Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 50, No 3, Autumn 2019 (667-681)
DOI: 10.22059/ijhs.2018.255705.1437

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۰، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۸ (ص ۶۸۱-۶۶۷)

کاربرد آمینولولینیک اسید بر رشد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تجمع آنتوسیانین در ریزنمونه‌های سیب تحت تنش شوری در شرایط درون‌شیشه‌ای

فاطمه زاهدزاده[۱]، فریبرز زارع نهندی[۲*]، محمدرضا دادپور[۲]، علیرضا مطلبی آذر[۲] و سعیده علیزاده سالطه[۳]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی سابق دکتری، دانشیار و استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۱۰)

چکیده

در این پژوهش اثر ۵- آمینولولینیک اسید در پنج غلظت ۰، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر در تعدیل تنش شوری (چهار سطح ۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار) در ریزنمونه‌های سیب پایه بوداگوسکی نه، بررسی گردید و برخی خصوصیات بیوشیمیایی اندازه‌گیری شدند. شاخساره و کالوس بر روی محیط کشت قرار داده شدند و تغییرات فیتوشیمیایی با وجود یا عدم وجود ۵- آمینولولینیک اسید در شرایط تنش شوری اندازه‌گیری شدند. ریزنمونه‌های شاخساره و کالوس تیمار شده با ۵- آمینو لوولینیک اسید (غلظت ۲/۵ تا ۲۰ میکرومولار) کاهش در فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز و افزایش در فعالیت سوپراکسیددیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز را نشان دادند. بیشترین مقدار کلروفیل a و b ریزنمونه‌های شاخساره در غلظت ۱۰ میکرومولار آمینولولینیک اسید مشاهده شد. هم‌چنین تنش شوری نقش مؤثری در افزایش مقدار آنتوسیانین ریزنمونه‌ها ایفا نمود و بیشترین مقدار آن در تنش شوری ۹۰ میلی‌مولار به‌دست آمد. افزایش شدت تنش شوری و غلظت ۵- آمینو لوولینیک اسید (۱۰-۲/۵ میکرومولار) در محیط کشت اثر افزایشی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فنول کل ریزنمونه‌های مورد مطالعه داشت. تنش شوری و آمینو لوولینیک اسید اثر هم‌افزایی بر مقدار سنتز فلاونوئیدها نیز داشت.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، بوداگوسکی نه، تغییرات بیوشیمیایی، ریزنمونه، کالوس.

Effects of aminolevulinic acid on growth, antioxidant activity and anthocyanin accumulation of apple explants under salinity stress in *in vitro* culture conditions

Fateme Zahedzadeh[1], Fariborz Zaare-Nahandi[2*], Mohammad Reza Dadpour[2], Alireza Motalebi-Azar[2] and Saeede Alizadeh Salteh[3]
1, 2, 3. Former Ph.D. Student, Associate Professor and Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
(Received: Apr. 22, 2018 - Accepted: Sep. 1, 2018)

ABSTRACT

The present study was carried out to evaluate the effect of 5-aminolevulinic acid (ALA) on physiological and biochemical changes of in vitro-cultured Budaguvsky 9 (Bud 9) apple cultivar under NaCl induced salinity stress. Virus-free shoots and callus of Bud 9 apple were cultured on MS medium containing different levels of NaCl (0, 30, 60 and 90 mM) and ALA (0, 2.5, 5, 10 and 20 µM). Four weeks later phytochemical variations of regenerated plantlets with or without NaCl and/or ALA treatments were recorded. Shoot explants and callus treated with 5-aminolevolinic acid at 2.5 to 20 µM concentrations demonstrated reduction in catalase and peroxidase and enhancement in superoxide dismutase and ascorbate peroxidase enzyme activity. The highest chlorophyll a and b values were observed at shoot explants treated with concentration of 10 µm of aminolevolinic acid. Also, salinity stress was performed an effective role on increasing the amount of anthocyanins of explants and the highest amount was obtained in 90 mM salinity stress. Increasing the intensity of salinity stress and amino acid concentration (2.5-10 µm) in culture media had synergic effect on the antioxidant activity, total phenol as well as flavonoids content of studied explants.

Keywords: Antioxidant Enzymes, biochemical change, Bud 9 apple, callus, explant.

* Corresponding author E-mail: f.zaare @gmail.com

مقدمه

کاهش روزافزون منابع آب و خاک و تنش‌های زیستی و غیرزیستی همه از عوامل کاهش عملکرد و کیفیت محصولات باغی است. در رابطه با تولیدات باغی جنبه‌های فراوانی وجود دارد که به‌طور مستقیم در عملکرد نهایی و کیفیت محصول کشت شده نقش خواهد داشت (Nikolskii-Gavrilov *et al*., 2015). کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی استراتژی مناسبی برای کاهش اثرات نامطلوب ایجادشده بر محصولات گیاهی تشخیص داده شده است و باعث تنظیم‌شدن فرایندهای فیزیولوژیکی- بیوشیمیایی می‌باشد که به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم در برگیرنده مکانیسم‌های تحمل به تنش هستند، می‌گردد (Al-Khateeb *et al*., 2006). پایه‌های سیب از نظر تحمل و مقاومت به شوری متفاوت هستند. بیشتر درختان سیب در ایران در مناطق خشک و نیمه‌خشک کشت می‌شوند که در این نواحی تبخیر بیشتر از بارندگی است و این موضوع باعث تجمع نمک در خاک می‌شود (Alizadeh *et al*., 2011). تأثیر تنش شوری در چندین پایه پاکوتاه کننده سیب با بررسی خصوصیات بیوشیمیایی نشان داد که غلظت بالای سدیم و کلر در محلول خاک موجب کاهش کیفیت و عملکرد گیاه می‌شود (Alizadeh *et al*., 2011). سیب یکی از مهمترین محصولات از نظر اقتصادی است ولی اطلاعات بسیار کمی در مورد پاسخ به تنش درباره ارقام مختلف آن وجود دارد. از میان تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف، تنظیم‌کننده رشد گیاهی بالقوه‌ای به نام ۵- آمینو لولینیک اسید (۵- آمینولولینیک اسید)[1] به عنوان یکی از مؤثرترین تعدیل کننده‌های تنش غیرزیستی شناخته شده است. ۵- آمینولولینیک اسید پیش‌ماده‌ای ضروری در ترکیبات تتراپیرول مثل کلروفیل، آهن و ویتامین B12 در گیاهان است (Xie *et al*., 2013). اگرچه استفاده از ۵- آمینولولنیک اسید در میوه‌ها به مقدار کم بررسی شده است ولی این ماده محرکی برای تجمع آنتوسیانین در سیب فوجی شناخته شده است (Jakopic *et al*., 2007). تاکنون مکانیسم این ترکیب تحت شرایط تنش‌های زیستی و غیرزیستی به‌طور کامل شناخته نشده است. هم‌چنین چگونگی افزایش در رشد و عملکرد گیاه توسط این ترکیب هنوز ناشناخته است. کشت بافت گیاهی نقش مهمی در ارزیابی مقاومت به تنش‌های غیرزیستی ایفا می‌کند. ایده‌های بسیار جدیدی در استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد جدید در کالوس‌زایی، پرآوری، باززایی گیاهان و تأثیر بر فرایندهای فیزیولوژیک مختلف در گیاهان وجود دارد (Nahar & Shimazaki, 2014).

تحمل به تنش‌های زیستی در ریزنمونه‌های درختان میوه در شرایط کشت درون شیشه‌ای به دلیل امکان تکرار آزمایش پی‌درپی در سال، کاهش هزینه‌ها و نیز کنترل به نسبت دقیق عامل‌های محیطی توانسته است در ارزیابی آغازین مقدار تحمل در برابر تنش‌های مختلف استفاده شود (Shiyab *et al*., 2003; Rai *et al*., 2011). این تحقیق با هدف بررسی تأثیر تنش شوری و استفاده از ۵- آمینولولینیک اسید به‌عنوان تعدیل‌کننده تنش روی پایه بوداگوسکی نه (Bud 9)[2] در شرایط درون‌شیشه‌ای انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه‌های اورگانوژنز و مورفوژنز، کشت بافت گیاهی و تغذیه گیاهان باغی گروه علوم باغبانی واقع در مجتمع آزمایشگاهی تحصیلات تکمیلی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام شد. در تیرماه سال ۱۳۹۳ جوانه‌های جانبی سیب پایه بوداگوسکی نه از ایستگاه خلعت‌پوشان دانشگاه تبریز جمع‌آوری و به‌منظور تولید گیاهان شبیه به والد مادری از کشت مریستم استفاده شد.

برای انجام ضدعفونی ریزنمونه‌ها، ابتدا برگ‌ها از شاخه‌های تهیه شده جدا و شاخه‌ها به طول دو و سه سانتی‌متر برش داده شد. ریز نمونه به‌مدت ۲۰ دقیقه در زیر آب جاری قرار گرفته و پس از آن به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول حاوی چند قطره مایع ظرفشویی قرار گرفت. در مرحله بعد نمونه‌ها با الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۵ دقیقه ضدعفونی‌شده و سپس در هیپوکلریت

1. Aminolevulinic acid

2. Budagovsky 9

سدیم ۱٪ به‌مدت ۱۵ الی ۲۰ دقیقه قرار گرفتند. سرانجام نمونه‌ها به زیر هود لامینار انتقال یافته و در آنجا با آب مقطر استریل سه بار شستشو داده شدند. در هر بار شستشو نمونه‌ها حدود یک دقیقه در آب مقطر استریل تکان داده شد. جوانه‌ها بعد از ضدعفونی، فلس‌زدایی شدند و پس از فلس‌زدایی در زیر استریومیکروسکوپ و با کنار زدن کرک‌های درون جوانه‌ای بر روی محیط کشت (ابتدا محیط کشت ۱/۲ و سپس کامل) قرار داده شدند. در این روش کوچک‌ترین بخش نوک شاخساره به عنوان ریزنمونه به‌کار گرفته شد. این بخش در برگیرنده برجستگی مریستمی بدون پریمودیای برگی بود. هدف از این روش تولید یک ریزگیاه ریشه‌دارشده از طریق جداسازی مریستم که عاری از ویروس‌های درون گیاهی، ارگانیزم‌های شبه ویروسی و برخی از باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌باشد.

ابتدا مریستم‌ها در محیط کشت MS 1/2 (Murashige & Skoog, 1962) بدون هورمون، در شیشه‌های بسیار کوچکی کشت شدند برخی از نمونه‌های کشت‌شده به کالوس تبدیل شدند و برخی دیگر رشد کردند مریستم‌های رشدیافته بعد از سه بار بازکشت در محیط کشت ۱/۲ و با رشد مریستم که به گیاه کوچکی تبدیل شده بود به شیشه‌های بزرگ‌تر منتقل شدند. برای به‌دست‌آوردن کالوس ابتدا نمونه‌های برگی به قطعات کوچک برش داده شدند و بر روی محیط کالوس‌زایی قرار گرفتند. ریزنمونه‌های تیمار شده تحت شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و نور ۸/۱۶ ساعت روشنایی/ تاریکی با نورسفید با شدت ۴۰ میکرومول درمترمربع در ثانیه قرار داده شدند. محیط‌کشت مورد استفاده برای پرآوری شامل محیط کشت MS+۱/۵میلی‌گرم در لیتر BAP+ ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA3+ ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و برای کالوس‌زایی شامل محیط‌کشت MS+۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kinetin + یک میلی‌گرم در لیتر NAA + یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود.

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار (چهار شیشه) و پنج ریزنمونه در هر تکرار انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج و یک درصد با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ver. 22 انجام شد. بعد از بازکشت‌های متوالی و به‌دست‌آوردن جمعیت انبوه تیمارهای موردنظر اعمال گردید. ۵- آمینولولینیک اسید در ۵ سطح (۰، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) و NaCl در ۴ سطح (۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار) به محیط‌های کشت افزوده شدند. بعد از افزودن نمک به محیط‌کشت و اتوکلاو محیط کشت‌ها در زیر هود لامینار ۵- آمینولولینیک اسید با فیلتر به محیط‌های کشت افزوده شد و بعد از گذشت چهار هفته از اعمال تیمارها، صفات موردنظر اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری کلروفیل

اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل میزان کلروفیل و کارتنوئیدهای برگ با روش Lichtenthaler (1987) ارزیابی شد. ۰/۰۴ گرم نمونه برگی با ۱۸۰۰ مایکرولیتر استون خالص عصاره‌گیری گردید. پس از یک شب قرار دادن نمونه‌ها در یخچال، نمونه‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند، روشناور جدا و با استفاده از اسپکتوفتومتر در چهار طول موج ۴۷۰، ۶۴۵، ۶۶۲ و ۷۱۰ نانومتر قرائت گردید. در نهایت مقدار کلروفیل a، کلروفیل b و کارتنوئید کل با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد و براساس میلی‌گرم در گرم وزن تازه بیان شد.

کلروفیل a (µg/ml) =
[11.24×(A662-A710)–2.04×(A645–A710)]
× dilution factor

کلروفیل b (µg/ml) =
20.13×(A645-A710)–4.19×(A662–A710)]
× dilution factor

کاروتنوئید کل (µg/ml) =
[(1000 × (A470-A710) –1.90×Chl a – 63.14
×Chl a)/ 214]× dilution factor

اندازه‌گیری آنتوسیانین

برای استخراج آنتوسیانین ۰/۲ گرم نمونه برگی با ۳

میلی‌لیتر از متانول اسیدی عصاره‌گیری شد سپس برای اندازه‌گیری از روش pH تفاضلی با استفاده از بافر کلرید پتاسیم (pH، ۱) و بافر استات سدیم (pH، ۴/۵) استفاده شد. جذب نمونه در طول موج ۵۳۰ و ۷۰۰ نانومتر قرائت شد و با استفاده از رابطه زیر میزان آنتوسیانین بر حسب میلی‌گرم در کیلوگرم وزن تر نمونه گیاهی محاسبه گردید (Giusti & Wrolstad, 2001).

$$A=(A_{\lambda vis\ max}-A700)_{pH1}-(A_{\lambda vis\ max}-A700)_{pH\ 4.5}$$

غلظت آنتوسیانین = $(A\times MW\times DF)/\varepsilon\times 1)$

MW=445.2

جرم مولکولی: DF: 15

ضریب جذب مولی: ε= 30200

ارزیابی فلاونوئید کل

محتوای فلاونوئید کل[1] (TFC) عصاره‌ها با روش ارائه شده توسط Chang *et al.* (2002) اندازه‌گیری شد. ۲۵۰ مایکرولیتر عصاره گیاهی به‌همراه ۱۰۰۰ مایکرولیتر آب مقطر و ۷۵ مایکرولیتر نیتریت سدیم ۵ درصد با هم مخلوط شدند و بعد از ۵ دقیقه انتظار ۱۵۰ مایکرولیتر $AlCl_3$ ۱۰ درصد اضافه گردید و بعد از ۶ دقیقه انتظار ۵۰۰ مایکرولیتر NaOH یک مولار اضافه شد و بعد از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق جذب در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت شد و جهت به‌دست‌آوردن منحنی کالیبراسیون از کوئرستین به‌عنوان استاندارد استفاده شد. برای این منظور غلظت‌های مختلف آن (۰/۱، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌مولار) به جای نمونه‌ها ریخته شد و میزان جذب آن‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شده و منحنی براساس میزان جذب در غلظت‌های مشخص رسم گردید و محتوی فلاونوئید کل محاسبه شد.

ارزیابی فنول کل

برای ارزیابی فنول کل از روش Folin & Ciocalteu (1927) استفاده شد. به یک گرم نمونه برگی پودرشده ۲ میلی‌لیتر متانول اسیدی افزوده و پس از آن به‌مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. روشناور جدا و ۵۰ مایکرولیتر از این عصاره با ۴۵۰ مایکرولیتر آب مقطر رقیق شد سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از واکنشگر فولین سیوکالتو ۱۰ درصد به آن اضافه گردید. پس از ده دقیقه به این مخلوط ۲ میلی‌لیتر سدیم بیکربنات ۷/۵٪ اضافه کرده و مخلوط واکنش یک ساعت و نیم در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شد و سپس میزان جذب در ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. برای به‌دست‌آوردن منحنی کالیبراسیون از اسید گالیک بعنوان استاندارد استفاده شد. برای تهیه استانداردها ابتدا ۱ میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰ میلی‌لیتر متانول خالص حل شد تا غلظت ۱۰۰ میلی-گرم در لیتر حاصل گردد. سپس از این استوک برای تهیه محلول‌های استاندارد با غلظت‌های مختلف استفاده شد به‌طوری‌که غلظت‌های مختلف آن به‌جای نمونه‌ها ریخته و میزان جذبشان در ۷۶۰ نانومتر خوانده شد و منحنی بر اساس میزان جذب در غلظت-های مشخص رسم گردید. میزان فنل کل بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن تازه بیان شد.

فعالیت آنتی اکسیدانی کل

برای ارزیابی این خصوصیت از روش DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) استفاده شد. این روش براساس توانایی عصاره گیاه در دادن الکترون یا هیدروژن به رادیکال آزاد DPPH و مهار آن استوار است (Brand-Williams, 1995). DPPH یک رادیکال آزاد پایدار می‌باشد که می‌تواند یک الکترون یا هیدروژن را قبول کند و به یک مولکول خنثی و پایدار تبدیل شود. این ماده بدلیل دارا بودن الکترون منفرد دارای جذب قوی در طول موج ۵۱۷ نانومتر می‌باشد که در این مرحله محلول متانولی آن برنگ بنفش پررنگ است. ابتدا برای اندازه‌گیری این خصوصیت ۰/۲ گرم از نمونه برگی وزن و در هاون به کمک ازت مایع پودر شد و با ۲ میلی‌لیتر متانول اسیدی عصاره‌گیری شد. پس از سانتریفیوژکردن در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد، روشناور جدا شد. سپس میزان جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر تعیین گردید. برای این منظور با استفاده از

1. Total flavonoid content

متانول خالص بلانک کرده و سپس با استفاده از سمپلر ۱۹۵۰ میکرولیتر محلول DPPH ۰/۰۸ میلی‌مولار در کووت ریخته و میزان جذب قرائت شد. بلافاصله ۵۰ مایکرولیتر از عصاره نمونه‌ها به آن افزوده شد. این نمونه به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی در دمای اتاق قرار گرفت و سپس مجدداً قرائت شد. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در عصاره‌های رقیق‌شده با کمک رابطه زیر، تعیین و به صورت درصد بیان شد.

$$\text{فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل} = \frac{(\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد})}{\text{جذب شاهد}} \times ۱۰۰$$

جهت اندازه‌گیری میزان پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به شیوه اسپکتروفوتومتری، یک عصاره آنزیمی از هر نمونه پودر منجمد برگ استخراج گردید. به همین منظور استخراج عصاره‌های آنزیمی از نمونه‌های پودر منجمد برگ، ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر استخراج شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH، ۷) حاوی ۱ درصد (حجم/ وزن) پلی‌وینیل پیرولیدون[1] تهیه شد. بدین ترتیب که، ۱۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH، ۷) با ۵۰ میلی‌لیتر محلول ۴ درصد پلی وینیل تهیه شده در همین بافر با هم مخلوط شدند. برای تعیین پروتئین کل، عصاره استفاده‌شده در سنجش آنزیم‌ها استفاده شد. برای این منظور از غلظت‌های ۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم پروتئین آلبومین سرم گاوی (Bovin serum albumin, BSA) در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استفاده گردید و مقدار پروتئین نمونه‌ها بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر گزارش گردید. برای تهیه معرف بردفورد ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم کوماسی بلو در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸ ٪ و ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ حل شد. برای تهیه محلول بردفورد، ۳۰ میلی‌لیتر معرف بردفورد، ۳۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸۸٪ و ۱۵ میلی‌لیتر الکل ۹۵٪ مخلوط شد و حجم محلول با آب مقطر به ۵۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول صاف و در شیشه قهوه‌ای نگهداری شد. برای اندازه‌گیری پروتئین، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی با یک میلی‌لیتر محلول بردفورد مخلوط شد و به کووت‌های موردنظر منتقل شد و بعد از ۲ دقیقه میزان جذب در ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. برای تهیه منحنی استاندارد از سرم آلبومین گاوی استفاده شد (Bradford, 1976).

ارزیابی آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL)[2]

جهت استخراج عصاره آنزیمی ۰/۱گرم نمونه برگی با ۹۰۰ مایکرولیتر بافر تریس ۱۰۰ میلی‌مولار (pH، ۸/۵) داخل هاون چینی سرد شده با ازت مایع له و عصاره‌گیری شد. مخلوط حاصل بلافاصله در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و روشناور آن جمع‌آوری گردید. جهت انجام واکنش، نیم میلی‌لیتر فنیل‌آلانین ۱۰ میلی‌مولار را به‌همراه ۰/۴ میلی‌لیتر آب دیونیزه شده با یک میلی‌لیتر بافر تریس و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی در یک فالکون ریخته و جذب آن در طول موج ۲۹۰ نانومترخوانده شد. سپس برای یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و واکنش با افزودن نیم میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۶ مولار متوقف گردید. فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز با تولید سینامات تعیین گردید. میزان تولید سینامات با اندازه‌گیری جذب محلول در طول موج ۲۹۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر (مدل SPEKOL 15) صورت گرفت. نمونه شاهد، حاوی تمام محتویات محلول به جز عصاره آنزیمی استخراج شده بود. فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین براساس نانومول سینامات در ساعت به ازای میلی‌گرم پروتئین موجود در عصاره بیان گردید. میزان پروتئین کل عصاره آنزیمی نیز توسط روش برادفورد برآورد شد (Beaudion-Eagan & Thrope, 1986).

ارزیابی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)[3]

میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، با اندازه‌گیری ممانعت آن از احیای نیترو بلو تترازولیوم (NBT)[4]

1. Phenyelalanin amonyalase

2. Phenylalanine ammoniumase
3. Superoxide dismutase
4. Nitro blue tetrazolium

وابسته به رادیکال سوپراکسید بر اساس روش Beyer & Fridovich (1987) تعیین شد. به این منظور، از مقایسه افزایش جذب مربوط به تولید فرمازان در اثر احیای نوری NBT در طول موج ۵۶۰ نانومتر بین حالت‌های وجود و عدم وجود عصاره آنزیمی استفاده شد. ۲ میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH، ۷/۸)، Na_2EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، متیونین[1] ۹/۹ میلی‌مولار، NBT ۵۷ میکرومولار، ریبوفلاوین ۰/۹ میکرومولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. ریبوفلاوین در آخر به بقیه اجزای واکنش اضافه و مخلوط به خوبی هم زده شد. به‌منظور بلانک‌نمودن دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر، از مخلوط واکنش بدون عصاره (شاهد) استفاده گردید. پس از هر بار بلانک نمودن دستگاه، اندازه‌گیری جذب اولیه در کووت‌های حاوی مخلوط واکنش دارای عصاره‌های آنزیمی مختلف در همین طول موج، انجام شد. سپس، این کووت‌ها همانند کووت حاوی مخلوط واکنش بدون عصاره آنزیمی (شاهد دارای جذب اولیه صفر)، به موقعیت یکسان در مرکز اتاقک نوردهی با دیواره‌های داخلی به رنگ سفید براق منتقل شدند. پس از ۵ دقیقه نوردهی با شدت نور حدود ۱۹۰۰۰ لوکس و انجام واکنش در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، اندازه‌گیری جذب نهایی در همه کووت‌ها در طول موج مزبور صورت گرفت و میزان افزایش جذب برای هریک محاسبه گردید. فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین (U/mg protein) بیان گردید. یک واحد، میزان آنزیمی بود که باعث ۵۰ درصد ممانعت از احیای نوری NBT شد.

ارزیابی آنزیم پراکسیداز (POX)[2]

فعالیت آنزیم پراکسیداز با روش Putter (1974) به‌روش تست گایاکول و تبدیل آن به تتراگایاکول انجام شد. افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر خوانده می‌شود. استخراج آنزیم به وسیله بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH، ۷) انجام شد. ۲ میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH، ۷)، پراکسید هیدروژن ۵ میلی‌مولار، گایاکول ۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. به منظور بلانک نمودن دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر، از مخلوط واکنش بدون عصاره استفاده شد. واکنش در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با افزودن پراکسید هیدروژن و هم زدن مخلوط، آغاز و بلافاصله افزایش جذب در این طول موج برای مدت ۳/۵ دقیقه به فواصل ۵ ثانیه قرائت گردید. یک واحد آنزیمی، مقداری از آنزیم پراکسیداز بود که تولید یک میکرومول تتراگایاکول از ۴ میکرومول گایاکول را به دنبال داشت. ضریب جذب مولی[3] برای تتراگایاکول، ۲۶/۶ معکوس میلی‌مولار سانتی‌متر بود.

ارزیابی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)[4]

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با روش Nakano & Asada (1981) انجام شد. میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، با اندازه‌گیری کاهش جذب مربوط به اکسید شدن و مصرف آسکوربات در طول موج ۲۹۰ نانومتر تعیین شد. ۲ میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH، ۷)، پراکسید هیدروژن ۰/۱ میلی‌مولار، Na_2EDTA[5] ۰/۱ میلی‌مولار، آسکوربات سدیم ۰/۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. جهت بلانک نمودن دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۹۰ نانومتر، از مخلوط واکنش بدون عصاره استفاده شد. واکنش در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با افزودن پراکسید هیدروژن و هم زدن مخلوط، آغاز و بلافاصله کاهش جذب در این طول موج برای مدت ۲ دقیقه به فواصل ۵ ثانیه قرائت گردید. فعالیت ویژه آنزیم آسکوربات پراکسیداز در هر نمونه عصاره آنزیمی، به صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید. یک واحد، مقداری از آنزیم آسکوربات پراکسیداز بود که اکسیدشدن یک میکرومول آسکوربات را سبب شد. ضریب جذب مولی برای آسکوربات، ۲/۸ معکوس میلی‌مولار سانتی‌متر بود.

1. Methionine
2. Peroxidase
3. Molar extinction (absorbance) coefficient
4. Ascorbate peroxidase
5. Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt

ارزیابی فعالیت آنزیم کاتالاز[1]

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، با اندازه‌گیری کاهش جذب مربوط به مصرف پراکسید هیدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر تعیین شد (Chance & Maely, 1955). ۱/۵ میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH، ۷)، پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی‌مولار و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. جهت بلانک‌نمودن دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر، از بافر مزبور به تنهایی استفاده شد. واکنش در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با افزودن پراکسید هیدروژن و هم زدن مخلوط، آغاز و بی‌درنگ کاهش جذب در این طول موج برای مدت ۳ دقیقه به فواصل ۵ ثانیه قرائت گردید. فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز در هر نمونه عصاره آنزیمی، به‌صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید. یک واحد، مقداری از این آنزیم بود که یک میکرومول پراکسید هیدروژن را تجزیه کرد. ضریب جذب مولی برای پراکسید هیدروژن، ۰/۰۳۹۴ معکوس میلی‌مولار سانتی‌متر بود.

نتایج و بحث

استفاده از ۵- آمینو لوولینیک اسید در غلظت ۱۰ میکرومولار موجب افزایش معنی‌دار کلروفیل a شد و تنش شوری موجب کاهش معنی‌دار کلروفیل a گردید. تنش شوری و تیمار ۵- آمینولولینیک اسید بر مقدار کلروفیل و کارتنوئید شاخساره و کالوس اثر معنی‌داری نشان داد ($p\leq ۰/۰۱$). هم‌چنین، اثر متقابل بین تیمارها بر خصوصیات ارزیابی شده به جز کلروفیل کل در ریزنمونه شاخساره معنی‌دار بود ($p\leq ۰/۰۵$). نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان داد که شوری و ۵- آمینولولینیک اسید به‌طور معنی‌داری بر مقدار رنگیزه‌ها تأثیرگذار هستند. مقدار کلروفیل کل گیاهچه و کالوس تفاوت قابل توجهی در اثر تیمار ۵- آمینولولینیک اسید داشت هم‌چنین مقدار کلروفیل a و b با تنش شوری کاهش یافت (جدول‌های ۱ و ۳). نتایج نشان داد که غلظت ۲۰ میکرومولار ۵- آمینولولینیک اسید اثر مثبتی در کنترل تأثیرات منفی شوری نداشت. هم‌چنین غلظت ۱۰ میکرومولار ۵- آمینولولینیک اسید نسبتاً موجب افزایش مقدار کارتنوئیدها در گیاهان تحت تنش شوری و شاهد شد (جدول‌های ۲ و ۴). تشدید تنش شوری و افزایش غلظت ۵- آمینو لوولینیک اسید سبب افزایش نسبت کلروفیل a به کلروفیل b در ریزنمونه‌های کالوس گردید. تنش شوری همراه با ۵- آمینو لوولینیک اسید در حفظ نسبت بالای کلروفیل a به کلروفیل b مؤثر بود (جدول‌های ۱ و ۳). استفاده از ۵- آمینو لوولینیک اسید در غلظت ۵ میکرومولار در تعدیل اثر کاهنده تنش شوری بر مقدار کلروفیل کل مؤثر بود. به نظر می‌رسد که کاهش محتوای کلروفیل ریزنمونه‌های شاخساره و کالوس سیب تحت تنش شوری در درجه نخست مربوط به تغییر متابولیسم نیتروژن در جهت ساخت پرولین و کاهش سنتز کلروفیل باشد. در شرایط شوری فعالیت آنزیم گلوتامیل‌کیناز از آنزیم گلوتامات‌لیگاز (اولین آنزیم مسیر بیوسنتز کلروفیل) بیشتر می‌شود تا پیش‌ساز گلوتامات بیشتر به مصرف اسیدآمینه‌ها به‌ویژه پرولین برسد، بنابراین بیوسنتز کلروفیل با محدودیت مواجه می‌شود، با افزایش شوری فعالیت آنزیم‌های کلروفیلاز و پراکسیداز نیز افزایش یافته و سبب تخریب کلروفیل گیاهان می‌شوند (Gibon *et al.*, 2000). بنابراین کاهش کلروفیل به‌وسیله شوری ممکن است نتیجه توقف مسیر بیوسنتز، تحریک مکانیسم‌های تخریبی آن و یا هر دو حالت باشد (Lobon *et al.*, 2002).

دلیل کاهش کلروفیل بر اثر تنش شوری با افزایش فعّالیت آنزیم تخریب‌کننده کلروفیل (Jamali *et al.*, 2007) و عدم سنتز کلروفیل و افزایش تخریب آن مرتبط است (Zhao *et al.*, 2007). غلظت بهینه آمینو لوولینیک اسید برای افزایش سنتز کارتنوئیدها در ریزنمونه‌های مختلف متفاوت است که در این بررسی در ریزنمونه‌ها شاخساره غلظت ۱۰ میکرومولار و در ریزنمونه‌های کالوس غلظت ۵ میکرومولار اثر معنی‌داری در افزایش کاروتنوئیدها داشته‌اند. Akram & Ashraf (2007) نیز اثر آمینو لوولینیک اسید را تابع گونه گیاهی، مرحله رشدی و شرایط محیطی گزارش کرده‌اند. کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی در

1. Catalase

تنش شوری در مطالعات قبلی محققان گزارش شده است. ۵- آمینولولینیک اسید نقش مهمی در سنتز تتراپیرول‌ها در برگ‌ها دارد (Tanaka *et al.*, 1992). افزایش رنگدانه‌های فتوسنتزی تحت تأثیر تیمار آمینو لوولینیک اسید به علت تأثیر این ترکیب بر بیوسنتز کلروفیل می‌باشد زیرا ۵- آمینو لوولینیک اسید پیش ماده اصلی بیوسنتز کلروفیل می‌باشد (Wang *et al.*, 2004; Youssef & Awad, 2008).

جدول ۱. تأثیر ۵- آمینولولینیک اسید بر خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ریزنمونه‌های کالوس سیب پایه Bud 9 تحت تنش شوری

Table 1. Effects of 5-aminolevulinic acid on physiological and biochemical characteristics of Bud9 apple callus explants under salinity stress

ALA	Salinity	Chlorophyll a (mg g^{-1} FW)	Chlorophyll b (mg g^{-1} FW)	Chloa/b	Total Chlorophyll (mg g^{-1} FW)	Carotenoids (mgg^{-1} FW)	Total anthocyanin (mg kg^{-1} FW)	Total flavonoid (mg g^{-1} FW)
0	0	0.950 cde	0.542 de	1.75 cdefg	1.49 cd	0.105 d	2.22 s	153.43 p
	30	0.945 def	0.514 fg	1.83 c	1.46 def	0.084 fg	3.55 p	169.50 o
	60	0.876 gh	0.437 i	2.01 ab	1.31 h	0.054 h	5.46 l	176.47 m
	90	0.756 i	0.366 l	2.06 ab	1.23 i	0.016 j	8.16 j	225.47 e
2.5	0	0.949 cde	0.562 c	1.68 efghi	1.51 bcd	0.118 c	2.58 r	169.53 o
	30	0.943 def	0.518 f	1.82 cd	1.46 def	0.089 ef	3.36 q	172.74 n
	60	0.859 h	0.430 i	1.99 ab	1.29 h	0.057 h	5.27 m	190.25 h
	90	0.752 i	0.384 k	1.95 b	1.13 i	0.016 j	8.43 h	244.75 d
5	0	0.997 abc	0.613 a	1.62 hi	1.61 a	0.201 a	5.11 n	178.55 l
	30	1.041 a	0.584 b	1.78 cde	1.62 a	0.160 b	8.36 i	186.40 j
	60	0.936 def	0.543 d	1.72 defgh	1.48 cde	0.106 d	10.42 d	196.65 g
	90	0.905 efg	0.515 fg	1.75 cdef	1.42 fg	0.080 g	15.25 a	267.36 c
10	0	1.001 ab	0.611 a	1.63 hi	1.61 a	0.196 a	5.11 n	184.30 k
	30	0.973 bcd	0.585 b	1.64 fghi	1.55 b	0.156 b	8.58 g	190.41 h
	60	0.902 efgh	0.532 e	1.69 efghi	1.43 efg	0.105d	10.10 e	202.68 f
	90	0.894 fgh	0.506 g	1.76 cdef	1.40 g	0.083fg	15.03 b	271.49 b
20	0	0.933 def	0.582 b	1.60 i	1.51 bc	0.093 e	4.26 o	186.59 j
	30	0.910 efg	0.554 c	1.64 ghi	1.46 cdef	0.083 fg	6.43 k	188.82 i
	60	0.674 j	0.464 h	1.45 j	1.13 i	0.043 i	9.27 f	202.75 f
	90	0.537 k	0.403 j	1.33 k	0.94 j	0.044 i	12.66 c	275.61 a

* مقادیر دارای حروف مشابه در هر ستون، نشان‌دهنده نبود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱درصد می‌باشند.

* Values followed by the same letter within a column indicate they are not significantly different ($p < 0.01$).

جدول ۲. اثر ۵- آمینولولینیک اسید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ریزنمونه‌های کالوس سیب پایه Bud9 تحت تنش شوری

Table 2. The effect of 5-aminolevulinic acid on antioxidant enzymes activities of Bud9 apple callus explants under salinity stress

ALA	Salinity	Total phenol (mg GAE g^{-1} FW)	Radical scavenging (%)	PAL (nm mg^{-1} protein)	CAT (Umg^{-1} protein)	POX (Umg^{-1} protein)	APX (Umg^{-1} protein)	SOD (Umg^{-1} protein)
0	0	3.33 s	51.35 p	0.392 s	0.015 hi	0.164 j	0.176 n	0.0041 op
	30	4.45 p	53.92 l	0.395 q	0.019 e	0.195 g	0.361 k	0.0041 op
	60	6.36 l	55.46 i	0.397 p	0.022 d	0.242 c	0.594 h	0.0046 j
	90	9.16 j	57.06 f	0.402 l	0.033 a	0.284 a	0.816 c	0.0051 g
2.5	0	3.58 r	51.35 p	0.393 r	0.015 gh	0.160 jk	0.176 n	0.0042 no
	30	4.36 q	53.74 m	0.398 o	0.018 ef	0.191 g	0.382 j	0.0043 m
	60	6.27 m	56.55 h	0.400 n	0.022 d	0.240 cd	0.617 g	0.0052 f
	90	9.43 h	58.04 d	0.402 l	0.031 ab	0.266 b	0.850 b	0.0066 b
5	0	6.11 n	53.94 l	0.401 m	0.011 j	0.131 m	0.314 l	0.0044 l
	30	9.36 i	56.86 g	0.406 k	0.016 fgh	0.173 i	0.592 h	0.0048 h
	60	11.42 d	59.62 c	0.409 i	0.021 d	0.192 g	0.719 e	0.0057 c
	90	16.25 a	63.26 a	0.412 f	0.029 bc	0.217 f	0.217 a	0.0069 a
10	0	6.11 n	53.46 n	0.407 j	0.011 j	0.152 l	0.313 l	0.0042 mn
	30	9.58 g	54.93 j	0.410 h	0.016 fgh	0.183 h	0.593 h	0.0045 k
	60	11.10 e	56.83 g	0.417 d	0.021 d	0.218 f	0.704 f	0.0054 e
	90	16.03 b	60.56 b	0.420 b	0.029 c	0.231 e	0.939 a	0.0066 b
20	0	5.26 o	54.42 o	0.411 g	0.013 eij	0.158 k	0.933 m	0.0041 p
	30	7.43 k	54.84 k	0.415 e	0.017 fg	0.182 h	0.483 i	0.0042 mn
	60	10.27 f	57.75 e	0.418 c	0.023 d	0.220 f	0.593 h	0.0047 l
	90	13.66 c	59.66 c	0.421 a	0.033 a	0.235 de	0.773 d	0.0055 d

* مقادیر دارای حروف مشابه در هر ستون، نشان‌دهنده نبود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱درصد می‌باشند.

* Values followed by the same letter within a column indicate they are not significantly different ($p < 0.01$).

جدول ۳. اثر ۵- آمینولولینیک اسید بر خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ریزنمونه‌های شاخساره سیب پایه Bud 9 تحت تنش شوری

Table 3. The effect of 5-aminolevulinic acid on physiological and biochemical characteristics of Bud9 apple shoot explants under salinity stress

ALA	Salinity	Chlorophyll a (mg g^{-1} FW)	Chlorophyll b (mg g^{-1} FW)	Total Chlorophyll (mg g^{-1} FW)	Carotenoids (mgg^{-1} FW)	Total anthocyanin (mg kg^{-1} FW)	Total flavonoid (mg g^{-1} FW)
0	0	4.82 abc	2.19 ab	7.01 abc	2.15 c	6.48 ef	516.33 i
	30	4.72 abc	2.09 abc	6.81 bc	2.15 c	6.62 ef	522.36 hi
	60	4.11 bcde	1.79 bcde	5.90 cde	1.36 def	6.39 f	534.77 efg
	90	3.52 def	1.06 ef	4.58 fg	1.44 f	6.78 e	565.71 d
2.5	0	4.88 abc	2.19 ab	7.09 abc	2.14 c	8.44 d	513.79 i
	30	4.79 abc	2.08 abc	6.88 bc	2.16 c	8.35 d	526.56 gh
	60	4.35 bcd	1.88 abcd	6.24 bcde	1.35 def	8.70 d	540.85 ef
	90	2.73 f	1.11 def	3.85 g	1.20 ef	8.61 d	584.28 c
5	0	4.88 abc	2.21 ab	7.11abc	2.27 bc	9.87 c	517.33 hi
	30	4.96 abc	2.11 abc	7.08 abc	2.14 c	9.95 c	535.40 efg
	60	4.45 bcd	1.77 bcde	6.23 bcde	1.58 d	9.99 c	544.24 e
	90	3.90 cde	1.30 cdef	5.20 ef	1.30 def	9.12 c	596.94 b
10	0	5.75 a	2.23 ab	8.08 a	3.08 a	12.96 b	534.07 fg
	30	5.10 ab	2.10 abc	7.21 ab	2.51 b	13.04 b	556.59 d
	60	4.77 abc	1.85 abcde	6.62 bcd	1.91 c	13.12 b	560.67 d
	90	3.85 cde	1.69 abcde	5.54 def	1.27 def	13.05 b	618.21 a
20	0	4.42 bcd	1.89 abcd	6.31 bcde	2.13 c	15.99 a	533.31 fg
	30	4.04 bcde	1.48 bcdef	5.53 def	2.10 c	16.09 a	566.01 d
	60	4.07 bcde	1.20 def	5.27 ef	1.53 de	16.14 a	575.86 c
	90	3.04 ef	0.815 f	3.85 g	1.13 f	16.12 a	624.45 a

* مقادیر دارای حروف مشابه در هر ستون، نشان‌دهنده نبود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱درصد می‌باشند.

* Values followed by the same letter within a column indicate they are not significantly different ($p < 0.01$).

جدول ۴. تأثیر ۵- آمینولولینیک اسید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ریزنمونه‌های شاخساره سیب پایه Bud 9 تحت تنش شوری

Table 4. The effect of 5-aminolevulinic acid on antioxidant enzymes activities of Bud9 apple shoot explants under salinity stress

ALA	Salinity	Total phenol (mg GAE g^{-1} FW)	Radical scavenging (%)	PAL (nm mg^{-1} protein)	CAT (Umg^{-1} protein)	POX (Umg^{-1} protein)	APX (Umg^{-1} protein)	SOD (Umg^{-1} protein)
0	0	374.56 d	56.56 ef	0.492 g	0.0147 f	0.240 e	1.27 g	0.0590 gh
	30	368.26 d	55.21 f	0.494 g	0.0185 de	0.210 gh	1.44 fg	0.0572 gh
	60	380.48 d	58.80 cde	0.495 g	0.0217 b	0.293 d	1.74 ef	0.0634cde
	90	426.20 b	61.40 bc	0.528 def	0.0285 a	0.357 b	2.10 cde	0.0687 ab
2.5	0	378.18 d	56.16 ef	0.501 g	0.0146 f	0.201 i	1.47 fg	0.0565 h
	30	381.53 cd	56.93 ef	0.495 g	0.0188 de	0.204 hi	1.56 fg	0.0570 h
	60	385.28 cd	58.64 cde	0.520 f	0.0216 b	0.291 d	1.76 ef	0.0638cde
	90	429.42 b	60.84 bcd	0.542 cd	0.0276 a	0.353 b	2.14 cde	0.0675 ab
5	0	381.40 cd	57.17 ef	0.518 f	0.0147 f	0.213 g	1.52 fg	0.0587 gh
	30	382.32 cd	57.75 ef	0.520 f	0.0167 ef	0.191 j	1.79 ef	0.0599fgh
	60	397.83 c	60.78 bcd	0.532 cdef	0.0183 de	0.217 fg	2.06 de	0.0668abc
	90	428.20 b	63.39 ab	0.545 c	0.0204 be	0.317 c	2.14 cde	0.0697 a
10	0	384.33 cd	58.54 cde	0.531 cdef	0.0148 f	0.214 g	2.22 cd	0.0607efg
	30	438.30 b	58.80 cde	0.533 cdef	0.0147 f	0.192 j	2.62 ab	0.0629def
	60	469.66 a	62.67 ab	0.538 b	0.0151 f	0.214 g	2.66 ab	0.0693 a
	90	483.68 a	64.62 a	0.614 a	0.0175 e	0.288 d	2.89 ab	0.0703 a
20	0	375.48 d	56.45 ef	0.525 ef	0.0150 f	0.222 f	2.21 cd	0.0574 gh
	30	378.39 d	57.71 ef	0.538 cde	0.0188 de	0.313 c	2.50 bc	0.0590 gh
	60	379.13 d	58.54 de	0.595 b	0.0297 a	0.353 b	2.70 ab	0.0655bcd
	90	381.78 cd	58.84 cde	0.614 a	0.0283 a	0.410 a	2.96 a	0.0688 ab

* مقادیر دارای حروف مشابه در هر ستون، نشان‌دهنده نبود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱درصد می‌باشند.

* Values followed by the same letter within a column indicate they are not significantly different ($p < 0.01$).

نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان داد که ۵- آمینولولینیک اسید بر میزان آنتوسیانین شاخساره و کالوس اثر معنی‌داری نشان داد و تنش شوری اثر مؤثری در افزایش مقدار آنتوسیانین ریزنمونه‌ها داشت و بیشترین مقدار آن در تنش شوری ۹۰ میلی‌مولار حاصل شد و اثرات متقابل آن‌ها بر ریزنمونه‌های مورد بررسی معنی‌دار بود ($p\leq ۰/۰۱$). افزایش آنتوسیانین ریزنمونه کالوس در پاسخ به تنش شوری بیشتر از ریزنمونه‌های شاخساره

بود. کاربرد ۵ (ریزنمونه کالوس) و ۱۰ میکرو مولار ۵- آمینولولینیک اسید (ریزنمونه شاخساره) موجب افزایش آنتوسیانین تحت تأثیر تمام تیمارهای شوری تا دو برابر در مقایسه با ریزنمونه شاهد شد (جدول‌های ۲ و ۴). هر چهار غلظت مورد بررسی ۵- آمینو لوولینیک اسید در افزایش مقدار آنتوسیانین ریزنمونه‌های کالوس تحت شرایط تنش نسبت به عدم استفاده این ترکیب به‌طور معنی‌داری مؤثر بوده است و این اثرگذاری در غلظت ۵ میکرومولار بارزتر بوده است. با افزایش شوری مقدار آنتوسیانین‌ها نیز افزایش یافته است. افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز بر اثر تنش شوری می‌تواند علتی بر افزایش آنتوسیانین باشد.Rosso & Mercadante (2007) نیز گزارش کرده‌اند که اضافه نمودن قندها و نمک‌ها اثر منفی بر پایداری آنتوسیانین دارد. بنابراین تنش شوری از طریق القای اسمزی می‌تواند موجب القای تجمع آنتوسیانین گردد. افزایش تجمع آنتوسیانین در ژنوتیپ‌های مختلف سیب تحت تأثیر ۵- آمینو لوولینیک اسید پیشتر توسط Xu *et al.* (2013) و Wang *et al.* (2006) نیز گزارش شده است. Xu *et al.* (2013) گزارش کرده‌اند که غلظت بهینه ۵- آمینو لوولینیک اسید برای افزایش سنتز آنتوسیانین در سیب بستگی به ژنوتیپ و عوامل محیطی دارد. Van-nocker *et al.* (2012) نیز نتایج مشابهی گزارش کرده‌اند. اگرچه افزایش تجمع آنتوسیانین تحت تأثیر ۵- آمینو لوولینیک اسید به افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌الانین آمونیالیاز نسبت داده می‌شود اما مکانیسم دقیق نحوه اثرگذاری این ترکیب بر سنتز آنتوسیانین هنوز مشخص نیست (Xu *et al.*, 2013). لازم به ذکر است که افزایش ۵- آمینو لوولینیک اسید تا حدی فرآیند بیوسنتز آنتوسیانین را بهبود می‌بخشد. بسته به نوع بافت و شرایط فیزیولوژیکی سلول افزایش بیش از حد آستانه تحمل این ترکیب نه تنها سبب افزایش بیوسنتز آنزیم و ترکیبات مؤثره مرتبط نمی‌شود، بلکه سبب کاهش تولید این ترکیبات نیز می‌شود این مورد نه تنها در ۵-آمینو لوولینیک اسید، بلکه در مورد سایر محرک‌ها از جمله متیل جاسمونات و شوری نیز صدق می‌کند (Samadi *et al.*, 2014).

افزایش غلظت ۵- آمینو لوولینیک اسید در محیط کشت سبب افزایش مقدار فلاونوئیدها گردید که مقدار آن در پایه بوداگوسکی نه ۲۷۵/۵ میلی‌گرم در گرم وزن تر بود. تنش شوری موجب افزایش قابل توجهی در فلاونوئیدهای ژنوتیپ مورد مطالعه شد. اعمال تنش شوری و تیمار ۵- آمینو لوولینیک اسید در کنار یکدیگر اثر افزایشی بر مقدار فلاونوئیدها داشته و بیشترین مقدار در تنش شوری ۹۰ میلی‌مولار و ۵- آمینو لوولینیک اسید ۱۰ میکرومولار حاصل شد که تفاوت معنی‌داری با غلظت‌های ۵ و ۲۰ میکرومولار نداشت. در این مطالعه نتایج اثرگذاری مثبت ۵- آمینو لوولینیک اسید بر مقدار فلاونوئیدهای سیب بوداگوسکی نه تحت تنش شوری از طریق افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و ترکیبات فنلی بوده است (جدول‌های ۱ و ۳). ۵- آمینو لوولینیک اسید محرک تجمع پلی‌فنول‌ها، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌هاست که این ماده می‌تواند با محتوی کلروفیل، کربوهیدرات و فعالیت آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز فلاونوئیدها مرتبط باشد (Xie *et al.*, 2013). افزایش ترکیبات فلاونوئیدی تحت تأثیر تنش شوری توسط محققین متعددی گزارش شده است (Navarro *et al.*, 2006; Hichema *et al.*, 2009). سنتز این ترکیب‌ها در گیاهان به بافت و اندام وابسته است و توسط عوامل محیطی، سن و سبزینه گیاه تحت تأثیر قرار می‌گیرد. ژن‌های بیوسنتز فلاونوئیدها در وضعیت تنش، تحریک می‌شوند تا رادیکال‌های آزاد را در محل تولیدشان قبل از این‌که به سلول آسیب برسانند خنثی کنند (Xie *et al.*, 2013).

در این پژوهش افزایش ترکیبات فنلی تحت تأثیر ۵-آمینو لوولینیک اسید در هر دو ریزنمونه پایه بوداگوسکی نه مشاهده شد نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان داد که افزایش غلظت ۵- آمینو لولینیک اسید تا ۱۰ میکرومولار در پایه بوداگوسکی نه با افزایش معنی‌دار فنل کل ریزنمونه‌ها همراه بود اما غلظت بالاتر این ترکیب (۲۰ میکرومولار) موجب کاهش فنل کل حتی به مقدار کمتر از نمونه‌های شاهد شد. در این مطالعه غلظت بالای ۵- آمینو لوولینیک اسید موجب کاهش مقدار فنل کل ریزنمونه‌ها گردید. مقدار فنول ریزنمونه‌های شاخساره

و کالوس با افزایش سطح شوری تا ۹۰ میلی‌مولار افزایش یافت. در تمام سطوح تنش شوری استفاده از ۵- آمینو لوولینیک اسید در غلظت‌های بین ۲/۵ تا ۱۰ میکرومولار موجب افزایش معنی‌دار فنل کل ریزنمونه‌ها شد اما غلظت بالاتر این ترکیب (۲۰ میکرومولار) تأثیری در افزایش فنل کل ریزنمونه‌ها نسبت به شاهد نداشت (جدول‌های ۲ و ۴). کاهش مقدار فنل در با غلظت‌های بالای ۵- آمینولوولینیک اسید را می‌توان به‌دلیل القای تنش اکسیداتیو تحت غلظت‌های بالای ۵-آمینو لوولینیک اسید نسبت داد. Akram *et al.* (2012) گزارش کرده‌اند که ۵- آمینو لوولینیک اسید اثری بر مقدار ترکیبات فنلی گیاه آفتابگردان تحت تنش نداشته است (Balestrasse *et al.*, 2010; Pattanayak *et al.*, 2011). با توجه به نقش ترکیبات فنلی در کاهش و یا مهار اتواکسیداسیون لیپیدها، جاروب‌کردن رادیکال‌های آزاد، خاموش نمودن اکسیژن یکتائی یا تجزیه پراکسیدها، این ترکیبات به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان ضروری برای حفاظت علیه تکثیر و پیشروی زنجیره اکسیداتیو و دفاع علیه گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌نمایند (Kasuri *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2010). نتایج حاصل از افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و افزایش تولید ترکیبات فنلی به عنوان پاسخ دفاعی در شرایط شوری در این آزمایش با پژوهش‌های بسیاری مطابقت دارد (Navarro *et al.*, 2006; Hichema *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2012).

نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان داد که کاربرد غلظت ۱۰-۵ میکرومولار ۵- آمینولولینیک اسید موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در شاخساره (۶۴/۶۲٪) و کالوس (۶۳/۲۶٪) سیب پایه بوداگوسکی نه شد (جدول‌های ۲ و ۴). تنش شوری ملایم (۳۰ میلی‌مولار) و متوسط (۶۰ میلی‌مولار) تأثیر قابل توجهی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریزنمونه‌های شاخساره سیب مورد مطالعه نداشت، با این حال تنش شوری شدید (۹۰ میلی‌مولار) موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی گردید به‌عبارت دیگر افزایش تنش شوری تا غلظت ۹۰ میلی‌مولار همراه با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی بوده است (جدول‌های ۲ و ۴). فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریزنمونه‌های کالوس و شاخساره به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر شوری و تیمار ۵- آمینولولینیک اسید قرار گرفتند ($p\leq ۰/۰۱$). تنش شوری و تیمار آمینو لوولینیک اسید با غلظت ۵ میکرومولار همراه با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود. در این بررسی تیمار ۵- آمینو لوولینیک اسید در هر دو ریزنمونه همراه با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود که این افزایش می‌تواند به‌دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان فنیل‌آلانین آمونیالیاز، سوپر اکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز باشد. Yoshida *et al.* (2003) میزان اثرگذاری ۵- آمینو لوولینیک اسید بر سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه را وابسته به غلظت گزارش کرده‌اند که در غلظت‌های پایین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و همچنین افزایش سنتز ترکیبات آنتی‌اکسیدانی تقویت می‌کند. غلظت‌های بالاتر ۵- آمینو لوولینیک اسید در یک pH فیزیولوژیکی تحت تأثیر واکنش‌های اکسیداسیون هوازی قرار گرفته و تولید رادیکال‌های آزاد سوپر هیدروکسید، هیدروکسیل و هیدروژن پراکسید می‌کند که سبب تشدید اثر تنش می‌گردد (Balestrasse *et al.*, 2010). ۵- آمینو لوولینیک اسید در غلظت‌های پایین به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان در واکنش‌های سازگاری به تنش‌های زیستی و غیر زیستی در گیاهان عمل کرده و سبب فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌گردد که رادیکال‌ها را جمع‌آوری و از بین می‌برد (Xu *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان با تحمل تنش رابطه مستقیم دارد. افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی تحت تنش شوری در شرایط درون شیشه‌ای در گیاهان مختلف گزارش شده است. هم‌چنین زمانی‌که میان تولید انواع واکنشگر اکسیژن و سیستم آنتی‌اکسیدانی برای دفع مولکول‌های رادیکال آزاد تعادل برقرار باشد، از صدمه اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک جلوگیری می‌شود (Xu *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014).

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که استفاده از ۵- آمینولولینیک اسید موجب افزایش فعالیت آنزیم

فنیل‌آلانین آمونیالیاز شد. بیشترین فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در پایه بوداگوسکی نه در تنش شوری ۹۰ میلی‌مولار و غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکرومولار ۵- آمینو لوولینیک اسید بود. استفاده از ۵- آمینو لوولینیک اسید تحت شرایط تنش شوری اثر هم‌افزایی معنی‌داری بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز داشت و با افزایش شدت تنش و غلظت استفاده شده از ۵- آمینو لوولینیک اسید این افزایش بارزتر بود (جدول‌های ۲ و ۴). هم‌چنین بررسی اثر متقابل تنش شوری و ۵-آمینو لوولینیک اسید بیانگر آن است که این دو تیمار موجب افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز گردید. Wang *et al.* (2006) نیز اثر افزایشی ۵- آمینو لوولینیک اسید بر ترکیبات حاصل از فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز را در سیب گزارش کرده‌اند. ۵- آمینولولینیک اسید موجب تعدیل بیان فنیل‌آلانین آمونیالیاز می‌شود که آنزیم کلیدی در مسیر فنیل پروپانوئید است (Xu *et al.*, 2013). ۵-آمینو لوولینیک اسید به‌عنوان یک جز پیام‌رسان کلیدی در فعال‌سازی پاسخ‌های اختصاصی دفاعی گیاه شناخته می‌شود و در جایگاه ترکیب القا کننده تنش، مسیر سیگنالیگ را فعال نموده و سبب افزایش رونویسی mRNA خاص آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز شده که منجر به پاسخ های دفاعی گیاه و بیوسنتز و تجمع ترکیبات فنولیک می‌گردد (Xu *et al.*, 2013).

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در واکنش به تیمار ۵- آمینو لوولینیک اسید، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز افزایش و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در ریزنمونه‌های شاخساره و کالوس کاهش یافت (جدول‌های ۲ و ۴). در هر دو ریزنمونه فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز با افزایش ۵- آمینولولینیک اسید به ۱۰ میکرومولار تحت تأثیر تمام سطوح شوری کاهش یافت اما فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز افزایش یافت (جدول‌های ۲ و ۴). اثرات متقابل شوری و ۵- آمینولوولینیک اسید بیانگر آن است که فعالیت آنزیم‌های اندازه‌گیری شده در پاسخ به تنش شوری در تیمار با ۵- آمینولولینیک اسید در ریزنمونه‌های شاخساره و کالوس افزایش یافت ولی فعالیت آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز تغییر کمی نشان دادند (جدول‌های ۲ و ۴). نتایج این پژوهش هم در راستای مطالعات قبلی بوده است و موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گونه‌های مختلف گیاهی شده است (Yang *et al.*, 2014; Kanto *et al.*, 2015).

Akram *et al.* (2013) نیز تفاوت در واکنش ریزنمونه‌ها و گونه‌های مختلف گیاهی به تیمار خارجی ۵- آمینو لوولینیک اسید را گزارش کرده‌اند. افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و کاهش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در ریزنمونه‌های شاخساره و کالوس در واکنش به تیمار ۵- آمینو لوولینیک اسید نشان می‌دهد که اثرات این تیمار به واکنش ریزنمونه‌ها (شاخساره و کالوس) و نوع آنزیم بستگی دارد (جدول‌های ۲ و ۴). مکانیسم آنتی‌اکسیدانی موجب افزایش تحمل به تنش شوری می‌شود و تغییرات زیادی در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان تحت تنش شوری ایجاد می‌شود (Meratan *et al.*, 2008). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، یک سیستم پاکسازی[1] است که خط دفاعی اولیه را در حفاظت پایه بوداگوسکی نه در مقابل آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش شوری تشکیل می‌دهد. در این پژوهش آنزیم‌ها پاسخ‌های متفاوتی نسبت به کاربرد ۵- آمینولولینیک اسید در شرایط تنش شوری نشان دادند. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گونه‌های گیاهی مختلف در پاسخ به تیمار ۵- آمینولولینیک اسید گزارش شده است (Li *et al.*, 2011; Zhen *et al.*, 2012).

Wang *et al.* (2013) نیز تفاوت در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ریزنمونه‌های مختلف در برابر تنش را گزارش کرده‌اند. کاهش فعالیت آنزیم‌ها تحت تنش شوری ممکن است به علت‌های مختلفی مانند تخریب پروتئین‌های آنزیمی با القای پروتئازهای درونی بر اثر شوری، افزایش میزان رادیکال‌های آزاد و سمیت ناشی از افزایش آن‌ها باشد (Hashemi *et al.*, 2010). از سوی

1. Scavenging system

دیگر، القا یا افزایش فعالیت آنزیم‌ها در گیاهان در معرض تنش شوری ممکن است به‌علت بیوسنتز آنزیم‌های جدید باشد (Feierabend & Dehne, 1996).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این بررسی نشان داد که تنش شوری اثر منفی بر فعالیت فیزیولوژیکی هر دو ریزنمونه شاخساره و کالوس داشت و میزان اثرگذاری ۵-آمینولولینیک اسید بر فعالیت‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ریزنمونه‌های مورد بررسی وابسته به غلظت آن بود و غلظت بالاتر ۵-آمینو لوولینیک اسید (۲۰ میکرومولار) سبب تشدید اثر منفی تنش شوری گردید. هم‌چنین میزان افزایش فعالیت آنزیم‌ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی تحت تأثیر آمینو لوولینیک اسید در ریزنمونه‌های شاخساره بیشتر از کالوس بود. ۵-آمینو لوولینیک اسید اثر معنی‌داری در افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و رنگیزه‌های فتوسنتزی داشت، بنابراین به‌عنوان یک ترکیب تعدیل‌کننده تنش شوری می‌تواند مورد توجه قرار بگیرد.

REFERENCES

1. Akram, N. A., Ashraf, M. & Al-Qurainy, F. (2012). Aminolevulinic acid-induced changes in some key physiological attributes and activities of antioxidant enzymes in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants under saline regimes. *Scientia Hort*iculturae, 142, 143-148.
2. Akram, N. A. & Ashraf, M. (2013). Regulation in plant stress tolerance by a potential plant growth regulator, 5-aminolevulinic acid. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(3), 663-679. DOI 10.1007/s00344-013-9325-9.
3. Alizadeh, A., Xlilova, X. & Eivazi, A. (2011). Biochemical response of apple dwarf rootstock to salinity stress. *Technical journal of Engineering and applied sciences*, 1, 118-124.
4. Al-Khateeb, A. A, Al-Khateeb, S. A. Okawara, R. & Al-Abdoulhady, I. A. (2006). Promotive effects of 5-aminolevulinic acid on fruit yield and quality of date palm cv Khs. *Biological Science*, 6, 1118-1121.
5. Balestrasse, K. B., Tomaro, M. L., Batlle, A. & Noriega, G. O. (2010). The role of 5-aminolevulinic acid in the response to cold stress in soybean plants. *Phytochemistry*, 71, 2038-2045.
6. Beaudion-Eagan, L.D. & Thorpe, T.A. (1989). Tyrosine and phenylnine ammonialyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures. *Plant Physiology*, 78, 438-441.
7. Beyer, W. F. & Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 161, 559-566.
8. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical *Chemistry*, 72, 248-254.
9. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebenson Wiss Technologie*, 28, 25-30.
10. Chance B. & Maely, A. C. (1955). Assay of catalase and peroxidases. *Methods in Enzymology*. 2, 764 -775
11. Chang, C., Yang, M., Wen, H. & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Food and Drug Analysis*, 10, 178-182.
12. Feierabend, J. & Dehne, S. (1996). Fate of the porphyrin cofactors during the light dependent turnover of catalase and of the photosysem II reaction center protein DI in mature rye leaves. *Planta*, 198(3), 413-422.
13. Flurky, W. H. (1986). Polyphenol oxidase in higher plants. *Plant physiology*, 81, 614-618.
14. Folin, O. & Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophan determination in proteins. *Journal of Biology and Chemistry*, 27, 627-650.
15. Gibon, Y., Sulpice, R. & Larher, F. (2000). Proline accumulation in canola leaf discs subjected to osmotic stress is related to the loss of chlorophylls and to the decrease of mitochondrial activity. *Physiologia Plantarum*, 4, 469-476.
16. Guisti, M. M. & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, (F1.21-F1.2.13). New York: John Wiley & Sons.
17. Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes. In: Douce R, Packer L (eds) Methods Enzymol 148. Academic Press Inc. New York: pp. 350-382
18. Hashemi, S., Asrar, Z. & Pourseyedi, S. (2010). Effects of seed pretreatment by salicylic acid on growth and some physiological and biochemical parameters in *Lepidium sativum*. *Iranian Journal of Plant Biology*, 2(2), 1-10.

19. Hichema, H., Mounir, D. & Naceurc, E. A. (2009). Differential responses of two maize (*Zea mays* L.) varieties to salt stress: Changes on polyphenols composition of foliage and oxidative damages. *Industrial Crops and Products*, 30, 144-151.
20. Jakopic, J., Veberic, R. & Stampar, F. (2007). The effect of reflective foil and hail nets on the lighting, color and anthocyanins of 'Fuji'. *Scientia Horticulturae*, 115, 40-46.
21. Jamil, M., Rehman, S. H. & Rha, E. S. (2007). Salinity effect on plant growth, psii photochemistry and chlorophyll content in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and cabbage (*Brassica Oleracea Capitata* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 39, 753-760
22. Kanto, U., Jutamanee, K., Osotsapar, Y., Chai-arree, W. & Jattupornpong, S. (2015). Promotive effect of priming with 5- aminolevulinic acid on seed germination capacity, seedling growth and antioxidant Enzyme activity in rice subjected to accelerated ageing treatment. *Plant Production Science*, 18, 443-454.
23. Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, M., Grignon, C. & Abdelly, C. (2007). Salinity effect on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritime*. *Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 45, 244-248.
24. Liu, D. M., Zhang, J., Sun, W. J., Li, Q., Dai, A. H. & Bai, J. G. (2011). 5-Aminolevulinic acid pretreatment mitigates drought stress of cucumber leaves through altering antioxidant enzyme activity. *Scientia Horticulturae*, 130, 820-828.
25. Lim, J. H., Park, K. J., Jeong, J. W. & Kin, K. J. (2012). Effect of salinity stress on phenolic compounds and carotenoids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) sprout. *Food chemistry*, 135, 1065-1070.
26. Lobon, N. C. Gallego, J. C. A., Diaz, T. S. & Garcia, J. C. E. (2002). Allepopathyic potential of Cistrus landanifer chemicals in response to variation of light and temperature. *Chemoecology*, 12, 139-143.
27. Meratan, A., Ghaffari, S. M. & Niknam, V. (2008). Effects of salinity on growth, proteins and antioxidant enzymes in three *Acanthophyllum* species of different ploidy levels. *Journal of Undergraduate Science & Technology*, 33, 1-8.
28. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15, 473-497.
29. Nahar, S. J. & Shimazaki, K. (2014). Application of 5-aminolevulinic Acid for the *in vitro* Micropropagation of *Cymbidium* as a potential novel plant regulator. *Environmental Control in Biology*, 52, 117-121
30. Nakano, Y. & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22, 867-880.
31. Navarro, J. M., Flores, P., Garrido, C. & Martinez, V. (2006). Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chemistry*, 96(1), 66-73.
32. Nikolskii-Gavrilov, I., Landeros-Sanchez, C., Pcios-Velez, O. L. & Henandez-Perez, J. M. (2015). Impact of climate change on salinity and drainage of irrigated lands in Mexico. *Agriucultural Science*, 7, 197-204.
33. Noreen, Z. & Ashraf, M. (2009). Assessment of variation in antioxidative defense system in salt treated pea (*Pisum sativum* L.) cultivars and its putative use as salinity tolerance markers. *Plant Physiology*, 166, 1764-1774.
34. Pattanayak, G. K. & Tripathy, B. C. (2011). Overexpression of protochlorophyllide oxidoreductase C regulates oxidative stress in Arabidopsis. *PLoS ONE*, 6: e26532.
35. Putter, J. (1974). "Peroxidase" Methods of enzymatic analysis, *Academic Press New York*, pp. 685-690.
36. Rai, M. K., Kalia, R. K., Singh, R., Gangola, M. P. & Dhawan, A. K. (2011). Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection- An overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany*, 71, 89-98.
37. Rosso, V. V. & Mercadante, A. Z. (2007). Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 347-352.
38. Samadi, S., Ghasemnezhad, A. & Alizadeh, M. (2014). Investigation on phenylalanine ammonia-lyase activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) affected by methyl jasmonate and salicylic acid in in-vitro conditions. *Journal of Plant Production Research*, 21 (4), 135-148.
39. Shiyab, M. S., Shibli, R. A. & Mohammad, M. M. (2003). Influence of sodium chloride salt stress on growth and nutrient acquisition of sour orange *in vitro*. *Plant Nutrition*, 26, 985-996.
40. Singh, R., Rastogi, S. & Dwivedi, U. N. (2010). Phenylpropanoid metabolism in ripening fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 398-416.
41. Sun, Y. P., Zhang, Z. P. & Wang, L. J. (2009). Promotion of 5- aminolevulinic acid treatment on leaf photosynthesis is related with increase of antioxidant enzyme activity in watermelon seedlings grown under shade condition. *Photosynthetica*, 47, 347-354.

42. Tanaka, Y., Tanaka, A. & Tsuji, H. (1992). Stabilization of apoproteins of light-harvesting chlorophyll-a/b protein complex by feeding 5-aminolevulinic acid under intermittent illumination. *Plant Physiology and Biochemistry*, 30, 365-370
43. Van Nocker, S., Berry, G., Najdowski, J., Michelutti, R., Luffman, M., Forsline, P., Alsmairat, N., Beaudry, R., Nair, M. G. & Ordidge, M. (2012). Genetic diversity of red-fleshed apples (Malus). *Euphytica*, 185(2), 281-293.
44. Wang, J. J., Jiang, W. B. & Huang, B. J. (2004). Promotion of 5-aminolevulinic acid on photosynthesis of melon (*Cucumis melo*) seedlings under low light and chilling stress conditions. *Plant Physiology*, 121, 258-264.
45. Wang, J. W., Zheng, L. P., Wu, J. Y. & Tan, R. X. (2008). Involvement of nitric oxide in oxidative burst phenylnine ammonia-lyase activation and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. *Nitric Oxide Biology and Chemistry*, 15, 351-358.
46. Xie, L., Wang, Z. H., Cheng, X. H., Gao, J. J., Zhang, Z. P. & Wang, L. J. (2013). 5-Aminolevulinic acid promotes anthocyanin accumulation in Fuji apples. *Plant Growth Regulation*, 69, 295-303.
47. Xu, F., Chang, J., Cheng, S.Y., Zhu, J., Li, L. L., Wang, Y. & Cheng, H. (2013). Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on the antioxidant system in Ginkgo biloba leaves. *African Journal of Biotechnology*, 8, 3769-3776.
48. Yang, Z., Chang, Z., Sun, L., Yu, J. & Huang, B. (2014). Physiological and metabolic effects of 5-aminolevulinic acid for mitigating salinity stress in creeping bentgrass. *PLoS ONE*, 9(12), e116283.
49. Yoshida, R., Fukuta, Y., Watanabe, S. & Tanaka, T. (2003). Physiological function of 5-ALA in leaf vegetable is related to AsA-GSH pathway. *Japan Society of Coordination Chemistry*, 38, 70-77.
50. Youssef, T. & Awad, M. A. (2008). Mechanisms of enhancing photosynthetic gas exchange in date palm seedlings (*Phoenix dactylifera* L.) under salinity stress by a 5-aminolevulinic acid-based fertilizer. *Plant Growth Regulation*, 27, 1-9.
51. Zhen, A., Bie, Z. L., Huang, Y., Liu, Z. X. & Fan, M. L. (2012). Effects of 5 aminolevulinic acid on the H_2O_2-content and antioxidative enzyme gene expression in NaCl-treated cucumber seedlings. *Biologia Plantarum*, 56(3), 566-570.
52. Zhao, G. Q., Ma, B. L. & Ren, C. Z. (2007). Growth, gas exchange, chlorophyll fluorescence, and ion content of naked oat in response to salinity. *Crop Science*, 47, 123-131.