Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 48, No 4, Winter 2018 (765-778)
DOI: 10.22059/ijhs.2017.204519.988

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۴۸، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۳۹۶ (ص ۷۷۸-۷۶۵)

تأثیر تابش اشعهٔ فرابنفش C بر مسیر زیست ساختی استیلبنوئیدها در کشت تعلیقی یاختهٔ انگور (*Vitis vinifera* L. cv. Shahani)

منصور غلامی[1*] و سید علی اندی[2]
۱ و ۲. استاد و دانشجوی دکتری، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/٦/۱٤)

چکیده

استیلبن‌های انگور یک خانوادهٔ شناخته‌شده از پلی فنول‌های گیاهی هستند که فعالیت‌های زیستی (بیولوژی) چندی از آن‌ها در رابطه با سودمندی‌های سلامتی به تأیید رسیده‌اند. در این پژوهش، تأثیر محرک اشعهٔ فرابنفش C در سه زمان (۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه) در ترکیب یا بدون ترکیب با تابش نور مرئی با سطح انرژی بالا (۱۰۰۰۰ لوکس) روی یک رگهٔ (لاین) یاخته‌ای به‌دست‌آمده از میانبر انگور رقم شاهانی (*Vitis vinifera* cv. Shahani) در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح کامل تصادفی بررسی و نتایج کسب‌شده با تیمارهای شاهد مقایسه شد. نتایج نشان دادند، تاریکی می‌تواند بیشتر از نور مرئی مسیر سوخت‌وسازی (متابولیکی) مربوط به تولید استیلبنوئیدها را تحریک کند. در میان زمان‌های استفاده‌شده از محرک اشعهٔ فرابنفش C، ده دقیقه استفاده از اشعهٔ فرابنفش C برای تولید مؤثر و تجمع بالای فنول‌ها (۱۱۲/۷۳ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک یاخته) و فلاونوئیدها (۱۵۰/٤۷ میلی‌گرم کاتکین در هر گرم وزن خشک یاخته) و همچنین استیلبنوئیدها شامل مجموع رسوراترول و فرم گلوکوزیله‌شدهٔ آن به نام پیسید (۷/٥٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بهینه بود. افزون بر این، نتایج نشان داد، یک رابطهٔ منفی معنی‌دار بین تولید این متابولیت‌ها و رشد یاخته وجود دارد. این یافته‌ها داده‌های ارزشمندی به‌منظور تولید انبوه کشت‌های یاخته‌ای برای تولید این ترکیب‌های خیلی با ارزش در سامانه‌های بیوراکتور ارائه می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: تابش نور مرئی، کشت تعلیقی یاخته‌ای، محرک اشعهٔ فرابنفش C، *V. vinifera* cv. Shahani.

The effect of UV-C light irradiation on stilbenoid biosynthetic pathway in grape (*Vitis vinifera* L. cv. Shahani) cell suspension culture

Mansour Gholami[1*] and Seyed Ali Andi[2]
1, 2. Professor and Ph. D. Candidate, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University of Hamadan, Iran
(Received: Apr. 26, 2016 - Accepted: Sep. 4, 2016)

ABSTRACT

Grape stilbenes are well-known family of plant polyphenolics that have been confirmed to have many biological activities in relation to health benefits. In this study, we investigated the effect of UV-C elicitor at three different irradiation periods (10, 20 and 30 min) in combination or not with high-level light irradiation (10000 LUX) on a cell line obtained from the pulp of *Vitis vinifera* cv. Shahani as Completely Randomized Factorial Design, and compared the results with those of untreated control cultures. Results showed that growing the cells in dark condition can stimulate the metabolic pathway related to bio-production of the stilbenoids more than that of the cells growing under light condition. Among the time courses of UV-C elicitor irradiation, according to our results, irradiation of UV-C for 10 min was optimum for efficient production and higher accumulation of phenolics (112.73 mg GA/g DCW) and flavonoids (150.47 mg catechin/g DCW) as well as stilbenoids including the summation of resveratrol and its glycosylated form piceid (7.54 µg/ml). Furthermore, it was shown that there is a significant negative correlation between production of these metabolites and the cell growth. These data provide valuable information for the future scale up of cell cultures for the production of these very high value compounds in bioreactor systems.

Keywords: Cell suspension culture, light irradiation, UV-C elicitor, *Vitis vinifera* cv. Shahani.

* Corresponding author E-mail: mgholami@basu.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

گیاه انگور با نام علمی *Vitis vinifera* L.، از خانوادهٔ تاک‌سانان (Vitaceae) یک گیاه چوبی چندساله است. انگور در بین درختان میوه به‌عنوان میوهٔ نخست در جهان معرفی می‌شود. اراضی موکاری جهان در سال ۲۰۱۳، ۷/۵۴۶ میلیون هکتار گزارش شده است. اگرچه مصرف عمدهٔ انگور در جهان برای تولید آب‌میوه (۶/۸ میلیون هکتار) است، از این میوه برای مصرف تازه خوری و تهیهٔ میوه‌های خشک نیز استفادهٔ فراوانی می‌شود (Waffo-Téguo *et al.*, 2013). متابولیت‌های ثانوی یا متابولیت‌های تخصصی برخلاف متابولیت‌های اولیه، بیشتر به خانواده‌های گیاهی خاصی اختصاص دارند و به‌طورکلی این متابولیت‌ها به‌عنوان یک راهبرد دفاعی و برای زنده‌مانی علیه شمار زیادی از تنش‌های زیستی و غیر زیستی تولید می‌شوند. درمجموع چهار ردهٔ اصلی از متابولیت‌های ثانوی با گیاهان تولید می‌شوند که شامل ترپنوئیدها، ترکیب‌ها شامل سولفور و سیانوژنیک، آلکالوئیدها و فنول‌ها هستند (Liscombe, 2008). هر یک از این متابولیت‌ها از مسیرهای زیست‌ساختی (بیوسنتزی) مخصوص به خود نشئت می‌گیرند. در انگور و فرآورده‌های آن، فراوان‌ترین متابولیت‌های یادشده در دستهٔ ترکیب‌های فنولی قرار می‌گیرند. مواد شیمیایی (پلی) فنولی انگورها در دو دستهٔ مهم به نام‌های فلاونوئیدها و استیلبنوئیدها قرار می‌گیرند (Saw *et al.*, 2012; Santamaria *et al.*, 2010; Mewis *et al.*, 2011). زیست‌ساخت این ترکیب‌ها از مسیر مالونات/فنیل پروپانوئید و با استفاده از آمینواسید فنیل‌آلانین به‌عنوان یک مولکول پیشرو کنترل می‌شود. آنزیم کالکون سنتاز (CHS) مخصوص برای تشکیل فلاونوئیدها به‌ویژه رنگیزه‌های آنتوسیانین به‌عنوان فرآورده‌های نهایی است و آنزیم بعدی به نام استیلبن سنتاز (STS) مسئول تولید استیلبنوئیدها شامل رسوراترول و مشتقات آن است (Krasnow & Murphy, 2004; Lijavetzky *et al.*, 2008). گزارش‌های چندی از نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهند، استیلبنوئیدها ویژگی‌های دارویی فراوانی دارند (Kloypan *et al.*, 2013; Kim, 2010; Hsieh & Wu, 2010; Hsieh, 2009). کمیت و کیفیت متابولیت‌های ثانوی تولیدشده در گیاهان وابسته به تغییر در شرایط بوم‌شناختی (اکولوژیکی) و رشدی است (Saw *et al.*, 2012). با در نظر گرفتن پیچیدگی زیست‌ساخت این متابولیت‌ها از روش‌های شیمیایی (Roat & Ramawat, 2009)، تولید این ترکیب‌های بسیار با ارزش از راه زیست‌فناوری، برای تولید انبوه ترکیب‌های مورد نظر، در طی دهه‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده است. زیست‌ساخت مواد شیمیایی گیاهی مانند استیلبنوئیدها می‌تواند با استفاده از انتخاب رگه (لاین)های یاخته‌ای با بازدهٔ بالا افزایش داده شود (Cai *et al.*, 2011). از این‌رو، راهبردهای مختلفی به‌منظور افزایش زیست‌ساخت متابولیت‌ها در کشت‌های یاخته‌ای گیاهی شامل تغییر در نسبت‌های مواد غذایی یا گرسنگی مواد مغذی (Yin *et al.*, 2012)، تغذیهٔ پیشرو (Kiselev *et al.*, 2013)، بهینه‌سازی محیط کشت (Nagella *et al.*, 2013)، کاربرد محرک‌ها (Elicitation) (Vuong *et al.*, 2014) و نفوذپذیری غشای پلاسمیک (Permeabilization) (Dornenburg & Knorr, 1993) صورت گرفته است. در میان این روش‌ها تحریک یا استفاده از محرک‌ها توجه خیلی زیادی را برای تولید متابولیت‌های تخصصی به خود معطوف کرده است. یکی از این محرک‌ها تابش اشعهٔ فرابنفش است که همانند محرک‌های دیگر می‌تواند نقش مهمی در مسیر پیام‌رسانی مربوط به تجمع متابولیت‌های ثانوی درون یاخته‌های گیاهی بازی کند. این اشعه انرژی الکترومغناطیسی است که طول‌موج کوتاه و انرژی زیادی دارد و برای چشم انسان نامرئی است و در طیف الکترومغناطیسی، بین اشعهٔ ایکس و نور مرئی قرار دارد. این اشعه طول‌موجی بین ۱۰۰ و ۴۰۰ نانومتر دارد و به سه دسته اشعهٔ فرابنفش A (۴۰۰-۳۱۵ نانومتر)، اشعهٔ فرابنفش B (۳۱۵-۲۸۰ نانومتر) و اشعهٔ فرابنفش C (۲۸۰-۱۰۰ نانومتر) تقسیم می‌شود. در این میان طیف اشعهٔ فرابنفش C با کوتاه‌ترین طول‌موج، بیشترین سطح انرژی را به خود اختصاص می‌دهد (Zhao *et al.*, 2005). درنتایج تحقیقی گزارش شده است، تیمار ترکیبی اشعهٔ فرابنفش C با متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک می‌توانند به‌عنوان یک روش مؤثر برای افزایش تولید استیلبن در کشت‌های یاخته‌ای انگور رقم Cabernet Sauvignon استفاده شوند که یک تأثیر هم‌افزایی در

Archive of SID

www.SID.ir

تجمع ترانس-رسوراترول خارج یاخته‌ای نشان داد. همچنین در این بررسی بیان نسبی ژن‌های مسئول در زیست‌ساخت استیلبن و فلاونوئیدها در سطح بالایی تنظیم شد و یک تأثیر هم‌افزایی از اشعهٔ فرابنفش C به همراه متیل جاسمونات یا سالیسیلیک اسید روی بیان ژن *STS* وجود داشته است (Xu *et al.*, 2015). Liu *et al.* (2010) رابطهٔ بین تولید استیلبنوئیدها و مدت تابش اشعهٔ فرابنفش C در زمان‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه را روی پینه (کالوس)های به‌دست‌آمده از چهار نژادگان (ژنوتیپ) انگور و سه نوع ریزنمونهٔ برگ، بذر و برون‌بر میوه بررسی کردند. نتایج به‌دست‌آمده نشان داده، هم نژادگان و هم نوع ریزنمونه بر میزان تجمع ترکیب‌های استیلبنوئیدی تأثیر معنی‌داری دارد و مدت‌زمان ۲۰ دقیقه تابش اشعهٔ فرابنفش C با طول‌موج ۲۵۴ نانومتر از فاصلهٔ ۳۰ سانتی‌متری بر پینه‌ها بیشترین تأثیر را در تولید استیلبنوئیدها شامل رسوراترول و پیسید دارد. Zhang *et al.* (2002) تأثیر نور و/یا جاسمونیک اسید را روی تجمع آنتوسیانین‌ها در کشت‌های یاخته‌ای انگور رقم گامای بررسی کرده و آنان نتیجه گرفتند که نور تجمع آنتوسیانین‌ها را در مقایسه با یاخته‌های روییده در تاریکی افزایش می‌دهد و تیمار یاخته‌ها با جاسمونیک اسید نیز هم به تنهایی و هم به همراه تابش نور، میزان آنتوسیانین‌ها را افزایش داد. با در نظر گرفتن این نکته و نیز دیگر گزارش‌ها در مورد تأثیر نور روی مسیر زیست‌ساختی فلاونوئیدها (Krasnow & Murphy, 2004)، به نظر می‌رسد که مسیر رقیب دیگری شامل استیلبنوئیدها با کاربرد تاریکی تحریک می‌شود. در این پژوهش تأثیر زمان‌های مختلف اشعهٔ فرابنفش C در ترکیب یا بدون ترکیب با تابش نور مرئی در سطوح انرژی بالا روی کشت‌های تعلیقی یاخته انگور رقم شاهانی، یک رگهٔ یاخته‌ای کسب‌شده که توانایی تولید رنگیزه‌های آنتوسیانین‌ها را ندارد، به‌منظور بررسی نقش تاریکی و نور روی مسیر سوخت‌وسازی (متابولیکی) منتج به تولید استیلبنوئیدها و بررسی تأثیر زمان‌های مختلف اشعهٔ فرابنفش C شامل ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه بر تولید استیلبنوئیدها شامل رسوراترول و رسوراترول گلوکوزید یا پیسید بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

استقرار کشت‌های پینه

بافت‌های پینه از میانبر حبه‌های در مرحلهٔ رسیدن رقم شاهانی موجود در کلکسیون ملی انگور ایستگاه تحقیقات انگور تاکستان در آزمایشگاه علوم باغبانی دانشگاه بوعلی سینا همدان به دست آمد. در آغاز حبه‌های انگور به مدت دو ساعت زیر آب شرب شهری، که به آن مقداری مادهٔ شوینده اضافه شده بود، شسته شدند. آنگاه نمونه‌ها درون اتانول ۷۰ درصد حجمی به حجمی به مدت ۳۰ ثانیه قرار گرفتند و پس‌ازاین مرحله سه بار و در بازه‌های زمانی ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه در آب مقطر سترون (استریل) شسته شدند. در ادامه حبه‌ها به مدت ۱۲ دقیقه درون ظرف حاوی ۵ درصد حجمی به حجمی از هیپوکلریت سدیم تجاری غوطه‌ور شدند و پس‌ازاین مرحله از ضدعفونی، عمل شست‌وشو همانند برابر مراحل گفته‌شدهٔ بالا انجام شد. هر حبهٔ سترون‌شده توسط تیغ اسکالپل سترون به چهار قسمت تقسیم شد و میانبر یا قسمت گوشتی تقسیم‌شده با سطح خارجی روی محیط کشت جامد (۰/۷ درصد وزنی به حجمی آگار) حاوی عنصرهای درشت مغذی‌ها (Gambourg *et al.*, 1968)، عنصرهای ریزمغذی‌ها (Murashige & Skoog, 1962)، ویتامین‌ها (Morel, 1970)، ۲۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کازئین هیدرولیزات، ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر کینتین و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر آلفا-نفتالن استیک اسید با pH=۵/۷ قرار گرفت. پس از ۶ تا ۷ هفته بافت‌های پینهٔ تولیدشده از کنارهٔ ریزنمونه‌ها هر ۴ هفته و برای سه بار واکشت شدند تا از این راه پینه‌های مناسب و شکننده برای استقرار کشت‌های تعلیقی یاخته‌ای تهیه شوند. هم ریزنمونه‌ها و هم توده‌های پینه در دمای ۲±۲۴ درجهٔ سلسیوس و در تاریکی مطلق نگه‌داری شدند.

استقرار کشت‌های تعلیقی یاخته‌ای

کشت‌های تعلیقی یاخته‌ای با انتقال ۲ گرم وزن تازهٔ پینهٔ نرم درون فلاسک‌های ارلن مایر تولید شد که فرمول ۷۰ میلی‌لیتر محیط کشت تعلیقی یاخته‌ای همانند ترکیب‌های مربوط به محیط القایی پینه بدون آگار بود. ارلن مایرها روی شیکر دوار با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در یک شرایط کنترل‌شدهٔ دمایی

Archive of SID

www.SID.ir

۲±۲۴ درجهٔ سلسیوس در تاریکی و در اتاقک رشد قرار گرفتند. برای آماده‌سازی و ثبات کشت‌های تعلیقی، یاخته‌ها هر دو هفته با یک نسبت ۱ به ۷ حجمی به حجمی به مدت ۵ ماه واکشت شدند و پس‌ازاین مدت تیمارهای آزمایشی اعمال شدند.

اعمال تیمارهای آزمایشی

در روز هفتم کشت که مربوط به مرحلهٔ رشد تصاعدی یاخته‌ها بر پایهٔ زیست‌تودهٔ اندازه‌گیری‌شدهٔ یاخته بود، کشت‌های تعلیقی یاخته‌ای به مدت ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه تحت تیمار اشعهٔ فرابنفش C با طول‌موج ۲۵۴ نانومتر از فاصلهٔ ۳۰ سانتی‌متری یاخته‌ها قرار گرفتند. روش کار به این صورت بود که در شرایط کامل سترون یاخته‌ها از اتاقک رشد و در زیر هود لامینار وارد پتری‌دیش شده و پس‌ازاین انتقال تحت تیمارهای زمانی مربوط به تابش اشعهٔ فرابنفش C قرار گرفتند. تیمارهای یادشده در بالا در ترکیب با تاریکی مطلق و یا ۱۰۰۰۰ لوکس از نور مرئی بررسی شدند. تیمار نور مرئی با استفاده از دو لامپ فلورسنت سفید خنک F40 در فاصلهٔ ۳۰ سانتی‌متری از فلاسک‌ها با تابش ۱۰۰۰۰ لوکس به دست آمد و برای تیمار تاریکی، فلاسک‌ها به‌منظور پرهیز از نور توسط دو لایه از فویل آلومینیومی ضخیم پوشانده شدند. نتایج مربوطه با تیمارهای شاهد تنها نور مرئی و تاریکی مطلق مقایسه شدند. درمجموع در این بررسی هشت تیمار شامل کشت‌های شاهد (تیمارهای تنها تاریکی و نور مرئی) و تیمارهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه از تابش اشعهٔ فرابنفش C (تحت یا تاریکی یا تابش نور ممتد ۱۰۰۰۰ لوکس) ارزیابی شدند. عامل اول مربوط به این آزمایش فاکتوریل شامل دو سطح نور (تاریکی مطلق و ۱۰۰۰۰ لوکس نور مرئی) و عامل دوم شامل چهار سطح از زمان‌های اشعهٔ فرابنفش C (۰، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه) بود. به‌منظور بهتر بررسی کردن اثر تاریکی و نور و همچنین تأثیر محرک اشعهٔ فرابنفش C بر رشد یاخته و تولید ترکیب‌های فنولی با ارزش، وزن تازهٔ یاخته (FCW)، وزن خشک یاخته (DCW)، pH و هدایت الکتریکی محیط (EC)، حجم محیط مصرفی (باقی‌مانده پس از پایان ۱۴ روز) (SMW) و همچنین مقادیر تولیدشده از فنول‌ها (P)، فلاونوئیدها (F)، رسوراترول و فرم گلوکوزیله‌شدهٔ آن به نام پیسید اندازه‌گیری شدند.

تعیین رشد یاخته، pH و هدایت الکتریکی

کشت‌های تعلیقی یاخته‌ای هفت روز پس از اعمال تیمارها، با عبور دادن از کاغذ صافی واتمن شمارهٔ ۱ و به‌منظور جداسازی یاخته‌ها و محیط کشت، برداشت شدند (Krisa *et al*., 1999; Roat & Ramawat, 2009). آنگاه یاخته‌ها به‌سرعت توسط آب مقطر سترون خنک در دو مرحله به‌منظور حذف بقایای ساکارز، شسته شدند و در ادامه برای تعیین وزن تازهٔ یاخته در هر ۸۰ میلی‌لیتر از محیط کشت، وزن شدند. ۱ گرم از یاخته‌های تازه در آون با دمای ۷۲ درجهٔ سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت و به‌منظور ثبت وزن خشک یاخته‌ای ثابت قرار داده شد. یاخته‌های باقی‌مانده در نیتروژن مایع منجمد شدند و به مدت ۴۸ ساعت با استفاده از یک دستگاه فریز درایر (FD-81 EYELA, Tokyo Rikakikai Co., LTD) خشک شدند. پس‌ازآن، یاخته‌ها تا تجزیه بیشتر در دمای منهای ۸۰ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند. محیط کشت گردآوری‌شده به مدت ده دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به‌منظور برداشتن مواد یاخته‌ای نامحلول سانتریفیوژ شد. پس از اندازه‌گیری حجم محیط کشت باقی‌مانده به‌وسیلهٔ یک استوانهٔ مدرج، pH و هدایت الکتریکی (EC) محیط به ترتیب به‌وسیلهٔ pH متر (827 pH Lab, Metrohm, Switzerland) و EC متر (WTW 82362, Weilheim, Germany) اندازه گرفته شدند.

استخراج مواد فنولی

برای استخراج مواد فنولی به ۳۰ میلی‌گرم از یاخته‌های لیوفیلیزشدهٔ ۱/۵ میلی‌لیتر از یک محلول شامل ۹۹درصد متانول و ۱درصد اسید هیدروکلریک اضافه شد. دروایهٔ (سوسپانسیون) به‌دست‌آمده به مدت ۲۰ ثانیه تکان داده (ورتکس) و در تاریکی و دمای ۴ درجهٔ سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگه‌داری شد. پس‌ازاین مدت نمونه‌ها به مدت ده دقیقه و با میزان g ۱۲۰۰۰ به‌منظور جدا کردن یاخته‌ها سانتریفیوژ شدند. سرانجام و پس از صاف کردن سوپرناتانت

Archive of SID

www.SID.ir

(روشناور) به‌وسیلهٔ صافی سر سرنگی ۰/۴۵ میکرومتر، نمونه‌ها در تاریکی و در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس تا تجزیهٔ بیشتر به‌منظور اندازه‌گیری فنول‌ها، فلاونوئیدها و همچنین شناسایی ترکیب‌های خاص از متابولیت‌های ثانوی با دستگاه HPLC، نگه‌داری شدند.

تعیین فنول‌ها و فلاونوئیدها

میزان فنول‌ها بر پایهٔ روش Folin-Ciocalteu با استفاده از گالیک اسید به‌عنوان یک استاندارد تعیین شد (Xu *et al*., 2015; Singleton *et al*., 1999). به‌طور خلاصه ۲۰۰ میکرولیتر از عصارهٔ استخراج‌شده با عامل رقت ۲ به یک لولهٔ آزمایش اضافه شد. پس از آن به این عصاره ۱ میلی‌لیتر از معرف Folin-Ciocalteu اضافه شده و پس از ۵ دقیقه ۸۰۰ میکرولیتر از یک محلول ۷/۵ درصد وزنی به حجمی کربنات سدیم اضافه شد و در ادامه لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه تکان داده شدند. محتوای لوله در تاریکی و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجهٔ سلسیوس قرار داده شد و پس از نگهداری در اتاقک رشد (انکوباتور)، جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر و با مقایسه با شاهد بدون عصاره با استفاده از طیف‌سنج نوری یا اسپکتروفتومتر (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific) اندازه گرفته شد. محتوای فنول‌ها به‌صورت میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک نمونه با استفاده از منحنی استاندارد رسم شده از گالیک اسید (سیگما-آلدریچ)، با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰، ۴۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (R^2=0.989) بیان شد. تجزیهٔ عصاره‌ها برای فلاونوئیدها با استفاده از روش Xu *et al*. (2015) انجام شد. بدین منظور؛ ۲۵۰ میکرولیتر از عصارهٔ نمونه با عامل رقت ۲ به یک لولهٔ آزمایش اضافه شد. پس از آن ۱/۲۵ میلی‌لیتر از آب MilliQ و ۷۵ میکرولیتر از محلول ۵ درصد وزنی به حجمی نیتریت سدیم به لوله اضافه شده و مخلوط به مدت ۵ دقیقه تکان داده شد. سپس ۱۵۰ میکرولیتر از محلول ۱۰ درصد وزنی به حجمی کلرید آلومینیوم به لوله اضافه شد و پس از ۶ دقیقه، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول ۱ مولار هیدروکسید سدیم به آن اضافه شد و درنهایت محتوای به‌دست‌آمده با ۲۷۵ میکرولیتر از آب MilliQ رقیق شد. میزان جذب فلاونوئیدها در طول‌موج ۵۱۰ نانومتر با مقایسه با شاهد بدون عصارهٔ یاخته‌ای با استفاده از طیف‌سنج نوری (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific) اندازه‌گیری شد. کمیت فلاونوئیدها برحسب میلی‌گرم کاتکین در هر گرم وزن خشک نمونه با استفاده از منحنی استاندارد (R^2= 0.999) تولیدشده با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کاتکین بیان شد.

ارزیابی ترکیب‌های استیلبنوئیدها به‌وسیلهٔ HPLC

استیلبنوئیدها با استفاده از یک روش تغییریافته برای شناسایی و کمیت سازی مواد فنولی شناسایی شدند (Ferri *et al*., 2009). جداسازی این ترکیب‌ها به‌وسیلهٔ سامانهٔ RP HPLC (Agilent 1100 HPLC, USA) با ویژگی‌های زیر انجام شد: G1311A Quaternary Pump، G1313A Autosampler ،G1379A Vacuum Degasser ، G1316A Column Oven ،column Kinetex C18, 2.6 µm 150 × 4.6 mm ID, Phenomenex، G1315B DAD diode array detector و ChemStation software. دمای ستون در ۳۰ درجهٔ سلسیوس تنظیم شد و حجم تزریق به‌وسیلهٔ نمونه‌گیر خودکار (اتوسمپلر) ۱۰ میکرولیتر بود. در جداسازی استیلبنوئیدها از دو حالت (فاز) متحرک استیک اسید ۰/۲ درصد با pH ۳ به‌عنوان حالت A و استونیتریل به‌عنوان حالت B با سرعت جریان ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. برنامهٔ زمانی مربوط به شیب حرکت این حالت‌های متحرک به این صورت بود: دقیقهٔ ۰، ۸۵درصد A و ۱۵درصد B؛ دقیقهٔ ۱۰، ۷۰درصد A و ۳۰درصد B؛ دقیقهٔ ۲۵، ۵۵درصد A و ۴۵درصد B؛ دقیقهٔ ۳۰، ۴۰درصد A و ۶۰درصد B؛ دقیقهٔ ۳۲، ۱۵درصد A و ۸۵درصد B؛ دقیقهٔ ۳۷، ۱۵درصد A و ۸۵درصد B؛ دقیقهٔ ۳۸، ۸۵درصد A و ۱۵درصد B؛ دقیقهٔ ۴۵، ۸۵درصد A و ۱۵درصد B. زمان بازداری کسب‌شده از استانداردها به‌منظور شناسایی ترکیب‌ها با زمان بازداری نمونه‌ها مقایسه شدند. افزون بر این به‌منظور شناسایی ترکیب‌ها از الگوی طیف اشعهٔ فرابنفش آن‌ها نیز استفاده شد. استانداردها از کمپانی سیگما-آلدریچ خریداری شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

محلول‌های پایهٔ (استوک) استاندارد شامل رسوراترول و پیسید در متانول درجهٔ دستگاه HPLC در یک غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آماده شدند. غلظت‌های ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴ و ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر از محلول‌های پایه به‌منظور تولید منحنی‌های استاندارد رقیق شدند. از طول‌موج ۳۰۶ نانومتر برای تجزیه‌وتحلیل کمی و کیفی ترکیب‌های مورد بحث استفاده شد. زمان بازداری برای ترکیب‌های رسوراترول و پیسید به ترتیب ۱۶/۰۲۵ و ۱۰/۵۹۵ دقیقه بود.

تجزیهٔ آماری

آزمایش‌های مربوط به این تحقیق به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد. داده‌های کسب‌شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخهٔ ۲۲/۰ تجزیه شدند. تفاوت‌های معنی‌دار بر پایهٔ آزمون آماری توکی و در سطح اطمینان ۹۵ درصد مقایسه شدند. هم اندازه‌گیری‌ها در سه تکرار انجام شد و داده‌ها به‌صورت میانگین ± استاندارد خطا (SE) گزارش شدند.

نتایج و بحث

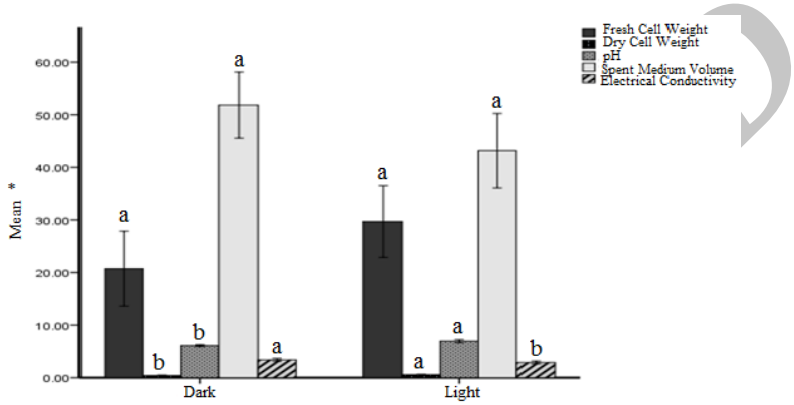
تأثیر تاریکی و نور بر فراسنجه‌های تولید و رشد یاخته

همان‌گونه که در شکل ۱ نشان داده شده، به غیر از وزن تازهٔ یاخته و حجم محیط مصرفی، تفاوت معنی‌داری بین دیگر فراسنجه (پارامتر)های رشد یاخته شامل وزن خشک یاخته، pH و هدایت الکتریکی محیط مشاهده شد. برخلاف یافته‌های Zhang *et al.* (2002) در این پژوهش یاخته‌های روییده در تاریکی نسبت به یاخته‌های روییده در نور مرئی وزن یاخته‌ای کمتری داشتند. این تفاوت می‌تواند به دلیل تفاوت موجود در بین رقم‌های استفاده‌شده در این دو بررسی باشد. pH اولیهٔ محیط ۵/۷ بود. این میزان پس از کاربرد تیمارهای تاریکی و نور به ترتیب به ۶/۱۰ و ۶/۹۶ افزایش پیدا کرد. درحالی‌که Cai *et al.* (2011) شماری محرک و فشار هیدرواستاتیک بالا را روی کشت‌های یاخته‌ای انگور رقم گامای فروکس اعمال کردند و افزایش ناچیزی از pH اندازه‌گیری‌شده را در فرآیند رشد یاخته مشاهده کردند. اگرچه میزان عددی هدایت الکتریکی در روز چهاردهم نسبت به میزان آن در آغاز آزمایش (۴/۱۴ میلی زیمنس بر سانتی‌متر) کمتر بود، این میزان تحت تیمارهای تاریکی و نور به ترتیب برابر با ۳/۴۰ و ۲/۹۰ میلی زیمنس بر سانتی‌متر بود که گویای یک اختلاف معنی‌دار بین دو تیمار یادشده است. حجم محیط کشت مصرفی در تاریکی در مقایسه با نور بیشتر بود که این نتیجه با کاهش وزن یاخته‌ای در تاریکی منطقی به نظر می‌رسد. به‌عنوان یک نتیجهٔ مهم ازآنجاکه میزان هدایت الکتریکی تحت تیمار تاریکی بیشتر از این میزان نسبت به تیمار نوری بود، به همین دلیل میزان جذب آب و مواد مغذی یاخته‌ها در محیط‌های تحت تأثیر این تیمار کمتر بوده و در نتیجه میزان رشد یاخته و در پی آن میزان وزن یاخته‌ای به‌دست‌آمده از این تیمار کمتر بود. با توجه به شکل ۲، تیمارهای تاریکی و نور تأثیر معنی‌داری بر فراسنجه‌های تولیدهای یاخته‌ای شامل فنول‌ها، فلاونوئیدها، و میزان‌های رسوراترول و پیسید نشان ندادند. بااین‌وجود، میزان فنول‌ها، فلاونوئیدها و رسوراترول در تاریکی به ترتیب با مقادیر عددی ۱۰۵/۲۹ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک یاخته، ۱۲۲/۲۳ میلی‌گرم کاتکین در هر گرم وزن خشک یاخته و ۴/۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشتر از میزان آن‌ها در نور به ترتیب با ارزش‌های ۹۹/۵۹، ۱۰۳/۸۰ و ۳/۹۸ بودند. لازم به یادآوری است که نور (۰/۹۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تأثیر بیشتری نسبت به تاریکی (۰/۷۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر) برای تولید پیسید نشان داد. شکل ۳ تأثیر تیمارهای تاریکی و نور را در میزان تولید استیلبنوئیدها (رسوراترول + پیسید) نشان می‌دهد. همان‌گونه که پیش‌بینی می‌شد، تاریکی نسبت به نور نقش مؤثرتری در تحریک مسیر زیست‌ساختی مربوط به تجمع ترکیب‌های پلی فنولی استیلبنوئیدها بازی می‌کند. شماری از محققان (Shi *et al*., 2014; Zhou & Singh, 2004; Cheng *et al*., 2015; Guan *et al*., 2016) در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، نور می‌تواند تولید رنگیزه‌های آنتوسیانین‌ها را به ترتیب در *Myrica rubra*، *Vaccinium macrocarpon*، *Vitis vinifera* cv. Yatomi Rosa و *V. vinifera* cv. Gamay and

Archive of SID

www.SID.ir

Gamay Freaux تحریک کند. این مورد همچنین در یاخته‌های روییده در کشت‌های تعلیقی نشئت‌گرفته از حبه‌های انگور (Zhang *et al*., 2002; Krasnow & Murphy, 2004) نیز تأیید شده است. بر پایهٔ این گزارش‌ها و نتایج به‌دست‌آمده، به نظر می‌رسد که یاخته‌های انگور به دلیل داشتن دو مسیر سوخت‌وسازی رقیب می‌توانند تحت تأثیر تیمارهای تاریکی و نور به ترتیب در جهت تولید استیلبنوئیدها و یا فلاونوئیدها قرار بگیرند. در نتیجه، این‌گونه می‌توان استنباط کرد که یاخته‌های روییده در تاریکی از یاخته‌های در حال رشد در نور مرئی از لحاظ تولید ترکیب‌های استیلبنوئید کل تواناتر هستند. احتمال دارد حذف تابش نور از یاخته‌های کشت‌های تعلیقی، مسیر سوخت‌وسازی موجود در یاخته‌های انگور را به سمت تولید استیلبنوئیدها سوق دهد. این نتیجه می‌تواند برای تولید انبوه استیلبنوئیدها در مقیاس تجاری و برای هدف‌های دارویی در آینده سودمند باشد.

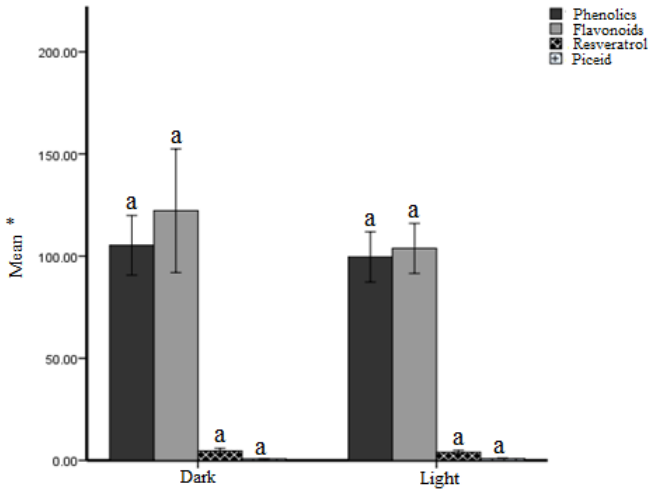


شکل ۱. اثر تیمارهای تاریکی و نور روی پارامترهای رشد سلول شامل: وزن تازه سلول (FCW)، وزن خشک سلول (DCW)، pH محیط، حجم محیط مصرفی (SMV) و هدایت الکتریکی محیط (EC).

* وزن تازه سلول و وزن خشک سلول به صورت گرم در هر ۸۰ میلی لیتر از محیط بیان شدند و واحدها برای حجم محیط مصرفی و هدایت الکتریکی به ترتیب میلی لیتر و میلی زیمنس بر سانتی متر بودند.

Figure 1. Effect of the dark and light treatments on the cell growth parameters including: Fresh Cell Weight (FCW); Dry Cell Weight (DCW); pH value; Spent Medium Volume (SMV) and Electrical Conductivity (EC).

* FCW and DCW were expressed as gram per 80 ml of the medium and those for SMV and EC were ml and mS/cm, respectively.



شکل ۲. اثر تیمارهای نور و تاریکی روی پارامترهای تولید سلول شامل: فنول‌ها (P)، فلاونوئیدها (F) و مقادیر رسوراترول و پیسید.

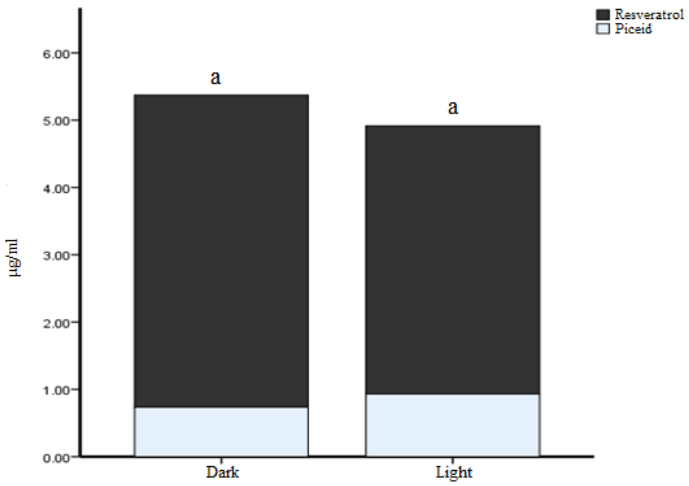
* فنول‌ها و فلاونوئیدها به ترتیب به صورت میلی گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک سلول و میلی گرم کاتکین در هر گرم وزن خشک سلول بیان شدند و واحدها برای رسوراترول و پیسید میکروگرم بر میلی لیتر بود.

Figure 2. Effect of the dark and light treatments on the cell production parameters consisting of: Phenolics (P); Flavonoids (F); Resveratrol and Piceid quantities.

* P and F were expressed as mg GA per gram dry cell weight and mg catechin per gram dry cell weight, respectively, and those for resveratrol and piceid were as µg/ml.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳. اثر تاریکی و نور روی تحریک مسیر متابولیکی مربوط به تولید استیلبنوئیدها

Figure 3. Effect of the dark and light on stimulating the metabolic pathway related to the production of the stilbenoids

تأثیر محرک اشعهٔ فرابنفش C بر فراسنجه‌های تولید و رشد یاخته

همان‌گونه که در شکل ۴ نشان داده شده، تفاوت معنی‌داری در میان شماری از عامل‌های اندازه‌گیری‌شدهٔ مربوط به رشد یاخته مانند وزن تازهٔ یاخته، وزن خشک یاخته، حجم محیط کشت مصرفی و همچنین هدایت الکتریکی مشاهده شد. وزن تازه و خشک یاخته‌های تیمارشده با اشعهٔ فرابنفش C به‌طور آشکاری در مقایسه با کشت‌های شاهد کاهش پیدا کردند. بیشترین و کمترین وزن‌های تازه و خشک یاخته‌ای به ترتیب در کشت‌های یاخته‌ای شاهد (۳۸/۹۲ و ۰/۶۰ گرم در ۸۰ میلی‌لیتر از محیط) و کشت‌های تحریک‌شده با زمان ده دقیقه از اشعهٔ فرابنفش C (۱۲/۸۵ و ۰/۳۶ گرم) مشاهده شدند. به‌طور همسان دو زمان دیگر استفاده‌شده از اشعهٔ فرابنفش C شامل ۲۰ و ۳۰ دقیقه نیز وزن‌های تازه و خشک یاخته‌ای را به ترتیب با میانگین‌های ۲۸/۸۱-۰/۵۷ گرم و ۲۰/۲۹-۰/۵۱ گرم در مقایسه با کشت‌های شاهد کاهش دادند. این رخداد به این علت می‌تواند باشد که اشعهٔ فرابنفش C ممکن است مقادیر جذب آب و مواد مغذی دیگر یاخته‌ها از محیط کشت را کاهش داده و در پی آن زمان تقسیم شدن یاخته‌ها را افزایش دهد. Xu *et al.* (2015) در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، تیمار تابش اشعهٔ فرابنفش C برای مدت ۱۰ و ۲۰ دقیقه، اثر معنی‌داری در وزن خشک یاخته‌ها در مقایسه با کشت‌های شاهد در کشت‌های تعلیقی یاخته‌ای انگور رقم Cabernet Sauvignon نشان نداد و بهترین زمان استفاده از این تیمار به‌منظور جلوگیری از رشد یاخته را زمان ۳۰ دقیقه گزارش کردند که با نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش که زمان ده دقیقه را به‌عنوان بهترین زمان برای جلوگیری از رشد یاخته معرفی می‌کند، مغایرت دارد. در این رابطه گزارش‌های چندی در استفاده از محرک‌های دیگر وجود دارند که نشان می‌دهند ارتباط مستقیمی بین استفاده از محرک‌ها و جلوگیری از رشد یاخته وجود دارد (Donnez *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2015). بیشترین و کمترین حجم محیط کشت مصرفی در کشت‌های تیمارشده با ده دقیقه از اشعهٔ فرابنفش C (۶۰/۶۷ میلی‌لیتر) و کشت‌های غیرتیمارشده (۳۷ میلی‌لیتر) مشاهده شد، لذا این منطقی به نظر می‌رسد که هر چه وزن تازهٔ یاخته‌ای کمتر باشد، حجم محیط کشت مصرفی بیشتر خواهد بود. هدایت الکتریکی در کشت‌های تعلیقی یاخته‌ای به‌طور مستقیم با شماری از ترکیب‌های یونی به‌ویژه اجزای نیترات همبستگی نشان می‌دهد، به‌طوری‌که هرچه میزان جذب یاخته‌ای از این مواد مغذی درون کشت‌های یاخته‌ای بیشتر باشد میزان هدایت الکتریکی محیط کمتر خواهد بود و در نتیجه سبب رشد یاخته‌ای بیشتری می‌شود (Cai *et al.*, 2011; Hahlbrock, 1975). از سوی دیگر، تجزیهٔ همبستگی،

Archive of SID

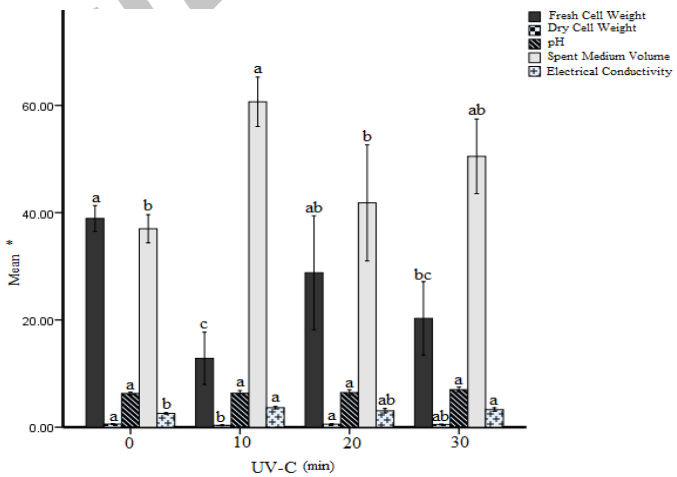
www.SID.ir

وجود ضریب همبستگی منفی معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ درصد (۰/۹۸-) بین هدایت الکتریکی و وزن تازهٔ یاخته را نشان داد. بنابراین اگر هدایت الکتریکی افزایش پیدا کند، وزن تازهٔ یاخته کاهش پیدا خواهد کرد. این نتیجه به‌روشنی در کشت‌های تعلیقی یاخته‌ای مشاهده شده است، به‌طوری‌که بیشترین و کمترین مقادیر عددی مربوط به هدایت الکتریکی به ترتیب در کشت‌های یاخته‌ای تحریک‌شده با ده دقیقه از اشعهٔ فرابنفش C (۳/۶۵ میلی زیمنس بر سانتی‌متر) و کشت‌های شاهد (۲/۵۷ میلی زیمنس بر سانتی‌متر) مشاهده شد که این کشت‌ها به ترتیب کمترین و بیشترین وزن‌های یاخته‌ای را داشتند. همان‌گونه که در شکل ۵ نشان داده شده است، اگرچه تفاوت‌های معنی‌داری در میان فنول‌ها و فلاونوییدهای مربوط به کشت‌های یاخته‌ای تیمارشده با زمان‌های مختلف تابش اشعهٔ فرابنفش C و شاهد مشاهده نشده ولی، تیمار زمانی ده دقیقه بیشترین فنول‌ها (۱۱۲/۷۳ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک یاخته) و فلاونوئیدها (۱۵۰/۴۷ میلی‌گرم کاتکین در هر گرم وزن خشک یاخته) را در مقایسه با تیمارهای دیگر نشان داد. گزارش‌های محدودی مبنی بر افزایش معنی‌دار فنول‌ها و فلاونوئیدها تحت تأثیر تفاوت‌های زمانی مربوط به تابش اشعهٔ فرابنفش C در مقایسه با شاهد وجود دارد (Xu *et al*., 2015). وجود اختلاف و نتایج متفاوت بین این پژوهش و بررسی‌های دیگر می‌تواند به دلیل رگه‌های یاخته‌ای به کار گرفته شده از رقم‌های متفاوت انگور باشد. نتایج این بررسی پیشنهاد می‌کنند که استفاده از تیمارهای زمانی کمتر مربوط به تابش اشعهٔ فرابنفش C می‌توانند در تجمع فنول‌ها و فلاونوییدها مؤثرتر باشند. Ali *et al*. (2014) از محرک (الیسیتور)های جاسمونیک اسید و متیل جاسمونات استفاده کرده و مشاهده کردند که غلظت‌های کم ۰/۵ و ۱/۰ میلی‌گرم بر لیتر اثر افزایشی در تجمع فنول‌ها و فلاونوئیدها داشتند. این گزارش نتایج این پژوهش را مبنی بر معرفی کمترین تیمار زمانی استفاده‌شده (ده دقیقه) از محرک اشعهٔ فرابنفش C به‌عنوان بهترین تیمار برای تولید فنول‌ها و فلاونوئیدها تأیید می‌کند. بر پایهٔ شکل ۶، هیچ تفاوت معنی‌دار آماری از نظر غلظت پیسید تحت تأثیر تیمارهای زمانی تابش اشعهٔ فرابنفش C مشاهده نشد. با این وجود، با توجه به شکل ۶ می‌توان دید که غلظت رسوراترول بین کشت‌های تعلیقی یاخته‌ای تیمارشده با ده دقیقه از اشعهٔ فرابنفش C و کشت‌های دیگر تفاوت دارد. این نتیجه نشان می‌دهد، محرک اشعهٔ فرابنفش C برای تحریک تولید رسوراترول درون یاخته‌های کشت‌های تعلیقی یاخته‌ای در مقایسه با تولید رسوراترول گلوکوزید یا پیسید مؤثرتر است. درنهایت بیشتر تولید رسوراترول در یاخته‌های روئیده در محیط تحت تأثیر ده دقیقه تابش اشعهٔ فرابنفش C ثبت شد که این میزان ۲/۲۹ برابر کشت‌های شاهد بود. اگرچه تفاوت‌های غیر معنی‌داری در میان دیگر تیمارهای زمانی مشاهده شد، اما میزان رسوراترول تولیدشده در تیمارهای زمانی ۲۰ و ۳۰ دقیقه تابش نیز به ترتیب ۱/۱۵ و ۱/۴۲ برابر کشت‌های شاهد بودند. نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش با یافته‌های Xu *et al*. (2015) و Liu *et al*. (2010) که زمان ۲۰ دقیقه را به‌عنوان بهترین برای تولید استیلبنوئیدها به ترتیب در کشت‌های یاخته‌ای Cabernet Sauvignon و پینه‌های به‌دست‌آمده از *V. labrusca* ×*V. riparia* معرفی کردند، مغایر بودند. مقایسهٔ این نتایج و نتایج بررسی‌های دیگران نشان می‌دهد، تولید استیلبن‌ها تحت تأثیر تیمارهای اشعهٔ فرابنفش C در کشت‌های تعلیقی یاخته‌ای ناشی از رقم‌های انگور در زمان‌های مختلف نتایج متفاوتی خواهد داشت. درمجموع نتایج این تحقیق منطبق بر نتایج Donnez *et al*. (2011) و Aroa *et al*. (2010) است که به ترتیب غلظت‌های کمتر از دو محرک غیرزیستی (متیل جاسمونات) و زیستی (*Cuscuta*) را به‌عنوان غلظت بهینه برای تولید استیلبنوئیدها معرفی کردند. افزون بر این، Sae-Lee *et al*. (2014) در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، هر چه غلظت‌های نیترات آمونیوم استفاده‌شده به‌عنوان محرک در کشت‌های یاخته‌ای انگور کمتر باشد، محتوای متابولیت‌های ثانوی تولیدشده مانند رسوراترول بیشتر خواهد بود. Van der Plas *et al*. (1995) نیز در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، تولید درون شیشه‌ای متابولیت های ثانوی به‌طور

Archive of SID

www.SID.ir

مثبتی با تقسیم و فعالیت سوخت‌وسازی کمتر یاخته و همچنین محتوای قند درونی بالاتر آن‌ها همبستگی دارد. بنابراین، احتمال دارد که یک همبستگی منفی بین متابولیت‌های ثانوی و رشد یاخته وجود داشته باشد. به نظر می‌رسد که توقف رشد در یاخته رخداد مهمی در راستای زیست‌ساخت متابولیت‌های ثانوی به‌عنوان یک راهبرد دفاعی باشد. از این‌رو، می‌توان انتظار داشت که هر چه رشد یاخته کمتر باشد، تولید رسوراترول در یاخته‌های کشت‌شده، به‌عنوان یک پاسخ به تنش بیشتر خواهد بود. با انجام تجزیهٔ همبستگی بین وزن تازهٔ یاخته و مقادیر رسوراترول تولیدشده مشخص شد که یک همبستگی منفی معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ درصد (۰/۷۳-) بین آن‌ها وجود دارد. با در نظر گرفتن اینکه پیسید یکی از مشتقات رسوراترول در فرم گلیکوزیل است و بر مبنای فرضیه از مولکول رسوراترول پس از تحریک مسیر سوخت‌وسازی مربوط به زیست‌ساخت استیلبنوئیدها تولید خواهد شد، در این تحقیق، مشخص شد که یک همبستگی منفی غیر معنی‌دار بین میزان رسوراترول و پیسید در یاخته‌های تیمارشده با تیمارهای زمانی مختلف اشعهٔ فرابنفش C وجود دارد (شکل ۷). به‌طوری‌که هر چه میزان رسوراترول در تیمارهای مورد نظر بیشتر باشد از میزان پیسید کاسته خواهد شد. ازآنجایی‌که رسوراترول با دریافت یک واحد از یوریدین دی فسفات-گلوکز تبدیل به پیسید می‌شود بنابراین منطقی به نظر می‌رسد که افزایش یکی از این ترکیب‌های درون‌یاخته‌ها با کاهش دیگری همراه باشد. بیشترین و کمترین میزان پیسید زیست‌ساخت شده به ترتیب در کشت‌های یاخته‌ای تحت تأثیر زمان‌های ۳۰ و ۱۰ دقیقه تابش نور اندازه‌گیری شدند که این مقادیر به ترتیب ۱/۴۷ و ۱/۱۷ برابر کشت‌های شاهد بودند. این نتایج نشان می‌دهند که تأثیر محرک اشعهٔ فرابنفش C برای تولید رسوراترول خیلی مؤثرتر از تأثیر آن برای تولید پیسید در کشت‌های یاخته‌ای به‌دست‌آمده از رقم مورد بررسی است. افزون بر این، تأثیر تیمارهای مختلف روی استیلبنوئیدها (رسوراترول + پیسید) در شکل ۸ نشان داده شده است. بر پایهٔ این داده‌ها، تیمار زمانی ده دقیقه از تابش اشعهٔ فرابنفش C را می‌توان به‌عنوان زمان بهینه برای استفاده از این محرک برای تولید استیلبنوئیدهای بررسی‌شده معرفی کرد. درنهایت، این تیمار بهترین تیمار به کار گرفته شده در این پژوهش برای تولید فنول‌ها، فلاونوئیدها و همچنین استیلبنوئیدها معرفی می‌شود.



شکل ۴. اثر تیمارهای نور UV-C روی پارامترهای رشد سلول شامل: وزن تازه سلول (FCW)، وزن خشک سلول (DCW)، pH محیط، حجم محیط مصرفی (SMV) و هدایت الکتریکی محیط (EC).

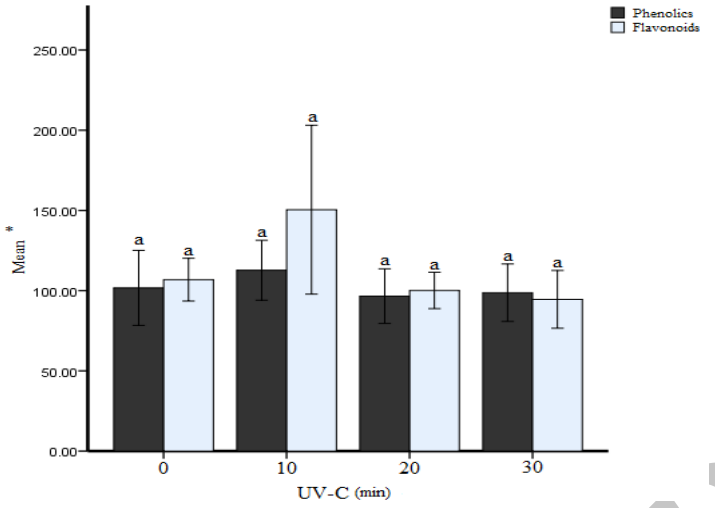
* وزن تازه سلول و وزن خشک سلول به صورت گرم در هر ۸۰ میلی لیتر از محیط بیان شدند و واحدها برای حجم محیط مصرفی و هدایت الکتریکی به ترتیب میلی لیتر و میلی زیمنس بر سانتی متر بودند.

Figure 4. Effect of UV-C treatments on the cell growth parameters including: Fresh Cell Weight (FCW); Dry Cell Weight (DCW); pH value; Spent Medium Volume (SMV) and Electrical Conductivity (EC).

* FCW and DCW were expressed as gram per 80 ml of the medium and those for SMV and EC were ml and mS/cm, respectively

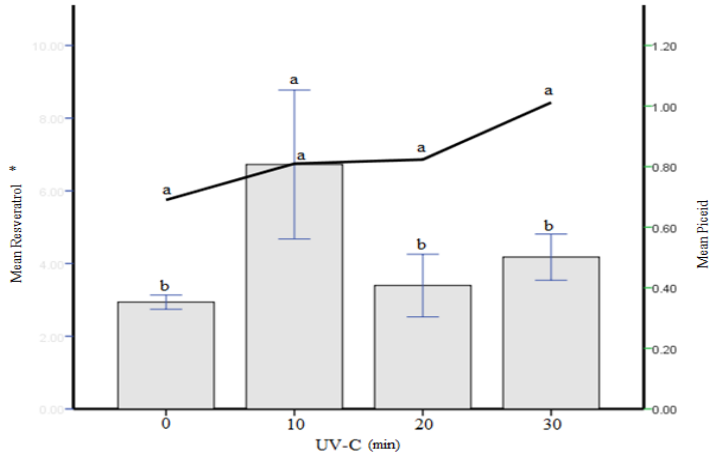
Archive of SID

www.SID.ir



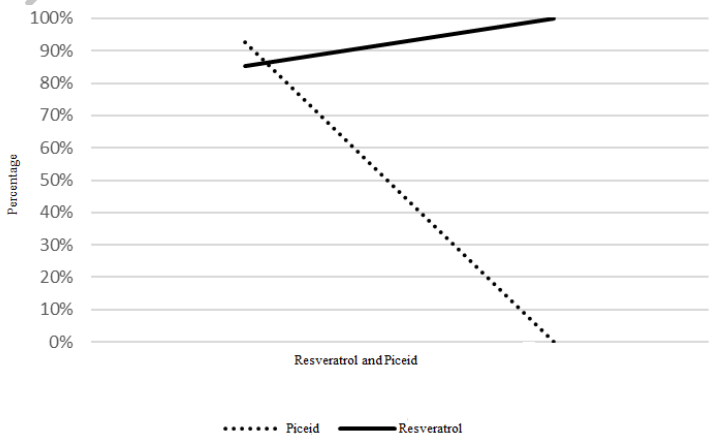
شکل ۵. اثر تیمارهای نور UV-C روی پارامترهای تولید سلول شامل: فنول‌ها (P) و فلاونوئیدها (F).
* فنول‌ها و فلاونوئیدها به ترتیب به صورت میلی گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک سلول و میلی گرم کاتکین در هر گرم وزن خشک سلول بیان شدند.

Figure 5. Effect of UV-C treatments on the cell production parameters consisting of: Phenolics (P) and Flavonoids (F)
* P and F were expressed as mg GA per gram dry cell weight and mg catechin per gram dry cell weight, respectively



شکل ۶. اثر تیمارهای نور UV-C روی تولید رسوراترول و پیسید.
* رسوراترول و پیسید به صورت میکروگرم بر میلی لیتر بیان شدند.

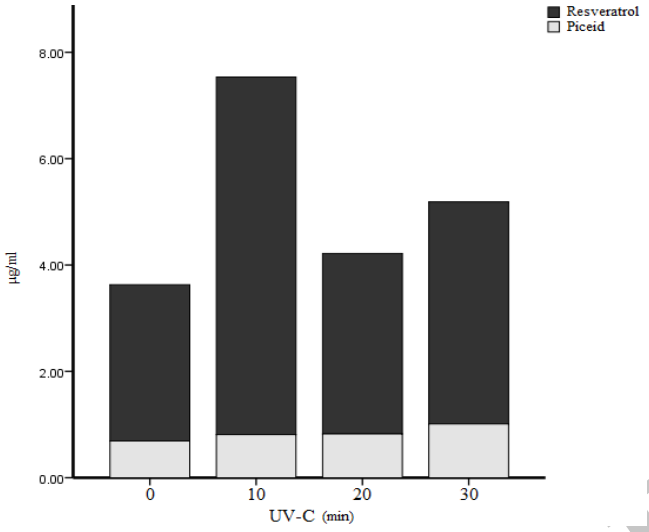
Figure 6. The effect of UV-C treatments on the bio-production of resveratrol and piceid
* Resveratrol and piceid were expressed as µg/ml



شکل ۷. رابطه بین تولید رسوراترول و پیسید در کشت های سلولی تحت تیمارهای نور UV-C

Figure 7. The correlation between the production of resveratrol and piceid affected by UV-C treatments

www.SID.ir



شکل ۸. اثر تیمارهای زمانی نور UV-C روی تولید استیلبنوئیدها (رسوراترول + پیسید)

Figure 8. The effect of UV-C treatments on the production of Stilbenoids (Resveratrol + Piceid)

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد، دو مسیر سوخت‌وسازی رقیب در یاخته‌های انگور می‌توانند تحت تأثیر تیمارهای نور و تاریکی قرار گیرند. شماری از گزارش‌ها نور را به‌عنوان یک عامل کلیدی برای تحریک مسیر سوخت‌وسازی فلاونوئیدها به‌ویژه تولید رنگیزه‌های آنتوسیانین‌ها معرفی کرده‌اند. در این تحقیق، اگرچه تفاوت بین دو سطح نور از لحاظ آماری برای تولید استیلبنوئیدها غیر معنی‌دار بود، اما به نظر می‌رسد که تحریک بیشتر این مسیر به‌وسیلهٔ تاریکی در مقایسه با نور می‌تواند به‌منظور پیشرفت در فرآیندهای همسان برای هدف‌های تجاری سودمند باشد. افزون بر این، ترکیب تاریکی و زمان ده دقیقه از اشعهٔ فرابنفش C در این تحقیق به‌عنوان تیمار بهینه و مؤثرتر برای توسعهٔ فرآیندهای ترکیبی تعیین شد. بر پایهٔ مشاهده‌ها، یک همبستگی منفی معنی‌دار بین تولید استیلبنوئیدها با رشد یاخته و همچنین یک همبستگی منفی غیرمعنی‌دار بین دو ترکیب رسوراترول و پیسید وجود داشت. اگرچه بررسی‌های بیشتری به‌منظور کشف همهٔ این سازوکارها مورد نیاز است، نتایج کار ما پیشنهاد می‌کند، به‌احتمال حذف تابش نور مرئی از یاخته‌ها و تیمار آن‌ها با زمان‌های مختلف محرک اشعهٔ فرابنفش C به‌ویژه زمان کمتر ده دقیقه در مسیر زیست‌ساختی رسوراترول نسبت به مسیر زیست‌ساختی دیگر مؤثرتر خواهد بود.

REFERENCES

1. Ali, M., Abbasi, B. H. & Ali, G. S. (2015). Elicitation of antioxidant secondary metabolites with jasmonates and gibberellic acid in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 120(3), 1099-1106.
2. Arora, J., Goyal, S. & Ramawat, K.G. (2010). Enhanced stilbene production in cell cultures of *Cayratia trifolia* through co-treatment with abiotic and biotic elicitors and sucrose. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46, 430-436.
3. Cai, Z., Riedel, H., Saw, N.M M.T., Mewis, I., Reineke, K., Knorr, D. & Smetanska, I. (2011). Effects of elicitors and high hydrostatic pressure on secondary metabolism of *Vitis vinifera* suspension culture. *Process Biochemistry*, 46, 1411-1416.
4. Cheng, J. H., Wei, L. Z. & Wu, J. (2015). Effect of Light Quality Selective Plastic Films on Anthocyanin Biosynthesis in *Vitis vinifera* L. cv. Yatomi Rosa. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 17, 157-166.
5. Donnez, D., Kim, K. H., Antoine, S., Conreux, A., De Luca, V., Jeandet, P., Clément, C. & Courot, E. (2011). Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2 L stirred bioreactor. *Process Biochemistry*, 46, 1056-1062.

Archive of SID

www.SID.ir

6. Dornenburg, H. & Knorr, D. (1993). Cellular permeabilization of cultured plant tissues by high electric field pulses or ultra high pressure for the recovery of secondary metabolites. *Food Biotechnology*, 7, 35-48.
7. Ferri, M., Tassoni, A., Franceschetti, M., Righetti, L., Naldrett, M. J. & Bagni, N. (2009). Chitosan treatment induces changes of protein expression profile and stilbene distribution in *Vitis vinifera* cell suspensions. *Proteomics*, 9, 610-624.
8. Gambourg, O. L., Miller, R. A. & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50, 151-156.
9. Guan, L., Dai, Z., Wu, B.H., Wu, J., Merlin, I., Hilbert, G., Renaud, C., Gome`s, E., Edwards, E., Li, S.H. & Delrot, S. (2016). Anthocyanin biosynthesis is differentially regulated by light in the skin and flesh of white-fleshed and teinturier grape berries. *Planta*, 243, 23-41.
10. Hahlbrock, K. (1975). Further Studies on the Relationship between the Rates of Nitrate Uptake, Growth and Conductivity Changes in the Medium of Plant Cell Suspension Cultures. *Planta*, 124, 311-318.
11. Hsieh, T. C. & Wu, J. M. (2010). Resveratrol: Biological and pharmaceutical properties as anticancer molecule. *BioFactors*, 36 (5), 360-369.
12. Hsieh, T. C. (2009). Antiproliferative Effects of Resveratrol and the Mediating Role of Resveratrol Targeting Protein NQO2 in Androgen Receptorpositive, Hormone-non-responsive CWR22Rv1 Cells. *Anticancer Research*, 29, 3011-3018.
13. Kim, Y. C. (2010). Neuroprotective Phenolics in Medicinal Plants. *Archives of Pharmacal Research*, 33, 1611-1632.
14. Kiselev, K. V., Shumakova, O. A. & Manyakhin, A.Yu. (2013). Effect of Plant Stilbene Precursors on the Biosynthesis of Resveratrol in *Vitis amurensis* Rupr. Cell Cultures. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49(1), 53-58.
15. Kloypan, C., Jeenapongsa, R., Sri-in, P., Chanta, S., Dokpuang, D., Tip-pyang, S. & Surapinit, N. (2012). Stilbenoids from *Gnetum macrostachyum* Attenuate Human Platelet Aggregation and Adhesion. *Phytotherapy Research*, 26, 1564-1568.
16. Krasnow, M.N. & Murphy, A.T. (2004). Polyphenol Glucosylating Activity in Cell Suspensions of Grape (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3467-3472.
17. Krisa, S., Larronde, F., Budzinski, H., Decendit, A., Deffieux, G. & Merillon, J. M. (1999). Stilbenes production by *Vitis vinifera* cell suspension cultures: methyl jasmonate induction and 13C biolabeling. *Journal of Natural Products*, 62, 1688-1690.
18. Lijavetzky, D., Almagro, L., Belchi-Navarro, S., Martínez-Zapater, J. M., Bru, R. & Pedreño, M. A. (2008). Synergistic effect of methyljasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in Monastrell grapevine cell cultures. *BMC Research Notes*, 1, 132.
19. Liscombe, D. K. (2008). *Discovery of Novel Alkaloid Biosynthetic Genes Using Biochemical Genomics.* Ph.D. Thesis. Department of Biological Sciences, Calgary University, Canada.
20. Liu, W., Liu, C., Yang, C., Wang, L. & Li, S. (2010). Effect of grape genotype and tissue type on callus growth and production of resveratrols and their piceids after UV-C irradiation. *Food Chemistry*, 122, 475-481.
21. Mewis, I., Smetanska, I. M., Müller, C. T. & Ulrichs, C. (2011). Specific Poly-phenolic Compounds in Cell Culture of *Vitis vinifera* L. cv. Gamay Fréaux. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164, 148-161.
22. Morel, G. (1970). Le probleme de la transformation tumorale chez les végétaux. *Physiologie Vegetale*, 8, 189-191.
23. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 472-497.
24. Nagella, P. & Murthy, H. N. (2010). Establishment of cell suspension cultures of *Withania somnifera* for the production of withanolide A. *Bioresource Technology*, 101, 6735-6739.
25. Qu, J., Zhang, W. & Yu, X. (2011). A combination of elicitation and precursor feeding leads to increased anthocyanin synthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 107, 261-269.
26. Roat, C. & Ramawat, K. G. (2009). Morphactin and 2iP markedly enhance accumulation of stilbenes in cell cultures of *Cayratia trifolia* (L.) Domin. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31, 411-414.
27. Sae-Lee, N., Kerdchoechuen, O. & Laohakunjit, N. (2014). Enhancement of Phenolics, Resveratrol and Antioxidant Activity by Nitrogen Enrichment in Cell Suspension Culture of *Vitis vinifera*. *Molecules*, 19, 7901-7912.
28. Santamaria, A. R., Mulinacci, N., Valletta, A., Innocenti, M. & Pasqua, G. (2011). Effects of Elicitors on the Production of Resveratrol and Viniferins in Cell Cultures of *Vitis vinifera* L. cv Italia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 9094-9101.

Archive of SID

www.SID.ir

29. Saw, N. M. M. T., Riedel, H., Cai, Z., Ku¨tu¨k, O. & Smetanska, I. (2012). Stimulation of anthocyanin synthesis in grape (*Vitis vinifera*) cell cultures by pulsed electric fields and ethephon. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 108, 47-54.
30. Shi, L., Cao, S., Chen, W. & Yang, Z. (2014). Blue light induced anthocyanin accumulation and expression of associated genes in Chinese bayberry fruit. *Scientia Horticulturae*, 179, 98-102.
31. Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
32. Van der Plas, L. H. W., Eijkelboom, C. & Hagendoorn, M. J. M. (1995). Relation between primary and secondary metabolism in plant cell suspensions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 43, 111-116.
33. Vuong, T. V., Franco, C. & Zhang, D. (2014). Treatment strategies for high resveratrol induction in *Vitis vinifera* L. cell suspension culture. *Biotechnology Reports*, 1-2, 15-21.
34. Waffo-Téguo, P., Krisa, S., Pawlus, A. D., Richard, T., Monti, J.P. & Merillon, J. M. (2013). Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes. In: K.G. Ramavat & J.M. Mérillon (Eds), *Grapevine Stilbenoids: Bioavailability and Neuroprotection*. (p. 2277) Springer Science.
35. Xu, A., Zhan, J. C. & Huang, W. D. (2015). Effects of ultraviolet C, methyl jasmonate and salicylic acid, alone or in combination, on stilbene biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 122(1), 197-211.
36. Yin, Y., Borges, G., Sakuta, M., Crozier, A. & Ashihara, H. (2012). Effect of phosphate deficiency on the content and biosynthesis of anthocyanins and the expression of related genes in suspension-cultured grape (*Vitis* sp.) cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, 55, 77-84.
37. Yuan, Y. J., Wei, Z. J., Miao, Z. Q. & Wu, J. C. (2002). Acting paths of elicitors on Taxol biosynthesis pathway and their synergistic effect. *Biochemical Engineering Journal*, 10, 77-83.
38. Zhang, W., Curtin, C., Kikuchi, M. & Franco, C. (2002). Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Science*, 162, 459-468.
39. Zhao, J., Davis, L. C. & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23, 283-333.
40. Zhou, Y. & Singh, B. R. (2004). Effect of Light on Anthocyanin Levels in Submerged, Harvested Cranberry Fruit. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 259-263.

Archive of SID

www.SID.ir