چهار هفته ای (وحشی و جهش یافته) قبل از چیده شدن، به مدت یک هفته به اتاقکی با دمای 13 درجه سانتیگراد (تنش متوسط سرما) و یک سوم دیگر به اتاقک دیگر تحت دمای 4 درجه سانتیگراد (تنش شدید سرما) انتقال یافتند و یک سوم باقی مانده درون همان اتاقک و تحت دمای 23 درجه سانتیگراد ماندند (شکل 1). به غیر از عامل دما بقیه شرایط یکسان بود. سپس بخش های هوایی گیاهان جهش یافته و وحشی از هر سه گروه تیمار برداشت شده و در نیتروژن مایع ذخیره شدند.

2-2- سنجش پروتئین کل

اندام هوایی تازه گیاهان (ساقه و برگ) پس از توزین، با دو میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم 0/1 مولار (pH 6.8) به صورت هموژن در آمد.

زرد رنگی ظاهر می شوند و بقیه قسمت های برگ ظاهر طبیعی دارند. در کلاس 4 (*chs7-15*) بخش هایی از برگ نزدیک به مرکز رزتی زرد می شوند. گیاهان موجود در کلاس های 2، 3 و 4 در نهایت تولید گل و بذر می کنند اما کلاس 1 جهش یافته ها پس از تنش متوسط سرما از بین می روند و پس بازگشت به دمای رشد طبیعی زنده نمی مانند [23]. در این تحقیق تأثیر دماهای پایین (4) درجه سانتیگراد (تنش شدید سرما) و 13 درجه سانتیگراد (تنش متوسط سرما) روی گیاهان جهش یافته کلاس 1 (*chs1-1*، *chs1-2*، *chs2-1* و *chs2-2*) به همراه گیاه تیپ وحشی بررسی شدند. به همین منظور سنجش فعالیت آنزیمی و بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز، فعالیت آنزیم های پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز و مقدار پروتئین کل به ترتیب به منظور مشخص شدن درگیری سیستم دفاعی آنتی اکسیدان در ایجاد مقاومت به تنش متوسط سرما، تعیین نقش انباشتگی ترکیبات ملانینی در بروز فنوتیپ کلروز، وقوع پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و نقش پروتئین ها در بهبود مقاومت جهش یافته ها نسبت به تنش متوسط سرما انجام شد.

2- مواد و روش ها

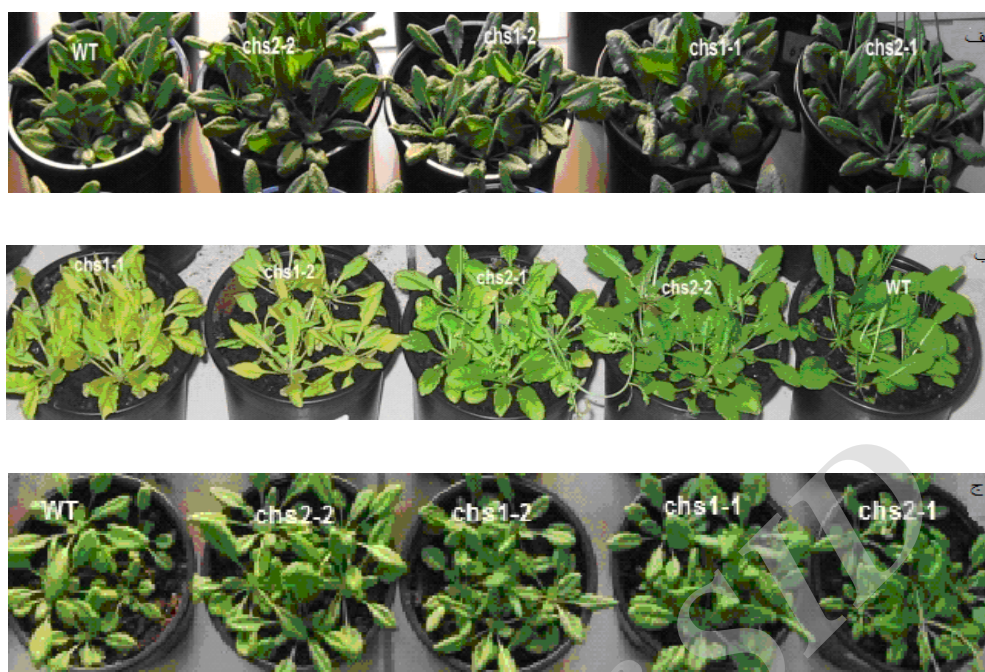
2-1- مواد گیاهی و شرایط رشد

بذرهای حاصل از جمعیت های نسل دوم گیاهان آرابیدوپسیس تالیانا اکو تیپ کلمیا شامل *chs1-1*، *chs1-2*، *chs2-1*، *chs2-2* و گیاه وحشی از مرکز بذر

جدول 1 مشخصات کلی بذر گیاهان وحشی و جهش یافته حساس به سرمای آرابیدوپسیس تالیانا

شناسه NASC	نام	شماره	لوکوس	الل	* ماده جهش زا	نیاز رشد
N6299	حساس به سرما	ST117	<i>chs 2</i>	<i>chs 2-2</i>	سولفونات اتیل متان	هیچ چیز
N 6298	حساس به سرما	ST 106	<i>chs 2</i>	<i>chs 2-1</i>	سولفونات اتیل متان	هیچ چیز
N 6252	حساس به سرما	PM2	<i>chs 1</i>	<i>chs 1-2</i>	سولفونات اتیل متان	هیچ چیز
N 3097	حساس به سرما	PM11	<i>Chs1</i>	<i>chs 1-1</i>	سولفونات اتیل متان	رشد در دمای بالای 23 درجه سانتیگراد

* بذرهای آرابیدوپسیس تالیانا با 0/2 یا 0/3 درصد EMS (اتیل متان سولفونات) به مدت 10 الی 15 ساعت تیمار شدند، سپس چندین بار برای حذف ماده جهش زا شستشو شدند.



شکل 1 نمای کلی تأثیر تیمارهای مختلف دمایی بر مورفولوژی گیاهان آراییدوپسیس تالیانا الف) گیاهان شاهد، ب) گیاهان تحت تنش متوسط سرما و ج) گیاهان تحت تنش شدید سرما.

ولت برای ژل بالایی و 140 ولت برای ژل پایینی انجام شد. برای تشخیص آنزیم پراکسیداز بر روی ژل از گهرمایه بنزیدین و پراکسید هیدروژن 10 میلی مولار حل شده در بافر فسفات 50 میلی مولار استفاده شد. بعد از گذشت 5 دقیقه غوطه‌ور شدن ژل در این مخلوط، باندها ظاهر و بعد از گذشت 15 دقیقه از ژل عکس برداری شد [25]. مارکر مورد استفاده Chromatein Prestained Protein Ladder بود، که حاوی 11 پروتئین با باندهایی در محدوده 10 الی 175 کیلودالتون می‌باشد.

4-2- سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO)

سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز بر طبق روش قناتی و همکاران (2002) تعیین گردید. 0/2 گرم از بافت تازه در نیتروژن مایع و در بافر فسفات 0/02 مولار، pH6/8 در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سائیده و عصاره‌گیری شد، سپس همگن حاصل در 12000 دور در

پس از همگن‌سازی نمونه‌ها به ویال‌های دو میلی‌لیتری انتقال داده شد و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد در سرعت 15000g به مدت 12 دقیقه سانتریفوژ شد. سپس فاز بالایی جدا شد و برای سنجش‌های آنزیمی نیز مورد استفاده قرار گرفت. سنجش غلظت پروتئین کل با استفاده از روش برادفورد [24] انجام شد و از BSA به عنوان استاندارد استفاده شد.

3-2- بررسی کیفی فعالیت آنزیم پراکسیداز به روش

Native PAGE

به منظور ارزیابی تغییرات کیفی آنزیم پراکسیداز از الکتروفورز عمودی (Native PAGE) بر روی ژل پلی آکریل آمید غیر واسرشته استفاده شد. ژل متمرکز کننده (stacking gel) با درصد 4 و ژل جدا کننده (separating gel) با درصد 12/5 تهیه شدند. مقادیر مساوی از پروتئین (10 میکروگرم) برای هر نمونه در چاهک‌ها تزریق شدند. الکتروفورز به مدت 2 ساعت با ولتاژ 120

سرعت واکنش اولیه، به عنوان تفاوت در افزایش جذب در طول موج 560 نانومتر در حضور و عدم حضور عصاره آنزیمی، متناسب با مقدار آنزیم بود. واحد فعالیت SOD به عنوان مقدار آنزیمی که از کاهش نوری NBT تا 50% ممانعت می‌کند، توصیف می‌شود. ارزش فعالیت SOD بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی گرم) در 100 میکرولیتر عصاره به دست آمده بیان گردید [27].

6-2- آنالیز RT-PCR

ژنوم کل با استفاده از مینی‌کیت گیاهی QIAGEN (RNeasy Cat.No.74904) استخراج شد. ابتدا DNA تک‌رشته ای (cDNA) با استفاده از کیت RT/PCR (AccuPower RT/PCR PreMix) سنتز شد. سطوح نسبی بیان Cu-Zn SOD2 به وسیله RT/PCR و با استفاده از 18S rRNA به عنوان استاندارد داخلی اندازه‌گیری شد. سنتز دومین رشته cDNA و تکثیر آن در چهل سیکل PCR با استفاده از پرایمرهای ویژه (جدول 2) برای این ژن و طبق برنامه زیر اجرا شد: دناتوراسیون در 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، اتصال پرایمرهای ویژه در 53 درجه سانتی‌گراد به مدت 1 دقیقه و سنتز DNA و گسترش آن در 72 درجه سانتی‌گراد در مدت زمان 1 دقیقه. تکثیر 18S rRNA با استفاده از پرایمرهای ویژه آن و طبق برنامه فوق‌الذکر اجرا شد.

دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ و محلول روئی جهت اندازه‌گیری فعالیت پلی فنل اکسیداز مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط واکنش شامل 100 میکرولیتر از عصاره آنزیمی، 500 میکرولیتر هیدروژن پراسید 5 میلی مولار و 500 میکرولیتر متیل کاتکول 0/02 مولار در 1900 میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات با pH 6/1 است. افزایش در جذب طول موج 420 نانومتر محاسبه و فعالیت آنزیمی به ازای تغییرات جذب به میلی‌گرم پروتئین در دقیقه بیان شد [26].

5-2- سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با اندازه‌گیری توانایی‌اش برای مهار کاهش فتوشیمیایی نیتروبلو ترازولیوم (NBT) سنجش شد. مخلوط واکنش (3 میلی‌لیتر) شامل 50 میلی مولار بافر فسفات پتاسیم، pH=7.3، 13 میلی‌مولار متیونین، 75 میلی‌مولار NBT، 0/1 میلی‌مولار اتیلن دی آمین متیل آمونیوم (EDTA)، 4 میلی‌مولار ریوفلاوین و 0/2 میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی بود. واکنش در لوله‌های آزمایش در 25 درجه سانتی‌گراد تحت لامپ فلورسنت 40 وات انجام شد. واکنش به مدت 8 دقیقه انجام شد و سپس با خاموش شدن لامپ متوقف شد. نمونه‌های شاهد و کنترل به همان روش، اما بدون نور و آنزیم به ترتیب اجرا شد. تحت شرایط آزمایش

جدول 2 مشخصات پرایمرها، P.S (اندازه محصول)، Tm (دما) بر حسب درجه سانتی‌گراد، R (راست) و L (چپ)

نام ژن	(P.S)	Tm	طول پرایمر	توالی نوکلئوتیدی
AT2G28190	235	54/1	20	CGTTAAAGCTCCGTCGAAAG L
Cu-Zn SOD CSD2		53/4	20	AGGGTTGAAATGTGGTCCTG R
18S rRNA	154	53/8	20	AAACGGCTACCACATCCAAG L
		53/6	20	CCTCCAATGGATCCTCGTTA R

وحشی بیشترین محتوای پروتئین را نسبت به گیاهان تحت تنش متوسط سرما و کنترل دارند. میزان پروتئین جهش یافته *chs2-2* نسبت به سایر جهش یافته‌ها و گیاه وحشی بیشتر بود (جدول 3). تحت تنش متوسط سرما کمترین میزان پروتئین مشاهده شد، که این کاهش به ترتیب در 2 جهش یافته *chs1-1* و *chs1-2* به بالاترین میزان خود رسید. مقدار پروتئین به ترتیب در گیاه وحشی و جهش یافته‌های *chs2-2* و *chs2-1* نسبت به دو جهش - یافته قبلی بیشتر بود. تحت دمای شاهد میزان پروتئین جهش یافته‌ها و گیاه وحشی تقریباً به یک میزان بود و جهش یافته *chs1-1* میزان پروتئین بیشتری نسبت به سایر جهش یافته‌ها داشت.

3-3- نتایج مربوط به مطالعه کیفی آنزیم پراکسیداز با

استفاده از روش Native-PAGE

آنالیز Native PAGE برای آنزیم پراکسیداز در بافت‌های ساقه و برگ در معرض دماهای پایین اجرا شد (شکل 2). نتایج نشان داد که تحت تنش متوسط سرما فعالیت پراکسیدازی در همه گیاهان جهش یافته افزایش یافت و این افزایش به صورت ظهور باندهایی با وزن مولکولی 70، 51 و 42 و 29 کیلودالتونی مشخص شد. فعالیت پراکسیدازی در جهش یافته‌های *chs1* نسبت به جهش - یافته‌های *chs2* بیشتر بود.

محصول RT/PCR با استفاده از آگارز 1/5% الکتروفورز شد و اتیدیوم بروماید برای رنگ‌آمیزی ژل به کار رفت. باندها زیر نور UV و با استفاده از دستگاه GelDOC مشاهده شدند. اندازه محصول ژن *Cu-ZnSOD2* و 18S به ترتیب 235 و 154 جفت نوکلئوتید بود.

2-7- محاسبات آماری

بررسی‌های آماری بر اساس آنالیز واریانس دو عاملی توسط نرم‌افزار SAS ویرایش 9/0 و SPSS و در سطح احتمال $p < 0/05$ صورت گرفت.

3- نتایج

3-1- مقایسه تأثیر سرما بر ویژگی‌های مورفولوژیکی گیاهان وحشی و جهش یافته

بررسی مورفولوژی گیاهان نشان داد که تحت تنش متوسط سرما همه جهش یافته‌ها دچار کلروز شدند، در صورتی که تحت تنش شدید سرما و کنترل، جهش یافته‌ها فنوتیپ متمایزی را نشان ندادند. شدت کلروز جهش یافته‌های *chs1* (*chs1-1* و *chs1-2*) از *chs2* (*chs2-1* و *chs2-2*) به مراتب بیشتر بود (شکل 1-ب)

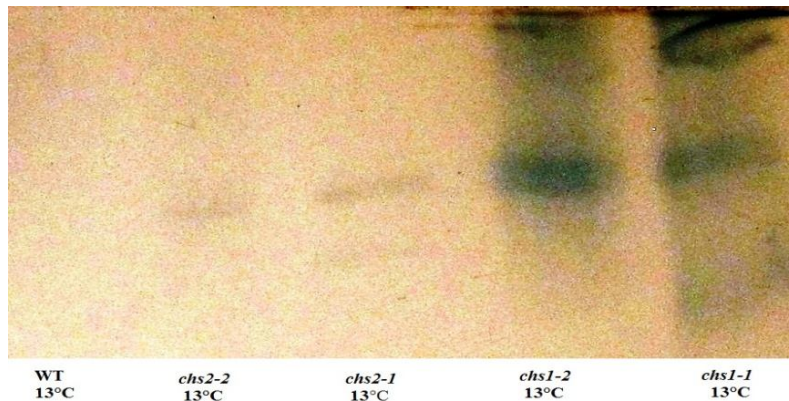
3-2- نتایج مربوط به سنجش میزان پروتئین کل

سنجش محتوای پروتئین کل ساقه و برگ گیاهان نشان داد که تحت تنش شدید سرما همه جهش یافته‌ها و گیاه

جدول 3 مقدار پروتئین کل (mg g^{-1} FW) تحت تیمارهای مختلف دمایی در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا

ژنوتیپ گیاه	شاهد	تنش متوسط سرما	تنش شدید سرما
WT	26/49+1/194 ^{ef}	34/41+0/341 ^{fg}	34/41+0/306 ^c
<i>chs2-2</i>	27/74+0/391 ^d	24/20+0/243 ^{fg}	42/25+1/010 ^a
<i>chs2-1</i>	26/74+0/451 ^{de}	22/65+0/305 ^{gh}	20/73+0/334 ^b
<i>chs1-2</i>	26/91+1/306 ^{de}	14/47+0/587 ⁱ	39/27+0/394 ^b
<i>chs1-1</i>	33/72+1/400 ^c	7/74+0/125 ^j	40/07+0/250 ^b

داده‌ها $\bar{X} \pm SE$ را نشان می‌دهند. حروف یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار است



شکل 2 تصویر مربوط به فعالیت پراکسیدازی گیاهان وحشی و جهش یافته آرابیدوپسیس تالیانا تحت تنش متوسط سرما

شاهد فعالیت پلی فنل اکسیدازی پایینی نسبت به دو تیمار تنش متوسط و شدید سرما داشتند و این کاهش در دو جهش یافته *chs1-1* و *chs1-2* نسبت به دو جهش یافته دیگر بیشتر و تقریباً مشابه با میزان فعالیت این آنزیم در گیاه وحشی بود (جدول 4).

3-5- اثر دمای پایین بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز SOD

برای تشخیص تفاوت‌ها در ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاهان جهش یافته *chs* در معرض تیمار دمای پایین، فعالیت آنزیم آنتی اکسیدان SOD اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که فعالیت SOD در همه گیاهان جهش یافته در معرض تنش سرمای متوسط در مقایسه با تنش سرمای شدید و کنترل افزایش یافته است. فعالیت SOD در گیاهان جهش یافته تحت تیمار سرمای متوسط نسبت به گیاهان تیپ وحشی بیشتر بود، با این حال، این فعالیت در همه جهش یافته‌ها (به استثنای *chs 2-1*) تحت تیمار سرمای شدید اندکی کاهش یافت. در غیاب تنش سرما (23 درجه سانتی‌گراد)، گیاهان جهش یافته *chs* فعالیت SOD مشابه (به استثنای *chs 2-2*) گیاهان تحت تیمار سرمای شدید داشتند (جدول 5).

گیاه وحشی تحت این تیمار دمایی هیچ نوع بانندی مربوط به فعالیت آنزیم پراکسیداز نشان نداد. همچنین تحت دمای شاهد و تنش شدید سرما نیز در هیچ کدام از جهش-یافته‌ها و گیاه وحشی بانند مربوط به فعالیت پراکسیدازی مشاهده نشد. الگوی کیفی آنزیم بنزیدین پراکسیداز اندام هوایی گیاه نشان می‌دهد که حداقل 4 ایزوزیم مشخص برای این آنزیم وجود دارد (شکل 2). مقدار فعالیت ایزوزیمی که دارای وزن مولکولی بالاتری نسبت به ایزوزیم دیگر است تحت تنش متوسط سرما افزایش فعالیت مشخصی نشان می‌دهد.

3-4- نتایج مربوط به سنجش میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز نشان داد که این آنزیم تحت تنش متوسط سرما بیشترین میزان فعالیت را در دو جهش یافته *chs1-1* و *chs1-2* نسبت به تنش شدید سرما و دمای کنترل داشت. فعالیت این آنزیم در دو جهش یافته دیگر نسبتاً پایین و نزدیک به فعالیت این آنزیم در گیاه تیپ وحشی بود. تحت تنش شدید سرما میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در جهش یافته‌های *chs2-2*، *chs2-1* و گیاه وحشی نسبت به تنش متوسط سرما و دمای کنترل بیشتر بود. گیاهان

جدول 4 میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز ($\Delta_{420}/\text{min}/\text{mg protein}$) تحت تیمارهای دمائی مختلف

ژنوتیپ گیاه	شاهد	تنش متوسط سرما	تنش شدید سرما
WT	0/61+0/005 ^h	1/02+0/014 ^f	1/26+0/02 ^d
<i>chs2-2</i>	0/79+0/008 ^g	0/92+0/011 ^g	1/31+0/008 ^b
<i>chs2-1</i>	0/81+0/008 ^g	1/10+0/017 ^e	1/29+0/011 ^c
<i>chs1-2</i>	0/62+0/005 ^h	1/57+0/014 ^a	1/1+0/017 ^e
<i>chs1-1</i>	0/60+0/012 ^h	1/6+0/011 ^a	1/25+0/028 ^d

داده‌ها $\bar{X} \pm SE$ را نشان می‌دهند. حروف یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار است.

جدول 5 میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (U/mg protein) تحت تیمارهای مختلف دمائی در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا

ژنوتیپ گیاه	شاهد	تنش متوسط سرما	تنش شدید سرما
WT	18/87+0/34 ^g	26/45+1/90 ^f	35/17+0/34 ^e
<i>chs2-2</i>	17/17+0/60 ^g	47/14+0/54 ^c	32/59+0/96 ^e
<i>chs2-1</i>	32/81+1/46 ^e	48/14+2/48 ^c	35/71+1/48 ^e
<i>chs1-2</i>	31/77+1/27 ^e	93/04+3/45 ^b	32/81+1/46 ^e
<i>chs1-1</i>	32/80+0/65 ^e	135/88+5/83 ^a	32/97+0/91 ^e

داده‌ها $\bar{X} \pm SE$ را نشان می‌دهند. حروف یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار است.

ظهور لکه‌های نکروزی روی برگ‌ها، کاهش فعالیت فتوسنتزی، آسیب به ریشه و نظایر آن می‌باشد [4]. نتایج این پژوهش نشان داد که از میان تیمارهای دمایی اعمال شده، تنش متوسط سرما منجر به ظهور فنوتیپ متمایزی می‌گردد و از بین گیاهان وحشی و جهش یافته بررسی شده، جهش یافته‌های حساس به سرما از نشانه‌های ذکر شده در بالا، فنوتیپ کلروز را نشان دادند. ظهور این فنوتیپ در گیاهان تحت تیمار متوسط سرما نسبت به همین گیاهان تحت تیمار شدید سرما نشان می‌دهد که در طی دوره تیمار سرمای متوسط از عملکرد طبیعی لوکوس جهش یافته (*chs1*, *chs2* و *chs3*) ممانعت می‌شود.

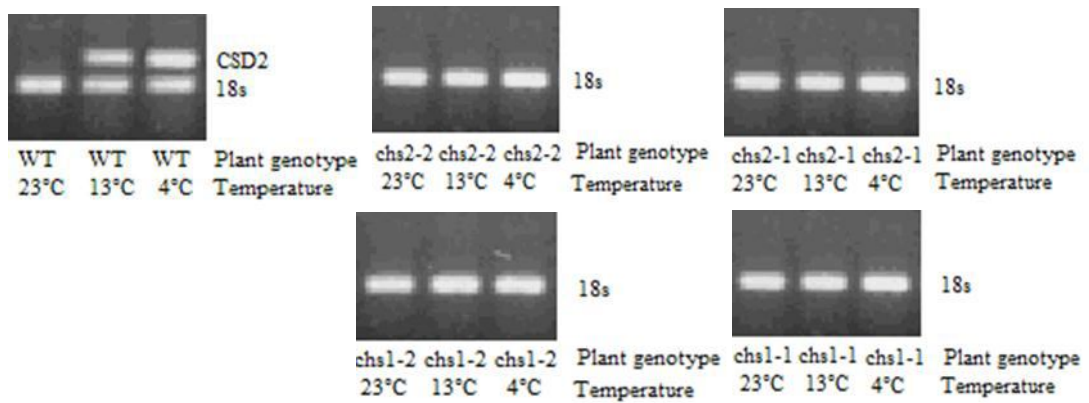
پراکسیدازها یک گروه بزرگ از ایزوآنزیم‌ها با یک گستره وسیع از نقاط ایزوالکتریک می‌باشند و به این ترتیب عملکردهای متنوعی دارند. پراکسیدازهای گیاهی در چرخه فعالیت معمول خود، کاتالیز کننده احیا HO2 هستند [۲۸، ۲۹].

3-6- اثر تیمارهای مختلف سرما بر میزان بیان ژن Cu-SOD2 (CSD2)

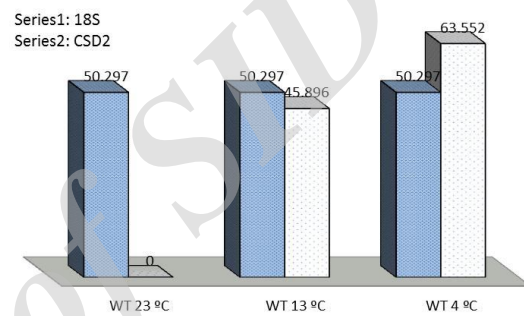
اندازه‌گیری بیان ژن CSD2 در گیاهان وحشی و جهش یافته نشان داد که این ژن تحت تنش متوسط سرما و تنش شدید سرما فقط در گیاه وحشی بیان شده است و تحت دمای شاهد در هیچ یک از گیاهان وحشی و جهش یافته بیان نداشته است. بیان این ژن در گیاه وحشی تحت تنش شدید سرما نسبت به تنش متوسط سرما بیشتر بود. هیچ یک از جهش یافته‌ها تحت تیمارهای دمایی پایین و دمای شاهد بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز را نشان ندادند (شکل 3).

4- بحث

نشانه‌های آسیب تنش متوسط سرما در میان گونه‌های گیاهی گسترده و شامل پژمردگی، زرد شدگی برگ‌ها،



(الف)



(ب)

شکل 3 بیان ژن آنزیم سوپراکسید دیسموتاز 2 (Cu-Zn2 SOD) در گیاهان آرابتوپسیس تالیانا تحت تیمارهای دمایی مختلف. (ب) اندازه گیری بیان ژن CSD2 در گیاه وحشی آرابتوپسیس به روش کمی با استفاده از نرم افزار Total lab Analyzer.

PAGE، افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز را در همه گیاهان جهش یافته نسبت به گیاه تیپ وحشی تحت تنش متوسط سرما نشان داد. در هیچ یک از گیاهان شاهد و گیاهان تحت تنش شدید سرما فعالیت پراکسیدازی با استفاده از Native PAGE مشاهده نشد. مشاهده 4 نوار الکتروفورزی مشخص با استفاده از گهرمایه های تخصصی آنزیم (بنزیدین و پراکسید هیدروژن) مؤید آن است هر 4 تا دارای فعالیت پراکسیدازی هستند.

گیاهان به منظور مقاومت در برابر تنش هایی نظیر دماهای پایین مجبورند که متابولیسم شان را سازش دهند. این فرایند نیاز به تجمع پروتئین هایی نظیر پروتئین های محلول دارد که سنتز شان در دمای پایین افزایش می یابد. سنتز پروتئین های ویژه یک سازوکار مهم درگیر در افزایش

فعالیت پراکسیداز را به آسانی می توان در تمام طول عمر گیاهان مختلف از مراحل اولیه جوانه زنی تا مرحله پیری از طریق کنترل طولی شدن یاخته ای، مکانیسم های دفاع و چندین عملکرد دیگر تشخیص داد. پراکسیدازها در بسیاری از فرایندهای سلولی از قبیل متابولیسم اکسین، تشکیل چوب، اتصالات عرضی در دیواره سلول گیاهی، پاسخ به تنش های محیطی و نظایر آن شرکت می کند [30]. مطالعات پیرامون این آنزیم بطور قابل ملاحظه ای انجام شده و در حال حاضر نیز در حال انجام است. دلایل عدم موفقیت در تعیین نقش دقیق پراکسیدازها را می توان در وجود تعداد زیاد ایزوفرم ها در گیاهان، اختصاصی نبودن گهرمایه های مختلف برای هر یک از این ایزوفرم ها دانست [28]. اطلاعات مربوط به Native

پلی فنل اکسیدازی جهش یافته‌های *chs1* نسبت به *chs2* منجر به تخریب بافتی و قهوه‌ای شدن بافتی بیشتر در جهش یافته‌های *chs1* نسبت به *chs2* می‌گردد (شکل 1-ب).

در داخل یک سلول، سوپراکسید دیسموتازها یکی از سیستم‌های عمده برای حذف آنزیمی O_2^- و H_2O_2 در گیاهان می‌باشند. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به طور قابل توجهی تحت تنش متوسط سرما در جهش یافته‌ها افزایش یافت. این پاسخ مشابه نتایج مشاهده شده برای آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در برگ‌های کاهو (*Cucumis sativus* L) می‌باشد [36]. مطالعات اخیر پیشنهاد کرده است که تنش اکسیداتیو القا شده توسط تنش متوسط سرما ممکن است یک نقش محوری در آسیب سلول‌های گیاهی در طی تنش متوسط سرما بازی کند [37].

گزارش‌های بسیاری در مورد تولید گیاهان تراریخت مقاوم به تنش اکسیداتیو که سوپراکسید دیسموتازها را بر علیه آن تولید می‌کنند، وجود دارد. CSD2 به عنوان یکی از انواع سوپراکسید دیسموتازها یکی از اجزای مسیر دفاع آنزیمی می‌باشد و برخی از تحقیقات نقش این ژن را در مقاومت گیاهان نسبت به تنش اکسیداتیو نشان داده‌اند. چنان که بیش بیان یک ژن Cu/Zn-SOD کلروپلاستی از نخود (همولوگ CSD2 آرابیدوپسیس *تالیانا*) در گیاهان تنباکوی تراریخت منجر به افزایش مقاومت گیاهان تنباکو در برابر تنش‌های دمایی پایین گردید [38].

همچنین مشخص شده است که در گیاه آرابیدوپسیس تحت تنش اکسیداتیو نظیر دمای پایین بیان *miR398* کاهش می‌یابد، کاهش بیان *miR398* منجر به افزایش بیان ژن هدف آن (CSD2) می‌گردد [39]. مطالعات بیان گسترده ژنوم بیش از 630 ژن پاسخ‌گو به تنش متوسط سرما با بیان نامنظم در همه جهش یافته‌های از بین رفته با تنش متوسط سرما شناسایی کرد، که شامل ژن‌های

مقاومت به یخبندان در طی سازش با سرما می‌باشد. نتایج حاصل از سنجش پروتئین گیاهان وحشی و جهش یافته تحت دماهای پایین نشان داد که محتوای پروتئین در گیاهان شاهد و گیاهان تحت تنش شدید سرما نسبت به تنش متوسط سرما بیشتر می‌باشد و این جهش یافته‌ها تحت تنش متوسط سرما قادر به سنتز پروتئین‌های لازم برای مقابله با این تیمار دمایی نمی‌باشند. مطالعات اخیر بر روی همین جهش یافته‌ها مشخص کرده است که قرارگیری در معرض دماهای پایین منجر به نقایصی در حفظ عملکرد کلروپلاست از جمله تجمع پروتئین می‌شود [31]. علاوه بر این، پیشنهاد شده است که پروتئین‌های شوک گرمایی القا شونده با سرما به عنوان چپرون‌هایی برای کمک به بیوسنتز صحیح پروتئین در طی قرارگیری در معرض سرما عمل می‌کنند [32]. بنابراین کاهش سنتز پروتئین در گیاهان تحت تنش متوسط سرما نسبت به گیاهان شاهد احتمالاً به دلیل جهش در ژن‌های *chs* و تأثیر ویژه‌اش بر روی سنتز پروتئین‌های لازم جهت مقاومت به تیمارهای دمایی پایین می‌باشد، که بطور غیرمستقیم وجود نقش حفاظتی برخی پروتئین‌ها را در معرض دمای پایین پیشنهاد می‌کنند.

پلی فنل اکسیداز به عنوان یکی از آنزیم‌هایی که در محافظت سلول‌ها در برابر تنش اکسیداتیو نقش دارند شناخته شده است و به عنوان جزئی از سیستم دفاع آنزیمی محسوب می‌شود [33]. پلی فنل اکسیداز آنزیم درگیر در فرایند قهوه‌ای شدن می‌باشد. قهوه‌ای شدن سریعاً زمانی که ساختار سلول از هم می‌پاشد و آنزیم سوپراکسید مخلوط می‌شوند، رخ می‌دهد [34]. مطالعات نشان دادند که فعالیت این آنزیم در پاسخ به انواع مختلفی از تنش‌های زیستی و غیرزیستی افزایش می‌یابد [35]. موافق با یافته‌های این محققان، در سنجش‌های تحقیق حاضر نیز میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز تحت تنش متوسط سرما افزایش یافت. بنابراین افزایش فعالیت

این جهش یافته‌ها صورت گرفته است می‌توان نتیجه گرفت که ژن CSD2 نقش دفاعی در برابر تنش‌های اکسیداتیو از گیاه دارد ولی در تحقیق حاضر به علت وقوع جهش در ژن‌های *chs1* بیان این ژن نیز به طور منفی تحت تأثیر قرار گرفته است.

به همین دلیل تخریب بافتی و قهوه‌ای شدن بافت در جهش یافته‌های *chs1* (*chs1-1* و *chs1-2*) نسبت به جهش یافته‌های *chs2* (*chs2-1*, *chs2-2*) بیشتر می‌باشد و همین مطلب منجر به حساسیت بیشترین 2 جهش یافته نسبت به تنش متوسط سرما گردیده است.

6- منابع

- [1] Levitt, J. (1980) *Responses of plants to environmental stress*. In: *Chilling, Freezing, and High Temperature Stress*. New York, Academic Press.
- [2] Wang, C.Y. (1990) *Chilling Injury of Horticultural Crops*. CRC Press, Boca Raton, Flxin, Zhanguo and Browse, John. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant Cell and Environment*, September 2000, vol. 23, PP. 893-902.
- [3] Lynch, D.V. (1990) *Chilling injury in plants: The relevance of membrane lipids*. In: Katterman F (ed) *Environmental Injury to Plants*. Academic, San Diego, CA, PP. 17-34.
- [4] Lyons, J.M. (1973) Chilling injury in plants. *Annu Rev Plant Physiol*. 24, 445-466.
- [5] Allen, D.J., and Ort, D.R. (2001) Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm climate plants. *Trends Plant Sci*. 6, 36-42.
- [6] Mohapatra, S.S., Poole, R.J., and Dhindsa, R.S. (1987) "Cold acclimation, freezing resistance and protein synthesis in alfalfa (*Medicago sativa* L. cv. Saranac)". *Journal. Experimental. Botany*. 38, 1697-1703.
- [7] Polle, A. (2001) Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol*. 126, 445-462.

مربوط به متابولیسم لیپید، عملکرد کلروپلاست، متابولیسم کربوهیدرات و سم‌زدایی رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد. این مطالعات همچنین الگوهای بیان گیاهان تیپ وحشی را با 12 جهش یافته حساس به تیمار متوسط سرما مقایسه کردند و نشان دادند که بیان تقریباً 1600 ژن توسط تیمار متوسط سرما تحت تأثیر قرار گرفته است. بر اساس این نتایج پیشنهاد شده است که عملکرد طبیعی لوکوس جهش یافته (*chs1*, *chs2* و *chs3*) از آشفتگی گسترده تنظیم رونویسی در طی دوره تیمار سرمای متوسط ممانعت می‌کند [40]. نتایج کار کنونی نشان داد که ژن CSD2 در هیچ یک از جهش یافته‌ها و تحت هیچکدام از تیمارها بیان نشده است. از طرفی کارهای قبلی که توسط سایر محققان بر روی همین جهش یافته‌ها انجام شده است نشان داد که احتمالاً عملکرد محصول ژن *chs1* (*chs1-1*, *chs1-2*) برای حفظ عملکرد کلروپلاست در دماهای پایین در جهش یافته‌های *chs* آرابیدوپسیس *تالیانا* مورد نیاز باشد [41]. به نظر می‌رسد بیان این ژن‌ها به علت وقوع جهش در ژن‌های *chs1* تحت تأثیر قرار می‌گیرد و احتمالاً فرایندهای حین رونویسی و پس از رونویسی در این فرایند دخیل باشند. از آنجا که این ژن‌ها خواستگاه کلروپلاستی دارند، برای اینکه عملکرد صحیح خود را داشته باشند نیاز به استقرار درون اندامک کلروپلاست دارند، که در صورت عدم بیان نمی‌توانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود را انجام دهند و بنابراین اندامک کلروپلاست در معرض تخریب اکسیداتیو قرار گرفته و به دلیل عدم عملکرد صحیح سیستم آنتی‌اکسیدانی در معرض تیمارهای دمایی پایین آسیب می‌بیند. ظهور فنوتیپ زرد شدگی در جهش یافته‌ها و نتایج کار محققان دیگر [41] خود دلیلی بر این ادعا می‌باشد.

5- نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده و کارهای قبلی که روی

- [20] Pillinger, J.M., Coope, J.A., and Ridge, I. (1994) Role of phenolic compounds in the antifungal activity of barley straw. *J. Chem. Ecol.* **20**, 1557-1569.
- [21] Mayer, A.M., and Harel, E. (1991) *Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables*, in: P.F. Fox (Ed.), *Food Enzymology*, Elsevier, New York, , PP. **373–398**.
- [22] Moller, I.M., Jensen, P.E., and Hansson, A. (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Bio.* **58**, 459–481.
- [23] Schneider, J.C., Hugly, S., and Somerville, C.R. (1995a) Chilling sensitive mutants of *Arabidopsis*. *Plant Mol. Bio. Reporter.* **13**, 11–17.
- [24] Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry.* **72**, 248–254.
- [25] Gove, J.P., and Hoyle, M.C. (1975) The isozymic similarity of indoleacetic acid oxidase to peroxidase in birch and horseradish. *Plant Physiol.* **56**, 684–687 .
- [26] Ghanati, F., Morita, A., and Yokota, H. (2002) Induction of suberin and increase of lignin content by excess Boron in Tobacco cells. *Soil Science. Plant Nutrient.* **48**, 357-364.
- [27] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.L. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
- [28] Yildirim, O., Aras, S., and Ergul, A. (2004) Response of Antioxidant System to Short-term NaCl stress in Grapevine Root stock-1616c & vitis vinifera L. cv. Razaki. *Acta Biological Cracoviensia.* **46**, 151-158.
- [29] Ashraf, M., Harris, P.J.C. (2004) Potential Biochemical Indicators of Salinity Tolerance in Plants. *Plant Science .* **166**, 3-16.
- [30] Kjalke, M., Anderson, M.B., Schneider, P., Christensen, B., Schulein, M., and Welinder, K.G. (1992) Comparison of Structure and Activities of Peroxidase from *Coprinus cinereus*, *Coprinus macrorhizus* and *Arthromyces ramosus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1120**, 248-256.
- [31] Schneider, J.C., Nielsen, E., and Somerville, C.R. (1995b) A chilling-sensitive mutant of *Arabidopsis* is deficient in chloroplast protein
- [8] Alscher, R.G., Erturk, N., and Heath, L.S. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* **53**, 1331–1341.
- [9] Bowler, C., van Montagu, M., and Inze, D. (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 83–116.
- [10] Kliebenstein, D.J., Monde, R.A., and Last, R.L. (1998) Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: An eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiol.* **118**, 637–650.
- [11] Drauz, K., and Waldmann, H. (2001) Enzyme catalysis in organic synthesis. A comprehensive handbook. Vol. I and II.
- [12] Chen, E.L., Chen, Y.A., Chen, L.M., and Liu, Z.H. (2002) Effect of copper on peroxidase activity and lignin content in *Raphanus sativus*. *Plant Physiol. Bioch.* **40**, 439-444.
- [13] Quiroga, M., Guerrero, C., Botella, M.A., Barcelo, A., Amaya, I., Medina, M.I., Alonso, F.J., Milrad, D.E., Forchetti, S., Tigier, H., and Valpuesta, V. (2000) A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol.* **122**, 1119-1127.
- [14] Lagrimini, L.M. (1991) Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. *Plant. Physiol.* **96**, 577-583.
- [15] Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., and Matsui, H. (2001) A large family of class III plant peroxidases. *Plant. Cell. Physiol.* **42**, 462-468.
- [16] Sat, I.G. (2008) The effect of heavy metals on peroxidase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *Afr. J. Biotechnol.* **7**, 2248-2253.
- [17] Sakharov, I.Y., Castillo, J.L., Areza, J.C., and Galaev, I.Y. (2000) Purification and stability of peroxidase of African oil palm *Elaeis guineensis*. *Bioseparation.* **9**, 125-132.
- [18] Bharti, A.K., and Khurana, J.P. (1997) Mutant of *Arabidopsis* as tools to understand the regulation of phenylpropanoids pathway and UVB protection mechanism. *J. Photochem. Photobiol.* **65**, 765–776.
- [19] Thypyapong, P., Hunt, M.D., and Steffens, J.C. (1995) Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. *Phytochemistry.* **40**, 673-676.

- Mitigates Chilling Stress of Cucumber Leaves through Altering Antioxidant Enzyme Activity. *J. Plant Physiol.* **168**, 927–934.
- [37] O’Kane, D., Gill, V., Boyd, P., and Burdon, R. (1996) Chilling Oxidative Stress and Antioxidant Responses in *Arabidopsis thaliana* Callus. *Planta*. **198**, 371–377.
- [38] Sen Gupta, A., Heinen, J.L., Holaday, A.S., Burke, J.J., and Allen, R.D. (1993) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**, 1629–1633.
- [39] Sunkar, R., Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhu, J.K. (2007) Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Sci.* **12**, 301–309.
- [40] Provart, N.J., Gil, P., Chen, W., Han, B., Chang, H.S., Wang, X., and Zhu, T. (2003) Gene Expression Phenotypes of *Arabidopsis* Associated with Sensitivity to Low Temperatures. *Plant Physiol.* **132**, 893–906.
- [41] Zoldan D, Shekaste Band R, Guy CL, Porat R (2012) Understanding Chilling Tolerance Traits Using *Arabidopsis* Chilling-Sensitive Mutants, In: Ahmad P, Prasad MNV (eds), *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*, PP. **159-173**.
- accumulation at low temperature. *Plant Cell Environ.* **18**, 23–32.
- [32] Anderson, J.V., Li, Q.B., Haskell, D.W., and Guy, C.L. (1994) Structural organization of the spinach endoplasmic reticulum-luminal 70-kilodalton heat-shock cognate gene and expression of 70-kilodalton heat-shock genes during cold acclimation. *Plant Physiol.* **104**, 1359–1370.
- [33] Chisari, M., Barbagallo, R. N., and Spagna, G. (2007) Characterization of polyphenol oxidase and peroxidase and influence on browning of cold stored strawberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **55**, 3469–347.
- [34] Espin, J.C., Garcia-Ruiz, P.A., Tudela, J., Varon, R., and Garcia-Canovas, F. (1998) Monophenolase and diphenolase reaction mechanisms of apple and pear polyphenol oxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **46**, 2968–2975.
- [35] Kayani, W.K., Majid, S.A., Mahmood, T., Naqvi, S.M.S., and Waheed, A. (2011) Effect of temperature stress on polyphenol oxidase activity in grains of some wheat cultivars. *Pak. J. Bot.* **43**, 1011–1020.
- [36] Li, Q., Yu, B., Gao, Y., Dai, A.H., and Bai, J.G. (2011) Cinnamic Acid Pretreatment