

بررسی اثر سالیسیلیک اسید در ایجاد مقاومت به سرما در دانه‌رست‌های تربچه^۱

پور اکبر لطیفه و مجید نوجوان اصغری: دانشگاه ارومیه

چکیده

به منظور بررسی تأثیر سالیسیلیک اسید (SA) بر افزایش تحمل به سرما، دانه‌رست‌های دو روزه^{۲۴} تربچه ۲۴ ساعت با محلول SA با غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌مولار) پیش تیمار شده‌اند سپس به مدت ۴۸ ساعت تحت تنش سرما (۲/۵ °C) قرار گرفتند. آزمایش‌های انجام یافته نشان داد که تحمل به سرما در این دانه‌رست‌ها افزایش یافت. این پدیده از طریق کاهش نشت K^+ و قندهای محلول به محیط کشت و افزایش طول ریشه دانه‌رست‌ها بالاخص در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار نشان داده شد. این نتایج نشان‌دهنده آن است که بین غلظت SA و کاهش صدمه سرما رابطه مستقیمی وجود دارد. با سنجش فعالیت سه آنزیم آنتی‌اکسیدان، آسکوربات پراکسیداز (APX)، گاپاکول پراکسیداز (GPX) و کاتالاز (CAT) در اندام هوایی و ریشه‌های دانه‌رست‌های تربچه نشان داده شد که مقاومت القایی حاصل از SA به سرما در دانه‌رست‌های تربچه با افزایش فعالیت این سه آنزیم آنتی‌اکسیدانی همراه است.

مقدمه

محرک‌هایی مثل بنزیل آدنین، هومیک اسید، آمینو اسیدها و سیلیکات‌ها موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها می‌شوند [۲۶]. این آنتی‌اکسیدان‌ها، متابولیت‌ها و آنزیم‌هایی هستند که رادیکال‌های آزاد را جارو می‌کنند. رادیکال‌های آزاد اکسیژن مثل سوپراکسید، هیدروژن پراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل در اثر سرما تجمع می‌یابند [۸]. آنتی‌اکسیدان‌ها با همکاری یکدیگر موجب فرونشانی سمیت رادیکال‌های آزاد می‌شوند و سلول‌های گیاهی را در مقابل آسیب دیدگی محافظت می‌کنند. یکی از این محرک‌های زیستی سالیسیلیک اسید (SA) است [۲۶]. SA به عنوان ماده‌ای که دارای اثر متنوع فیزیولوژیکی در رشد و نمو گیاهان است شناخته شده است [۱۷]. به هر حال، قسمت اعظم شواهد علمی پیشنهاد می‌کنند که SA نقشی کلیدی در ایجاد مقاومت سازگانی و دفاعی دارد [۶]، [۷]، [۲۵]. اصولاً به کارگیری محرک‌های زیستی چند هفته قبل از اعمال تنش موجب مقاومت در برابر تنش می‌شود [۲۶]. نشان داده شده است که تیمار با SA موجب تحمل به گرما از طریق افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها در دانه‌رست‌های خردل می‌شود [۵]. در محافظت در برابر صدمات اکسیداتیو

کلمات کلیدی: سالیسیلیک اسید، تحمل سرما، تربچه، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان.

^۱-Raphanus sativus L.

القایی در آرابیدوپسیس، SA دارای نقشی اساسی است [۱۵]. محلول پاشی دانهرست‌های خردل با SA در غلظت‌های بین ۱۰ الی ۵۰۰ میکرو مولار به طور معنی‌داری تحمل به شوک حرارتی در 50°C به مدت ۱/۵ ساعت را موجب می‌شود [۵]. به علاوه با بررسی ذرت نشان داده شده است که SA صدمه سرما را در این گیاه در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار کاهش می‌دهد و موجب محافظت در مقابل تنش دماهای پایین می‌شود. در این آزمایش نشان داده شده است که تیمار SA هیچ تغییری در فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز (APX) و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) نمی‌دهد، ولی فعالیت کاتالاز (CAT) را کاهش می‌دهد و فعالیت گایاکول پراکسیداز (GPX) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) بعد از یک روز تیمار با SA افزایش می‌یابد [۱۲]. همچنین، مشخص شده است که در تنش سرما تشکیل پرولین و پروتیین‌های ویژه القا شونده با سرما، سنتز دی هیدرین‌ها را موجب می‌شود [۳]. با این حال با بررسی دانهرست‌های خیار مشخص شد که تنش سرما موجب افزایش نشت الکتروولت‌ها و کاهش رشد ریشه می‌شود [۲۰]، [۲۱]. از طرف دیگر سرما غلظت ترکیب‌های سمی اکسیژن را در بافت‌های حساس افزایش می‌دهد [۱۰]، [۱۱]، [۲۴]. گزارش‌هایی وجود دارد که تعدادی از آنزیم‌ها در محافظت گیاهان از آسیب‌های اکسیداتیو نقش دارند [۲]، [۹]. نشان داده شده است که همبستگی مستقیمی بین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و مقاومت به سرما وجود دارد. برای نمونه در رقم خیار مقاوم به سرما فعالیت آنزیم SOD و APX در برگ‌ها نسبت به رقم حساس به سرما بیشتر است [۲۲]. گزارش شده است که در فلفل، ذرت، خیار [۱۳] و دانهرست‌های برنج [۱۴] که با محلول‌های SA تیمار شده اند، SA اثر معنی‌داری در تحمل به سرما در این گیاهان داشته است. از طرف دیگر، گزارش شده است که SA در پس خور O_2^- و فعالیت پراکسیداز در گیاهان درگیر است [۱۸]. هدف این آزمایش‌ها بررسی اثر SA در ایجاد تحمل به سرما در دانهرست‌های تربچه و نحوه تغییر فعالیت آنزیم‌های APX، GPX و CAT در آن بود.

مواد و روش‌های آزمایشگاهی

برای این تحقیق از بذر تربچه رقم هلندی^۱ استفاده شد. بعد از تهیه بذرها از بازار محلی به تعداد ۱۰ عدد در داخل پتری دیش‌های ضد عفونی شده که حاوی دو عدد کاغذ صافی و ۵ ml آب مقطر بود کشت شدند. بعداً تمام ظروف به انکوباتور 25°C منتقل و به مدت ۴۸ ساعت در آن نگهداری شدند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت دانهرست‌های دو روزه که طول ریشه چه آن‌ها به یک سانتی‌متر رسیده بود انتخاب و به داخل پتری‌های محتوی دو عدد کاغذ صافی و ۷ ml محلول‌های SA با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌مولار منتقل شدند. برای هر تیمار ۶ تکرار در نظر گرفته شد. بعد از انتقال دانهرست‌ها به تیمارهای SA، دوباره پتری دیش‌ها به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور 25°C قرار گرفتند بعد از ۲۴ ساعت پتری دیش‌ها به دو قسمت تقسیم شد.

^۱-Raphanus Sativus L.

از هر غلظت ۳ تکرار جهت تیمار سرما به داخل یخچال با درجه حرارت $2/5^{\circ}\text{C}$ منتقل شد و ۴۸ ساعت دیگر در تیمار مورد نظر باقی ماندند. بعد از آن اندازه‌گیری‌های لازم جهت تعیین صدمه سرما و اثر SA در ایجاد مقاومت به سرما انجام گرفت.

اندازه‌گیری K^+ نشت یافته به محیط کشت

پتری دیش‌های محتوی دانهرست‌های دو روزه بعد از تیمار سرما در $2/5^{\circ}\text{C}$ به مدت ۴۸ ساعت از یخچال خارج شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور 25°C قرار گرفتند. سپس، کاغذ صافی به همراه دانهرست‌ها از پتری‌ها خارج و محلول باقی مانده در پتری‌ها به لوله‌های آزمایش کوچک منتقل شد. میزان K^+ محلول‌ها با دستگاه فلم فتومتر مدل فلیم فوتومتر^۱ 405 اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری قندهای نشت یافته به محیط کشت

پتری دیش‌های محتوی دانهرست‌های دو روزه بعد از تیمار سرما به مدت ۴۸ ساعت در $2/5^{\circ}\text{C}$ ، دوباره به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور 25°C قرار گرفتند. سپس کاغذ صافی به همراه دانهرست‌ها از داخل پتری‌ها خارج شد و از محلول باقی مانده 2 ml به داخل لوله‌های آزمایش منتقل شد. بر روی هر یک از لوله‌ها 1 ml فنل 5% اضافه شده سپس 3 ml سولفوریک اسید 98% با فشار بر روی آن‌ها اضافه شد. لوله‌ها به مدت یک ساعت به حال خود رها شدند بعد از یک ساعت و ظهور رنگ قرمز فورفورال جذب با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج 485 نانومتر اندازه‌گیری شد [۱].

اندازه‌گیری طول ریشه‌های دانهرست‌ها

بعد از انتقال دانهرست‌های دو روزه به غلظت‌های مختلف SA، تمام پتری دیش‌ها به مدت ۳۰ ساعت در $2/5^{\circ}\text{C}$ قرار گرفتند. بعد از ۳۰ ساعت همه آن‌ها به 25°C منتقل شدند. طول ریشه دانهرست‌ها 120 ساعت بود که بعد از انتقال با خط کش در حد میلی‌متر اندازه‌گیری شد. این عمل برای تیمار 25°C نیز انجام گرفت [۱۴].

طرز تهیه عصاره گیاهی جهت انجام فعالیت آنزیم‌ها در تیمارهای سرما دیده و 25°C

برای تهیه عصاره گیاهی از روش کانگ^۲ و همکاران (۲۰۰۲) با تغییر جزئی استفاده شد. به میزان $0/5\text{g}$ وزن تر بافت از هر دو اندام ریشه و اندام هوایی به طور جداگانه از همه تیمارها توزین شد و سپس به داخل هاون سرد منتقل شد و توسط 3 ml بافر شامل (بافر تریس-HCl $0/05$ مولار با $\text{pH } 7/5$ ، 3 mgCl_2 میلی‌مولار، EDTA 1 میلی‌مولار) با دسته هاون ساییده شد. بافر استخراجی جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات

^۱-Flame photometer

^۲-Kang

پراکسیداز (APX) علاوه بر موارد فوق شامل ۰/۲ میلی مولار آسکوربات نیز بود. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در داخل سانتریفیوژ با نیروی ۵۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. محلول رویی حاصل به عنوان عصاره ناخالص برای اندازه گیری فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان استفاده شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

فعالیت آنزیم APX در تمام تیمارها و تکرارها با استفاده از روش «شن و ازاد» [۴] با تغییرات اندکی اندازه گیری شد. ۲/۵ ml بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH ۷ شامل EDTA ۰/۱ میلی مولار، آسکوربات ۰/۵ میلی مولار، ۰/۲ ml H_2O_2 ۱% (V/V) برداشته و روی آن ۰/۱ ml آنزیم استخراجی اضافه شد سپس فعالیت آنزیم بر اساس اکسید شدن آسکوربات و خواندن جذب محلول با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ nm اندازه گیری شد که همراه با کاهش جذب در طی دو دقیقه فعالیت آنزیم بود. منحنی استاندارد با غلظت های ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرو گرم تهیه شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX)

فعالیت (GPX) در همه تیمارها و تکرارها با استفاده از روش آپادایا^۲ و همکاران [۲۳] انجام گرفت. ۲/۵ ml از بافر فسفات ۵۰ میلی مولار برداشته و روی آن ۱ ml H_2O_2 ۱% (V/V)، ۱ ml گایاکول ۱% و ۰/۳ عصاره آنزیم استخراجی اضافه نموده و فعالیت آنزیم در طی دو دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰ nm اندازه گیری شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش میلی و شن^۳ [۱۶] اندازه گیری شد. ۲/۵ ml از بافر فسفات ۵۰ میلی مولار pH=۷/۴ برداشته و روی آن ۰/۱ ml H_2O_2 ۱% و ۰/۳ ml عصاره آنزیمی اضافه شد و فعالیت آنزیم در طی دو دقیقه با دستگاه اولتر اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ nm اندازه گیری شد.

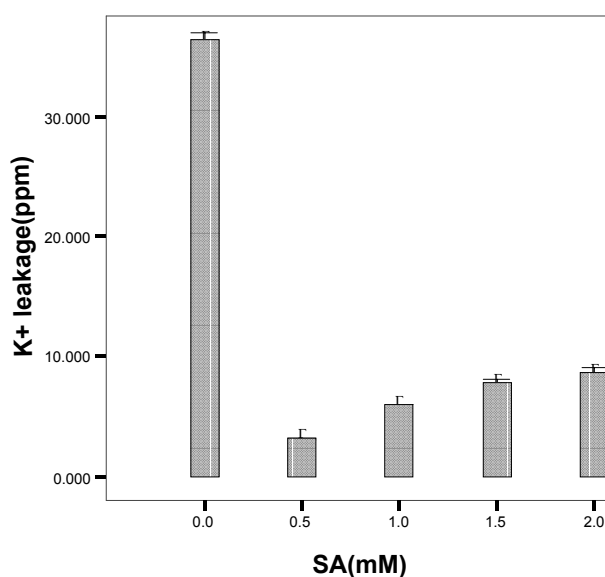
آنالیز آماری

در این مقاله برای رسم نمودارها از برنامه رایانه ای SPSS و EXCEL استفاده شده است و بارهای عمودی نمودارها نشانگر خطای معیار ($\pm SE$) هستند.

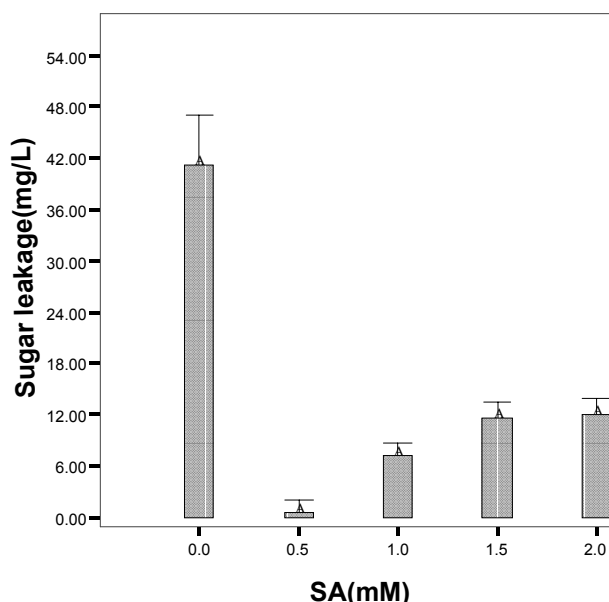
نتایج و بحث

مقدار پتاسیم و قندهای محلول نشت یافته به محیط کشت که نشانگر صدمه سرما به غشاهای سلولی است اندازه‌گیری شد. مقدار K^+ در اثر تیمار سرما حدود ۳۶ پی‌پی‌ام بود ولی با تیمار سرما به همراه SA از میزان نشت K^+ به طور معنی‌داری کاسته شد. بهترین غلظت SA برای جلوگیری از صدمه سرما در حد ۰/۵ میلی‌مولار بود (نمودار ۱). سایر غلظت‌های SA نیز از نظر نشت K^+ با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان دادند. اندازه‌گیری قندهای نشت یافته نیز نشان داد که بیشترین مقدار نشت از آن تیمار شاهد است؛ ولی در اثر استفاده از SA به همراه تیمار سرما، از مقدار نشت قندهای محلول به طور معنی‌داری کاسته شد. در این مورد نیز غلظت ۰/۵ میلی‌مولار SA بیشترین اثر کاهنده از خسارت سرما را نشان داد (نمودار ۲).

اثر توام سرما SA بر رشد طولی ریشه‌های تربچه در دمای ۲/۵ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. نتایج در جدول ۱ درج شده است. کاهش رشد طولی ریشه نیز شاخص بارزی از صدمه سرما است. از داده‌های این جدول روشن می‌شود که در اثر سرما از طول ریشه‌ها کاسته شده و از ۱۱۱/۵ میلی‌متر به ۷۱/۳ میلی‌متر می‌رسد. از طرف دیگر، در تیمار ۲۵ °C، در اثر افزایش SA، از طول ریشه‌ها کاسته می‌شود. ولی در تیمار ۲/۵ °C، غلظت ۰/۵ میلی‌مولار SA، از کاهش رشد ریشه در مقایسه با شاهد جلوگیری نموده ولی غلظت‌های بالاتر، به صورت بازدارنده رشد ریشه عمل کرده و با اثر سرما همیاری کرده است. نتیجه این آزمایش با نتایج نشت K^+ و قندهای محلولی همسویی دارد و همدیگر را تأیید می‌کنند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که SA در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار از خسارت سرما جلوگیری می‌کند و تربچه را به سرما مقاوم می‌سازد.



نمودار ۱- تأثیر سالیسیلیک اسید بر روی نشت پتاسیم به محیط کشت در دانه‌رست‌های تربچه در طی تیمار سرما

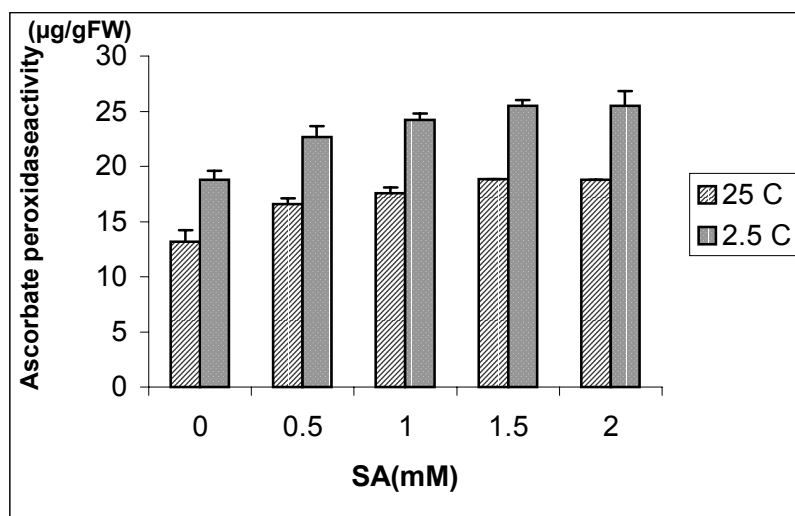


نمودار ۲- تأثیر سالیسیلیک اسید بر روی نشت قندهای محلول به محیط کشت دانه‌رست‌های تربچه در طی تیمار سرما

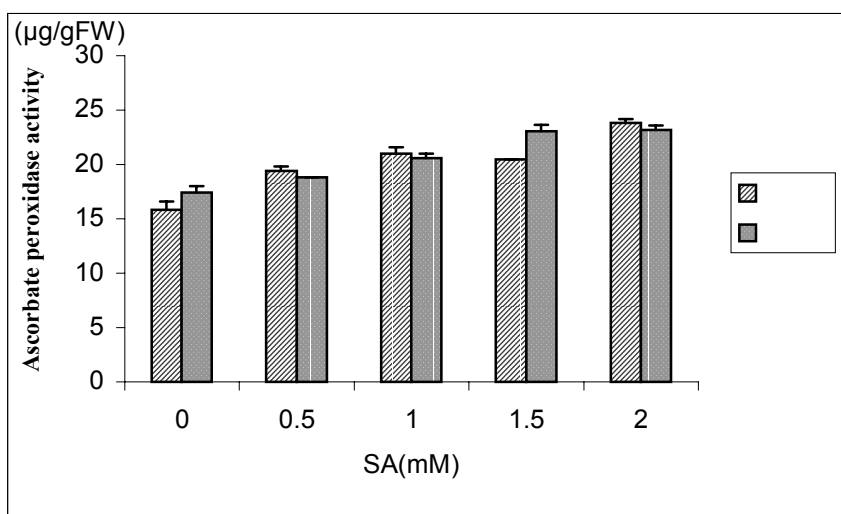
جدول ۱- اثر سالیسیلیک اسید در ایجاد مقاومت به سرما در دانه‌رست‌های تربچه

خطای معیار \pm طول ریشه (میلی‌متر)		
SA(mM)	۲/۵ °C	۲۵ °C
۰	۷۱/۳۳ \pm ۰/۸۸	۱۱۱/۵۳ \pm ۱/۹۳
۰/۵	۷۱/۳۳ \pm ۰/۶۶	۴۵/۵۵ \pm ۲/۴۳
۱	۴۲/۳۴ \pm ۰/۶۹	۲۴/۲۵ \pm ۰/۷۵
۱/۵	۳۳/۲۳ \pm ۰/۳۹	۱۵ \pm ۰/۵
۲	۲۱/۳۰ \pm ۰/۳۵	۱۰ \pm ۰

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نشان داد که فعالیت آنزیم APX در بافت‌های ریشه و ساقه در تیمار ۲/۵ °C افزایش معنی‌داری در مقایسه با تیمار ۲۵ °C دارد. (نمودارهای ۳ و ۴ را ببینید). حداکثر فعالیت این آنزیم در ریشه‌ها در غلظت ۱ میلی‌مولار SA مشاهده می‌شود؛ ولی در غلظت‌های بالاتر، اختلافات معنی‌دار نیست (نمودار ۳) ولی در اندام هوایی حداکثر فعالیت این آنزیم در غلظت ۱/۵ میلی‌مولار مشاهده می‌شود (نمودار ۴). به علاوه تفاوت بین تیمارهای ۲/۵ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد در ساقه خیلی بارز نیست.

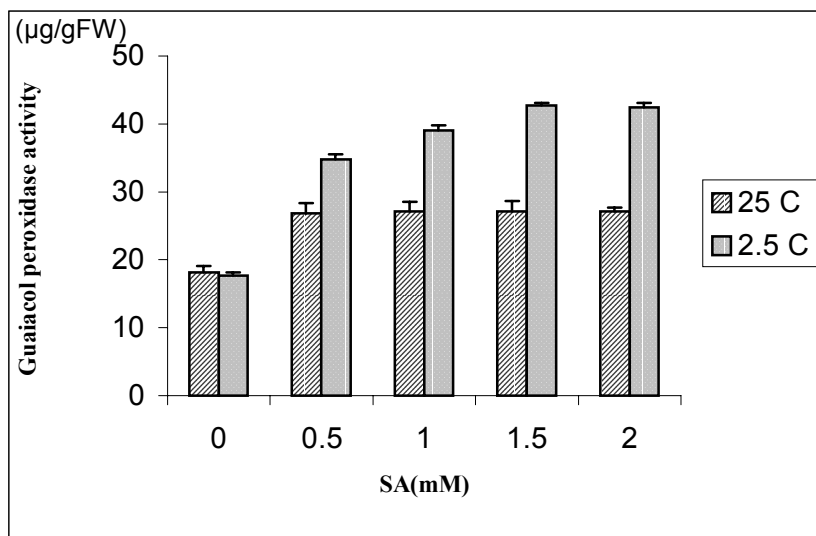


نمودار ۳- اثر SA روی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ریشه‌های دانه‌رست‌های تربچه در دو تیمار دمایی ۲/۵ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد

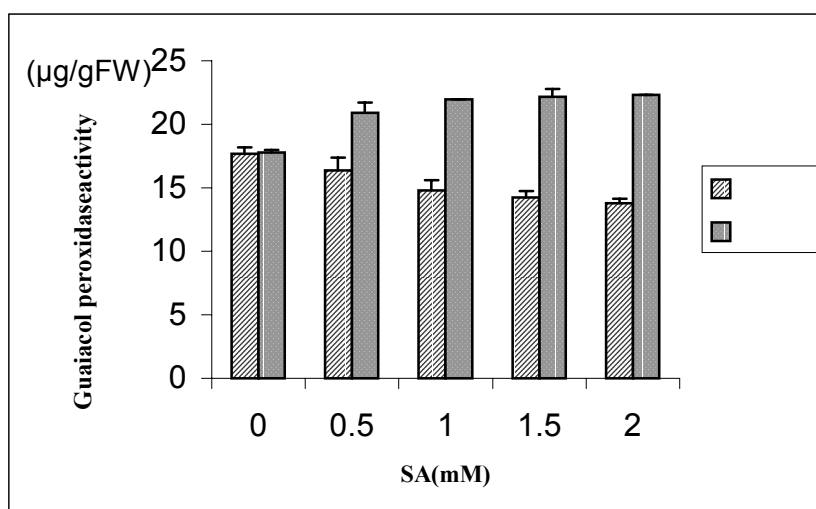


نمودار ۴- اثر SA روی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در اندام هوایی دانه‌رست‌های تربچه در دو تیمار دمایی ۲/۵ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد

سنجش آنزیم GPX در ریشه نشان داد که اضافه کردن SA سبب افزایش فعالیت آن در ۲۵ °C می‌شود، ولی تفاوتی بین فعالیت آن در غلظت‌های مختلف SA مشاهده نمی‌شود (نمودار ۵). اما فعالیت GPX در تیمار ۲/۵ °C به‌مراه افزایش غلظت SA، افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد. ولی در اندام هوایی در تیمار ۲۵ °C از فعالیت آن به موازات افزایش غلظت SA، کاسته می‌شود. اما در تیمار ۲/۵ °C، فعالیت GPX در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار SA افزایش معنی‌داری در مقایسه با شاهد نشان می‌دهد. ولی، با افزایش بیشتر غلظت SA، تقریباً ثابت می‌ماند (نمودار ۶).

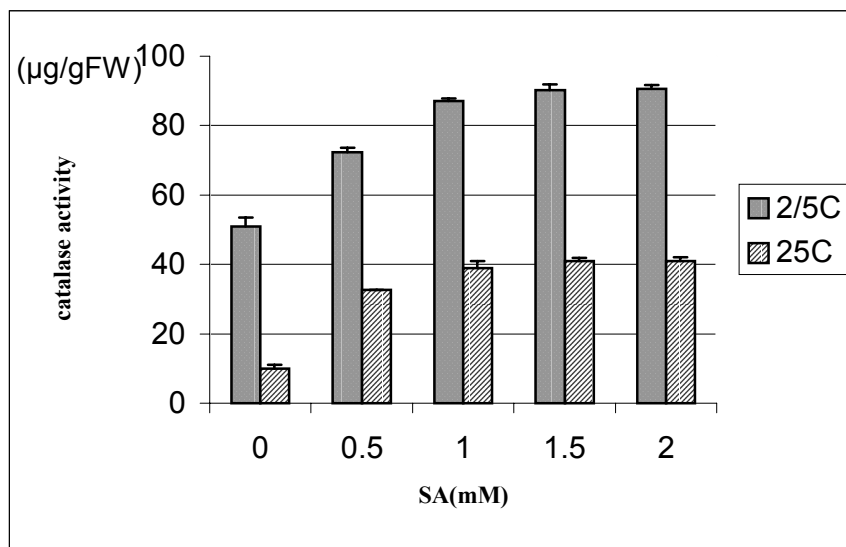


نمودار ۵- اثر SA روی فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در ریشه‌های دانه‌رست‌های تربچه در دو تیمار دمایی ۲/۵ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد

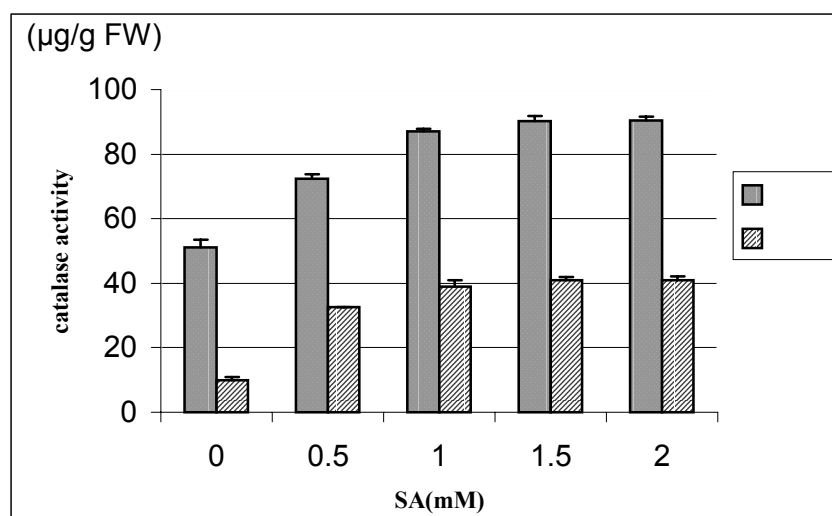


نمودار ۶- اثر SA روی فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در اندام هوایی دانه‌رست‌های تربچه در دو تیمار دمایی ۲/۵ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد

فعالیت آنزیم کاتالاز در اندام هوایی تربچه به موازات افزایش غلظت SA، افزایش معنی‌دار می‌یابد. از طرف دیگر، این افزایش فعالیت، در تیمار ۲/۵ °C بسیار بالاتر از ۲۵ °C است (نمودار ۷). ولی در ریشه‌ها، به موازات افزایش غلظت SA، فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش می‌یابد ولی اختلافی بین تیمار ۲/۵ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده نمی‌شود (نمودار ۸).



نمودار ۷- اثر اسید سالیسیلیک روی فعالیت آنزیم کاتالاز در اندام هوایی دانه‌رست‌های تربچه در دو تیمار دمایی ۲/۵ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد



نمودار ۸- اثر اسید سالیسیلیک روی فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه‌های دانه‌رست‌های تربچه در دو تیمار دمایی ۲/۵ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد

در تفسیر نتایج می‌توان گفت سرما موجب تجمع رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS) مثل سوپراکسید، هیدروژن پراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل می‌شود [۸]. ROSها احتمالاً سیگنال‌هایی هستند که جاروکننده‌های ROS و دیگر مکانیسم‌های محافظتی را القا می‌کنند [۱۹]. این رادیکال‌های فعال عوامل اکسیدان قوی هستند و موجب آسیب رسیدن به لیپیدها و DNA سلول‌ها می‌شوند [۲۶]. بعضی از محرک‌های زیستی مثل SA موجب

سنتر آنتی‌اکسیدان‌ها می‌شوند و چنان‌که نتایج نیز نشان می‌دهد فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز افزایش می‌یابد که این آنزیم‌ها، O_2^- ایجاد شده در اثر تنش سرما را به H_2O_2 تبدیل می‌کنند و سپس آنرا به H_2O متابولیزه می‌سازند. وجود APX علاوه بر نقش در متابولیزه نمودن H_2O_2 جهت احیاء آسکوربات نیز ضروری به نظر می‌رسد. پس SA با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان موجب پاکسازی ROS‌های ایجاد شده در اثر تنش سرما می‌شود که در نتیجه مولکول‌های فعال حیاتی از آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش در امان می‌مانند و این مکانیسم اصلی برای سازش دانه‌رست‌های تربچه به سرما است، که با نتایج، از آزمایش‌ها نشأت K^+ و قندهای یافته نیز تأیید می‌شود. در این راستا نتایج حاصل از آزمایش‌های ما با کار ژاندا^۱ و همکاران [۱۲] در سال ۱۹۹۹ و همچنین با کار کانگ^۲ و سالتیویت^۳ [۱۳] در سال ۲۰۰۲ هم‌سویی نشان می‌دهد، با این تفاوت که در دانه‌رست‌های تربچه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان هم در اندام هوایی و هم در اندام زمینی افزایش می‌یابد در حالی‌که در طی کار کانگ و همکاران روی برنج، خیار و ذرت فعالیت آنزیم‌ها فقط در بافت هوایی افزایش می‌یابد. نتایج حاصل از بررسی حاضر بر روی دانه‌رست‌های تربچه نشان داد که بین تحمل به سرما و فعالیت سه آنزیم آنتی‌اکسیدانی APX؛ GPX و CAT همبستگی مستقیمی وجود دارد و SA یک نیاز اساسی جهت سازش برای تنظیم واکنش‌های اکسیداتیو و حمایت مؤثر از مکانیسم دفع مسمومیت در گیاهان است.

منابع

۱. حدادچی غلامرضا. بیوشیمی و فیزیولوژی گیاهی (عملی). انتشارات بخش فرهنگی جهاد دانشگاهی منابع طبیعی دانشگاه مازندران. ۱۳۶۵، چاپ اول.
2. Azada K, Takahahi M. Production and scavenger of active oxygen in photosynthesis. In: ky le DJ, Osmond CB, Arntzen CJ. Photo inhibition: Topics in photosynthesis. Elsevier Amsterdam. 9 (1987) 227-287.
3. Buchanan B. B., Gruissem W, Jones. Biochemistry and molecular biology of plant physiology. ISBN.0-943088 (2001) 39-43.
4. Chen G. X., Asada K. Ascorbate peroxidase in tea leaves: Occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. Plant Cell Physiol. 30 (1989) 987-998.

5. Dat J., Christine H. Foyer and Scott M. Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in Mustard seedling. *Plant Physiol.* 118 (1998)1455-1461.
6. Ehyedi A. J., Yalpani N, Silvenman P. and Raskin I. Signal molecules in systemic plant resistance to pathogenes and pestes. *Cell.* 70 (1992) 879 – 886.
7. Esashi Y., Wakabyashi S. , Tsukada Y. and Sato H. S. Possible involvement of ethylene–stimulated germination of Cocklebur seed. *Plant Physiol.* 63 (1979) 1039–1043.
8. Hasagawa P. M., Bressan R. A. , Zhu J. K. and Bohner H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Anne.Rev. Plant Mol. Plant Physiol.* 51 (2000) 463-499.
9. Hauptmann N., Cadenas E. The oxygen paradox: Biochemistry of active oxygen. In: Sandalios JG(ed) oxidant defense cold spring. Harbor laboratory Press. Plain view NY.(1997) 120.
10. Hodges D. M., Andrews J., Jonson D. A., Hamilton R. I. Antioxidant enzyme responses to chilling stress indifferentially sensitive in bred maize lines. *Bot.* 43 (1997)1105-1113.
11. Hodgson R., Raison Jk. Superoxide production by thylakoids during chilling and implication in the succptibility of plants to chilling- induce photo inhibition. *Planta.* 183 (1997) 222-228.
12. Janda A., Szalai G.,Tari I., Paldi E. Hydroponic treatment with salicylic acid decrease the effect of chilling injury in maize plant. *Planta* 208(1999) 175-180.
13. Kang H. M., Saltiveit M. E. Activity of enzymatic antioxidant defens systems in chilled and heat-shocked cucumber seedling radicals. *Plant Physiol.* 113 (2001) 548-559.
14. Kang H. M., Saltiveit M. E. Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling(leaves and roots) and differentially affected by salicylic acid. *Physiologia Plantarum.* 115 (2002)577-576.
15. Larkidale J, and Knigth H. Protection against heat stress- induce oxidative damage in Arabidopsis, abscisic acid, ethylene and salicylic acid. *Plant Physiol.*128(20002)682-695.

16. Maehly A. C, Chen B. The assay of catalase and peroxidase In: Glic D(ed) methods of biochemical analysis. Inter science publisher, New York. Ny. 1 (1959) 357-425.
17. Malamy J, and Klessig D. F. Salicylic acid and plant disease resistance. Plant J. 2 (1992) 645-654.
18. Martinez. Salicylic acid mediated by the oxidative burst is key molecular in local and systemic responses of cotton challenged by an a virulent race *Xanthomonas compestris* PV malvacearum. Plant Physiology. 122 (2000) 757-766.
19. Prasad T. K., Anterson M. d, Martin B., Acan Steward C. R. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedling and a regulatory for hydrogen peroxidase. Plant Cell. 6 (1994) 65-71.
20. Rab A., Saltveit ME. Differential chilling sensitivity in cucumber seedling. Plant Physiol. 96(1996a) 375-382.
21. Rab A., Saltveit ME. Sensitivity of seedling radicles to chilling tolerance. J. AM. Soc. Hor. Sci. 121(1996b) 711-715.
22. Shen W., Nadak, Tachibana S. Effect of cold treatment on enzymic and none enzymic antioxidant activities of chilling tolerant and chilling-sensitive cucumber cultivars.J. Jap. Soc. Hort. Sci. 68 (1999) 967-973.
23. Upadhyaya A., Sankhla D., Davis TD., Sankhla N., Smidth BN. Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. Plant Physiol. 121 (1985) 453-461.
24. Waise RR., Naylor AW. Chilling-enhanced photo oxidation: Evidence for the role of singlet oxygen and super oxide in the break down of pigments and endogenous antioxidants. Plant Physiol. 83 (1987) 278-282.
25. Yalpani N., Raskin I. Salicylic acid: A systemic signal in plant disease resistance. Trend Microbiol. 1 (1993) 88-92.
26. Zhang X., Schimdt R. Biostimulating turgrasses. Grounds Maintenance. Nov. 1(1999)