

カトレア交配種メリクロン苗の抗酸化酵素活性に及ぼす順化温度の影響

李 又紅¹・今井 健²・大野 始³・松井 鑄一郎^{2*}

¹ 岐阜大学連合農学研究科 501-1193 岐阜市柳戸

² 岐阜大学農学部 501-1193 岐阜市柳戸

³ 静岡大学農学部 422-8529 静岡市大谷

Effects of Acclimatization Temperatures on Antioxidant Enzyme Activities in Mericlones of a Cattleya Hybrid

Youhong Li¹, Ken Imai², Hajime Ohno³ and Shuichiro Matsui^{2*}.

¹The United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University. Yanagido, Gifu 501-1193

²Faculty of Agriculture, Gifu University. Yanagido, Gifu 501-1193

³Faculty of Agriculture, Shizuoka University. Ohya, Shizuoka 422-8529

Summary

Mericlones of *Brassolaeliocattleya* Shinmei ‘Sanyang’ transplanted from flasks to pots with sphagnum moss were acclimated for 4 weeks in growth cabinets controlled at 15°C, 25°C and 35°C under $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ for 16-hr photoperiod with fluorescent lamps. Except for root CAT activity that increased at 25°C, superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) activities in leaves and roots fluctuated slightly. However, those activities at 15°C and 35°C, initially changed significantly after the onset of the treatments; they became stable during the rest of the acclimation period. Based on the antioxidative enzyme activities, the responses to thermal stress were greater in roots than in leaves. These results indicate the significance of managing the root environment at transplantation time. SOD activities that were highest at 35°C, followed by those at 15°C, clearly demonstrate the effects of acclimation temperatures (thermal stress) on both leaves and roots. Thermal effects on APX and CAT differed between leaves and roots. SOD activities in both leaves and roots as affected by the high temperature became smoothly stabilized. CAT activated for 48 hrs after the onset of the acclimation treatment reverted to its initial level and remained so for several more weeks. Activities in SOD, APX, and CAT in roots that increased at 15°C indicate that cattleya plants are heat- but not cold-resistant.

Key Words: acclimation, antioxidative enzymes, cattleya, mericlone, temperature.

諸 言

ラン苗の順化環境に関する研究はいくらかあり、カトレア実生について、Islam(1999)は光や温度条件を検討し、生育状況から適温の存在することを報告している。しかし、苗の順化過程を植物生理学的な点から把握する研究は乏しい。Liら(2001)はカトレアやシンビジウムの成株において順化中の温度がストレス要因となったとき活性酸素の発生を助長し、この消去に抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)やカタラーゼ(CAT)が深く関与する

ことを報告している。これらの酵素の活性はランのみならず他の植物においても、生物学的あるいは非生物的要因により変動することが知られており(今堀ら, 1998; 西原ら, 2001)、キュウリやトウモロコシなどの耐寒性の弱い植物ではこれらの活性が低い(Jahnkeら, 1991; Shenら, 1999)。したがって、ラン苗の順化においてこれらの酵素は順化温度制御の指標となりうると考えられる。ランには光合成様式がC₃のものとCAMのものが存在し(Avadhaniら, 1982)、光合成様式によって過酸化水素含量や上述の3酵素活性に差異のあることも知られている(李ら, 2001)。したがって、順化過程の解明にはこのことも考慮する必要がある。さらに苗の順化過程を明らかにする上で、根の受ける影響を把握することは一層重要と考えられる。すなわち、フラスコ苗の場合、根は水分が多く無機イオン成分の豊富な培地内にあるが、植え出し

2003年5月20日 受付。2003年12月25日 受理。
本研究の一部は園芸学会平成14年度春季大会で発表した。
*Corresponding author.

た後はコンポストとしてミズゴケなどを使用するため、より好気的な条件となるなど、植え出した前後で培養環境は著しく変化し、植え出した時の根は損傷も生じて、地上部よりも大きな影響を受けると考えられる。

最も順化に影響する環境要因として光、温度、養水分があげられる。温度について、CAM植物のカトレア交配種メリクロン苗を用い、高温や低温が順化過程において抗酸化酵素活性にどのような影響を与えるか明らかにし、順化に関する指針を得る目的で実験を行った。

材料および方法

1. メリクロン苗の順化

カトレア苗生産者から購入したフラスコ入り *Brassolaeliocattleya* Shinmei ‘Sanyang’ のメリクロン苗 (苗齢1年, 草丈6 cm) を実験に用いた。メリクロン苗はフラスコから水道水で培地とともに洗い出し、水が苗から流下後、水を含ませたミズゴケでポットに植え替え、1鉢に40本植えのコミュニティポットとした。2001年5月24日、温度を15°C (低温)、25°C (中温) および35°C (高温) に設定したグロースキャビネット内に移し、順化を開始した。光量はIslam (1999)の結果から $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ とし、植物育成用蛍光灯で毎日8時から24時までの16時間日長とした、かん水は毎日行い、施肥は液肥 (N:P:K=195:79:570 ppm) で適宜行った。

2. 酵素の抽出と活性の測定

1) 酵素の抽出

葉と根 (根の先端部約2 mmを切除) を定植直後 (0時間)、6、12、24および48時間後、さらに、順化開始1、2、3、4週間後に採集した。新鮮重1 gずつ3サンプルを液体窒素で凍結後、 -20°C に貯蔵した。凍結試料をpH7.0のリン酸緩衝液4 ml中で乳鉢、乳棒を用いて磨砕し、2層ガーゼでろ過した。ろ液を10,000 rpm, 5°C , 20分間冷却遠心 (Tomy, MX-150) し、上澄み液を粗酵素液とした。

2) 酵素活性の測定

SOD活性の測定: SOD活性の測定は、Beauchamp・Fridovich (1971)の方法に準じた。すなわち、50 mM炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 10.2) 2.3 ml, 1.0 mMニトロブルーテトラゾニウム (NBT), 4.0 mMキサンチン, 3.0 mM EDTA, 0.15% (w/v) BSA (牛血製アルブミン) および10倍に薄めた希釈粗酵素液の各々0.1 mlを含む反応液に、キサンチンオキシダーゼ0.1 mlを加えて反応を開始させた。 30°C で20分間インキュベートした後10 mM CuCl_2 0.2 mlの添加により反応を停止させ、生成した青色ホルマザンの吸光度を分光光度計 (Hitachi, Model 100-50) をもちいて560 nmの波長で測定した。なお対照区の吸光度を50%抑制するSOD活性を1単位とした。

APX活性の測定: APX活性の測定は、蒸留水2 ml, 0.2% アスコルビン酸1 ml, 粗酵素液0.4 mlを含む反応

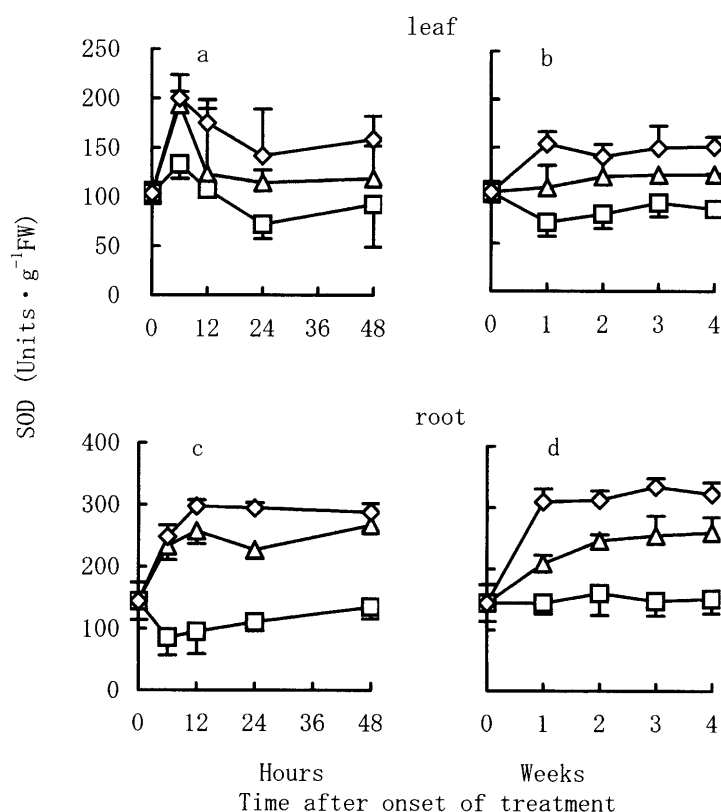


Fig. 1. Effect of acclimation temperatures ($\diamond$, 35°C , high; $\square$, 25°C , moderate; $\triangle$, 15°C , low) on SOD activity in leaves (a, b) and roots (c, d) of mericlones of a cattleya hybrid. Vertical bars represent SD (n=3).

液, およびこの反応液の蒸留水 1 ml を 5 mM H_2O_2 1 ml に置き換えた反応液を 24°C で 2 分間反応させ, 10% メタリン酸 1 ml を加えて反応を停止させた. 指示薬として 1% 澱粉液数滴を加えて 0.005 N ヨウ素液で浅青色まで残存するアスコルビン酸量を滴定し, 前者の反応液におけるアスコルビン酸量から後者の量を差し引いて算出した.

CAT 活性の測定: CAT 活性の測定は Greenfield・Price (1954) の方法に準じ, 前記の抽出用リン酸緩衝液 2 ml, 粗酵素液 0.4 ml および 3% H_2O_2 2 ml を含む反応液における常圧・24°C・2 分間の酸素生成量を容積法で測定した.

結 果

1. 順化温度が SOD 活性に及ぼす影響

1) 48 時間処理の影響

48 時間処理からみると (第 1 図 a, c) 葉の SOD 活性は処理開始 6 時間後にはいずれの区でも上昇し, 特に高, 低温区で中温区より有意に増大したがその後低下した. 根の SOD 活性は, 低, 高温区では葉より増大し, 高く推移した. これに対し中温区では処理開始後, やや低下したが 48 時間後には, 初期の値に回復した. 根では低温と高温の両区の差がわずかで, 中温区より極めて活性が高かった.

2) 4 週間処理の影響

葉, 根ともに高温処理区では他の 2 処理区以上の高い SOD 活性を維持した (第 1 図 b, d). 一方, 中温区の葉では活性が低下したが, 根の SOD 活性は初期の値が維持された. 低温区の葉では SOD 活性は変化しなかったが, 根では活性増大が 2 週間後まで続いた. 処理 2 週間後以降は, 3 処理区ともに安定状態となり, 処理終了時の SOD 活性は葉, 根ともに高い順に高温区, 低温区, 中温区となった.

2. 順化温度が APX 活性に及ぼす影響

1) 48 時間処理の影響

葉の APX 活性は低温区で処理 6 時間後に有意に増大した後初期値以下に低下した (第 2 図 a). 中温区と高温区では急速に低下した. 根では低温区は葉と異なり, 6 時間後から 12 時間後まで有意に低下した後, 回復する傾向を示したのに対して, 高温区では 6 時間後にわずかに低下したが 12 時間後には初期値に回復し, その後再び低下した (第 2 図 c). 中温区では根の APX 活性は変化しなかった. 48 時間後における 3 つの温度処理区の APX 活性の差は葉では認めらず, 根では高温区と低温区が中温区より低かった.

2) 4 週間処理の影響

48 時間後にはほとんど差のなかった葉の APX 活性が高

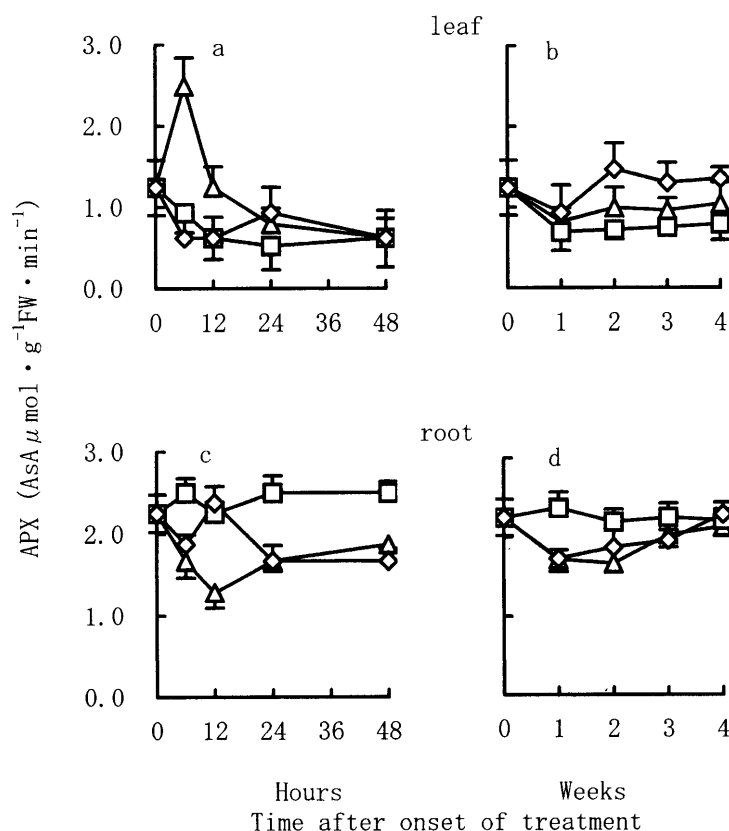


Fig. 2. Effect of acclimation temperatures ($\diamond$, 35°C, high; $\square$, 25°C, moderate; $\triangle$, 15°C, low) on APX activity in leaves (a, b) and roots (c, d) of mericlones of a cattleya hybrid. Vertical bars represent SD (n=3). AsA, ascorbic acid.

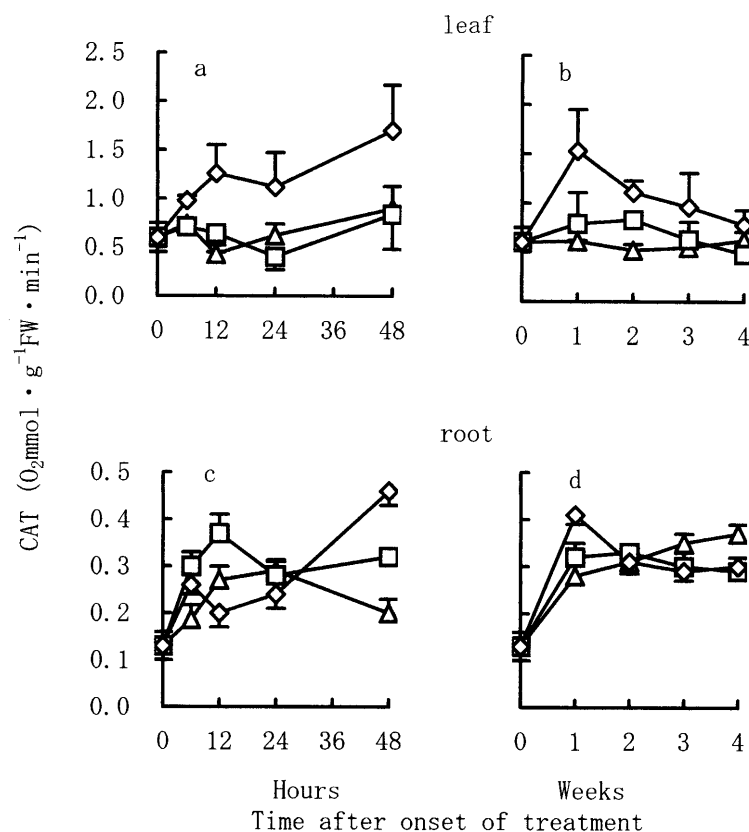


Fig. 3. Effect of acclimation temperatures ($\diamond$, 35°C, high; $\square$, 25°C, moderate; $\triangle$, 15°C, low) on CAT activity in leaves (a, b) and roots (c, d) of mericlones of a cattleya hybrid. Vertical bars represent SD (n=3).

温区では2週間後に増大した(第2図b)。根では中温区はほとんど変化しなかったのに対して、48時後に低下した低、高温区の活性はその後順化の経過につれて初期値に回復した(第2図d)。4週間後には葉では高、低、中温区の順となったが、根では3温度処理区間にAPX活性の差異は認められなかった。

3. 順化温度がCAT活性に及ぼす影響

1) 48時間処理の影響

葉のCAT活性は高温区で処理48時間後に有意に増大した(第3図a)。一方、低、中温区では葉、根ともにやや増大した(第3図c)。根における活性の変動は、葉と同様著しかった高温区だけでなく、低、中温区でも著しかった。48時間後のCAT活性は高、中、低温区の順であった。

2) 4週間処理の影響

葉のCAT活性は高温区では処理1週間後に有意に増大した後、低下したが、低、中温区ではほとんど変化しなかった(第3図b)。根では3つの温度処理区ともに活性が高まった状態で推移した。最も活性が高かった高温区は2週間後からやや低下したが、中温区では活性が維持され、低温区では4週間後も増大した。4週間後の活性には、根では高温区、中温区に差がなく、低温区が高かった(第3図d)。

考 察

カトレア成株は冬期で夜温13~15°Cに保つ温度管理が必要で、35°Cの高温には数時間耐えることができる。プラスチックから出してコミュニティポットに移植した苗は夜温15.5°Cは必要で、18.5°Cに高めると生育がよくなる(Northern, 1970)。本研究では1か月後の生育を見ると、処理開始後3週目から、定植時に存在した根から中、高温で発育した新根は約0.5 cmの白色透明の新根となった。これに対して低温区では根と葉の先端が褐変する低温障害が発生した。このような点を考慮すると、本実験で設定した15°Cや35°Cは適温域から隔たった処理温度といえ、抗酸化酵素活性の変動を見ても急激なストレスをもたらしたことは明らかである。メリクロン苗の順化中、葉のSOD活性は温度が高いほど高かったが、いずれの温度でも一時的な変動の後、高、低、中温の順で安定した。低温の影響についてみると、SODは正常な状態でも活性を示すが、低温ストレスを受けると活性は増大する(Jahnkeら, 1991; Shenら, 1999)。低温感受性植物に対し、低温条件下で光照射すると光合成機能は著しく低下するが、これはラジカルの生成と光合成電子伝達系の損傷によるためとされる(Taylorら, 1974; Powlesら, 1983)。本実験の低温処理後のSODの活性化は、こうした不完全な電子

伝達により生じる O_2^- を消去する植物の最初の防御反応として働く (Fridovich, 1986) ことを示している。しかし、12時間後以降活性が低下したという本実験の結果は APX や CAT の活性低下によって H_2O_2 濃度が高くなり、消去されなかった H_2O_2 が SOD を不活性化する (河野, 1988) ことが原因と考えられる。一方、高温条件下における反応は Li ら (2001) の報告と一致した。SOD 活性の増大は細胞における O_2^- の増加の指標とされ (Fridovich, 1986), O_2^- の生成増大は長期にわたり、SOD 活性は高く維持され、生成した H_2O_2 の分解は順化の前期は CAT により、後期は APX により低温区と比較してより順調に行われるのであろう。

SOD 活性の変化から、根に対する高温と低温の影響は葉に対するより大きいと考えられる。SOD には 3 種類があり、そのうち CuZn-SOD は葉緑体に、Mn-SOD はミトコンドリアに主に分布し (二木, 1990), さらに培養細胞や個体の物理的あるいは化学的刺激による Mn-SOD 発現量は CuZn-SOD より勝るとされ (井上, 1996), 本研究のミズゴケ中で生長した根は白色の部分が多かったことも考慮すると、根における変動は呼吸に関与するミトコンドリアへの影響によるものと考えられる。また、高温と低温の影響を比較したとき、高温では 1 週間で SOD 活性は安定するのに対し、低温では 2 週間後も増大し続け、低温の影響が高温より長く続くことを示している。

APX は SOD とともに water-water サイクルを形成し (Nakano・Asada, 1981; Asada, 1992), 葉緑体において過剰な光エネルギーを消去する役割を果たしている。高温処理開始後 APX 活性が低下したことから、順化初期にはカトレアではこのサイクルの関与は低いと思われた。しかし、その後順化が進むと APX 活性は増加して初期の値に回復したことから、SOD とともに H_2O_2 の分解に関与すると考えられる。Li ら (2001) は成株について昼温 32°C, 夜温 20°C で 2 か月順化したカトレア成株の APX 活性は 30°C ~15°C で順化したものより高かったと報告している。一方、低温区の場合葉における APX 活性は 6 時間後に急激に増大し、その後低下したことから、APX はストレス直後の活性酸素の除去に関与していると考えられる。このような低温条件下での活性低下は、キュウリやトウモロコシの非耐寒性品種は活性が低いこと (Jahnke ら, 1991; Shen ら, 1999) と一致するように思われる。

根では高、低温処理で APX 活性が低下した。根におけるこの変動は、根が白色化していたことからサイトゾルなど葉緑体以外に存在する APX が関与していると推察される。このことに関して、浅田 (1990) は植物では光合成組織のほか根やジャガイモの塊茎などクロロプラストをもたない組織にも APX が検出されると述べている。高、低温処理区の APX 活性は 4 週間後まで中温区との間に差が認められなかった。このことから高、低温の根に及ぼす影響は長く続くと推察される。

CAT は正常な光合成でもペルオキシソームで光呼吸に伴い産生された H_2O_2 を分解し、光呼吸は気温が高いほど高まる (石井, 1992)。一方、CAT は光阻害の発生と併行して光不活性化され、温度に対する感受性も高く、高温で活性が高まり、低温で低下する (Omran, 1980; Feierabend ら, 1992)。しかし、CAM 植物の場合、光呼吸は昼間 CO_2 が C_4 化合物から生成され、その濃度が高まるため、 C_3 植物に比べ低いとされる (芦原, 1991)。本研究のカトレアの場合、高温で葉の CAT 活性が高まり、李 ら (2001) の成株における結果と一致した。中、低温区における CAT の変動の少ない結果と対比すると、高温では CAT の活性増大に光呼吸の関与が示唆される。

根の CAT 活性は葉より低かった。これは CAT が根では主に呼吸や養分吸収と移行に関係するミトコンドリアや膜系で生成する H_2O_2 のみの分解に関与することを示唆している。活性の変化は、いずれの温度でも順化後 48 時間以内は著しかった。トウモロコシにおいて CAT のアイソザイムの存在とその細胞内分布の違いや発育段階における発現の違いが知られており (Scandalios, 1994), カトレアの場合も葉と根にアイソザイムが存在し、その役割が異なると考えられる。

中温区におけるこれら抗酸化酵素活性は CAT の処理後 12 時間までを除くと安定していた。このことは本条件下で活性酸素の生成が少なかったことを示し、25°C の条件は好適な順化条件であったと考えられる。この結果は Islam (1999) の結果を抗酸化酵素活性の面から支持している。また、根の受けるストレスは葉以上に大きいことが明らかになった。いずれの抗酸化酵素活性の変動も根で著しく、CAT 活性は中温区においても植え替え 12 時間後に増大した。植え出し時の根の扱いの大切さとともに、その後の環境条件にも配慮する必要性を明確に示している。

以上のように SOD, APX や CAT 活性は温度の影響を著しく受け、葉や根における変動も大きく、これによるカトレアのストレスの大きさと環境への適応性を評価する順化温度制御の指標として応用できるのでないかと思われた。李 ら (2001) は光合成様式の異なるカトレアとシンビジウムの成株の低温順化を行い、抗酸化酵素活性の変化が認められる結果から前者は後者より低温ストレス回避への対応が必要と述べ、SOD はストレス初期の重要性を、APX は順化過程の指標を、CAT は光合成様式を含めた植物の生理的な差異を示すと述べている。本研究の高温に対する影響や葉と根におけるこれら酵素の変動の差異を考慮すると、低温において根の SOD, APX および CAT が長期にわたり変化することからカトレアは耐寒性が低く、高温に対しては SOD が早期に安定化することや CAT の初期値への回復が速いことから耐暑性は高いことを示し、SOD はストレスの大きさや環境への適応能力を、一方、APX, CAT は葉と根におけるオルガネラの受ける影響を示すと判断される。したがって、必要とする

順化の期間を李ら (2001) の結果を参考にこれらの活性が平衡に達するかあるいは低下を開始するまでの期間とし、影響の大きい根をもとに判断すると、高温順化に要する期間は APX が初期値に回復する 4 週間、低温順化については CAT の増大傾向から 4 週間以上と推測された。

摘 要

Brassolaeliocattlea Shinmei ‘Sanyang’ メリクロン苗をフラスコからミズゴケを培地としてポットに植え替えた。温度を 15°C (低温)、25°C (中温) および 35°C (高温) に設定し、植物育成用蛍光灯で光量が $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、16 時間日長のグロースキャビネット内に苗を移し、4 週間順化した。中温区の葉と根の SOD, APX, CAT 活性は根の CAT 活性を除き変化が少なかった。これに対し、高、低温区では処理 48 時間以内に活性が顕著に変動し、時間の経過につれて活性は安定化した。根は葉と比較していずれの抗酸化酵素活性も変動が著しく大きく、根の受けるストレスは葉より大きかった。このことは植え替え時の根の取扱いや根をとりまく環境の重要性を示している。処理終了まで SOD 活性の差は葉、根ともに処理温度によって明確に異なり、高、低、中温区の順となった。ストレスの強度と環境への適応性を示すと思われる。APX や CAT 活性に対する温度の影響は葉と根で異なった。高温に対する葉や根の SOD 活性の早期安定化や CAT の初期値への速やかな回復、低温における根の SOD, APX, CAT 活性の長期増大は、カトレアの耐暑性と非耐寒性の性質を示した。

謝 辞 本研究に際し、東海オーキッド有限会社 (岐阜県) を通じて香斌蘭園 (台湾) から材料の提供をいただいた。記して深謝の意を表する。

引用文献

- 浅田浩二. 1990. アスコルビン酸ペルオキシダーゼ-クロロプラストでの過酸化水素消去系-. p. 305–312. 中野稔・浅田浩二・大柳善彦編. 活性酸素-生物での生成・消去・作用の分子機構. 共立出版社. 東京.
- Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase-A hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85:235–241.
- 芦原 坦. 1991. 炭素の固定とその生成物のゆくえ-炭素代謝-. p. 18–69. 太田次郎・石原勝敏・黒岩澄雄・清水碩・高橋景一・三浦謹一郎編. 基礎生物学講座 5. 植物の生理. 朝倉書店. 東京.
- Avadhani, P. N., C. J. Goh, A. N. Rao and J. Arditti. 1982. Carbon fixation in orchids. p. 173–193. In: J. Arditti (ed.). *Orchid biology-reviews and perspectives, II*. Cornell Univ. Press, Ithaca, New York.
- Beauchamp, C. and I. Fridovich, 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276–287.
- Feierabend, J., C. Schaan and B. Hertwig. 1992. Photoactivation of catalase occurs under both high and low-temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosynthesis II. *Plant Physiol.* 100: 1554–1561.
- Fridovich, I. 1986. Biological effects of the superoxide radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* 247: 1–11.
- Greenfield, R. E. and V. E. Price. 1954. Liver catalase I. A manometric determination of catalase activity. *J. Biol. Chem.* 209: 355–361.
- 今堀義洋・周 燕飛・上田悦範・茶診和雄. 1998. ピーマン果実の成熟中のアスコルビン酸代謝. 園学雑. 67: 798–804.
- 井上正康. 1996. 活性酸素とシグナル伝達 — レドックス制御と生物の生存戦略. p. 68–72. 講談社. 東京.
- 石井龍一. 1992. 各種要因による光合成の制御. p. 80–82. 宮地重遠編. 現代植物生理学 I 光合成. 朝倉書店. 東京.
- Islam, M. O. 1999. Studies on the micropropagation of orchids and the growth and physiology of plantlets. 岐阜大学博士論文.
- Jahnke, L. S., M. R. Hull and S. P. Long. 1991. Chilling stress and oxygen metabolizing enzymes in *Zea mays* and *Zea diploperennis*. *Plant Cell and Environ.* 14: 97–104.
- 河野泰久. 1988. スーパーオキシドによる酵素の活性. 農化. 62: 1112–1116
- Li, J., S. Matsui and S. Onwona-Agyeman. 2001. Effects of cultural temperatures on antioxidant levels in leaves of *Cattleya* and *Cymbidium*. *Environ. Control in Biol.* 39: 1–7.
- 李 進才・趙 習コウ・松井鑄一郎. 2001. C₃, C₄ と CAM 植物における過酸化水素含量と抗酸化酵素活性の差異. 園学雑. 70: 747–752.
- Nakano, Y. and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22: 867–880.
- 二木鋭雄. 1990. 生体における酸素毒性に対する防御システム. p. 177–190. 日本化学会編. 季刊 化学総説 No.7. 活性酸素種の化学. 学会出版センター. 東京.
- 西原英治・高橋国昭・中田 昇・田中 浄・渡辺圭太郎. 2001. 5-アミノレブリン酸 (ALA) 処理がハウレンソウの光合成速度、過酸化水素の生成、抗酸化物質および活性酸素消去酵素に及ぼす影響. 園学雑. 70: 346–352.
- Northern, R. T. 1970. *Home orchid growing*, 3rd ed. p. 19–28. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Omran, R. G. 1980. Peroxide levels and the activities of catalase and indoleacetic acid oxidase during and after chilling in cucumber seedlings. *Plant Physiol.* 65: 407–

- 408.
- Powles, S. B., J. A. Berry and O. Bjrkman. 1983. Interaction between light and chilling temperature on the inhibition of photosynthesis in chilling-sensitive plants. *Plant Cell and Environ.* 6: 117.
- Scandalios, J. G. 1994. Regulation and properties of plant catalases. p. 275-315. In: C. H. Foyer and P. M. Mullineaux (eds.). *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*. CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida.
- Shen, W., K. Nada and S. Tachibana. 1999. Effect of cold treatment on enzymic and nonenzymic antioxidant activities in leaves of chilling-tolerant and chilling-sensitive cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivars. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 68: 967-973.
- Taylor, A. O., C. R. Slack and H. G. McPherson. 1974. Plants under climatic stress. VI. Chilling and light effects on photosynthetic enzymes of sorghum and maize. *Plant Physiol.* 54: 696.