



Wpływ związków fenolowych na rozwój pąków kątowych podkładki jabłoni M7 w warunkach *in vitro*

Ewa Plażuk, Krystyna Kromer

Ogród Botaniczny, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław

Influence of the phenol substances on shoot buds development of apple rootstock M7 in tissue culture

Summary

The *in vitro* culture of the apple-tree rootstock M7 was established from apical and lateral shoot meristems as initial explants. The growth of lateral buds, which leads to branch development is limited by the apical dominance. The effect of exogenous growth regulators on axillary bud stimulation was examined. Additionally, the relationship between the position of axillary buds on the stem and their potential growth were investigated. The results indicate that buds from the upper region, near the shoot apex, developed better in comparison with those located below. The participation of endogenous inhibitor of gradient distribution in stem is suggested. We analysed the possible role of phenolic compounds on the initiation and growth stimulation of axillary buds. Several phenols which are known to be specific for apple rootstock M7 was examined to evaluate their effect on bud development.

Key words:

phenols, fitohormons, axillary buds, the apple-tree rootstock M7 *in vitro* culture.

Adres do korespondencji

Krystyna Kromer,
Pracownia Kultur
Tkankowych,
Ogród Botaniczny,
Uniwersytet Wrocławski,
ul. Sienkiewicza 23,
50-335 Wrocław.

1. Wprowadzenie

Polifenole należą do zróżnicowanej grupy połączeń aromatycznych zaliczanych do metabolitów wtórnych, których znaczenie w fizjologii roślin nie zostało poznane. Funkcje związków fenolowych badacze wiążą z inhibicją wzrostu (1-3). Niektóre związki fenolowe, a w szczególności kwasy fenolowe są uznawane

za inhibitory kiełkowania nasion (4). Występujący u wątrobowców kwas lunularowy zastępuje nieobecny u tych roślin kwas absycynowy i pełni rolę hormonu spoczynku (5). Wiele fenoli ma działanie allelopatyczne, np. florydżyna. Związki te wydzielane do gleby, hamują rozwój innych roślin w swoim otoczeniu (6).

Wielu badaczy stara się wyjaśnić rolę substancji fenolowych obecnych w pąkach śpiących (7-9). W zahamowanych pąkach, a głównie w ich primordiach liściowych notowano nagromadzenie fenoli, takich jak: naringenina (10), florydżyna (11), kwas kawowy (12) oraz kwercytryna (13). Prunina odnajdywana w uśpionych pąkach brzoskwini, jak podaje Erez i Lavee (7) wykazuje hamujące działanie w teście elongacji koleoptyli pszenicy. Niektórzy badacze (14) wykazywali, że przerwaniu spoczynku pąków towarzyszył obniżony poziom endogennych fenoli, natomiast inni (15,16) nie wiązali związków fenolowych z procesem spoczynku.

Pędy podkładki jabłoni M7 w warunkach *in vitro* syntetyzują szereg fenoli (17), które mogą odpowiadać za jej słaby wzrost wydłużeniowy oraz silną dominację wierzchołkową, związaną z korelacyjnym hamowaniem pąków pachwinowych.

Dużym zainteresowaniem cieszą się związki fenolowe występujące w owocach lub też w nasionach (18). Odnotowano zmiany w zawartości florydżyny w czasie rozwoju nasion u jabłoni (19). Podobnie pewne fluktuacje w stężeniu tego związku wiąże się z rozwojem korzeni przybyszowych u podkładek jabłoni (17). W literaturze można znaleźć doniesienia o wahaniach w ilości endogennych fenoli u jabłoni podczas sezonu wegetacyjnego (20). Jednakże brakuje danych na temat ewentualnej roli fizjologicznej związków fenolowych występujących w pędach u tego gatunku.

Wielu badaczy wykazało (21-23), że związki fenolowe wpływają na rozwój roślin. U gatunków *Malus* jednym z ważniejszych fenoli endogennych jest florydżyna. Jones donosi (24), że florydżyna stymuluje wzrost pędów jabłoni. Podobny pozytywny wpływ florydżyny oraz produktu jej degradacji – floroglucynolu wykazano u jabłoni podczas rozwoju liści (24) oraz ukorzenia pędów (25).

2. Materiały i metody

Kultury *in vitro* podkładki jabłoni M7 (*Malus pumila* Mill.) wyprowadzono z merystemów wierzchołkowych oraz lateralnych pędu wyszczepianych na pożywkę QL wg Quoirin i Lepoivre (26) zawierającą dodatkowo kinetynę (KIN 0,2 mg/dm³) oraz kwas indoliloctowy (IAA 0,2 mg/dm³). Pędy rozwijające się z merystemów przenoszono na pożywkę Quoirin-Lepoivre zawierającą mikroelementy wg Murashige i Skoog (27), sacharozę (20 g/dm³), agar (8 g/dm³) oraz odpowiednio dobrane stężenia fitohormonów zaproponowane przez Kromer (28): 6-benzyladenina (BA 0,5 mg/dm³), kwas indolilomasłowy (IBA 0,1 mg/dm³), kwas giberelinowy (GA₃ 2 mg/dm³). Pożywkę tę stosowano jako optymalną do mikrorozmnażania poprzez podział pędów i stymulację rozwoju pąków zlokalizowanych w pachwinach liści.

Zjawisko dominacji wierzchołkowej analizowano w dwóch systemach doświadczalnych, a mianowicie inicjując rozwój pąków podwierzchołkowych po odcięciu wierzchołka oraz stymulując rozwój pąków pachwinowych w kulturach pojedynczych węzłów. Prześledzono wpływ wieku plastochronowego na rozwój pąków kątowych z izolowanych fragmentów jednowęzłowych. Pędy (dł. 2,5 cm) podzielono na strefy: podwierzchołkową zawierającą węzły od VI (pierwszy możliwy do izolacji węzeł) do VIII, środkową (węzły VIII-XII) oraz bazalną (węzły XIII-XVI).

Endogenne fenole ekstrahowano ze świeżego materiału roślinnego na podstawie Amorim i wsp. (29). Ekstrakty etanolowe frakcjonowano octanem etylu i uzyskiwano frakcję octanową oraz wodną. Rozdział poszczególnych fenoli przeprowadzono przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej (TLC) stosując układy: BAW dla frakcji wodnej i 5% kwas octowy dla frakcji octanowej. Identyfikację związków fenolowych prowadzono na podstawie ich barwy i fluorescencji pod wpływem promieniowania UV oraz zmian we fluorescencji po amoniaku i po $AlCl_3$. W analizie jakościowej wykorzystywano ponadto charakterystyczne reakcje barwne opisane przez Harborne (30).

Całkowitą zawartość związków fenolowych w ekstraktach, w poszczególnych frakcjach oraz eluatach po rozdziale TLC oznaczano opierając się na metodzie Folina i Denisa (31) przy użyciu odczynnika opracowanego przez Folina i Ciocalteu (32). Całkowitą zawartość związków fenolowych określano też z zastosowaniem błękitu pruskiego wg metody podanej przez Budini i wsp. (33). Ilość florydżyny i tanin określono za pomocą reakcji barwnej z waniliną, którą Swain i Hills (34) stosowali do oznaczania proantocyjanidyn, a McMurrough i Dowell (35) do oznaczania dihydrochalkonów. Jako katalizatora użyto kwasu siarkowego zgodnie z metodyką jaką przyjęli Goldstein i Swain (36). Zawartość tanin oraz katechiny i epikatechiny oznaczano na podstawie reakcji barwnej przy użyciu aldehydu p-dimetyloaminocynamonowego (35).

Analizowano wpływ kilku fenoli: florydżyny, floretyny, kwasu chlorogenowego, katechiny i kwercetyny na rozwój pędów podkładki jabłoni M7 z pąków pachwinowych w warunkach kultury *in vitro*. Substancje te stosowano w dawkach: 5, 10, 20, 50 i 100 μM w pożywce QL. Badano wybijanie pąków w hodowli jednowęzłowych fragmentów pędów oraz rozwój pąków podwierzchołkowych na zdekapitowanych pędach.

3. Wyniki i dyskusja

W badaniach wykazano, że rozwijające się pąki pachwinowe podkładki jabłoni M7 w hodowli *in vitro* cechuje niejednakowe tempo wzrostu. Wbrew przewidywaniom wynikającym ze zjawiska dominacji wierzchołkowej najszybciej i najintensywniej rozwijają się pędy z najmłodszych pąków, co wiąże się prawdopodobnie ze zwiększoną wrażliwością młodych tkanek na stymulatory wzrostu podawane w po-

żywe. Niejednakowe zdolności do rozwoju pąków zależne od ich położenia na pędzie, a zatem wieku plastochronowego stwierdzili także Miguel i wsp. (37), badając u *Lupinus angustifolius* rozwój pędów z pąków pochodzących z różnych regionów pędu. Pąki boczne podlegające korelacyjnej inhibicji zapadają w uśpienie krótko po uformowaniu ich na wierzchołku, bądź po krótkim czasie rozwoju. Po zabiegach znoszących dominację wierzchołkową, bądź po zadziałaniu fitohormonami następuje odblokowanie aktywności mitotycznej (38). Długość oczekiwania na oznaki wzrostu pąków podkładki jabłoni w przeprowadzonych doświadczeniach zależała od rodzaju eksplantatu oraz podania fitohormonów (tab. 1).

Optymalna dla wzrostu pędów pożywka wymagała obecności zarówno cytokiny (BA) jak i ustalonych ilości auksyny (IBA) oraz gibereliny (GA_3), które indukowały wzrost wydłużeniowy pędów. W rozwoju pąków pachwinowych wyróżniono trzy fazy: indukcji, aktywacji wzrostu i elongacji. Po zniesieniu dominacji wierzchołkowej pąki przechodziły fazę latencji, której długość zależna była od aplikacji fitohormonów. Intensywność wydłużania młodych pędów również uwarunkowana była obecnością w pożywce stymulatorów wzrostu (tab. 1).

Po uwolnieniu od dominacji wierzchołkowej pąki na zdekapitowanych pędach rosły szybciej i odznaczały się większą wrażliwością na aplikowane w pożywce stymulatory, niż te hodowane z pojedynczych węzłów (tab. 1). Tłumaczyć to można tym, że pęd poddawany dekapitacji w kulturze *in vitro* jest razem z pożywką źródłem składników żywieniowych niezbędnych do zainicjowania rozwoju i wzrostu. Natomiast jednowęzłowy fragment pędu wyszczepiony *in vitro* bardziej zależny jest od substancji podanych w pożywce. Taki mały eksplantat (2-3 mm), który zawiera węzeł wraz z liściem jest lepszym układem modelowym do badań, i pozwala prześledzić rzeczywisty wpływ substancji aplikowanych w pożywce na rozwój pąków.

Tabela 1

Długość faz rozwoju pąków pachwinowych w hodowli fragmentów jednowęzłowych i na zdekapitowanych pędach na pożywce kontrolnej i zawierającej fitohormony (BA 0,5 mg/dm³, IBA 0,1 mg/dm³, GA_3 2,0 mg/dm³)

pożywka	Faza rozwoju pąków (dni kultury)		
	I – pobudzenie	II – inicjacja wzrostu	III – elongacja
	Rodzaj eksplantatu – Węzły		
QL (kontrola)	5	12	po 14 dniach
QL + fitohormony	3	7	po 10 dniach
	Rodzaj eksplantatu – Zdekapitowane pędy		
QL (kontrola)	3	8	po 10 dniach
QL + fitohormony	2	6	po 7 dniach

W przeprowadzonej analizie związków fenolowych endogennych dla pędów podkładki jabłoni hodowanej w warunkach *in vitro* wykazano stosunkowo wysokie,

jak na metabolity wtórne, nagromadzenie ich w tkankach. Występujące w pędach fenole cechuje różnorodność form: od prostych – kwas chlorogenowy, poprzez połączenia z cukrowcami – florydzyne, glikozydy kwercetyny, po polimery – taniny skondensowane.

Najwięcej związków fenolowych zlokalizowanych jest w najmłodszych, intensywnie rosnących częściach pędu podkładki jabłoni M7 (tab. 2). W młodych primordiach liściowych na wierzchołku pędu odnotowano szczególnie wysokie nagromadzenie wszystkich fenoli z wyraźną przewagą florydzyne. Również Turetskaya i wsp. (39) oznaczali u kilku gatunków roślin fenole w młodych, zielonych tkankach.

Wyróżnione w pędzie podkładki M7 strefy: wierzchołkowa, podwierzchołkowa, środkowa i bazalna charakteryzują się różnicami w stężeniu endogennych fenoli. Całkowita ilość fenoli, w tym również zawartość tanin i florydzyne układa się wzdłuż pędu w gradient malejący wraz z odległością od wierzchołka. Im starsza plastochronowo część pędu, tym mniej zawiera tych związków (tab. 2).

Tabela 2

Zawartość fenoli oznaczana w 4 strefach pędu: wierzchołkowej, podwierzchołkowej, środkowej, bazalnej

Zawartość fenoli ($\mu\text{M/g}$ świeżej masy)			
Strefa pędu	A – całk. fenole ozn. odcz. Folina-Ciocalteu	B – florydzyne i taniny ozn. waniliną	C – taniny ozn. aldehydem p-dimetyloaminocynamonowym
wierzchołkowa	105,6	49	14,5
podwierzchołkowa	75,67	37,23	8,98
środkowa	49,33	21,57	8,26
bazalna	31,67	17,63	3,15
Zawartość fenoli ($\mu\text{M/g}$ świeżej masy)			
Strefa pędu	D – florydzyne obl. z różnicy B-C	E – inne fenole nie ozn. waniliną obl. z różnicy A-B	
wierzchołkowa	34,5	56,61	
podwierzchołkowa	28,25	38,44	
środkowa	13,31	27,76	
bazalna	14,48	14,04	

W badaniach nad rozwojem pędów wykazano, że im więcej fenoli zawiera fragment pędu, tym pąki pachwinowe pochodzące z niego są bardziej reaktywne na fitohormony i odpowiadają silniejszym wzrostem po uwolnieniu ich od dominacji wierzchołkowej. Paradoksalne, jak się wydaje, jest zatem przypisywanie roli inhibitorowej związkom fenolowym, odnajdywanym w wysokich stężeniach w młodych rozwijających się organach.

Aby sprawdzić jak substancje fenolowe endogenne dla pędów podkładki jabłoni M7 wpływają na jej rozwój prowadzono doświadczenia z egzogenną aplikacją wy-

branych fenoli. Określano ich działanie w procesie rozwoju i wzrostu pędów z pąków pachwinowych. Stosowano: florydzynę, floretynę, kwercetynę, katechinę oraz kwas chlorogenowy w różnych stężeniach (5, 10, 20, 50 i 100 μM) w pożywce. Efekt fenoli w testach *in vitro* przede wszystkim zależny był od ich dawki. Wszystkie substancje fenolowe użyte w wysokich koncentracjach (100 μM) wobec braku fitohormonów w pożywce hamowały rozwój pąków, a nawet powodowały zamieranie tkanek. Wpływ testowanych stężeń fenoli zależał także od układu badawczego stosowanego w przełamaniu dominacji wierzchołkowej. Dodawane fenole silniej oddziaływały na pąki z izolowanych fragmentów jednowęzłowych niż na pąki podwierzchołkowe w kulturze całych pędów poddanych dekapitacji. Można to wiązać z silniejszą ekspozycją pojedynczych węzłów na aplikowane w pożywce związki.

Przypuszczalnie fenole ograniczają wzrost osłabiając metabolizm komórkowy (40). Ich efekt zależy od stężenia oraz budowy chemicznej. Niektórzy badacze są zwolennikami teorii, że para- i ortodifenole ujawniają swój inhibitorowy charakter dopiero po konwersji w para- i orto chinony (41). W badaniach potwierdzono, że chinony znacznie silniej hamowały wzrost koleoptyli i korzeni niż odpowiadające im fenole (42). Chinony prawdopodobnie odpowiadają za hamowanie podziałów mitotycznych komórek (43).

Zupełnie inne działanie do notowanego przy wysokich stężeniach aplikowanych fenoli, wywierały substancje te stosowane w niskich koncentracjach – takich jakie odnajduje się w tkankach. Wszystkie badane związki: florydżyna, floretyna, kwercetyna, katechina i kwas chlorogenowy w stężeniach 5, 10 i 20 μM stymulowały rozwój pędów pachwinowych podkładki jabłoni. Efekt ich działania ujawniał się na różnych etapach rozwoju pąków uwalnianych od dominacji wierzchołkowej. Niektóre związki: floretyna i florydżyna skracaly czas inicjacji rozwoju pąków, przyspieszając pierwsze widoczne makroskopowo oznaki wzrostu. Natomiast wpływ innych zastosowanych substancji: kwercetyny, katechiny i kwasu chlorogenowego uwidacznial się w późniejszym okresie hodowli. Wspierały one wzrost elongacyjny młodych pędów pachwinowych, których długość przewyższała znacznie przyrosty pędów kontrolnych (tab. 3).

Tabela 3

Wpływ związków fenolowych (20 μM) w pożywce QL na rozwój pędów podwierzchołkowych na pędach poddanych dekapitacji

Związki fenolowe Czas hodowli	Przyrosty długości pędów (%) (kontrola QL = 100%)				
	QL + floretyna	QL + florydżyna	QL + kwercetyna	QL + kwas chlorogenowy	QL + katechina
2 tygodnie	200 \pm 15,2	300 \pm 8,6	125 \pm 7,5	125 \pm 6,3	120 \pm 5,1
4 tygodnie	150 \pm 4,8	175 \pm 2,5	100 \pm 1,6	150 \pm 1,0	112 \pm 8,3
6 tygodni	121 \pm 3,5	143 \pm 6,0	146 \pm 2,3	171 \pm 2,5	142 \pm 7,2
8 tygodni	168 \pm 11,2	193 \pm 4,5	225 \pm 7,2	212 \pm 10,5	275 \pm 5,0

Według doniesień literatury florydzyzna oraz produkt jej degradacji – floroglucynol działały synergistycznie z auksyną w stymulacji wzrostu owsa (44). W badaniach prowadzonych nad efektem floroglucynolu w hodowli kilku roślin drzewiastych wykazano, że związek ten stymulował proliferację pędów (24) oraz promował ich ukorzenianie (25). Są podstawy, jak się wydaje, by sądzić, że kwas chlorogenowy jest związany z intensywnymi podziałami komórkowymi (45). W kulturach *in vitro* wzmacniał on proliferację kalusa z międzywęźli *Prunus avium*. U gatunku tego stwierdzono wyższą zawartość kwasu chlorogenowego w pędach roślin o silnym wzroście elongacyjnym niż w roślinach o zwartym pokroju (46). Według Goudarzi i wsp. (47) oraz Demiralay i wsp. (48) określone fenole mogą zwiększać przeżywalność tak małych eksplantatów jak wierzchołki pędu, czy merystemy i stymulować rozwój z nich pędów w kulturach *in vitro*.

W zaprezentowanych wynikach sugeruje się, że fenole obecne w tkankach roślinnych (biorąc pod uwagę ich stężenie fizjologiczne) raczej wspomagają niż hamują wzrost w przypadku podkładki jabłoni M7. W dotychczasowych badaniach nie wyjaśniono czy działają one bezpośrednio, czy pośrednio poprzez modulację działania innych regulatorów wzrostu. W testach *in vitro* wykazano, że niektóre naturalnie występujące flawonoidy mogą regulować stężenie auksyny, wpływając na: aktywność oksydazy IAA (49), syntezę IAA z tryptofanu (50), polarny transport IAA (51). Zenk i Müller (52) wykazali, że fenole, takie jak: kwas chlorogenowy czy kwercetyna mogą pośrednio stymulować wzrost wydłużeniowy poprzez hamowanie rozkładu auksyny. W badaniach prowadzonych *in vivo* na *Arabidopsis* stwierdzono, że kwercetyna może działać jako inhibitor transportu auksyny (53).

Badania nad substancjami fenolowymi są niezwykle trudne ze względu na mnogość ich form oraz specyfikę ich występowania w określonych grupach taksonomicznych roślin. Substancje te są bardzo reaktywne i podlegają przemianom podczas różnych procesów fizjologicznych (54). Tak jak zbadali to Dean i wsp. (55), kwas salicylowy po krótkim czasie od podania roślinie podlegał w tkankach glikozytacji. Taka modyfikacja chemiczna, jak wiadomo, może zmieniać działanie związku fenolowego. McClure (56) wykazuje, że glikozydy fenolowe mają inne fizjologiczne właściwości niż ich aglikony. Potwierdzono to na podstawie danych dotyczących floretyny, która w testach na izolowanych mitochondriach hamowała ich aktywność, podczas gdy florydzyzna nie wykazywała takiego efektu (57). Według Stenlida (58) glikozyd naringina stymulowała bazypetalny transport auksyny *in vitro*, natomiast jej aglikon naringenina działała przeciwnie – hamowała bazypetalny, a stymulowała akropetalny przepływ IAA w hipokotylu ogórka.

Wobec takiej złożoności problemu trudno określić fizjologiczną rolę tych związków. Niektórzy spośród badaczy postulują przede wszystkim ich udział w mechanizmach obronnych przed roślinożercami oraz w odporności na patogeny (59,60). Na podstawie uzyskanych wyników badań nad rozwojem pędów pachwinowych sugeruje się, że polifenole obecne w tkankach podkładki jabłoni mogą oddziaływać jako czynniki wspierające zorganizowany wzrost. Działanie ich, jak się

wyduje, opiera się na modulowaniu wpływu innych czynników wzrostowych, takich jak fitohormony. Przypuszczalnie substancje te przygotowują tkanki i uwrażliwiają je na działanie stymulatorów wzrostu.

Literatura

1. Pridham J. B., (1965), *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 16, 13-36.
2. Kefeli V. I., Kadyrov C. S., (1971), *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 22, 185-196.
3. Gross D., (1975), *Phytochem.*, 14, 2105-2112.
4. Hancock C. R., Barlow H. W. B., Lacey H. J., (1961), *J. Exp. Bot.*, 12, 401-408.
5. Pryce R. J., (1972b), *Phytochem.*, 11, 1759-1762.
6. Jankiewicz L. S., (1997), *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin*, PWN, Warszawa, t. II, 249-270.
7. Erez A., Lavee S., (1968), *Israel Journal of Botany*, 17, 35-42.
8. Rodriguez A., Sanchez-Tames R., (1986), *Physiol. Plant.*, 66, 288-292.
9. Codignola A., Maffei M., Fieschi M., (1988), *New Phytol.*, 108, 83-89.
10. El Mansy J. H., Walker D., (1969), *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 94, 298-301.
11. Sarapuu L. P., (1970), PhD thesis.
12. Thakur M. L., (1977), *J. Exp. Bot.*, 28, 793-801.
13. Codignola A., Gallino M., Papa G., Vinai A., (1982), *Giornale Bot. Italiano*, 116, 9-14.
14. Mandahar C. J., Gulati A., Nath S., (1980), *New Phytol.*, 84, 37-43.
15. Melin C., Billot J., Dupin J. F., Paulet P., (1974), *Physiol. Plant.*, 32, 382-387.
16. Maffei M., Codignola A., Gallino M., (1982), *Allionia* 25, 95-100.
17. Kromer K., (1995), *Fizjologiczne podstawy ukorzenia podkładki jabłoni M7 w warunkach in vitro*, Prace Botaniczne LXV, Wyd. UWr., Wrocław.
18. Hulme A. C., (1970), *The biochemistry of fruits and their products*, Academic Press, London, New York, 269-298.
19. Dziewanowska K., Grochowska M. J., Lewak S., (1974), *Fruit Science Reports*, 1, 3-9.
20. Bassuk N. L., Howard B. H., (1981), *J. Hort. Sci.*, 56, 301-312.
21. Murashige T., (1974), *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 25, 135-166.
22. James D. J., Thurbon I. J., (1981a), *Z. Pflanzenphysiol.*, 105, 11-20.
23. Hammatt N., Grant N. J., (1997), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 47, 103-110.
24. Jones O. P., (1976), *Nature*, 262, 392-393.
25. James D. J., Thurbon I. J., (1981b), *J. Hort. Sci.*, 56, 15-20.
26. Quoirin M., Lepoivre P., (1977), *Acta Hort.*, 78, 437-442.
27. Murashige T., Skoog A., (1962), *Physiol. Plant.*, 13, 473-497.
28. Kromer K., (1987), *Symposium on Plant Micropropagation in Horticultural Industries*, Eds. Arlon, Ducte G., Jacob M., Simeon A., Press Universitaires, Liege, 119-123.
29. Amorim H. V., Dougall D. K., Sharp W. R., (1977), *Physiol. Plant.*, 39, 91-95.
30. Harborne J. B., (1984), *Phytochemical Methods, A guide to modern techniques of plant analysis*, Chapman and Hall, London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras.
31. Folin O., Denis W., (1915), *J. Biol. Chem.*, 22, 305.
32. Folin O., Ciocalteu V., (1927), *J. Biol. Chem.*, 73, 627.
33. Budini R., Tonelli D., Girotti S., (1980), *J. Agr. Food Chem.*, 26, 973.
34. Swain T., Hills W. E., (1959), *J. Agr. Food Chem.*, 10, 63.
35. McMurrough I., McDowell J., (1978), *J. Anal. Biochem.*, 91, 92.
36. Goldstein J. L., Swain T., (1963), *Phytochemistry*, 2, 371.
37. Miguel L. C., Longnecker N. E., Ma Q., Osborne L., Atkins C. A., (1998), *J. Exp. Bot.*, 49, 547-553.
38. Stafstrom J. P., Altschuler M., Anderson D. H., (1993), *Plant Mol. Biol.*, 22, 83-90.
39. Turetskaya R., Kefeli V., Kutaček M., Vackova K., Tschumakovski N., Krupnikova T., (1968), *Biol. Plant.*, 10, 205-221.

40. Kefeli V. I., Kadyrov C. S., (1971), *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 22, 185-196.
41. Leopold A. C., Plummer T. H., (1961), *Plant. Physiol.*, 36, 589-591.
42. Stom D., (1970), PhD thesis.
43. van Fleet D. S., (1954), *Phytomorph.*, 4, 300-310.
44. Nitsch J. P., Nitsch C., (1959), *Bull. Soc. Bot. Franc.*, 106, 414-419.
45. Ostreiko S. A., Popov Yu. G., (1979), *Fiziol. Rast.*, 26, 283-290.
46. Feucht W., Johal C. S., (1977), *Acta Hort.*, 78, 109-114.
47. Goudarzi R., Majedi A., Talaie A. R., Mostafavi M., (1997), *Iranian J. Agric. Sci.*, 28, 133-134.
48. Demiralay A., Yalcin-Mendi Y., Aka-Kacar Y., Cetiner S., Aksoy U., Ferguson L., Hepksoy S. (1998), *Acta Hort.*, 480, 165-167.
49. Mumford F. E., Smith D. H., Castle J. E., (1961), *Plant. Physiol.*, 36, 752-756.
50. Gordon S. A., Paleg L. G., (1961), *Plant. Physiol.*, 36, 838-845.
51. Stenlid G., (1968), *Physiol. Plant.*, 21, 882-894.
52. Zenk M. H., Müller G., (1963), *Nature*, 23, 761-763.
53. Murphy A., Peer W., Taiz L., (2000), *Planta*, 211, 315-324.
54. Collins F. W., (1987), *Am. Ass. Cereal Chem.*, 65, 227-295.
55. Dean J. V., Shah R. P., Mohammed L. A., (2003), *Physiol. Plant.*, 118, 328-336.
56. McClure J. M., (1975), *The Flavonoids*, Eds. Harborne J.B., Mabry T.J., Mabry H., Chapman and Hall, London, 970-1055.
57. Ravanel P., Tissut M., Douce R., (1982), *Phytochem.*, 21, 2845-2850.
58. Stenlid G., (1976), *Physiol. Plant.*, 38, 262-266.
59. Malamy J., Carr J. P., Klessig D. F., Raskin I., (1990), *Science*, 250, 1002-1004.
60. Delaney T. P., Friedrich I., Ryais J., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 6602-6606.