

Evaluation of auxin and thiamine interaction effect on PAL activity and phenolic compounds content in vegetative growth stage of soybean plants

Mahdiyeh hamzeh nejadi ¹, Nazi Nader nejad ^{1*}, Zahra Asrar ¹, Hossein Mozafari ²

¹ Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar of University Kerman, Kerman, Iran

² Department of Ecology, Research Institute for Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

Abstract

Soybean (*Glycin max* L.) is one of the most important oily seeds in the world. This plant is rich in protein and unsaturated fats, and plays a significant role in human health with phenolic compounds and flavonoids. Indole Butyric Acid (IBA) is a plant growth regulator that plays a key role in producing phenolic compounds and increasing the antioxidant capacity of the plant. Thiamine is one of the important vitamins in strengthening the immune system and increasing the resistance to environmental stresses in the plant's growth stages. Regarding the effect of hormone auxin and thiamine on the production of phenolic compounds as one of the antioxidant compounds in growth stages, the aim of this study was to investigate the effect of the two compounds in two stages of soybean growth and compare their effect on phenolic compounds changes in order to Detecting higher antioxidant capacity in environmental stress tolerance. For this purpose, the DPX cultivar of soybean seeds were prepared from Dezful Agriculture Research Center and planted in perlite containing flowers. The plants were planted under factorial design under IBA treatments with three concentrations of 0, 10 and 50 and thiamine with three concentrations of 0, 50 and 200. Extraction and evaluation of phenolic compounds, anthocyanins and pigments in leaves were performed. Data were analyzed using Duncan's test at a significant level of 5%. The results showed that the combined use of auxin and thiamine increased the carotenoid content in both phases and caused a significant increase in phenolic content. Application of auxin alone reduced auxin and thiamine the anthocyanin content significantly in both phases, but did not have a significant effect on phenolic content. The results showed that the PAL activity of the phenolic and anthocyanin content increased significantly in the 9-leaf stage compared to 3-leaf. Generally, the results showed that interaction effect between auxin and thiamine on phenolic compounds in different stages of vegetative growth significantly improved and increased plant defense.

Key words: Auxin, PAL activity, phenolic compounds, soybean vegetative stages

* nnnadernejad@yahoo.com

بررسی تاثیر هم‌زمان اکسین و تیامین بر میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز و محتوای ترکیبات فنلی در دو مرحله رشد رویشی گیاه سویا (*Glycin max*)

مهديه حمزه نژادی^۱، نازی نادر نژاد^{۱*}، زهرا اسرار^۱، حسین مظفری^۲

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران

^۲ گروه اکولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

چکیده

سویا (*Glycin max* L.) گیاهی سرشار از پروتئین، چربی‌های غیراشباع، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی است که نقش مهمی در سلامت انسان دارد. ایندول ۳-بوتیریک اسید (IBA) از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بوده که در تولید ترکیبات فنلی و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه نقش بسزایی دارد. تیامین نیز از ویتامین‌های مهم گیاهی در تقویت سیستم دفاعی و افزایش مقاومت به تنش‌های محیطی است. با توجه به اثر هورمون اکسین و تیامین بر تولید ترکیبات فنلی با ویژگی آنتی‌اکسیدانی در مراحل رشد، هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی اثر این دو ترکیب بر دو مرحله رشد رویشی گیاه سویا و تغییرات ترکیبات فنلی جهت ایجاد ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر در مقاومت به تنش‌های محیطی است. به این منظور بذرهاي سویا، رقم DPX کاشته شدند و گیاهان در قالب طرح فاکتوریل با سه غلظت صفر، ۱۰ و ۵۰ میکرومولار ایندول ۳-بوتیریک اسید و سه غلظت صفر، ۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار تیامین تیمار شدند. اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل، آنتوسیانین و رنگیزه‌ها در برگ انجام شد. نتایج نشان دادند که کاربرد هم‌زمان اکسین و تیامین، محتوای فنلی و کاروتنوئید را در هر دو مرحله به طور معنی‌داری افزایش داد. کاربرد اکسین به تنهایی کاهش معنی‌دار محتوای آنتوسیانین را در هر دو مرحله سبب شد؛ اما بر محتوای فنلی تاثیر معنی‌داری نداشت. به طور کلی، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL)، محتوای فنلی و آنتوسیانین در مرحله ۹ برگی نسبت به ۳ برگی افزایش بیشتری داشته است. این نتایج بیان‌کننده تاثیر هم‌زمان اکسین و تیامین بر محتوای ترکیبات فنلی در مراحل مختلف رشد رویشی و افزایش قدرت دفاعی گیاه است.

واژه‌های کلیدی: اکسین، ترکیبات فنلی، محتوای آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز، مراحل رویشی سویا.

مقدمه

گیاه سویا با نام علمی (*Glycine max* L.) متعلق به خانواده Fabaceae و گیاه علفی یک‌ساله است که به صورت بوته‌ای با شاخ و برگ بسیار رشد می‌کند. سویا دو مرحله رویشی و زایشی دارد (McWilliams *et al*, 2004).

گیاه سویا نقش ویژه‌ای در پیشگیری از خطر ابتلا به طیف وسیعی از بیماری‌های خطرناک مانند سرطان سینه و پروستات دارد و مهم‌ترین محصول جهان از نظر خواص پیشگیری‌کننده است (Hellal and Abdelhamid, 2013).

گیاهان منبع بسیاری از موادشیمیایی هستند که مصرف دارویی دارند و فراورده‌های حاصل از متابولیسم ثانویه گیاهی جزء گرانبهاترین ترکیبات شیمیایی گیاهی هستند. این ترکیبات منحصر به گونه یا حتی نژاد ویژه‌ای هستند و اغلب در دوره رشدی و نمو ویژه در گیاه تولید می‌شوند. ترکیبات فنلی گروه عمده‌ای از ترکیبات شیمیایی گیاهی حاصل از مسیر فنیل پروپانویید هستند که اهمیت فیزیولوژیک و مورفولوژیک آن‌ها ثابت شده است و گزارش‌های زیادی از ویژگی آنتی‌اکسیدانی آن‌ها و اثرشان بر حذف رادیکال‌های آزاد وجود دارد. این ترکیبات به‌طور گسترده در گیاهان وجود دارند؛ به رنگ، عطر و طعم میوه‌ها کمک می‌کنند (Chang-Kui Ding *et al*, 2001)؛ در قسمت‌های مختلف سلول گیاهی و در مراحل مختلف رشد گیاه تشکیل می‌شوند (Ewane *et al*, 2012). بیشترین فعالیت فنیل آلانین آمونیلایز در گیاهان جوان و در حال نمو مشاهده شده است. فعالیت این آنزیم در مراحل مختلف رشد و نمو گیاه متفاوت

است و بیشترین فعالیت آن در مرحله جوانه زنی مشاهده شده است (Ziaei *et al*, 2012).

فلاونوئیدها گروه وسیعی از ترکیبات فنلی هستند که گستره وسیعی از نقش‌های زیستی را به‌ویژه در برابر تنش‌ها دارند. و فعالیت آنتی‌اکسیدانی زیاد این ترکیبات نسبت به کاروتنوئیدها گزارش شده است (Lister and Lancaster, 1996) اکسین از تنظیم‌کنندگان رشد گیاهی است. ایندول ۳- بوتیریک اسید (IBA) ترکیبی مصنوعی است که ریشه‌زایی را در گیاهان سبب می‌شود (Strader and Bartel, 2011). گزارش‌ها نشان می‌دهند که ایندول ۳-استیک اسید (IAA) نسبت به ایندول ۳- بوتیریک اسید به نور و دما حساس‌تر است (Zolman *et al*, 2000). همچنین ایندول ۳- بوتیریک اسید در مسافت‌های طولانی در گیاهان حرکت می‌کند و در طول انتقال دست‌نخورده باقی می‌ماند. در ریشه، ساقه و سایر بافت‌ها انتقال ایندول ۳- استیک اسید از ایندول ۳- بوتیریک اسید کاملاً متفاوت است (Korasick *et al*, 2013). عکس‌العمل گیاه، به حساسیت اندام گیاهی بستگی دارد و پاسخ گیاه به اکسین به غلظت آن وابسته است (Jellin *et al*, 2008). همچنین تاثیر اکسین خارجی بر محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در گیاه *Vigna* اثبات شده است (Vats *et al*, 2012).

تیامین (ویتامین B₁) جزء ویتامین‌های محلول در آب است و تاثیر این ترکیب در تولید متابولیت‌های ثانویه اثبات شده است (Abrahamian and Kantharajah, 2011). گزارش‌های مبنی بر اثر تیامین بر افزایش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی (Yousef and Talaat, 2003)، افزایش رشد ریشه و همچنین افزایش

ترکیب تیمارهای استفاده شده در پژوهش حاضر، با آزمایش فاکتوریل تهیه شد.

گیاهان موجود، در ۲۷ گلدان کاشته شدند. پس از گذشت ۲۱ روز نمونه‌ها تیمار شدند. از گلدان‌های کاشته شده، ۳ گلدان، شاهد و برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شدند. تیمارها شامل

۱- اکسین صفر+تیامین صفر (شاهد)؛

۲- اکسین ۱۰+تیامین ۵۰ میکرومولار؛

۳- اکسین ۱۰+تیامین ۲۰۰ میکرومولار؛

۴- اکسین ۵۰+تیامین ۵۰ میکرومولار؛

۵- اکسین ۵۰، تیامین ۲۰۰ میکرومولار؛

۶- اکسین صفر+تیامین ۵۰ میکرومولار؛

۷- اکسین صفر+تیامین ۲۰۰ میکرومولار؛

۸- تیامین صفر+اکسین ۱۰ میکرومولار؛

و ۹- تیامین صفر+اکسین ۵۰ میکرومولار

بودند که در پژوهش حاضر، دو مرحله رویشی ۳ تا ۵ برگی و ۹ تا ۱۱ برگی در نظر گرفته شدند. تیماردهی به صورت یک روز در میان تا رسیدن گیاه به مرحله زایشی ادامه پیدا کرد؛ سپس برگ‌ها و ریشه‌های گیاهان مد نظر برای مطالعه، در ازت مایع منجمد و برای سنجش‌های بعدی به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

طول ساقه و ریشه با استفاده از خط کش میلی متری اندازه گیری شد. طول ساقه از یقه تا قسمت انتهایی ساقه، و طول ریشه از یقه تا انتهای ریشه در نظر گرفته شد. برای هر گروه تیماری سه تکرار، هر تکرار از میانگین سه نمونه محاسبه و بر اساس واحد میلی متر گزارش گردید.

وزن تر و خشک گیاه وجود دارد (Abdel-Aziz et al, 2009).

باتوجه به اینکه گیاه سویا اهمیت زیادی از نظر داشتن ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی به ویژه ایزوفلاونوئیدها دارد، هدف اصلی پژوهش حاضر، بررسی تاثیر متقابل تیمارهای هورمون ایندول ۳- بوتیریک اسید و ویتامین تیامین بر محتوای ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز در مراحل مختلف رشد رویشی گیاه سویا و تشخیص مناسب‌ترین مرحله تیماردهی برای افزایش این ترکیبات است.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر، رقم DPX مطالعه شد. بذره‌های مطلوب از نظر سالم بودن و مناسب بودن اندازه و وزن برای کاشت انتخاب شدند. در نخستین هفته پس از کشت در گلدان، آبیاری با آب مقطر انجام شد. برای تامین املاح لازم برای گیاه، پس از یک هفته، آبیاری با محلول کامل غذایی هوگلند سه بار در هفته انجام شد. پس از گذشت سه هفته، نمونه‌های گیاهی در مرحله ۳ تا ۵ برگی و ۹ تا ۱۱ برگی تا رسیدن به مرحله زایشی تیمار شدند. تیمارهای لازم برای پژوهش حاضر، با افزودن ایندول ۳- بوتیریک اسید و تیامین (ویتامین B1) به محلول غذایی تهیه شدند. محلول غذایی استفاده شده، هوگلند بود که به نسبت ۰/۵ و اسیدیته مشخص ۶/۴ استفاده شد (Hoagland and Arnon, 1950). غلظت‌های صفر، ۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار تیامین و غلظت‌های صفر، ۱۰ و ۵۰ میکرومولار ایندول ۳- بوتیریک اسید و جمعا نه تیمار به دست آمد. جدول

طبق رابطه‌های ۱ تا ۴ به ترتیب غلظت کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها (شامل: کاروتن‌ها و گزارتوفیل‌ها) محاسبه شدند. غلظت برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره گیاهی تعیین شد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی برحسب گرم وزن تر محاسبه و ارائه شدند.

سنجش میزان آنتوسیانین‌ها: برای اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین‌های برگ‌گ روش Wagner (۱۹۷۹) استفاده شد. ۰/۱ گرم از بافت برگ‌گی در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و کلریدریک اسید خالص به نسبت حجمی (۱:۹۹) کاملاً سائیده شد. عصاره در لوله‌های آزمایش سرپیچ‌دار ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت؛ سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (مدل 5804R، شرکت Eppendorf، آلمان) و جذب محلول رویی در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه غلظت، ضریب خاموشی (ε) ۳۳۰۰۰ سانتی‌متر بر مول در نظر گرفته شد.

$$A = \epsilon bc$$

سنجش میزان فلاونوئیدها: فلاونوئیدهای کل با روش اندازه‌گیری آلومینیوم کلراید کالریمتری Zhishen و همکاران (۱۹۹۹) انجام شد. ۰/۱ گرم از نمونه‌های گیاهی در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به خوبی سائیده شد و عصاره حاصل سانتریفیوژ شد. محلول رویی برای آزمایش‌های بعدی استفاده شد. ۵۰۰ میکرولیتر عصاره برداشته و با آب مقطر به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از ۵ دقیقه ۳۰۰ میکرو لیتر سدیم نیتريت ۵ درصد و ۶۰۰ میکرو لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد به محلول

اندازه‌گیری وزن تر اندام هوایی و ریشه گیاه: پس از جدا کردن اندام هوایی و ریشه از یکدیگر، وزن هریک برحسب گرم با ترازو (مدل BPSIID، شرکت Sartorius، آلمان) با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. **اندازه‌گیری طول اندام هوایی و ریشه:** طول ریشه و ساقه با خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد. طول ساقه، از یقه تا قسمت پایانی ساقه و طول ریشه، از یقه تا پایان ریشه در نظر گرفته شد. اندازه‌گیری طول ساقه، برای هر گروه تیماری در سه تکرار انجام شد. هر تکرار از میانگین سه نمونه محاسبه و براساس واحد میلی‌متر گزارش شد.

سنجش میزان کلروفیل و کاروتنوئید: برای سنجش میزان کلروفیل و کاروتنوئید از روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) استفاده شد. ۰/۲ گرم از برگ‌های تازه گیاه در هاون چینی حاوی ۱۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد سائیده شد و پس از صاف کردن با کاغذ صافی، جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible (مدل Cary-50، شرکت Varian، استرالیا) در طول موج‌های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲۰ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. برای تنظیم دستگاه، استون ۸۰ درصد استفاده شد. غلظت رنگیزه‌ها با رابطه‌های ۱ تا ۴ محاسبه شدند.

رابطه ۱:

$$Chla = (12.25A_{6632} - 2.79A_{6468})$$

رابطه ۲:

$$Chlb = (21.21A_{6468} - 5.1A_{6632})$$

رابطه ۳:

$$ChIT = Chla + chlb$$

رابطه ۴:

$$Car = \left(\frac{(1000A_{470} - 1.8Chla - 85.02Chlb)}{198} \right)$$

جذب آنها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد (Bradford, 1976).

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL): اندازه‌گیری با روش Hahldbrock و Rogg (۱۹۷۵) انجام شد. برای تهیه عصاره آنزیمی، مقدار ۳۰۰ میلی گرم از بافت تازه برگ با ۶/۵ میلی لیتر بافر تریس - هیدرو کلریک اسید ۵۰ میلی مولار با $\text{pH}=8/8$ حاوی بتا مرکاپتواتانول ۱۵ میلی مولار در هاون سرد ساییده شد؛ سپس عصاره به دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی برای برای سنجش آنزیم مد نظر استفاده شد.

آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز واکنش تبدیل فنیل آلانین را به سینامیک اسید کاتالیز می‌کند. در این روش فنیل آلانین گهرمایه آنزیم است و فعالیت آنزیم بر اساس سرعت تشکیل سینامیک اسید تعیین می‌شود. در لوله آزمایش، ۱ میلی لیتر از بافر استخراج با ۰/۵ میلی لیتر ال-فنیل آلانین ۱۰ میلی مولار، ۰/۴ میلی لیتر آب دو بار تقطیر و ۱ میلی لیتر عصاره آنزیمی مخلوط و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. واکنش با اضافه کردن ۰/۵ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد به پایان می‌رسد. غلظت سینامیک اسید با اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر و ضریب خاموشی معادل ۹۵۰۰ میلی مولار بر سانتی‌متر به دست آمد. یک واحد از فعالیت این آنزیم معادل ۱ میکرومول از سینامیک اسید تولید شده در دقیقه است.

اضافه شد. پس از ۶ دقیقه، ۲ میلی لیتر سدیم هیدروکسید ۱ مولار با ۲ میلی لیتر آب مقطر به محلول اضافه شد. شدت جذب محلول با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۰ نانومتر خوانده شد.

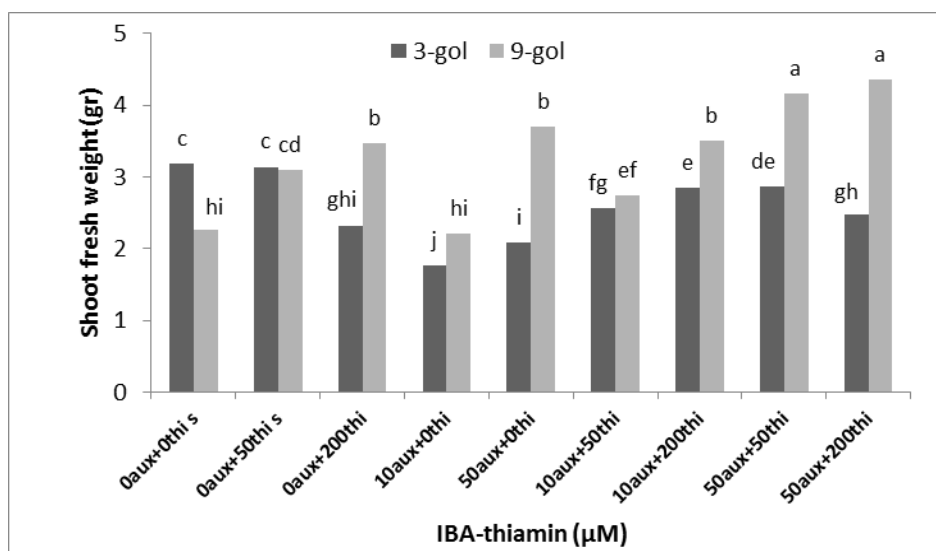
اندازه‌گیری میزان فنل کل: محتوای ترکیبات فنلی کل با روش Tunc-Ozdemir (2009) استخراج شد. ۰/۱ گرم از برگ تر گیاه در ۵ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد سائیده و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شد؛ سپس به ۱ میلی لیتر محلول رویی، ۱ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه شد و حجم محلول با آب مقطر به ۵ میلی لیتر رسانده شد؛ سپس ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین ۵۰ درصد و ۱ میلی لیتر سدیم کربنات ۵ درصد به آن اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱ ساعت در تاریکی نگهداری و سپس جذب هر نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد و غلظت ترکیبات فنلی کل بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد.

سنجش غلظت پروتئین: به این منظور ۱ گرم بافت تر در یک هاون چینی محتوی ۳ میلی لیتر بافر تریس - ساکارز با $\text{pH}=7/5$ به طور کامل سائیده شد. محلول همگن به دست آمده به لوله سانتریفیوژ منتقل و پس از ۱۰ دقیقه سکون، به مدت ۲۵ دقیقه در ۴۰۰۰g سانتریفیوژ شد. در پایان مرحله سانتریفیوژ، لوله‌ها به آرامی از دستگاه خارج و محلول رویی در چند لوله آزمایش توزیع شد. عصاره‌های حاصل برای سنجش غلظت پروتئین استفاده شدند. برای سنجش غلظت پروتئین به لوله‌های آزمایش مقدار ۰/۱ میلی لیتر عصاره پروتئینی و ۵ میلی لیتر معرف بیوره افزوده و سریعاً ورتکس شد. پس از دو دقیقه و قبل از یک ساعت

نتایج

مقدار وزن تر اندام هوایی مربوط به مرحله نه‌برگی بود که در بیشترین حالت در تیمار اکسین ۵۰ میکرومولار و تیامین ۲۰۰ و ۵۰ میکرومولار بیشترین افزایش را نسبت به شاهد داشت (شکل ۱).

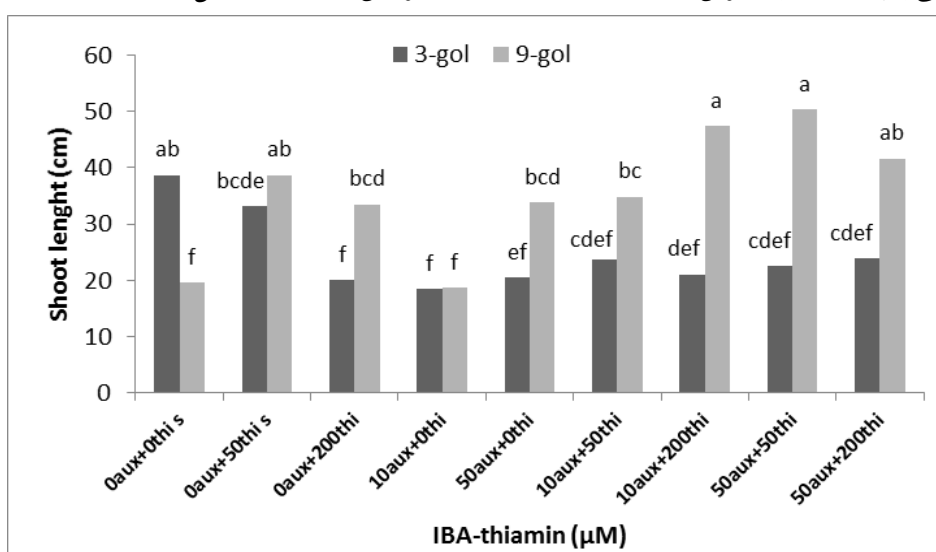
نتایج حاصل از تجزیه آماری بین سه عامل مرحله رویشی، اکسین و تیامین نشان داد که اثر متقابل بین این سه عامل وجود دارد که این تاثیر متقابل سه‌گانه در سطح ۵ درصد معنی‌دار است. در هر سه تیمار بیشترین



شکل ۱- تاثیر سه عامل دوره رویشی، اکسین و تیامین بر وزن تر اندام هوایی در گیاه سویا، مقادیر میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار است. حروف غیرمشترک بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است.

اکسین ۵۰ میکرومولار و تیامین ۵۰ میکرومولار بیشترین افزایش را داشت (شکل ۲).

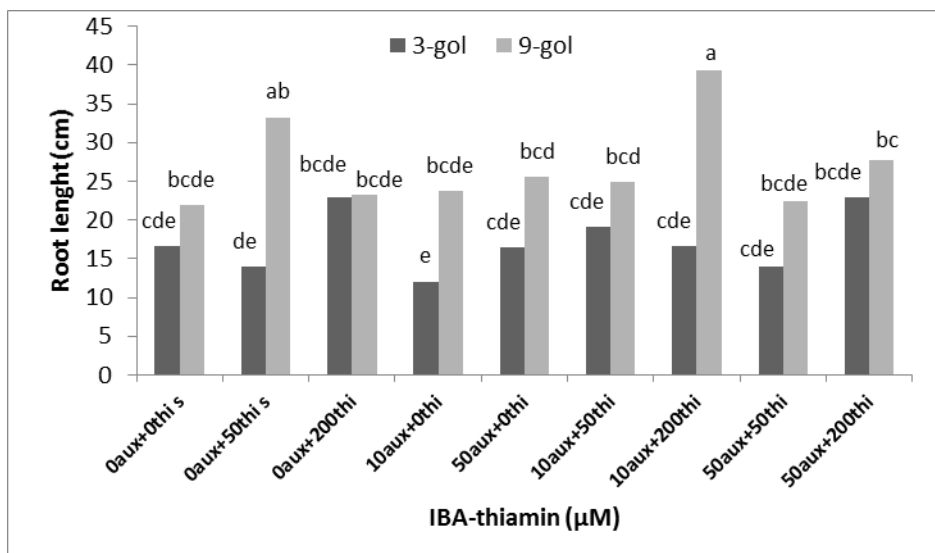
در هر سه تیمار بیشترین مقدار طول ساقه مربوط به مرحله نه‌برگی بود که در بیشترین حالت در تیمار



شکل ۲- تاثیر سه عامل دوره رویشی، اکسین و تیامین بر طول ساقه در گیاه سویا، مقادیر میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار است. حروف غیرمشترک بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است.

اکسین ۱۰ میکرومولار و تیامین ۲۰۰ میکرومولار
بیشترین افزایش را نسبت به شاهد داشت (شکل ۳).

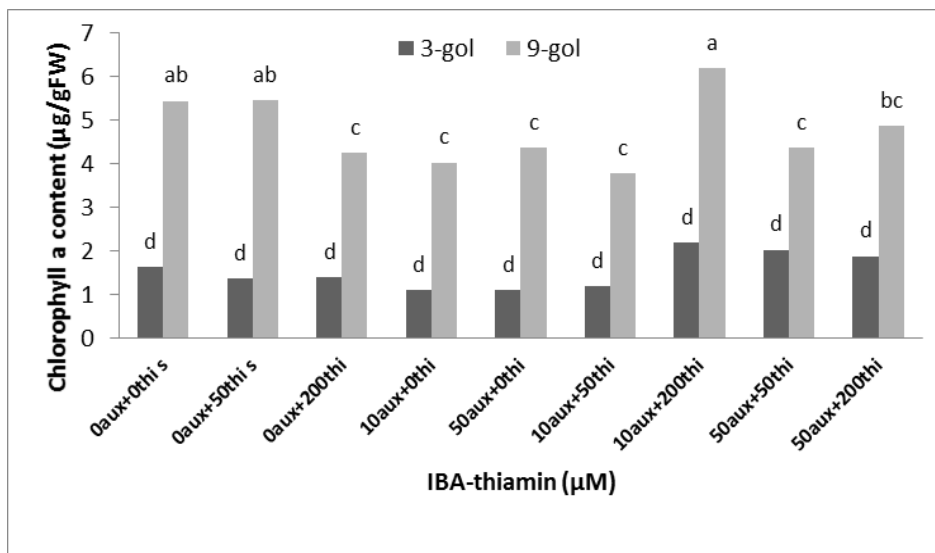
در هر سه تیمار بیشترین مقدار طول ریشه مربوط به
مرحله نه‌برگی بود که در بیشترین حالت در تیمار



شکل ۳- تاثیر سه عامل دوره رویشی، اکسین و تیامین بر طول ریشه در گیاه سویا، مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشترک بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است.

اکسین ۱۰ میکرومولار و تیامین ۲۰۰ میکرومولار
بیشترین افزایش را نسبت به شاهد داشت (شکل ۴).

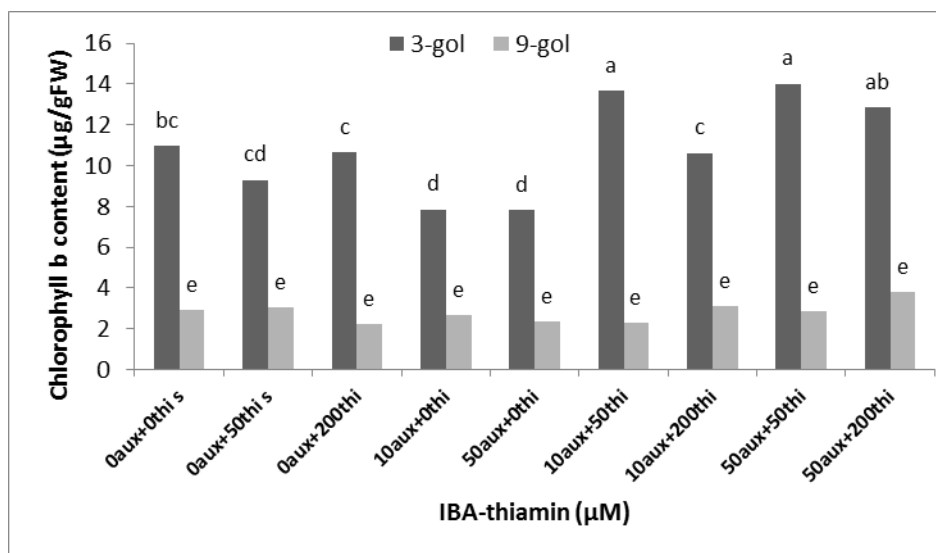
در هر سه تیمار بیشترین محتوای کلروفیل a مربوط
به مرحله نه‌برگی بود که در بیشترین حالت در تیمار



شکل ۴- تاثیر سه عامل دوره رویشی، اکسین و تیامین بر محتوای کلروفیل a در گیاه سویا، مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشترک بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است.

اکسین ۵۰ میکرومولار و تیامین ۵۰ میکرومولار بیشترین افزایش را نسبت به شاهد داشت (شکل ۵).

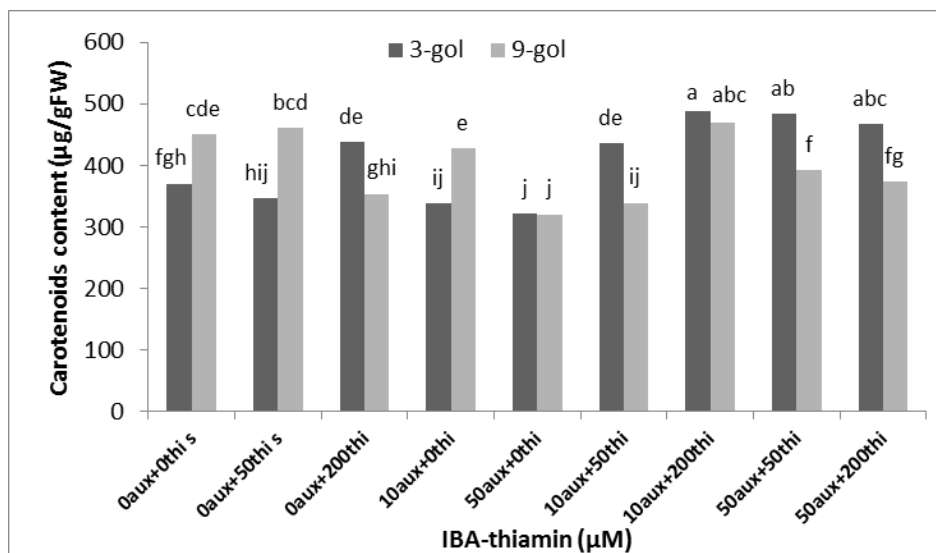
در هر سه تیمار بیشترین محتوای کلروفیل b مربوط به مرحله سه‌برگی بود که در بیشترین حالت در تیمار



شکل ۵- تاثیر سه عامل دوره رویشی، اکسین و تیامین بر محتوای کلروفیل b در گیاه سویا، مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشترک بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است.

میکرومولار و تیامین ۲۰۰ میکرومولار بیشترین افزایش را نسبت به شاهد داشت (شکل ۶).

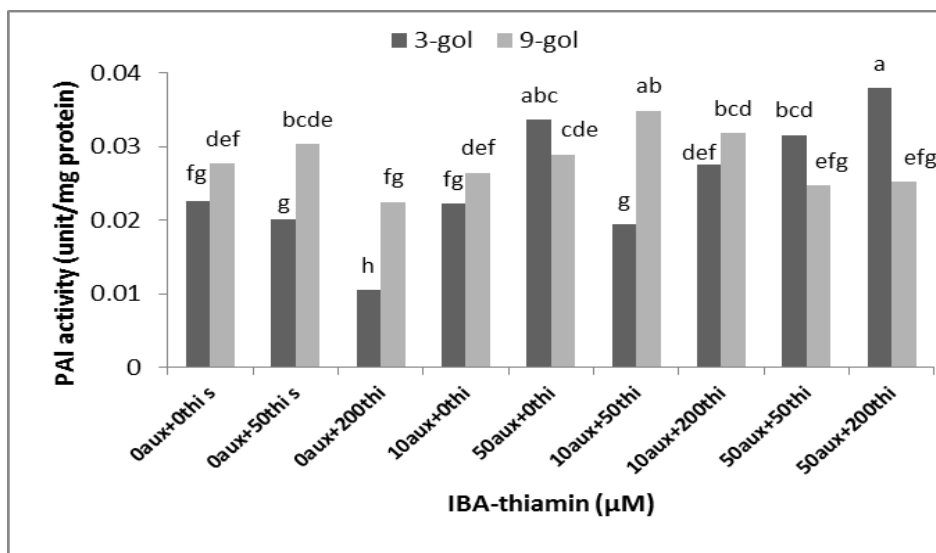
بیشترین محتوای کلروفیل b مربوط به مرحله سه‌برگی بود که در بیشترین حالت در تیمار اکسین ۱۰



شکل ۶- تاثیر سه عامل دوره رویشی، اکسین و تیامین بر محتوای کاروتنوئیدها در گیاه سویا- مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشترک بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است.

میکرومولار بیشترین افزایش را نسبت به شاهد داشت (شکل ۷).

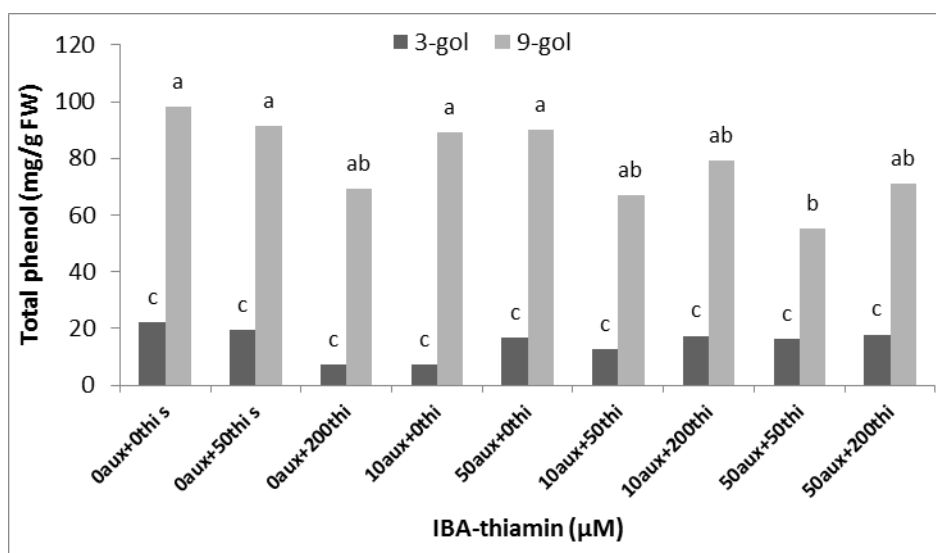
در هر سه تیمار بیشترین فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز مربوط به مرحله سه‌برگی بود که در بیشترین حالت در تیمار اکسین ۵۰ میکرومولار و تیامین ۲۰۰



شکل ۷- تاثیر سه عامل دوره رویشی، اکسین و تیامین بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز (PAL) در گیاه سویا، مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشترک بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است.

اکسین صفر میکرومولار و تیامین صفر میکرومولار بیشترین افزایش را داشت (شکل ۸).

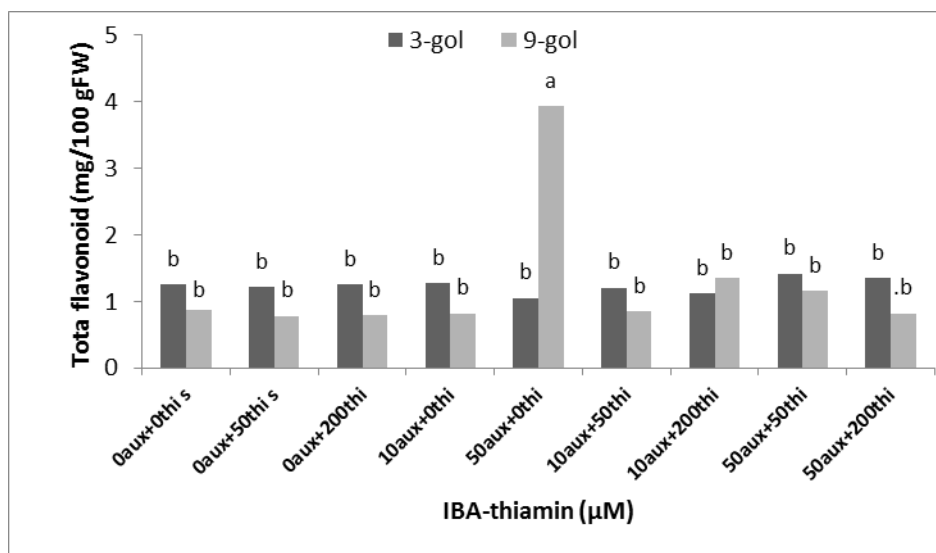
در هر سه تیمار بیشترین محتوای فنل کل مربوط به مرحله نه‌برگی بود که در بیشترین حالت در تیمار



شکل ۸- تاثیر سه عامل دوره رویشی، اکسین و تیامین بر محتوای فنل کل در گیاه سویا، مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشترک بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است.

میکرومولار و تیامین صفر میکرومولار بیشترین افزایش را نسبت به شاهد داشت (شکل ۹).

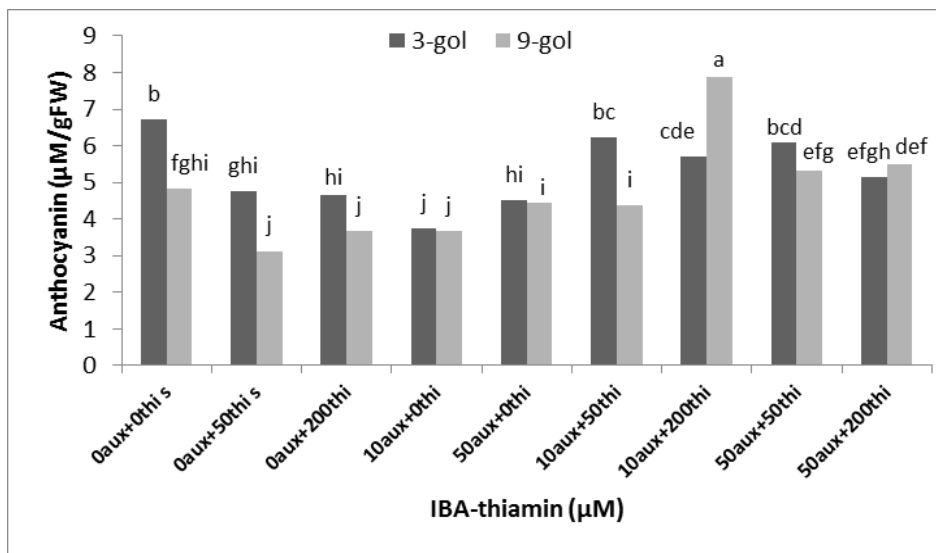
بیشترین محتوای فلاونوئید مربوط به مرحله نه‌برگی بود که در بیشترین حالت در تیمار اکسین ۵۰



شکل ۹- تاثیر سه عامل دوره رویشی، اکسین و تیامین بر محتوای فلاونوئید در گیاه سویا، مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشترک بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است.

میکرومولار و تیامین ۲۰۰ میکرومولار بیشترین افزایش را نسبت به شاهد داشت (شکل ۱۰).

بیشترین محتوای آنتوسیانین مربوط به مرحله نه‌برگی بود که در بیشترین حالت در تیمار اکسین ۱۰



شکل ۱۰- تاثیر سه عامل دوره رویشی، اکسین و تیامین بر محتوای آنتوسیانین در گیاه سویا - مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشترک بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است.

بحث

Fuchs (۲۰۰۱) گزارش کرد که رقم گیاه و هورمون اکسین بر ریشه‌زایی و رشد ریشه در قلمه‌های ساقه گل رز هیبرید موثر است. غلظت بیش از حد اکسین؛ زرد شدن و ریزش برگ‌ها، سیاه شدن ساقه و خشک شدن قلمه‌ها را موجب می‌شود. Abdel-Aziz و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که کاربرد تیمین، شاخص‌های رشد، از جمله وزن تر و خشک گیاه رزماری را به طور معنی‌داری افزایش داد.

در پژوهش حاضر طبق شکل (۱) تیمارهای هم‌زمان اکسین و تیمین و مرحله رویشی تاثیر معنی‌داری بر وزن تر اندام هوایی داشت، بیشترین افزایش مربوط به تیمار اکسین ۵۰ میکرومولار و تیمین ۲۰۰ میکرومولار بود که در مرحله ۹ تا ۱۱ برگی مشاهده شد. همچنین طبق شکل (۳) تیمارهای هم‌زمان اکسین و تیمین تاثیر معنی‌داری بر طول ریشه بین دو مرحله رشد رویشی داشت که بیشترین تاثیر مربوط به اکسین ۱۰ میکرومولار و تیمین ۲۰۰ میکرومولار در مرحله ۹ تا ۱۱ برگی بود. علاوه بر این، طبق شکل (۲) مشخص شد که تیمار اکسین، تیمین و مرحله رویشی تاثیر معنی‌داری بر طول ساقه داشتند که بیشترین افزایش در مرحله ۹ تا ۱۱ برگی در تیمار اکسین ۵۰ میکرومولار و تیمین ۵۰ میکرومولار مشاهده شد.

نتایج بررسی ما با نتایج تحقیق بر گیاه گل داوودی، گل رز و گیاه تاتوره مطابقت دارد (Abdel-Aziz et al, 2009). بنابراین، به نظر می‌رسد کاربرد تیمین و اکسین بیشترین تاثیر را بر شاخص‌های رشد گیاه در مرحله ۹ تا ۱۱ برگی داشته است.

نتایج حاصل از بررسی رنگیزه‌های فتوستتزی نشان داد تیمارهای مختلف اکسین و تیمین در مراحل مختلف رشد رویشی تاثیر معنی‌داری بر محتوای کلروفیل دارد که حداکثر میزان کلروفیل a مربوط به مرحله ۵ تا ۷ برگی در تیمار هم‌زمان اکسین ۵۰ و تیمین ۲۰۰ میکرومولار بود (شکل ۴) و محتوای کلروفیل b در مرحله ۹ تا ۱۱ برگی افزایش چشمگیری داشت (شکل ۵). همچنین بررسی محتوای کاروتنوئیدها نشان داد که بیشترین غلظت مربوط به مرحله ۳ تا ۵ برگی و در تیمار اکسین ۱۰ میکرومولار و تیمین ۲۰۰ میکرومولار بود و اختلاف معنی‌داری بین دو مرحله رویشی مطالعه شده در تیمارهای مختلف مشاهده شد.

گزارش شده است که کاربرد تیمین افزایش معنی‌دار محتوای کربوهیدرات‌های گیاهان رزماری را باعث شد که ممکن است ناشی از نقش مهم آن در بیوسنتز مولکول‌های کلروفیل باشد که محتوای کلروفیل را تغییر می‌دهد (Youssef and Talaat, 2003). همچنین نتایج بررسی‌ها بر گلابی نشان داده است که اکسین در غلظت‌های مناسب از شکسته شدن کلروفیل جلوگیری می‌کند (Frenkel and Dyck, 1973).

در پژوهش حاضر طبق شکل (۷) بین سه عامل مرحله رویشی، تیمار اکسین و تیمین تفاوت معنی‌داری وجود دارد و بیشترین مقدار آنزیم مربوط به مرحله ۳ تا ۵ برگی در تیمار اکسین ۵۰ میکرومولار و تیمین ۲۰۰ میکرومولار بود.

بیشترین فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز در گیاهان جوان و در حال نمو دیده می‌شود و اغلب در

می‌دهند که ضمن مراحل رشد در گیاه گردو ترکیبات فنلی به تدریج تغییر می‌یابند و ارتباط مهمی بین میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز و تجمع محتوای فنلی و فلاونوئیدی وجود دارد (Malmir, 2014).

همچنین مطالعات نشان می‌دهند که تغییرات فنیل آلانین آمونیلایز ممکن است بر اساس کاربرد اکسین تاثیر عکس بر سنتز پلی‌فنل‌ها داشته باشند. به علاوه، کاربرد ایندول ۳- بوتیریک اسید تغییرات بر دیگر آنزیم‌ها از جمله پلی‌فنل اکسیداز را باعث شده است که این آنزیم در تقسیم، تمایز و نمو موثر است (Lukatkin, 2002). کاربرد خارجی اکسین ایندول ۳- بوتیریک اسید ممکن است بر فعالیت دو آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز موثر باشد (Basak et al, 2000). همچنین محققان گزارش کردند تیمار تیمارین در افزایش مقاومت به قارچ در گیاه انگور موثر است و این ویتامین بیان ژن آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانویید را فعال می‌کند و ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی افزایش می‌یابند (Boubakri et al, 2013). افزایش محتوای فنلی با کاربرد تیمارین در گیاهان سویا (Abdel-Monaim, 2011)، بابونه و سرو به اثبات رسیده است (Abdel-Aziz et al, 2009).

برخی محققان بیان کردند که غلظت ترکیبات فنلی در فصول مختلف و در مراحل مختلف رشد متفاوت است و این ترکیبات در مراحل ابتدایی رشد، چیره هستند (Kui-Ding et al, 2001). در پژوهش حاضر نیز اکسین و تیمارین بر محتوای ترکیبات فنلی در دو مرحله رشد رویشی اثر معنی‌دار داشت (شکل ۸) که بیشترین تاثیر در مرحله ۹ تا ۱۱ برگی بود.

بلوغ با کاهش مقدار آنزیم همراه است (Ziaei et al, 2012).

بررسی بر گیاه ریحان نشان داد که به طور کلی بیان ژن و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز در مراحل مختلف رشد متفاوت است و فعالیت این آنزیم در مراحل ابتدایی رشد گیاه، بیشترین مقدار است که با نتایج ما مطابقت دارد (Ziaei et al, 2012). گزارش شده است که اکسین فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز را در گیاه توت‌فرنگی افزایش می‌دهد و همچنین نقش اساسی در ایجاد مقاومت در گیاهان ضمن مراحل ابتدایی رشد ایفا می‌کند. به نظر می‌رسد زیاد بودن میزان آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز در مرحله ۳ تا ۵ برگی، مقاومت گیاه را در مراحل ابتدایی رشد افزایش می‌دهد که با کاربرد اکسین و تیمارین دیده شده است.

ترکیبات فنلی از جمله آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها که حاصل از مسیر فنیل پروپانویید هستند در سازوکارهای فیزیولوژیک مانند رشد، تولید مثل، رویش دانه و ایجاد مقاومت در گیاه نقش اساسی دارند (Ewane et al, 2012).

بر اساس نتایج پژوهش حاضر تیمار اکسین و تیمارین بر محتوای فنلی کل در مراحل مختلف رشد تاثیر معنی‌داری داشت که بیشترین تاثیر در مرحله ۹ تا ۱۱ برگی گیاهان شاهد و سپس در تیمارهای اکسین صفر و تیمارین ۵۰ میکرومولار دیده شد.

محققان نشان دادند در چهار مرحله فنولوژیک (ابتدای دوره رویشی، پایان دوره رویشی، جوانه زدن گل و گل کامل) در پونه کوهی محتوای فنلی افزایش یافت (Sellami et al, 2009). برخی گزارش‌ها نشان

در پژوهش حاضر، تفاوت معنی‌داری در محتوای آنتوسیانین بین دو مرحله رویشی وجود داشت و بیشترین غلظت مربوط به مرحله ۹ تا ۱۱ برگی و در تیمار اکسین ۱۰ میکرومولار و تیامین ۲۰۰ میکرومولار بود (شکل ۱۰) که با نتایج حاصل از تحقیق بر گیاه سیب درختی هماهنگی داشت (Lister and Lancaster, 1996). تنوع گسترده‌ای در میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز، آنتوسیانین و فلاونوئید کل در ارقام مختلف سیب در مراحل مختلف رشد مشاهده شد؛ اما همبستگی معنی‌داری بین فعالیت فنیل آلانین آمونیا لیا ز در سه مرحله رشد و غلظت آنتوسیانین نهایی دیده نشد که با نتایج ما مطابقت داشت. همچنین گزارش شده است که اگرچه تولید آنتوسیانین اغلب با افزایش فنیل آلانین آمونیا لیا ز همراه است، نمونه‌های زیادی از فعالیت فنیل آلانین آمونیا لیا ز بدون تولید آنتوسیانین وجود دارند (Lister and Lancaster, 1996). Li (1996) و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند که مقادیر اندک آنتوسیانین‌ها با وجود افزایش میزان آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز، به علت فعالیت نکردن آنزیم‌های بیوستتری آنتوسیانین‌ها در مرحله‌ای خاص است و افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز به تشکیل دیگر ترکیبات فنلی منجر می‌شود.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد بین عوامل مرحله رویشی، اکسین و تیامین با وزن تر اندام هوایی، طول ساقه و طول ریشه، اثر متقابل معنی‌داری وجود دارد. در تیمار هم‌زمان اکسین ۵۰ و تیامین ۲۰۰ میکرومولار در مرحله رویشی نه تا یازده برگی بیشترین وزن تر، در تیمار هم‌زمان اکسین ۵۰ و تیامین ۵۰ میکرومولار در مرحله رویشی نه تا یازده برگی بیشترین طول ساقه و در

در پژوهش حاضر تفاوت معنی‌داری در میزان غلظت فلاونوئیدها در مرحله ۹ تا ۱۱ برگی در تیمار اکسین ۵۰ میکرومولار به تنهایی در مرحله ۳ تا ۵ برگی مشاهده شد (شکل ۹). در میوه توت‌فرنگی گزارشی درباره فنل کل، فلاونوئیدها، تانن‌ها و ارتباطشان با فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز هنگام نمو میوه دیده نشد (Cheng and Breen, 1991) که با نتایج ما همخوانی داشت. همچنین اختلاف آشکار بین فعالیت فنیل آلانین آمونیا لیا ز، میزان فنل و فلاونوئید کل در توت‌فرنگی دیده شد که ممکن است ناشی از تجمع فنل‌ها قبل از گرده‌افشانی باشد زیرا بیشترین میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز یک هفته قبل از گرده‌افشانی مشاهده شد. در گیاه سیب درختی نیز ارتباط و همبستگی معنی‌داری بین فعالیت فنیل آلانین آمونیا لیا ز در سه مرحله رشد و غلظت فلاونوئیدها وجود ندارد (Lister and Lancaster, 1996)؛ اما در گیاه گردو مشاهده شده است که تجمع ترکیبات فنلی به‌طور غیرمستقیم با فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز تنظیم می‌شود (Jay-Allemand et al, 1989). همچنین تأثیر اکسین خارجی بر محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در گیاه *Vigna* گزارش شده است (Vats et al, 2012). گزارش شده است که میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در برگ‌ها در مراحل مختلف رشد، به تعادل سوخت و ساز این ترکیبات بستگی دارد. همچنین میزان فلاونوئیدها در برگ با افزایش رشد زیاد می‌شود (Malmir, 2014) و به نظر می‌رسد در مرحله ۳ تا ۵ برگی میزان ساخته شدن این ترکیبات بیشتر از سایر مراحل باشد.

بود. دربارهٔ تاثیر تیمارها بر محتوای آنزیم فنیل آلانین آمونیاکاز، هر سه عامل تاثیر معنی‌داری داشتند و بیشترین آن مربوط به اکسین ۵۰ + تیمین ۵۰ میکرومولار در مرحلهٔ سه تا پنج برگی بود.

جمع‌بندی

باتوجه به نتایج بررسی حاضر، به نظر می‌رسد کاربرد هم‌زمان اکسین و تیمین بر افزایش ترکیبات فنلی در مراحل مختلف رشد گیاه زراعی و دانهٔ روغنی موثر است.

سپاسگزاری

نگارندگان از گروه زیست‌شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان بابت همکاری صمیمانه در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌کنند.

تیمار هم‌زمان اکسین ۱۰ و تیمین ۲۰۰ میکرومولار در مرحلهٔ نه تا یازده‌برگی بیشترین طول ریشه مشاهده شدند. بین رنگیزه‌های فتوستتزی و سه عامل مرحلهٔ رویشی، اکسین و تیمین نیز ارتباط معنی‌دار وجود داشت. دربارهٔ اثر این سه عامل بر محتوای فنلی دیده شد که تنها مرحلهٔ رویشی و تیمار تیمین به تنهایی اثر معنی‌دار بر محتوای فنلی داشت و بیشترین افزایش مربوط به مرحلهٔ نه تا یازده برگی و گیاهان شاهد بود. دربارهٔ تاثیر متقابل مرحلهٔ رویشی، اکسین و تیمین هر سه عامل با هم تاثیر معنی‌داری بر محتوای فلاونوئید داشتند و بیشترین افزایش مربوط به مرحلهٔ نه تا یازده‌برگی بود. دربارهٔ تاثیر تیمارها بر محتوای آنتوسیانین دیده شد که هر سه عامل با هم تاثیر معنی‌داری بر محتوای آنتوسیانین داشتند و بیشترین افزایش غلظت مربوط به تیمار هم‌زمان اکسین ۱۰ و تیمین ۲۰۰ میکرومولار در مرحلهٔ رویشی ۹ تا ۱۱ برگی

منابع

- Abdel-Aziz, S., Lobna, T. and Soad, M. (2009) Some studies on the effect of putrescine, ascorbic acid and thiamine on growth, flowering and some chemical constituents of *Gladiolus* plants at Nubaria. *Journal of Applied Sciences* 2(2): 169-179.
- Abdel-Monaim, M. (2011) Role of riboflavin and thiamine in induced resistance against charcoal rot disease of soybean. *African Journal of Biotechnology* 10(53): 10842-10855.
- Abrahamian, P. and Kantharajah, A. (2011) Effect of vitamins on *in vitro* organogenesis of plant. *American Journal of Plant Sciences* 2(5): 669-674.
- Basak, U. C., Das, A. B. and Das, P. (2000) Rooting response in stem cuttings from five species of mangrove trees: effect of auxins and enzyme activities. *Marine Biology* 136(1): 185-189.
- Boubakri, H., Poutaraud, A., Wahab, M. A. and Clayeux, C. (2013) Thiamine modulates metabolism of the phenylpropanoid pathway leading to enhanced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine. *BMC Plant Biology* 26: 13-31.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1): 248-254.
- Cheng, G. W. and Breen, P. J. (1991) activity of phenylalanine ammonia-lyase and concentration of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116(5): 865-869.

- Ding, C. K., Chachin, K., Ueda, Y., Imahori, Y. and Wang, C. Y. (2001) Metabolism of phenolic compounds during loquat fruit development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(6): 2883-2888.
- Ewane, C. A., Lepoivre, P., Lapeyre, L. and Lassois, L. (2012) Involvement of phenolic compounds in the susceptibility of bananas to crown rot. A review. *Biotechnology Agronomy Society and Environment* 16(3): 393-404.
- Frenkel, C. and Dyck, R. (1973) Auxin inhibition of ripening in *Bartlett pears*. *Plant Physiology* 51(1): 6-9.
- Fuchs, H. (2001) Root regeneration of rose plants as influenced by applied auxins. In: 3rd International Symposium of the Research and Cultivation of Roses, Perth, Australia.
- Hellal, F. and Abdelhamid, M. (2013) Nutrient management practices for enhancing soybean (*Glycine max* L.) production. *Acta Biologica Colombiana*. 18(2): 301-310.
- Hoagland, D. R. and Arnon, D. I. (1950) The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station, University of California, California.
- Jay-Allemand, C., Drouet, A., Ouaras, A. and Cornu, D. (1989) Polyphenolic and enzymatic characterization of ageing and rejuvenation of hybrid walnut trees (*Juglans nigra* x *Juglans regia*): relationship to growth. *Annales Sciences Forestières* 46(23): 190-195.
- Jellin, J. M., Gregory, P. and Batz, F. (2008) Natural medicines comprehensive database. *Journal of the Medical Library Association* 90(1): 1-89.
- Korasick, D. A., Enders, T. and Strader, L. C. (2013) Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany* 64(9): 2541-2555.
- Li, Y., Sakiyama, R., Maruyama, H. and Kawabata, S. (2001) Regulation of anthocyanin biosynthesis during fruit development in nyoho strawberry. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 70(1): 28-32.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148(2): 350-382.
- Lister, C. and Lancaster, J. (1996) Phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity and relationship to anthocyanin and flavonoid levels New Zealand-grown apple cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121(2): 281-285.
- Lukatkin, A. S. (2002) Contribution of oxidative stress to the development of cold-induced damage to leaves of chilling-sensitive plants: Reactive oxygen species formation during plant chilling. *Russian Journal of Plant Physiology* 49(5): 622-627.
- Malmir, H. A. (2014) The changes in phenolic and flavonoids compound related to the harvest times and enzyme activity during stages of leaves development in *Juglans Regia*. *International Journal of Agriculture and Forestry* 4(4): 338-342.
- McWilliams, D. A., Berglund, D. R., and Endres, G. J. (2004) Soybean growth and management quick guide. North Dakota State University NDSU Extension Service, 117(4): 1-5.
- Sellami, I. H., Maamouri, E., Chahed, T., Wannas, W. A., Kchouk, M. E. and Marzouk, B. (2009) Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). *Industrial Crops and Products* 30(3): 395-402.
- Strader, L. C. and Bartel, B. (2011) Transport and metabolism of the endogenous auxin precursor indole-3-butyric acid. *Molecular Plant* 4(3): 477-486.

- Tunc-Ozdemir, M., Miller, G., Song, L., Kim, J., Sodek, A., Koussevitzky, Sh., Narayan Misra, A., Mittler, R. and Shintani, D. (2009) Thiamin confers enhanced tolerance to oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 151: 421-432.
- Vats, S., Tiwari, R., Alam, A., Behera, K. K. and Pareek, R. (2012) Evaluation of phytochemicals, antioxidant and antimicrobial activity of *in vitro* culture of *Vigna unguiculata*. *Researcher* 4: 70-74.
- Wagner, G. J. (1979) Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant Physiology* 64(1): 88-93.
- Youssef, A. A. and Talaat, I. M. (2003) Physiological response of rosemary plants to some vitamins. *Egyptian Pharmaceutical Journal* (1): 81-93.
- Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64(4): 555-559.
- Ziaei, M., Sharifi, M., Behmanesh, M. and Razavi, K. (2012) Gene expression and activity of phenylalanine ammonia lyase and essential oil composition of (*Ocimum basilicum* L.) at different growth stages. *Iranian Journal of Technology* (10): 32-39.
- Zolman, B. K., Yoder, A. and Bartel, B. (2000) Genetic analysis of IBA response in *Arabidopsis thaliana* reveals four mutant classes. *Genetic* 159: 1323-1337.