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

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال نهم، شماره سی و دو، تابستان ۱۳۹۶، صفحه ۶۸-۵۳
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۱۱/۳
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۵/۱۲/۲۲
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۱۲/۲۴

بررسی تاثیر هم‌زمان اکسین و تیامین بر میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و محتوای ترکیبات فنلی در دو مرحلهٔ رشد رویشی گیاه سویا (*Glycin max*)

مهدیه حمزه نژادی[۱]، نازی نادر نژاد[۱*]، زهرا اسرار[۱]، حسین مظفری[۲]

[۱] گروه زیست شناسی، 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. باتوجه 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 مرحلهٔ رشد رویشی گیاه سویا و تغییرات ترکیبات فنلی جهت ایجاد ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر در مقاومت به تنش‌های محیطی است. به‌این‌منظور بذرهای سویا، رقم DPX کاشته شدند و گیاهان در قالب طرح فاکتوریل با سه غلظت صفر، ۱۰و 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 هردو مرحله به‌طور معنی‌داری افزایش داد. کاربرد اکسین به‌تنهایی کاهش معنی‌دار محتوای آنتوسیانین را در هردو مرحله سبب شد؛ اما بر محتوای فنلی تاثیر معنی‌داری نداشت. به‌طورکلی، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)، محتوای فنلی و آنتوسیانین در مرحلهٔ ۹ برگی نسبت به۳ برگی افزایش بیشتری داشته است. این نتایج بیان‌کنندهٔ 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 فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، مراحل رویشی سویا.

* نگارنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: nnnadernejad@yahoo.com ، شماره تماس: ۰۳۴۳۱۳۲۲۰۶۰

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

گیاه سویا با نام علمی (*Glycine max* L.) متعلق به خانوادهٔ Fabaceae و گیاه علفی یک‌ساله است که به‌صورت بوته‌ای با شاخ و برگ بسیار رشد می‌کند. سویا دو مرحلهٔ 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 ثانویهٔ گیاهی جزء گرانبهاترین ترکیبات شیمیایی گیاهی هستند. این ترکیبات منحصر به گونه یا حتی نژاد ویژه‌ای هستند و اغلب در دورهٔ رشدی و نموی ویژه در گیاه تولید می‌شوند. ترکیبات فنلی گروه عمده‌ای از ترکیبات شیمیایی گیاهی حاصل از مسیر فنیل پروپانوییید 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 آمونیالیاز 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 درمرحلهٔ جوانه زنی مشاهده شده است (Ziaei *et al*, 2012).

فلاونوئیدها گروه وسیعی از ترکیبات فنلی هستند که گسترهٔ 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 B_1) 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

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

باتوجه‌به‌اینکه گیاه سویا اهمیت زیادی از نظر داشتن ترکیبات فنلی و فلانوئیدی به‌ویژه 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 آمونیالیاز در مراحل مختلف رشد رویشی گیاه سویا و تشخیص مناسب‌ترین مرحلهٔ تیماردهی برای افزایش این ترکیبات است.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر، رقم DPX مطالعه شد. بذرهای مطلوب از نظر سالم‌بودن و مناسب‌بودن 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 مرحلهٔ ۳ تا ۵ برگی و ۹ تا ۱۱ برگی تا رسیدن به مرحلهٔ 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 استفاده‌شده، هوگلند بود که به نسبت ۰/۵ و اسیدیتهٔ 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 ترکیب تیمارهای استفاده‌شده 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 کاشته‌شده، 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 ۱۰میکرومولار؛
و ۹- تیامین صفر+اکسین ۵۰ میکرومولار

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

اندازه‌گیری وزن تر اندام هوایی و ریشهٔ گیاه: پس از جداکردن 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 هرگروه 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 تازهٔ گیاه در هاون چینی حاوی ۱۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد سائیده شد و پس از صاف‌کردن 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.

رابطهٔ ۱:

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

رابطهٔ ۲:

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

رابطهٔ ۳:

$$ChlT = Chla + chlb$$

رابطهٔ ۴:

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

طبق رابطه‌های ۱ تا ۴ به‌ترتیب غلظت کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها (شامل: کاروتن‌ها و گزانتوفیل‌ها) محاسبه شدند. غلظت برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصارهٔ 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 برگ روش Wagner (۱۹۷۹) استفاده شد. ۰/۱ گرم از بافت برگی در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و کلریدریک اسید خالص به نسبت حجمی (۱:۹۹) کاملا سائیده شد. عصاره در لوله‌های آزمایش سرپیچ‌دار ریخته شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت؛ سپس به‌مدت 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 محاسبهٔ غلظت، ضریب خاموشی (ε) ۳۳۰۰۰ سانتی‌متر بر مول در نظر گرفته شد.

$$A = \varepsilon bc$$

سنجش میزان فلاونوئیدها: فلاونوئیدهای کل با روش اندازه‌گیری آلومینیوم کلرایدکالریمتری Zhishen و همکاران (۱۹۹۹) انجام شد.۰/۱گرم از نمونه‌های گیاهی در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به‌خوبی ساییده شد و عصارهٔ 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 نیتریت ۵ درصد و ۶۰۰ میکرولیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد به محلول

اضافه شد. پس از ۶ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید ۱ مولار با ۲ میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد سائیده و به‌مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شد؛ سپس به ۱ میلی‌لیتر محلول رویی، ۱ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه شد و حجم محلول با آب مقطر به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد؛ سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۵۰ درصد و ۱ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۵ درصد به آن اضافه شد. مخلوط حاصل به‌مدت ۱ ساعت در تاریکی نگهداری و سپس جذب هر نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد و غلظت ترکیبات فنلی کل برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد.

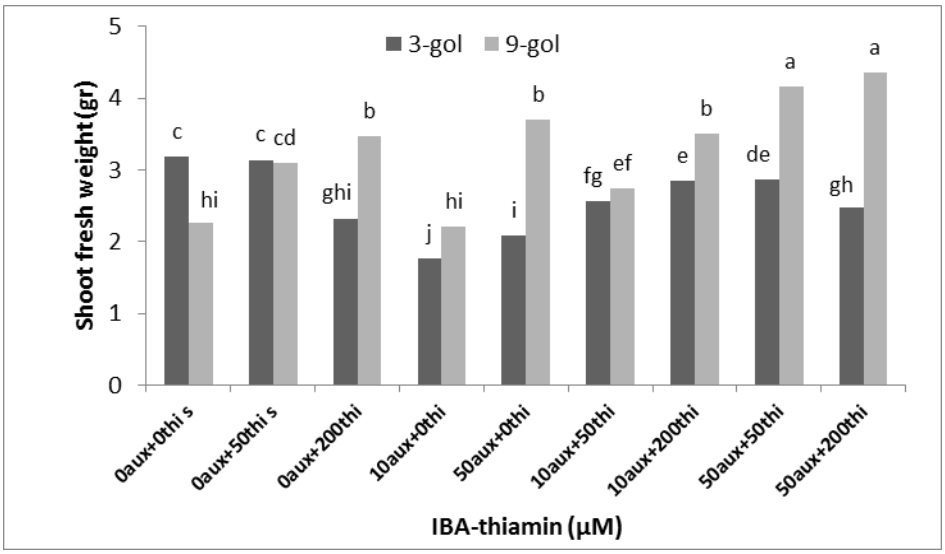
سنجش غلظت پروتئین: به‌این‌منظور ۱ گرم بافت تر در یک هاون چینی محتوی ۳ میلی‌لیتر بافر تریس-ساکارز با pH=۷/۵ به‌طور کامل سائیده شد. محلول همگن به‌دست‌آمده به لولهٔ سانتریفیوژ منتقل و پس از ۱۰ دقیقه سکون، به‌مدت ۲۵ دقیقه در ۴۰۰۰g سانتریفیوژ شد. در پایان مرحلهٔ سانتریفیوژ، لوله‌ها به‌آرامی از دستگاه خارج و محلول رویی در چند لولهٔ آزمایش توزیع شد. عصاره‌های حاصل برای سنجش غلظت پروتئین استفاده شدند. برای سنجش غلظت پروتئین به لوله‌های آزمایش مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر عصارهٔ پروتئینی و ۵ میلی‌لیتر معرف بیوره افزوده و سریعاً ورتکس شد. پس از دو دقیقه و قبل از یک ساعت جذب آنها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد (Bradford, 1976).

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL): اندازه‌گیری با روش Hahldbrock و Rogg (۱۹۷۵) انجام شد. برای تهیهٔ عصارهٔ آنزیمی، مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم از بافت تازهٔ برگی با۶/۵ میلی‌لیتر بافر تریس - هیدرو کلریک اسید ۵۰ میلی‌مولار با pH=۸/۸ حاوی بتا مرکاپتواتانول ۱۵ میلی‌مولار در هاون سرد ساییده شد؛ سپس عصارهٔ به‌دست‌آمده به‌مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی برای برای سنجش آنزیم مد نظر استفاده شد.

آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز واکنش تبدیل فنیل آلانین را به سینامیک اسید کاتالیز می‌کند. در این روش فنیل آلانین گهرمایهٔ آنزیم است و فعالیت آنزیم براساس سرعت تشکیل سینامیک اسید تعیین می‌شود. در لولهٔ آزمایش، ۱ میلی‌لیتر از بافر استخراج با ۰/۵ میلی‌لیتر ال-فنیل آلانین ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۴میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر و ۱ میلی‌لیتر عصارهٔ آنزیمی مخلوط و به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد. واکنش با اضافه‌کردن ۰/۵ میلی‌لیتر 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 میلی‌مولار بر سانتی‌متر به دست آمد. یک واحد از فعالیت این آنزیم معادل ۱ میکرومول از سینامیک اسید تولیدشده در دقیقه است.

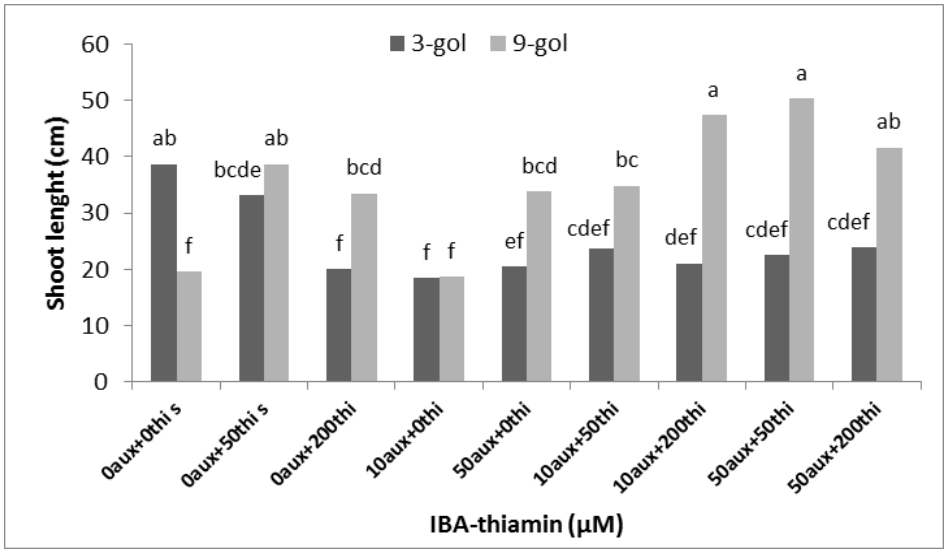
نتایج

نتایج حاصل از تجزیهٔ آماری بین سه عامل مرحلهٔ رویشی، اکسین و تیامین نشان داد که اثر متقابلی بین این سه عامل وجود داردکه این تاثیر متقابل سه‌گانه در سطح ۵ درصد معنی‌دار است. در هر سه تیمار بیشترین مقدار وزن تر اندام هوایی مربوط به مرحلهٔ 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).



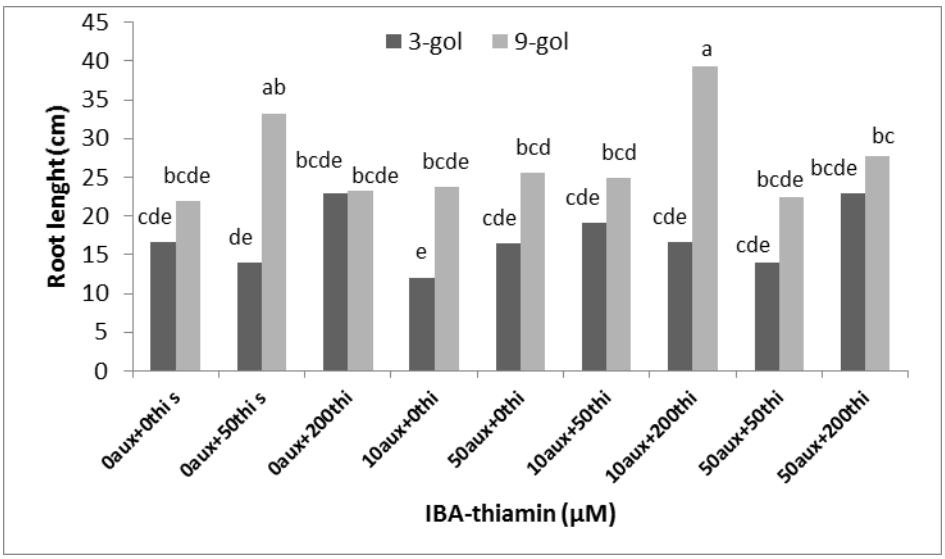
شکل ۱- تاثیر سه عامل دورهٔ رویشی، اکسین و تیامین بر وزن تر اندام هوایی درگیاه سویا، مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشترک بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح $P<0.05$ است.

در هر سه تیمار بیشترین مقدار طول ساقه مربوط به مرحلهٔ نه‌برگی بود که در بیشترین حالت در تیمار اکسین ۵۰ میکرومولار و تیامین ۵۰ میکرومولار بیشترین افزایش را داشت (شکل ۲).



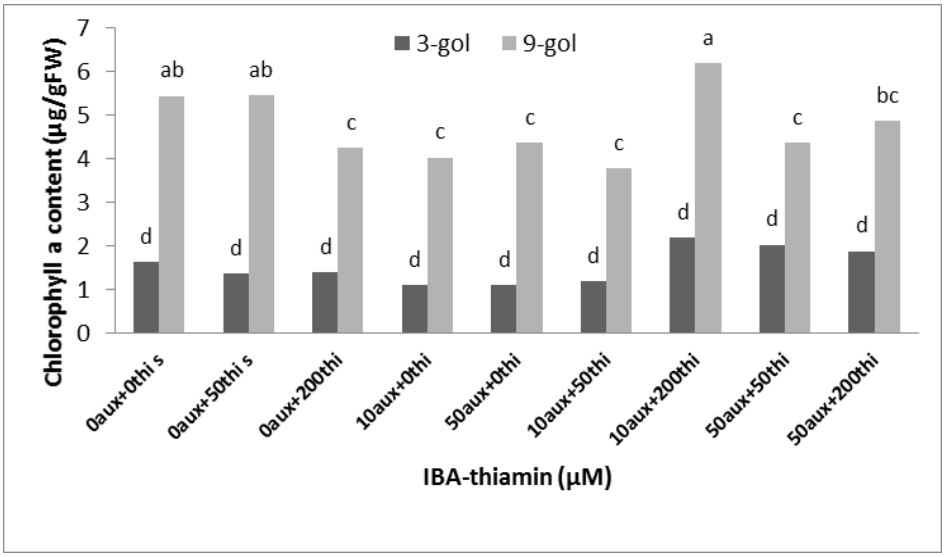
شکل ۲ - تاثیر سه عامل دورهٔ رویشی، اکسین و تیامین بر طول ساقه درگیاه سویا ، مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشترک بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح $P<0.05$ است.

در هر سه تیمار بیشترین مقدارطول ریشه مربوط به مرحلهٔ نه‌برگی بود که در بیشترین حالت در تیمار اکسین ۱۰ میکرومولار و تیامین ۲۰۰ میکرومولار بیشترین افزایش را نسبت به شاهد داشت (شکل ۳).



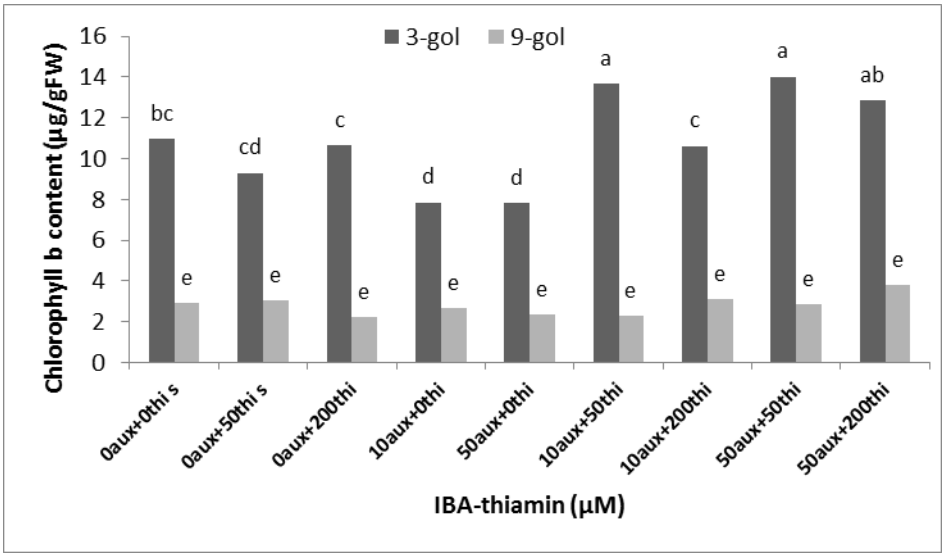
شکل ۳- تاثیر سه عامل دورهٔ رویشی، اکسین و تیامین بر طول ریشه درگیاه سویا، مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشترک بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح $P<0.05$ است.

در هر سه تیمار بیشترین محتوای کلروفیل a مربوط به مرحلهٔ نه‌برگی بود که در بیشترین حالت در تیمار اکسین ۱۰ میکرومولار و تیامین ۲۰۰ میکرومولار بیشترین افزایش را نسبت به شاهد داشت (شکل ۴).



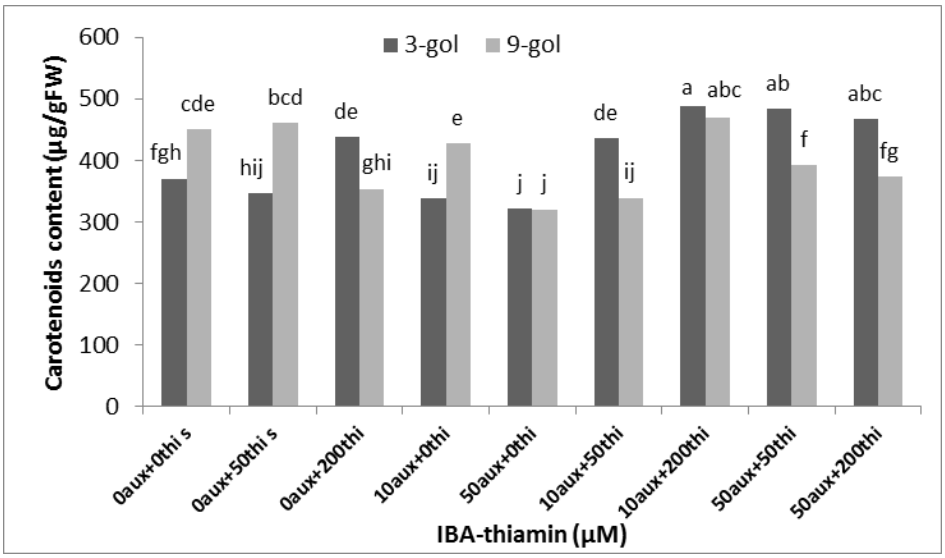
شکل ۴- تاثیر سه عامل دورهٔ رویشی، اکسین و تیامین بر محتوای کلروفیل a درگیاه سویا، مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشترک بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح $P<0.05$ است.

در هر سه تیمار بیشترین محتوای کلروفیل b مربوط به مرحلهٔ سه‌برگی بود که در بیشترین حالت در تیمار اکسین ۵۰ میکرومولار و تیامین ۵۰ میکرومولار بیشترین افزایش را نسبت به شاهد داشت (شکل ۵).



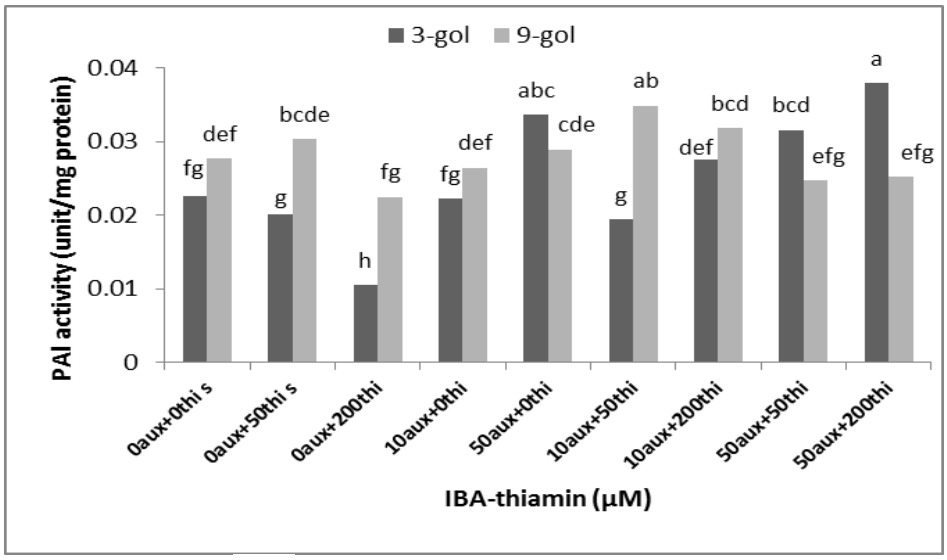
شکل ۵- تاثیر سه عامل دورهٔ رویشی، اکسین و تیامین بر محتوای کلروفیل b درگیاه سویا، مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشترک بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح $P<0.05$ است.

بیشترین محتوای کلروفیل b مربوط به مرحلهٔ سه‌برگی بود که در بیشترین حالت در تیمار اکسین ۱۰ میکرومولار و تیامین ۲۰۰ میکرومولار بیشترین افزایش را نسبت به شاهد داشت (شکل ۶).



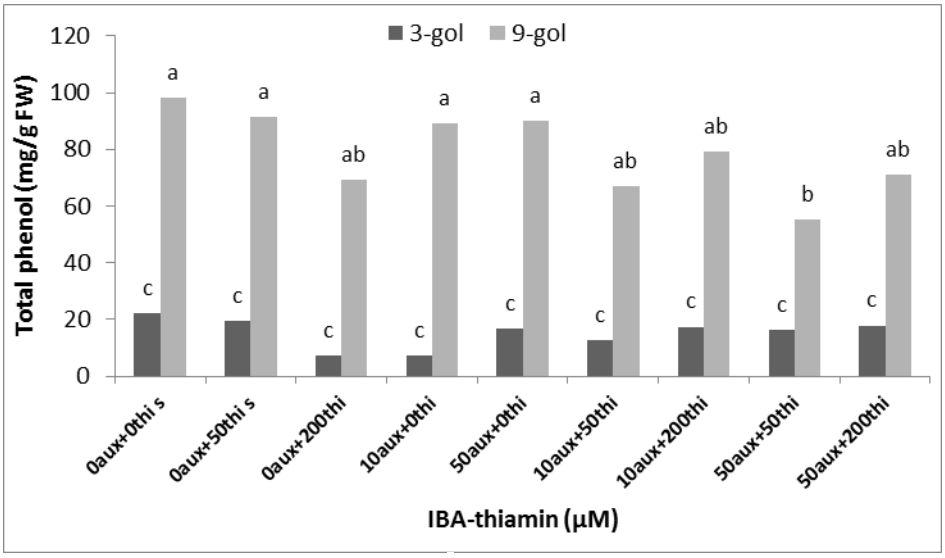
شکل ۶- تاثیر سه عامل دورهٔ رویشی، اکسین و تیامین بر محتوای کاروتنوئیدها درگیاه سویا- مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشترک بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح $P<0.05$ است.

در هر سه تیمار بیشترین فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز مربوط به مرحلهٔ سه‌برگی بود که در بیشترین حالت در تیمار اکسین ۵۰ میکرومولار و تیامین ۲۰۰ میکرومولار بیشترین افزایش را نسبت به شاهد داشت (شکل ۷).



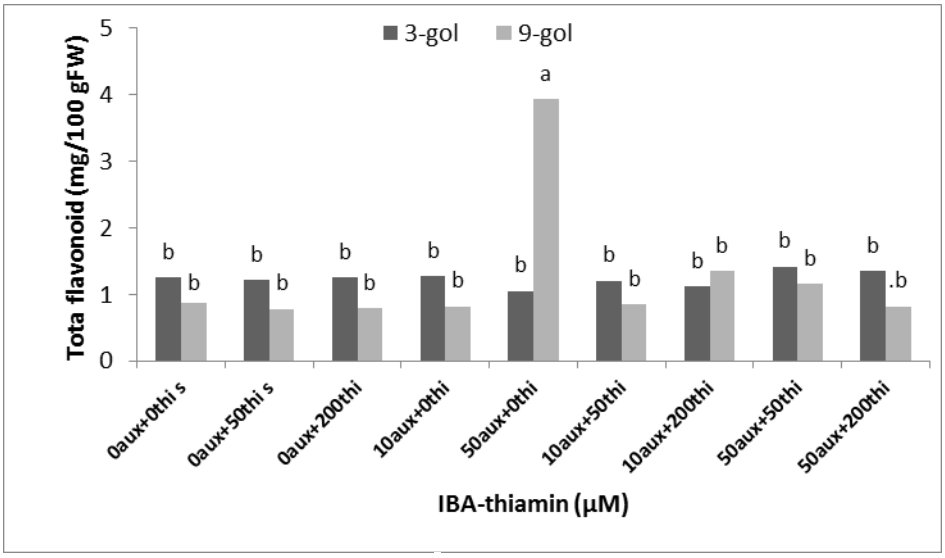
شکل ۷- تاثیر سه عامل دورهٔ رویشی، اکسین و تیامین بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) درگیاه سویا ، مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشترک بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح $P<0.05$ است.

در هر سه تیمار بیشترین محتوای فنل کل مربوط به مرحلهٔ نه‌برگی بود که در بیشترین حالت در تیمار اکسین صفر میکرومولار و تیامین صفر میکرومولار بیشترین افزایش را داشت (شکل ۸).



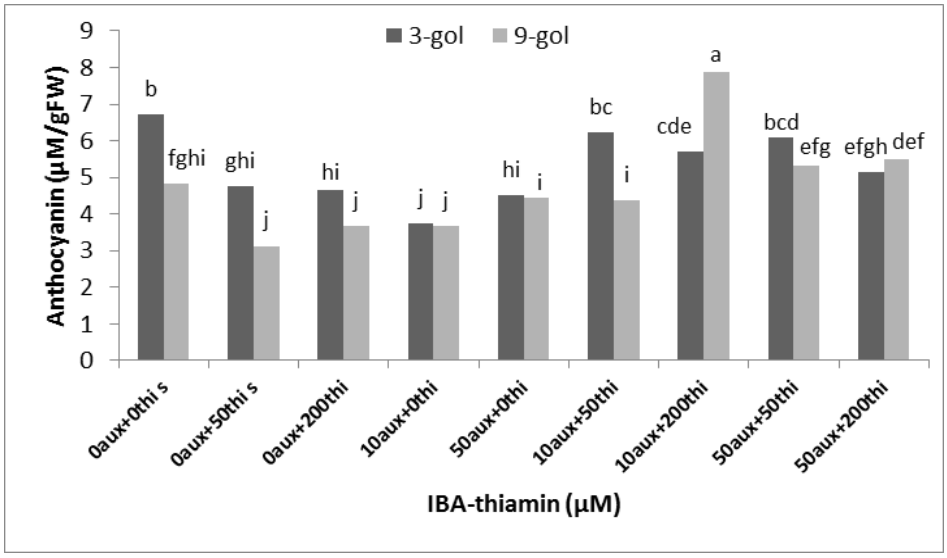
شکل ۸– تاثیر سه عامل دورهٔ رویشی، اکسین و تیامین بر محتوای فنل کل درگیاه سویا، مقادیر میانگین سه تکرار ±انحراف معیار است. حروف غیرمشترک بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح $P<0.05$ است.

بیشترین محتوای فلاونوئید مربوط به مرحلهٔ نه‌برگی بود که در بیشترین حالت در تیمار اکسین ۵۰ میکرومولار و تیامین صفر میکرومولار بیشترین افزایش را نسبت به شاهد داشت (شکل ۹).



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

بیشترین محتوای آنتوسیانین مربوط به مرحلهٔ نه‌برگی بود که در بیشترین حالت در تیمار اکسین ۱۰ میکرومولار و تیامین ۲۰۰ میکرومولار بیشترین افزایش را نسبت به شاهد داشت (شکل ۱۰).



شکل ۱۰- تاثیر سه عامل دورهٔ رویشی، اکسین و تیامین بر محتوای آنتوسیانین درگیاه سویا - مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشترک بیان‌کنندهٔ 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 ساقهٔ گل رز هیبرید موثر است. غلظت بیش از حد اکسین؛ زردشدن و ریزش برگ‌ها، سیاه‌شدن ساقه و خشک‌شدن قلمه‌ها را موجب می‌شود. Abdel-Aziz و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که کاربرد تیامین، شاخص‌های رشد، ازجمله وزن تر و خشک گیاه رزماری را به‌طور معنی‌داری افزایش داد.

در پژوهش حاضر طبق شکل (۱) تیمارهای هم‌زمان اکسین و تیامین و مرحلهٔ رویشی تاثیر معنی‌داری بر وزن تر اندام هوایی داشت، بیشترین افزایش مربوط به تیمار اکسین ۵۰ میکرومولار و تیامین ۲۰۰ میکرومولار بود که در مرحلهٔ ۹ تا ۱۱ برگی مشاهده شد. همچنین طبق شکل (۳) تیمارهای هم‌زمان اکسین و تیامین تاثیر معنی‌داری بر طول ریشه بین دو مرحلهٔ رشد رویشی داشت که بیشترین تاثیر مربوط به اکسین ۱۰ میکرومولار و تیامین ۲۰۰ میکرومولار در مرحلهٔ ۹ تا۱۱ برگی بود .علاوه‌براین، طبق شکل (۲) مشخص شد که تیمار اکسین، تیامین و مرحلهٔ رویشی تاثیر معنی‌داری بر طول ساقه داشتند که بیشترین افزایش در مرحلهٔ ۹ تا ۱۱ برگی در تیمار اکسین ۵۰ میکرومولار و تیامین 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 تیامین و اکسین بیشترین تاثیر را بر شاخص‌های رشد گیاه در مرحلهٔ ۹ تا ۱۱ برگی داشته است.

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

گزارش شده است که کاربرد تیامین 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 شکسته‌شدن کلروفیل جلوگیری می‌کند (Frenkel and Dyck, 1973).

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

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

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

بررسی بر گیاه ریحان نشان داد که به‌طورکلی بیان ژن و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز 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 آمونیالیاز را در گیاه توت‌فرنگی افزایش می‌دهد و همچنین نقش اساسی در ایجاد مقاومت در گیاهان ضمن مراحل ابتدایی رشد ایفا می‌کند. به نظر می‌رسد زیادبودن میزان آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در مرحلهٔ ۳ تا ۵ برگی، مقاومت گیاه را در مراحل ابتدایی رشد افزایش می‌دهد که با کاربرد اکسین و تیامین دیده شده است.

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

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

محققان نشان دادند در چهار مرحلهٔ فنولوژیک (ابتدای دورهٔ رویشی، پایان دورهٔ رویشی، جوانه‌زدن گل و گل کامل) در پونهٔ کوهی محتوای فنلی افزایش یافت (Sellami *et al*, 2009). برخی گزارش‌ها نشان می‌دهند که ضمن مراحل رشد در گیاه گردو ترکیبات فنلی به‌تدریج تغییر می‌یابند و ارتباط مهمی بین میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز و تجمع محتوای فنلی و فلاونوئیدی وجود دارد (Malmir, 2014).

همچنین مطالعات نشان می‌دهند که تغییرات فنیل آلانین آمونیالیاز ممکن است براساس کاربرد اکسین تاثیر عکس بر سنتز پلی‌فنل‌ها داشته باشند. به‌علاوه، کاربرد ایندول ۳- بوتیریک اسید تغییرات بر دیگر آنزیم‌ها ازجمله 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 برفعالیت دو آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز موثر باشد (Basak *et al*, 2000). همچنین محققان گزارش کردند تیمار تیامین در افزایش مقاومت به قارچ در گیاه انگور موثر است و این ویتامین بیان ژن آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوییید را فعال می‌کند و ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی افزایش می‌یابند (Boubakri *et al*, 2013). افزایش محتوای فنلی با کاربرد تیامین در گیاهان سویا (Abdel-Monaim, 2011)، بابونه و سرو به اثبات رسیده است (Abdel-Aziz *et al*, 2009).

برخی محققان بیان کردندکه 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 تیامین بر محتوای ترکیبات فنلی در دو مرحلهٔ رشد رویشی اثر معنی‌دار داشت (شکل ۸) که بیشترین تاثیر در مرحلهٔ ۹ تا ۱۱ برگی بود.

در پژوهش حاضر تفاوت معنی‌داری در میزان غلظت فلاونوئیدها در مرحلهٔ ۹ تا ۱۱ برگی در تیمار اکسین ۵۰ میکرومولار به‌تنهایی در مرحله۳ تا ۵ برگی مشاهده شد (شکل ۹). در میوهٔ توت‌فرنگی گزارشی دربارهٔ فنل کل، فلاونوئیدها، تانن‌ها و ارتباطشان با فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز هنگام نمو میوه دیده نشد (Cheng and Breen, 1991) که با نتایج ما همخوانی داشت. همچنین اختلاف آشکار بین فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز، 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 آمونیالیاز یک هفته قبل از گرده‌افشانی مشاهده شد. در گیاه سیب درختی نیز ارتباط و همبستگی معنی‌داری بین فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز در سه مرحلهٔ 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 آمونیالیاز تنظیم می‌شود (Jay-Allemand *et al*, 1989). همچنین تاثیر 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 مرحلهٔ ۳ تا ۵ برگی میزان ساخته‌شدن این ترکیبات بیشتر از سایر مراحل باشد.

در پژوهش حاضر، تفاوت معنی‌دار در محتوای آنتوسیانین بین دو مرحلهٔ رویشی وجود داشت و بیشترین غلظت مربوط به مرحلهٔ 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 آمونیالیاز، آنتوسیانین و فلاونوئید کل در ارقام مختلف سیب در مراحل مختلف رشد مشاهده شد؛ اما همبستگی معنی‌داری بین فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز در سه مرحلهٔ 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 آمونیالیاز همراه است، نمونه‌های زیادی از فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز بدون تولید آنتوسیانین وجود دارند (Lister and Lancaster, 1996. Li) و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردندکه مقادیر اندک آنتوسیانین‌ها باوجود افزایش میزان آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز، به‌علت فعالیت‌نکردن آنزیم‌های بیوسنتزی آنتوسیانین‌ها در مرحله‌ای خاص است و افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز به تشکیل دیگر ترکیبات فنلی منجر می‌شود.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد بین عوامل مرحلهٔ 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 مرحلهٔ رویشی نه تا یازده‌برگی بیشترین وزن تر، در تیمار هم‌زمان اکسین ۵۰ و تیامین ۵۰ میکرومولار در مرحلهٔ رویشی نه تا یازده‌برگی بیشترین طول ساقه و در

تیمار هم‌زمان اکسین ۱۰ و تیامین ۲۰۰ میکرومولار در مرحلهٔ نه تا یازده‌برگی بیشترین طول ریشه مشاهده شدند. بین رنگیزه‌های فتوسنتزی و سه عامل مرحلهٔ رویشی، اکسین و تیامین نیز ارتباط معنی‌دار وجود داشت. دربارهٔ اثر این سه عامل بر محتوای فنلی دیده شد که تنها مرحلهٔ رویشی و تیمار تیامین به‌تنهایی 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 تیامین 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 تیامین ۲۰۰ میکرومولار در مرحلهٔ رویشی ۹ تا ۱۱ برگی بود. دربارهٔ تاثیر تیمارها بر محتوای آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز، هر سه عامل تاثیر معنی‌داری داشتند و بیشترین آن مربوط به اکسین ۵۰ + تیامین ۵۰ میکرومولار در مرحلهٔ سه تا پنج برگی بود.

جمع‌بندی

باتوجه به نتایج بررسی حاضر، به نظر می‌رسد کاربرد هم‌زمان اکسین و تیامین 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.

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 liyase (PAL) activity and relationship to anthocyanin and flavnoid 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., Wannes, 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 *Arabidipsis*. 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 liyase 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 *Arabidipsis thaliana* reveals four mutant classes. Genetic 159: 1323-1337.