Journal of Life Science 2008 Vol. 18. No. 12. 1705~1711 ©JLS / ISSN 1225-9918

저온 처리한 상추의 잎 내에서 ascorbate peroxidase와 dehydroascorbate reductase의 반응

강 상 재*

경북대학교 환경원예학과

Received September 23, 2008 / Accepted December 22, 2008

Response of Ascorbate Peroxidase and Dehydroascorbate Reductase in Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Leaves Exposed to Cold Stress. Sang-Jae Kang*. *Dept. of Environmental Horticulture, Kyungpook Nat'l University, 742-711 Sangju, Korea* - To investigate the relationship between cold stress and the activity of ascorbate peroxidase(APX), dehydroascorbate reductase (DHAR), mRNA expression level of two enzymes, hydrogen peroxide content was studied in lettuce leaves under stress condition imposed by cold stress at 4°C for 24 hr in the dark and following recovery at 20°C from cold stress. Hydrogen peroxide content increased gradually in lettuce leaves during cold stress, but decreased slightly following recovery from cold stress. Soluble protein content, however, decreased gradually during cold stress, and then rapidly returned to normal levels following recovery. Total chlorophyll content decreased gradually during cold stress, and then keep constant following recovery. The patterns of chlorophyll a and b content similar to that of total chlorophyll content, and carotenoid content didn't change. The ratio of chlorophyll a and total chlorophyll was increased during cold stress, but decreased with rapid during cold stress, and then the ratio returned to normal levels following recovery. During cold stress, the activity of APX and DHAR in the lettuce leaves increased dramatically, and also transcript levels of mRNA of APX and DHAR, as determined by probing ^{32}P-labeled single stranded RNA of APX and DHAR, highly increased and returned to normal levels following recovery, respectively. Relationship between APX and DHAR activity and hydrogen peroxide highly related (R^2=0.8715 and 0.8643), whereas between hydrogen peroxide and total chlorophyll content and soluble content related reversely (R^2=0.5021 and 0.8915).

Key words : Ascorbate peroxidase, cold stress, dehydroascorbate reductase, hydrogen peroxide, lettuce

서 론

식물은 여러 가지 기후지역에서 적응하며 생활하기 때문에 기온에 적응하는 메카니즘이 매우 다양하게 나타난다. 온대 기원의 식물은 저온에 매우 민감하여 영하의 기온이나 조직에 얼음이 존재하면 살아남기가 어려워지지만 저온에 적응하여 정상적인 생활을 할 수 있다. 식물이 저온에 적응하는 것은 환경조건에 의해 생성되는 적응내지 내성반응이며 저온저항성이 증대되는 여러 가지 적응 메카니즘을 가지고 있다. 식물은 여러 가지 환경스트레스에 직면하면 과산화수소의 함량이 증가하며 세포에 손상을 주므로 이를 제거하기 위하여 효소적인 반응과 비효소적 반응을 동시에 나타내게 된다고 알려져 있다. 아스코브산(ascorbate:Asc)은 직접적으로 과산화수소를 무독화하는 항산화물질로 잘 알려져 있으며[19], 아스코브산을 효소반응의 기질로 사용하여 과산화수소를 물로 환원시키는 효소인 아스코브산 과산화효소[Ascorbate Peroxidase: APX (EC 1.11.1.11)]가 효소적 반응을 하는 것으로 잘 알려져 있다[3,4]. 아스코브산 과산화효소는 오이의 잎 내에서 엽록체와 사이토졸에서 과산화수소의 무독화 작용에 관여하는 동위효소의 한 종류이며 과산화수소의 함량 변화와 동일한 패턴을 가지므로 저온스트레스에서는 특히 사이토졸에 존재하는 APX의 역할이 매우 중요한 것으로 생각된다[14]. 아스코브산 과산화효소(APX)는 과산화수소를 무독화하는 가장 중요한 항산화효소로서 활성도 변화가 카탈레이스와 달리 동위효소의 총 활성도가 증가하는 것으로 보고되어 있으며[14], 아라비돕스에서도 저온스트레스에 저항하는 작용이 카탈레이스보다 APX동위효소의 역할이 더 큰 것으로 알려져 있다. 과산화수소는 환경스트레스에 직면하면 세포 간 공간에서 과산화수소가 생성되고 cytosolic APX가 존재하는 사이토졸로 확산되어 들어가기 때문이기도 하며, 사이토졸에 존재하는 APX가 카탈레이스보다 과산화수소에 대한 친화성이 더 높기 때문이기도 하다고 알려져 있다[4,12].

환원된 아스코브산(Dehydroascobate: DHA)는 디하이드로아스코브산 환원효소[Dehydroascobate Reductase: DHAR (EC 1.8.5.1)]이 글루타싸이온(glutathione: GSH)을 기질로 사

*Corresponding author
Tel : +82-54-530-1231, Fax : +82-54-530-1239
E-mail : kangsj@knu.ac.kr

용하여 아스코브산으로 재생되는 과정을 가지고 있으므로 식물체 내 아스코브산의 수준을 조절하는 중요한 항산화효소이다. DHAR의 활성도는 여러 가지 환경스트레스에 반응하여 증가한다고 알려져 있으며 mRNA의 수준 등에 관한 특성이 보고되어 있다[8,24,26,27,29].

본 연구에서는 정상적으로 생육하고 있는 식물이 저온에 직면하였을 때 과산화수소의 생성과 아스코브산 과산화효소와의 관련성과 항산화방어 시스템에서 생화학적변화와 생리적 변화를 나타내는 저온스트레스에서 활성산소를 제거하는 항산화효소 시스템의 방어기구에 대한 연구를 수행하기 위하여 상추를 공시작물로 하여 수행하였다.

재료 및 방법

공시작물과 저온 처리

본 실험에 사용된 공시작물은 상추(*Lactuca sativa* L., cv. Baronet, Journey Co. USA)이며 육묘용 상토(Metro-Mix 350®)를 채운 포트(12×12 cm)에 3립씩 파종하여 발아시켰다. 발아 후 생육이 건전한 1주만 남기고 제거한 후 미국 캔자스 주립대학교 온실에서 제조하여 공급하는 영양용액(N:P:K= 20-10-20)을 2일 간격으로 공급하면서 4주간 생장상[10시간/14시간(주/야), 200 μE $m^{-2}s^{-1}$]에서 생육시켰다. 저온 처리는 공시작물을 4°C로 조절된 암상태의 생장상에서 24시간 동안 처리하였으며 처리 후 20°C에서 48시간 동안 회복시켰다. 저온 처리한 공시작물을 각각 0, 3, 6, 12, 24시간째와 회복 후 24, 48시간째에 잎을 채취하여 액체질소에서 담가 동결하고 -70°C에서 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

조효소액의 조제와 효소활성도 측정

아스코브산 과산화효소(APX)의 활성도 측정을 위한 조효소액의 조제는 보관중인 시료(3그램)를 액체질소를 넣어 마쇄한 후 1 mM의 아스코브산이 포함된 10배 부피의 인산완충액(pH 7.5, 100 mM K-P_i 완충액, 0.33 mM mannitol, 1 mM EDTA, 1%(w/v) PVP-40, 1 mM PMSF, 1 mM ascorbate)에서 추출하였다. APX의 활성도의 측정은 290 nm(ε =2.79 mM^{-1} cm^{-1})의 흡광도 감소를 활성도 측정용 완충액이 포함된 반응액에서 다음과 같이 수행하였다[17]. 효소활성도 측정용 반응액(총부피 1 ml)은 50 mM 인산완충액(0.5 mM ascorbate, 0.2 mM H_2O_2, 30 μl 조효소액)을 사용하였으며 반응용액에 과산화수소 첨가하면서 반응을 개시하고 1분 동안 산화된 아스코브산의 변화를 290 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소액과 과산화수소를 첨가하지 않고 산화된 흡광도의 변화를 대조로 하여 보정한 후 아스코브산의 산화정도를 시간 당 μmol로 계산하여 활성도로 나타내었다.

DHA 환원효소(DHAR)의 조효소액은 아스코브산을 첨가하지 않은 동일한 완충액과 동일한 방법으로 추출하여 조제하였다[11,26]. DHAR의 활성도 측정은 DHA가 아스코브산으로 환원되는 양을 290 nm(ε=2.79 mM^{-1} cm^{-1})에서의 흡광도 변화를 50 mM 인산완충액(pH 6.5, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM MDHA, 2.3 mM GSH)에서 측정하였으며 GSH에 의한 비효소적 DHA의 환원된 량을 보정하였다. 각각의 조효소액의 단백질의 함량은 Bradford법[5]으로 측정하였다.

엽록소와 카로티노이드 함량

총 엽록소와 엽록소 a와 b, 카로티노이드의 함량은 시료 0.2그램을 액체질소에서 마쇄한 후 10배 부피의 인산완충액[pH 7.0, 20% sorbitol, 1 mM EDTA와 0.1% (w/v) PMSF]으로 현탁하였다. 이 현탁액 100 μl를 900 μl의 95%(v/v) 에탄올을 넣고 완전히 혼합하고 12,000× *g*에서 10분간 원심분리한 상징액을 각각 664 nm, 648 nm, and 470 nm에서 흡광도를 측정하여 엽록소와 카로티노이드 함량을 환산하여 생체중량 당 mg으로 나타내었다[2,15].

과산화수소 함량

과산화수소의 함량은 시료 0.2그램을 액체질소를 넣어 마쇄하고 10배 부피의 0.1% (w/v) trichloriacetic acid (TCA)로 추출한 현탁액을 12,000× *g*에서 15분간 원심분리하여 상징액을 수집하였다. 상징액 500 μl를 10mM 인산완충액(pH 7.0)과 1 ml의 1 M KI를 첨가하여 발색시킨 후 390 nm에서 흡광도를 측정하였다. 과산화수소 표준곡선으로부터 과산화수소의 함량을 μM로 나타내었다[1,10].

APX와 DHAR의 cDNA 증폭

APX와 DHAR의 cDNAs는 시금치의 cDNA (accession. No. AB063289, AF195783)로부터 프라이머[APX: 5′-CTG ATG GGT GAG AAA GAA GG-3′(F), 5′-ATG TTG CTT GCT TTG GTA AT-3′(R); DHAR: 5′-AGT CGC GTA TTC ACT TTC AT-3′(F), 5′-AGA TTG CAT TGG GAC ATT AC-3′(R)]를 제작 프로그램(Primer 3, Whitehead Institute, USA)을 사용하여 제작하여 PCR의 방법으로 증폭하였다. PCR은 최종 부피를 25 μl로 하여 94°C에서 5분간 반응시킨 후, 94°C에서 1분, 52°C에서 1분, 72°C에서 1분의 순서로 35cycles로 수행한 다음 72°C에서 5분간 안정화시켰으며 2%(w/v) 아가로스젤 전기영동으로 단일밴드를 확인하였다.

Northern Blot 분석

Northern Blot분석을 위한 RNA의 추출은 CTAB을 이용하여 추출하였으며[6], 추출한 총 RNA (11.4 μg)는 10%(v/v) formaldehyde가 함유된 1.2%(w/v) 아가로스 젤 전기영동을 한 후 nylon membrane (Sigma, CO, USA)에 전이시켰다. Membrane은 55°C의 Prehybridization 완충액(6× SSC, 5× Denhardt's 용액, 1% (w/v) SDS, 100 μg ml^{-1} denatured sal-

mon sperm DNA)에서 3시간 동안 반응시켰으며[21], APX와 DHAR의 ^{32}P-random primed cDNA가 들어있는 Hybridization 완충액에서 12 시간 동안 반응시켰다. 반응액을 60°C의 세척완충액(2× SSC, 0.1% SDS)에서 10분간, 0.1× SSC, 0.1% SDS에서 1시간) 세척한 후 24 시간 동안 노출시키고 Blot 분석시스템(Storm, GE healthcare, USA)에서 스캔하였다.

결과 및 고찰

단백질 및 과산화수소의 함량

공시작물을 4°C에서 저온 처리하여 단백질의 함량과 과산화수소의 생성량을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 상추식물을 저온 처리하였을 때 잎 조직 내 과산화수소의 함량은 일정하게 증가하다가 20°C에서 저온처리를 회복시키면 그 함량이 정상상태로 회복하는 경향을 보였다(Fig. 1A). 단백질의 함량도 감소하는 경향을 나타내다가 20°C로 회복시키면 점차 그 함량이 회복되는 경향을 보이고 있어(Fig. 1B) 저온처리는 상추에서 강한 산화적 스트레스의 일종으로 단백질의 생성과 과산화수소의 생성량과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있다.

저온 처리한 오이의 잎 내 단백질의 함량이 약간 증가한다고 보고하고 있으나[13] 본 연구에서는 이 결과와 약간 상이한 결과를 보였으며, 과산화수소의 함량 변화는 비슷한 결과를 나타내었다. 그러나 오이 유묘를 저온처리 하였을 때 잎 내 단백질의 함량이 감소하여 저온 저항성이 감소하였다고 보고하고 있다[12]. 따라서 저온처리는 식물세포 내 과산화수소를 생성을 촉진하여 축적하게 되며 이 활성산소를 제거하기 위하여 catalase, peroxidase, SOD, APX, GR 등과 같은 항산화효소와 기능적으로 밀접하게 관련되어 있다[18,20,22,30]. 식물체에 과산화수소를 무독화하는 식물체 내 생화학적 변화와 관련된 ascorbate peroxidase (APX)의 cDNA의 발현을 유도한다고 알려져 있으며[22,28], 또한 세포 내 과산화수소의 함량이 증가하면 아스코브산과 관련된 효소의 활성도가 증가하는 것으로 보고되어 있다. 아스코브산은 활성산소를 환원시키는 기능을 가지고 있으므로 아스코브산을 전자공여체로 하여 과산화수소를 무독화하는 APX와 관련된 일련의 반응과 몇 가지 효소의 활성도 변화에 대한 연구가 많이 수행되고 있으며 아스코브산의 재생과 관련된 DHAR의 활성도 변화와 깊은 상관이 있을 것으로 추정된다.

엽록소 함량의 변화

상추의 잎을 저온 처리 하였을 때 엽록소의 함량 변화는 Fig. 2(A)와 같으며 엽록소의 함량은 저온스트레스를 처리할 경우 엽록소 a와 b 및 총엽록소의 함량이 점차 감소하는 경

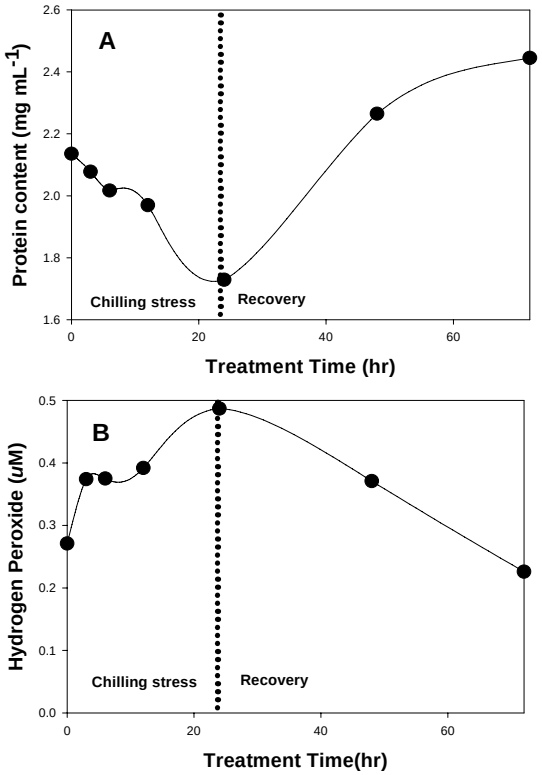

Fig. 1. Changes in soluble protein content (A) and hydrogen peroxide content (B) in lettuce leaves exposed to 4°C in the dark.

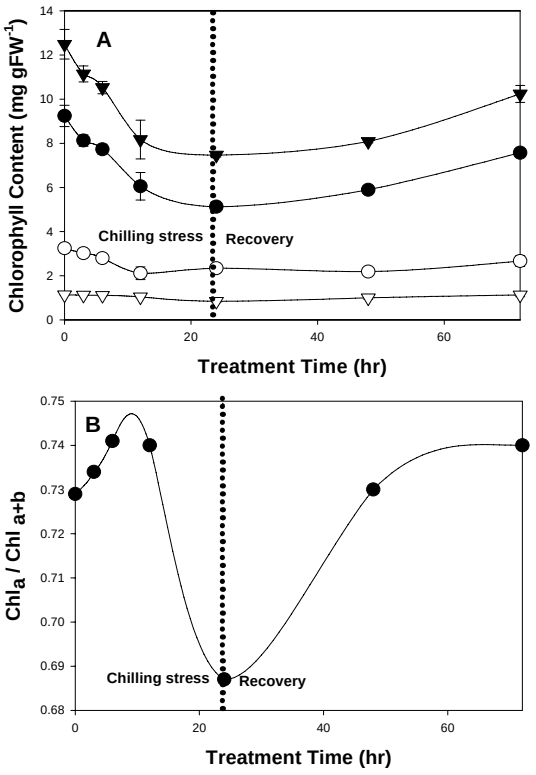

Fig 2. Changes in chlorophyll content (A) and ratio of Chl_a/Chl_{a+b} (B) in lettuce leaves exposed to 4°C in the dark ●: Chl_a; ○: Chl_b; ▼: total chlorophyll; ▽: carotenoid.

향을 보였으며 생육 적온인 20°C로 회복시켰을 경우 정상적인 엽록소의 합성이 이루어지고 있음을 알 수 있다.

반면 카로티노이드의 함량의 변화는 거의 일어나지 않고 일정한 수준을 유지하는 것으로 나타났다. 총 엽록소에 대한 엽록소a의 비율은 Fig. 2(B)와 같이 저온처리 12시간 까지는 증가하다가 24시간이 지나면서 급격하게 감소하게 되고, 마찬가지로 적온으로 회복시켰을 때 그 비율은 정상적인 경향을 가지는 것으로 보아 저온처리와 엽록소의 합성과는 깊은 상관이 있음을 추정할 수 있다. 상추의 경우 4°C의 저온 처리는 수분스트레스[16,31] 처리 시와 같이 식물체의 산화적 손상과 관련이 있다는 결과와 유사하게 나타났으며, 저온스트레스 처리는 식물의 엽록소의 생합성을 저하시켜 광합성 작용을 감소시킨다는 결과와 비슷하다는 사실을 확인할 수 있었다[9].

효소활성도 변화와 mRNA 수준 변화

저온스트레스 처리 시 과산화수소의 생성량이 증가하여(Fig. 1B 참조) 공시작물은 산화적 스트레스에 직면하게 되면서 스스로 이 활성산소를 제거하기 위한 효소적 반응이 유도되는 메카니즘을 가진다. 이와 같은 산화적스트레스 증가로 과산화수소가 세포내에 축적되면 세포에 손상을 유발하기 때문에 이를 제거하기 위하여 아스코브산 과산화효소가 아스코브산을 기질로 하여 과산화수소를 물로 환원시키는 작용을 가지게 된다. 이 과산화작용으로 아스코브산은 디하이드로아스코브산으로 변하고 이를 아스코브산으로 환원하는 효소적 작용을 동시에 가지면서 산화적 손상을 완화시키는 생화학적 작용을 가진다. 따라서 아스코브산이 디하이드로아스코브산으로 환원시키는 과정을 촉매효소인 디하이드로아스코브산 환원효소(DHAR)의 활성도변화를 추정하면 식물이 수분스트레스 환경에 적응하는 기작을 설명할 수 있게 된다. 상추 식물에서 저온 스트레스가 진행됨에 따라 아스코브산 관련효소인 APX와 DHAR의 활성도 변화는 Fig. 3과 같다. 전체적으로 APX와 DHAR의 활성도는 저온 처리가 진행됨에 따라 식물체 잎 내에서 증가하는 경향을 보이고 있으나 적온으로 회복시키면 정상으로 유지됨을 알 수 있다.

이 결과는 상추식물에서 저온과 같은 환경스트레스는 아스코브산과 관련된 항산화효소의 작용으로 저온저항성 또는 적응성을 획득하는 메카니즘과 연관되어 있음을 추정할 수 있다.

오이의 잎에서 저온 처리에 반응하는 몇 가지 효소의 활성도 변화를 조사한 결과[14], 저온 처리는 슈퍼옥사이드 전이효소(SOD)와 APX 등의 항산화효소의 활성도는 증가한다고 하였다. 특히 오이의 잎에서는 5종류의 APX 동위효소가 확인되었다고 하였으며 그중 저온저항성에 관련된 활성이 각각 나타난다고 하였다.

상추식물에 저온처리를 하였을 때 APX와 DHAR의 생성

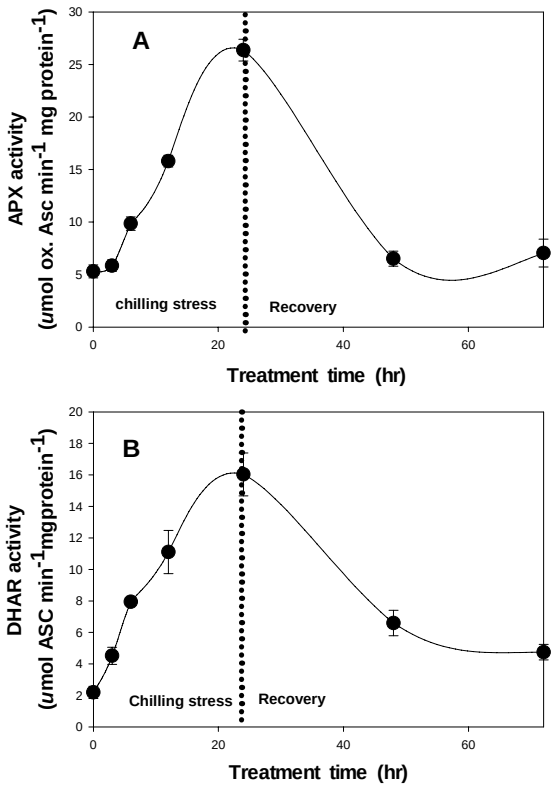

Fig. 3. Changes of APX activity (A) and DHAR activity (B) in lettuce leaves exposed to 4°C in the dark.

량과 활성도와 관련된 mRNA의 발현 정도는 Fig. 4와 같이 나타났다. 저온처리 시간이 경과함에 따라 각각의 mRNA의 발현 수준이 크게 증가함을 알 수 있으며 적온으로 회복시 mRNA의 수준도 회복됨을 알 수 있었다. 이 결과는 저온스트레스로 인한 상추의 저온 적응반응은 APX와 DHAR의 효소적 작용과 밀접한 관련이 있음을 추정할 수 있다. 벼의 유묘에서 저온 처리 시 APX의 mRNA의 수준이 크게 증가하였다고 한 보고[22]와, 아라비돕시스에서 저온 반응성 유전자들을 확인한 보고[23]와 유사한 결과를 얻었다.

과산화수소의 함량과의 상관관계

저온스트레스로 인하여 생성되는 과산화수소의 함량변화와 저온 처리를 받은 상추에서 일어나는 여러 가지 생화학적 반응으로 나타나는 효소의 활성도, 단백질의 함량, 엽록소의 함량 등과의 상관관계를 나타낸 결과는 Fig. 5와 같다.

APX의 활성도와 과산화수소의 함량과의 상관관계는 공시식물체내 과산화수소의 함량이 증가하면서 APX의 활성도와는 정의 상관(R^2=0.8715)으로 증가하며(Fig. 5A), DHAR의 활성도도 과산화수소의 함량증가로 동일한 경향으로 증가(R^2=0.8643)하는 것으로 나타나(Fig. 5B) 두 가지 관련효소가 상추의 저온 저항성 획득에 비슷한 영향을 미치는 것으로 생각된다. 엽록소의 함량과 단백질의 함량은 Fig. 5C와 D에 나

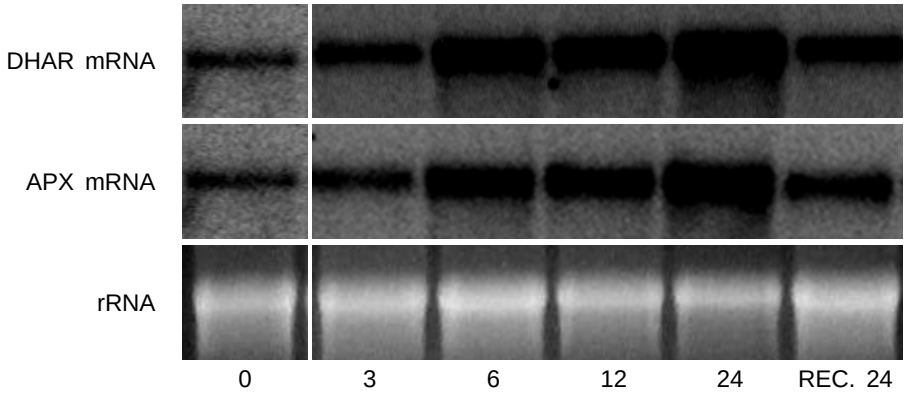

Fig. 4. RNA blot hybridization analysis for APX and DHAR mRNA. Total RNA was isolated from lettuce leaves, and separated by electrophoresis (11.4 μg each) for detection of APX and DHAR mRNA. APX and DHAR mRNA was detected by probing ^{32}P-labeled single stranded APX and DHAR RNA. Total RNA on the agarose gel was stained with Ethidium Bromide.

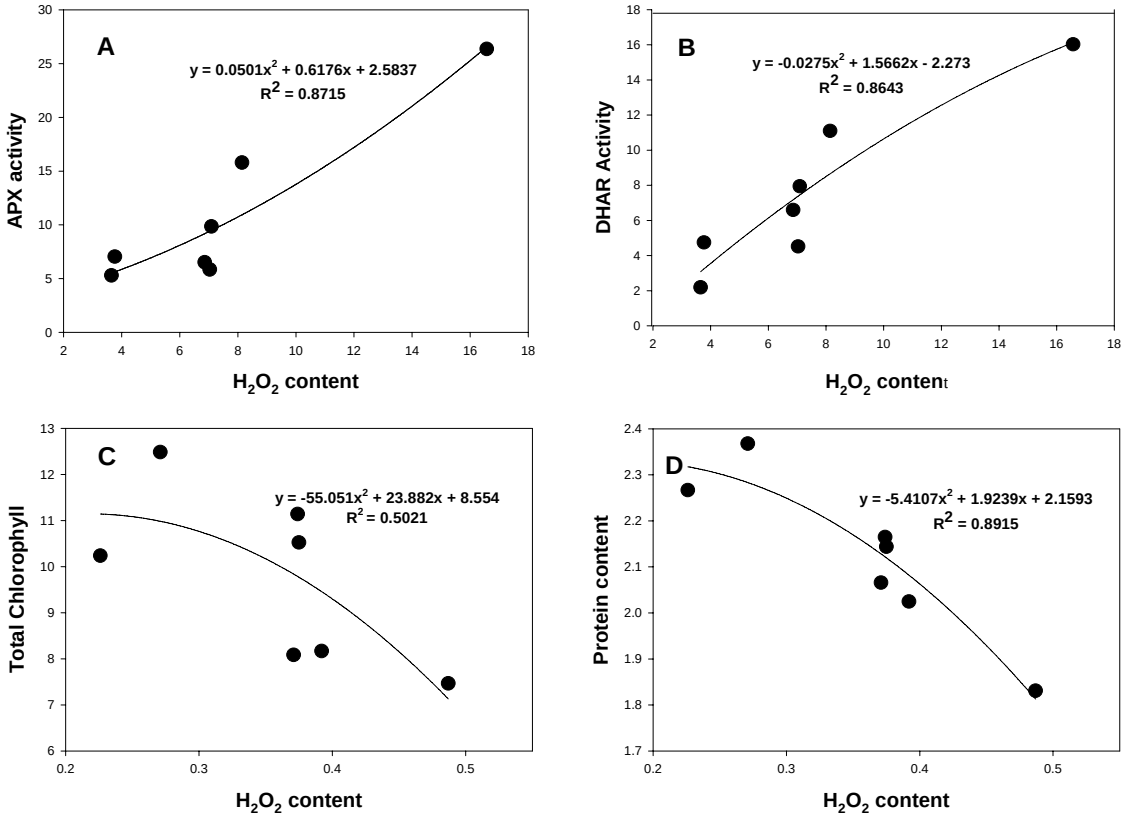

Fig. 5. Relationship between hydrogen peroxide and APX, DHAR activity, total chlorophyll and protein content in lettuce leaves exposed to 4°C in the dark.

타낸 바와 같이 저온처리로 과산화수소의 생성량이 증가하면 반대로 감소하는 경향(R^2=0.5021, R^2=0.8915)을 보여 저온과 같은 환경스트레스는 단백질의 합성과 엽록소의 합성을 감소시켜 식물의 생육에 영향을 미치는 요인으로 작용함을 추정할 수 있다. 상추식물은 저온처리를 하였을 때 저온 적응성 획득을 위하여 APX와 DHAR과 효소적 메카니즘과 단백질, 엽록소 등과 같은 생리화학적 메카니즘을 동시에 공유하는 것으로 생각할 수 있다.

요 약

상추식물에서 저온 처리를 하였을 때 저온 적응성 획득 메카니즘과 관련된 APX와 DHAR의 활성도와 mRNA 발현 수준 등과의 관련성을 조사한 결과는 다음과 같다. 잎 조직

내 과산화수소의 함량은 일정하게 증가하다가 20°C에서 저온처리를 회복시키면 그 함량이 정상상태로 회복하는 경향을 보였으나 단백질의 함량은 반대의 경향을 나타내었다. 엽록소의 함량은 저온스트레스를 처리할 경우 엽록소 a와 b 및 총 엽록소의 함량이 점차 감소하는 경향을 보였으며 저온스트레스 회복 시 다시 증가하는 경향을 보였으나 카로티노이드 함량의 변화는 거의 일어나지 않고 일정한 수준을 유지하는 것으로 나타났다. 총 엽록소에 대한 엽록소a의 비율은 저온처리 12시간까지는 증가하다가 24시간 이후 급격하게 감소하게 되고 저온스트레스를 회복시켰을 때 정상 수준으로 회복되는 경향을 나타내었다. APX와 DHAR의 활성도는 저온 처리가 진행됨에 따라 상추의 잎 조직 내에서 급격하게 증가하는 경향을 보이고 있으나 적온으로 회복시키면 정상 수준으로 유지되었다. 저온처리 시간이 경과함에 따라 APX와 DHAR의 mRNA의 발현 수준이 크게 증가하는 경향을 보였다가 원래 수준으로 회복되었다. APX의 활성도와 과산화수소의 함량과의 상관관계는 상추의 잎 조직 내 과산화수소의 함량이 증가하면 APX의 활성도가 증가하는 경향(R^2=0.8715)을 보였으며, DHAR의 활성도와 과산화수소의 함량도 동일한 경향으로 증가(R^2=0.8643)하였다. 그러나 과산화수소의 생성량이 증가함에 따라 엽록소의 함량과 단백질의 함량은 저온 스트레스처리로 과산화수소의 생성량이 증가하면 엽록소의 함량(R^2=0.5021)과 수용성단백질의 함량과는 감소하는 경향(R^2=0.8915)을 보였다.

References

1. Alexieva, V., I. Sergiev, S. Mapelli and E. Karanov. 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell and Environment* **24,** 1337-1344.
2. Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*. **24,** 1-15.
3. Asada, K. and M. Takahashi. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In Photoinhibition: Topics in photosynthesis, pp. 227-287, *In* Kyle, D. J., C. B. Osmond and C. J. Arntzen (eds.), Elsevier, Amsterdam.
4. Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*. **85,** 235-241.
5. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **59,** 248-254.
6. Chang, S., J. Puryear and J. Cairney. 1993. A simple method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* **11**, 113-116.
7. Chang, C. C., L. Ball, M. J. Fryer, N. R. Baker, S. Karpinski and P. M. Mullineaux. 2004. Induction of ascorbate peroxidase 2 express in wounded *Arabidopsis* leaves does involve known wound signaling pathways but is associated with changes in photosynthesis. *Plant J.* **38,** 499-511.
8. Chen, Z., T. E. Young, J. Ling, S. C. Chang and D. R. Gallie. 2003. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *PNAS* **100,** 3525-3530.
9. Ensminger, I., F. Busch and N. P. A. Huner. 2006. Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis. *Physiologia Plantarum* **126,** 28-44.
10. Foyer, C. H., J. Rowell and D. Walker. 1983. Measurements of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta.* **157,** 239-244.
11. Hossain, M. A. and K. Asada. 1984. Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant and Cell Physiol.* **25**, 85-92.
12. Kang, K. S., C. J. Lim, T. J. Han, J. C. Kim and C. D. Jin. 1998. Activation of ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* leaves on response to aminotriazole. *J. Plant Biol.* **41,** 155-161.
13. Kang, H. M., K. W. Park and M. E. Saltveit. 2005. Chilling tolerance of cucumber(*Cucumis sativus*) seedling radicles is affacted by radicle length, seedling vigor, and induced osmotic-and heat shock proteins. *Physiologia Plantarum* **124,** 485-492.
14. Lee, D. H. and C. B. Lee. 2000. Chilling stress-induced change of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Sci.* **159,** 75-85.
15. Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* **148,** 350-382.
16. Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in *Plant Sci*. **7,** 405-410.
17. Nakano, Y. and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*. **22,** 867-880.
18. O'kane, D., V. Gill, P. Boyd and R. Burdon. 1996. Chilling, oxidative stress abd antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. *Planta.* **198,** 371-377.
19. Padh, H. 1990. Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem. and Cell Biol.* **68,** 1166-1173.
20. Prasad, T. K., M. D. Anderson, B. A. Martin and C. R. Stewart. 1994. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedling and a regulatory role for hydrogen peroxide. *The Plant Cell* **6,** 65-74.
21. Sambrook, J., E. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual, Ed 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
22. Sato, Y., T. Murakami, H. Funatsuki, S. Matsuba, H. Saruyama and M. Tanida. 2001. Heat shock-mediated *APX* gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings. *J. Exp. Bot.* **52,** 145-151.
23. Seki, M., M. Narusaka, J. Ishida, T. Nanjo, M. Fujita, Y. Oono, A. Kamiya, M. Nakajima, A. Enju, T. Sakuri, M. Satou, K. Akiyama, T. Taji, K. Yamaguchi-Shinozaki, P. Carninci, J. Kawai, Y. Hayashizaki and K. Shinizaki. 2002. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high salinity stresses using a full length cDNA microarray. *Plant J.* **31,** 279-292.

24. Shigeoka, S., T. Ishikawa, M. Tamoi, Y. Miyakawa, T. Takeda, Y. Yabuta and K. Yoshimura. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. of Exp. Bot.* **53,** 1305-1319.
25. Shimaoka, T., C. Miyake and A. Yokota. 2003. Mechanism of the reaction catalyzed by dehydroascorbate reductase from spinach chloroplast. *Eur. J. Biochem.* **270,** 921-928.
26. Shimaoka, T., A. Yokota and C. Miyake. 2000. Purification and characterization of chloroplast dehydroascorbate reductase from spinach leaves. *Plant Cell Physiol.* **41,** 1110-1118.
27. Urano, J., T. Nakagawa, Y. Maki, T. Masumura, K. Tanaka, N. Murata and T. Ushimara. 2000. Molecular cloning and characterization of a rice dehydroascorbate reductase. *FEBS Letters* **466,** 107-111.
28. Yabuta, Y., T. Maruta, K. Yoshimura, T. Ishikawa and S. Shigeoka. 2004. Two distinct redox signaling pathways for cytosolic APX induction under photooxidative stress. *Plant Cell Physiol.* **45,** 1586-1594.
29. Yoshimura, K., Y. Yabuta, T. Ishikawa and S. Shigeoka. 2000. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol.* **123,** 223-233.
30. Zhao, S., and E. Blumwald. 1998. Changes in oxidation-reduction state and antioxidant enzymes in the roots of jack pine seedling during cold acclimation. *Physiol. Plant* **104,** 134-142.
31. Zlatev, Z. S., F. C. Lidom, J. C. Ramalho and I. T. Yordanov. 2006. Comparision of resistance to drought of three bean cultivar. *Biologia Plantrum* **50,** 389-394.