

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

منصور غلامی^{۱*} و سید علی اندی^۲

۱ و ۲. استاد و دانشجوی دکتری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۶/۱۴)

چکیده

استیلبن‌های انگور یک خانواده شناخته شده از پلی فتول‌های گیاهی هستند که فعالیت‌های زیستی (بیولوژی) چندی از آنها در رابطه با سودمندی‌های سلامتی به تأیید رسیده‌اند. در این پژوهش، تأثیر محرک اشعه 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 رگه (لاین) یاخته‌ای به دست آمده از میانبر انگور رقم شاهانی (*Vitis vinifera* cv. Shahani) در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح کامل تصادفی بررسی و نتایج کسب شده با تیمارهای شاهد مقایسه شد. نتایج نشان دادند، تاریکی می‌تواند بیشتر از نور مرئی مسیر سوخت‌وسازی (متابولیسم) مربوط به تولید استیلبنوئیدها را تحریک کند. در میان زمان‌های استفاده شده از محرک اشعه فرابنفش C، ده دقیقه استفاده از اشعه فرابنفش C برای تولید مؤثر و تجمع بالای فتول‌ها (۱۱۲/۷۳ میلی گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک یاخته) و فلاونوئیدها (۱۵۰/۴۷ میلی گرم کاتکین در هر گرم وزن خشک یاخته) و همچنین استیلبنوئیدها شامل مجموع رسوراترول و فرم گلوکوزیله شده آن به نام پسید (۷/۵۴ میکروگرم بر میلی لیتر) بهینه بود. افزون بر این، نتایج نشان داد، یک رابطه منفی معنی‌دار بین تولید این متابولیت‌ها و رشد یاخته وجود دارد. این یافته‌ها داده‌های ارزشمندی به منظور 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 اشعه 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 Andei²

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

مقدمه

گیاه انگور با نام علمی *Vitis vinifera* L.، از خانواده تاکسانان (Vitaceae) یک گیاه چوبی چندساله است. انگور در بین درختان میوه به عنوان میوه نخست در جهان معرفی می‌شود. اراضی موکاری جهان در سال ۲۰۱۳، ۷/۵۴۶ میلیون هکتار گزارش شده است. اگرچه مصرف عمده انگور در جهان برای تولید آب‌میوه (۶/۸ میلیون هکتار) است، از این میوه برای مصرف تازه خوری و تهیه میوه‌های خشک نیز استفاده فراوانی می‌شود (Waffo-Téguo *et al.*, 2013). متابولیت‌های ثانوی یا متابولیت‌های تخصصی برخلاف متابولیت‌های اولیه، بیشتر به خانواده‌های گیاهی خاصی اختصاص دارند و به‌طور کلی این متابولیت‌ها به‌عنوان یک راهبرد دفاعی و برای زنده‌مانی علیه شمار زیادی از تنش‌های زیستی و غیر زیستی تولید می‌شوند. در مجموع چهار رده 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 دسته ترکیب‌های فنولی قرار می‌گیرند. مواد شیمیایی (پلی) فنولی انگورها در دو دسته مهم به نام‌های فلاونوئیدها و استیلبنوئیدها قرار می‌گیرند (Saw *et al.*, 2011; Santamaria *et al.*, 2010; Mewis *et al.*, 2011). زیست‌ساخت این ترکیب‌ها از مسیر مالونات/فنیل پروپانئید 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, 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 بازده 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)، تغذیه 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 اشعه 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 اشعه ایکس و نور مرئی قرار دارد. این اشعه طول‌موجی بین ۱۰۰ و ۴۰۰ نانومتر دارد و به سه دسته اشعه فرابنفش A (۳۱۵-۴۰۰ نانومتر)، اشعه فرابنفش B (۲۸۰-۳۱۵ نانومتر) و اشعه فرابنفش C (۱۰۰-۲۸۰ نانومتر) تقسیم می‌شود. در این میان طیف اشعه فرابنفش C با کوتاه‌ترین طول‌موج، بیشترین سطح انرژی را به خود اختصاص می‌دهد (Zhao *et al.*, 2005). درنتایج تحقیقی گزارش شده است، تیمار ترکیبی اشعه فرابنفش C با متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک می‌تواند به‌عنوان یک روش مؤثر برای افزایش تولید استیلبن در کشت‌های یاخته‌ای انگور رقم Cabernet Sauvignon استفاده شوند که یک تأثیر هم‌افزایی در

مواد و روش‌ها

استقرار کشت‌های پینه

بافت‌های پینه از میانبر حبه‌های در مرحله 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 ماده شوینده اضافه شده بود، شسته شدند. آنگاه نمونه‌ها درون اتانول ۷۰ درصد حجمی به حجمی به مدت ۳۰ ثانیه قرار گرفتند و پس از این 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 پس از این مرحله از ضدعفونی، عمل شست‌وشو همانند برابر مراحل گفته‌شده بالا انجام شد. هر حبه سترون شده 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 پینه تولیدشده از کناره 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 24 ± 2 درجه سلسیوس و در تاریکی مطلق نگهداری شدند.

استقرار کشت‌های تعلیقی یاخته‌ای

کشت‌های تعلیقی یاخته‌ای با انتقال ۲ گرم وزن تازه پینه 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 کنترل‌شده دمایی

تجمع ترانس-رسوراترول خارج یاخته‌ای نشان داد. همچنین در این بررسی بیان نسبی ژن‌های مسئول در زیست‌ساخت استیلین و فلاونوئیدها در سطح بالایی تنظیم شد و یک تأثیر هم‌افزایی از اشعه فرابنفش C به همراه متیل جاسمونات یا سالیسیلیک اسید روی بیان ژن STS وجود داشته است (Xu et al., 2015). Liu et al. (2010) رابطه بین تولید استیلبنوئیدها و مدت تابش اشعه فرابنفش C در زمان‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه را روی پینه (کالوس)‌های به‌دست‌آمده از چهار نژادگان (ژنوتیپ) انگور و سه نوع ریزنمونه برگ، بذر و برون بر 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 اشعه فرابنفش C با طول‌موج ۲۵۴ نانومتر از فاصله 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 اشعه فرابنفش C در ترکیب یا بدون ترکیب با تابش نور مرئی در سطوح انرژی بالا روی کشت‌های تعلیقی یاخته انگور رقم شاهانی، یک رگه 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 اشعه فرابنفش C شامل ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه بر تولید استیلبنوئیدها شامل رسوراترول و رسوراترول گلوکوزید یا پیسید بررسی شده است.

مقادیر تولیدشده از فنولها (P)، فلاونوئیدها (F)، رسوراترول و فرم گلوکوزیله شده آن به نام پیسید اندازه گیری شدند.

تعیین رشد یاخته، pH و هدایت الکتریکی

کشت‌های تعلیقی یاخته‌ای هفت روز پس از اعمال تیمارها، با عبور دادن از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ و به منظور جداسازی یاخته‌ها و محیط کشت، برداشت شدند (Krisa et al., 1999; Roat & Ramawat, 2009). آنگاه یاخته‌ها به سرعت توسط آب مقطر سترون خنک در دو مرحله به منظور حذف بقایای ساکارز، شسته شدند و در ادامه برای تعیین وزن تازه یاخته در هر ۸۰ میلی لیتر از محیط کشت، وزن شدند. ۱ گرم از یاخته‌های تازه در آن با دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت و به منظور ثبت وزن خشک یاخته‌ای ثابت قرار داده شد. یاخته‌های باقی مانده در نیتروزن مایع منجمد شدند و به مدت ۴۸ ساعت با استفاده از یک دستگاه فریز درایر (FD-81 EYELA, Tokyo Rikakikai Co., LTD) خشک شدند. پس از آن، یاخته‌ها تا تجزیه بیشتر در دمای منهای ۸۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. محیط کشت گردآوری شده به مدت ده دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به منظور برداشتن مواد یاخته‌ای نامحلول سانتریفیوژ شد. پس از اندازه گیری حجم محیط کشت باقی مانده به وسیله یک استوانه مدرج، pH و هدایت الکتریکی (EC) محیط به ترتیب به وسیله 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 میلی گرم از یاخته‌های لیوفیلیز شده ۱/۵ میلی لیتر از یک محلول شامل ۹۹ درصد متانول و ۱ درصد اسید هیدروکلریک اضافه شد. دروایه (سوسپانسیون) به دست آمده به مدت ۲۰ ثانیه تکان داده (ورتکس) و در تاریکی و دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. پس از این مدت نمونه‌ها به مدت ده دقیقه و با میزان g ۱۲۰۰۰ به منظور جدا کردن یاخته‌ها سانتریفیوژ شدند. سرانجام و پس از صاف کردن سوپرناتانت

درجه سلسیوس در تاریکی و در اتاقک رشد قرار گرفتند. برای آماده سازی و ثبات کشت‌های تعلیقی، یاخته‌ها هر دو هفته با یک نسبت ۱ به ۷ حجمی به حجمی به مدت ۵ ماه واگشت شدند و پس از این مدت تیمارهای آزمایشی اعمال شدند.

اعمال تیمارهای آزمایشی

در روز هفتم کشت که مربوط به مرحله رشد تصاعدی یاخته‌ها بر پایه زیست توده اندازه گیری شده یاخته بود، کشت‌های تعلیقی یاخته‌ای به مدت ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه تحت تیمار اشعه فرابنفش C با طول موج ۲۵۴ نانومتر از فاصله ۳۰ سانتی متری یاخته‌ها قرار گرفتند. روش کار به این صورت بود که در شرایط کامل سترون یاخته‌ها از اتاقک رشد و در زیر هود لامینار وارد پتری دیش شده و پس از این انتقال تحت تیمارهای زمانی مربوط به تابش اشعه فرابنفش C قرار گرفتند. تیمارهای یاد شده 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 فاصله ۳۰ سانتی متری از فلاسک‌ها با تابش ۱۰۰۰۰ لوکس به دست آمد و برای تیمار تاریکی، فلاسک‌ها به منظور 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. در مجموع در این بررسی هشت تیمار شامل کشت‌های شاهد (تیمارهای تنها تاریکی و نور مرئی) و تیمارهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه از تابش اشعه 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 اشعه فرابنفش C (۰، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه) بود. به منظور بهتر بررسی کردن اثر تاریکی و نور و همچنین تأثیر محرک اشعه فرابنفش C بر رشد یاخته و تولید ترکیب‌های فنولی با ارزش، وزن تازه یاخته (FCW)، وزن خشک یاخته (DCW)، pH و هدایت الکتریکی محیط (EC)، حجم محیط مصرفی (باقی مانده پس از پایان ۱۴ روز) (SMW) و همچنین

محتوای به دست آمده با ۲۷۵ میکرولیتر از آب MilliQ رقیق شد. میزان جذب فلاونوئیدها در طول موج ۵۱۰ نانومتر با مقایسه با شاهد بدون عصاره 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 به وسیله HPLC
استیلبنوئیدها با استفاده از یک روش تغییر یافته برای شناسایی و کمیت سازی مواد فنولی شناسایی شدند (Ferri *et al.*, 2009). جداسازی این ترکیب‌ها به وسیله سامانه RP HPLC (Agilent 1100 HPLC, USA) با ویژگی‌های زیر انجام شد: G1311A Quaternary Pump, G1313A Autosampler, G1379A Vacuum Degasser column Kinetex C18, 2.6, G1316A Column Oven, G1315B Phenomenex $\mu\text{m } 150 \times 4.6 \text{ mm ID}$, ChemStation و DAD diode array detector software. دمای ستون در ۳۰ درجه سلسیوس تنظیم شد و حجم تزریق به وسیله نمونه‌گیر خودکار (اتوسمپلر) ۱۰ میکرولیتر بود. در جداسازی استیلبنوئیدها از دو حالت (فاز) متحرک استیک اسید ۰/۲ درصد با pH ۳ به عنوان حالت A و استونیتریل به عنوان حالت B با سرعت جریان ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. برنامه زمانی مربوط به شیب حرکت این حالت‌های متحرک به این صورت بود: دقیقه ۰، ۸۵ درصد A و ۱۵ درصد B؛ دقیقه ۱۰، ۷۰ درصد A و ۳۰ درصد B؛ دقیقه ۲۵، ۵۵ درصد A و ۴۵ درصد B؛ دقیقه ۳۰، ۴۰ درصد A و ۶۰ درصد B؛ دقیقه ۳۲، ۱۵ درصد A و ۸۵ درصد B؛ دقیقه ۳۷، ۱۵ درصد A و ۸۵ درصد B؛ دقیقه ۴۵، ۴۵ درصد A و ۱۵ درصد B. زمان بازداری کسب شده از استانداردها به منظور شناسایی ترکیب‌ها با زمان بازداری نمونه‌ها مقایسه شدند. افزون بر این به منظور شناسایی ترکیب‌ها از الگوی طیف اشعه فرابنفش آن‌ها نیز استفاده شد. استانداردها از کمپانی سیگما-آلدریچ خریداری شدند.

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

تعیین فنول‌ها و فلاونوئیدها

میزان فنول‌ها بر پایه روش Folin-Ciocalteu با استفاده از گالیک اسید به عنوان یک استاندارد تعیین شد (Xu *et al.*, 2015; Singleton *et al.*, 1999). به طور خلاصه ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده با عامل رقت ۲ به یک لوله 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 کرینات 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 درجه سلسیوس قرار داده شد و پس از نگهداری در اتاقک رشد (انکوباتور)، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر و با مقایسه با شاهد بدون عصاره با استفاده از طیف‌سنج نوری یا اسپکتروفنومتر (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific) اندازه گرفته شد. محتوای فنول‌ها به صورت 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. تجزیه عصاره‌ها برای فلاونوئیدها با استفاده از روش Xu *et al.* (2015) انجام شد. بدین منظور؛ ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره نمونه با عامل رقت ۲ به یک لوله آزمایش اضافه شد. پس از آن ۱/۲۵ میلی‌لیتر از آب MilliQ و ۷۵ میکرولیتر از محلول ۵ درصد وزنی به حجمی نیتريت 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 در نهایت

چهاردهم نسبت به میزان آن در آغاز آزمایش (۴/۱۴ میلی زیمنس بر سانتی متر) کمتر بود، این میزان تحت تیمارهای تاریکی و نور به ترتیب برابر با ۳/۴۰ و ۲/۹۰ میلی زیمنس بر سانتی متر بود که گویای یک اختلاف معنی دار 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 نتیجه مهم از آنجا که 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 به دست آمده از این تیمار کمتر بود. با توجه به شکل ۲، تیمارهای تاریکی و نور تأثیر معنی داری بر فراسنجه‌های تولیدهای یاخته‌ای شامل فنول‌ها، فلاونوئیدها، و میزان‌های رسوراترول و پیسید نشان ندادند. باین وجود، میزان فنول‌ها، فلاونوئیدها و رسوراترول در تاریکی به ترتیب با مقادیر عددی ۱۰۵/۲۹ میلی گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک یاخته، ۱۲۲/۲۳ میلی گرم کاتکین در هر گرم وزن خشک یاخته و ۴/۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر 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 میلی لیتر) تأثیر بیشتری نسبت به تاریکی (۰/۷۴ میکروگرم بر میلی لیتر) 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*، *Vitis vinifera* cv. *Vaccinium macrocarpon* و *Yatomi Rosa* و *V. vinifera* cv. Gamay and

محلول‌های پایه (استوک) استاندارد شامل رسوراترول و پیسید در متانول درجه دستگاه HPLC در یک غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آماده شدند. غلظت‌های ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴ و ۱۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر از محلول‌های پایه به منظور تولید منحنی‌های استاندارد رقیق شدند. از طول موج ۳۰۶ نانومتر برای تجزیه و تحلیل کمی و کیفی ترکیب‌های مورد بحث استفاده شد. زمان بازداری برای ترکیب‌های رسوراترول و پیسید به ترتیب ۱۶/۰۲۵ و ۱۰/۵۹۵ دقیقه بود.

تجزیه آماری

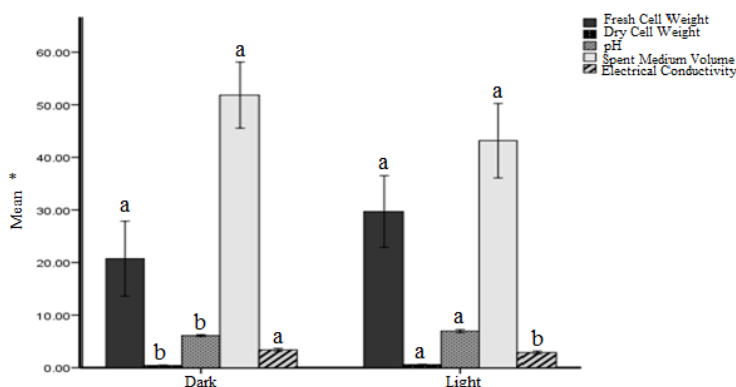
آزمایش‌های مربوط به این تحقیق به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد. داده‌های کسب شده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲/۰ تجزیه شدند. تفاوت‌های معنی دار بر پایه آزمون آماری توکی و در سطح اطمینان ۹۵ درصد مقایسه شدند. هم اندازه‌گیری‌ها در سه تکرار انجام شد و داده‌ها به صورت میانگین \pm استاندارد 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 تازه یاخته و حجم محیط مصرفی، تفاوت معنی داری 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 استفاده شده در این دو بررسی باشد. pH اولیه محیط ۵/۷ بود. این میزان پس از کاربرد تیمارهای تاریکی و نور به ترتیب به ۶/۱۰ و ۶/۹۶ افزایش پیدا کرد. در حالی که (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 اندازه‌گیری شده را در فرآیند رشد یاخته مشاهده کردند. اگرچه میزان عددی هدایت الکتریکی در روز

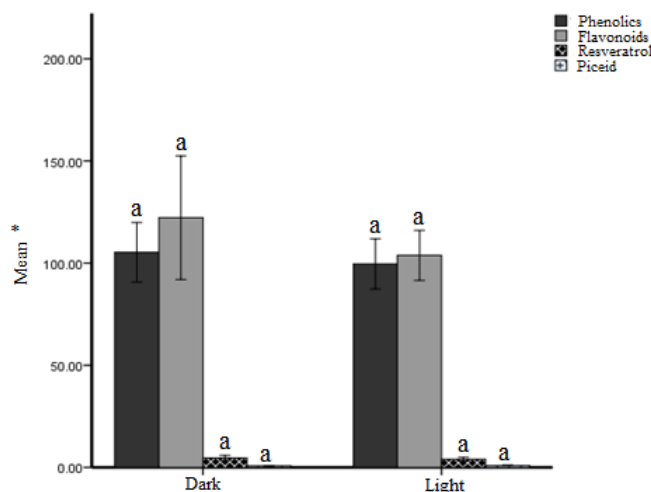
استنباط کرد که یاخته‌های روییده در تاریکی از یاخته‌های در حال رشد در نور مرئی از لحاظ تولید ترکیب‌های استیلبنوئید کل توانا تر هستند. احتمال دارد حذف تابش نور از یاخته‌های کشت‌های تعلیقی، مسیر سوخت‌وسازی موجود در یاخته‌های انگور را به سمت تولید استیلبنوئیدها سوق دهد. این نتیجه می‌تواند برای تولید انبوه استیلبنوئیدها در مقیاس تجاری و برای هدف‌های دارویی در آینده سودمند باشد.

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 پایه 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



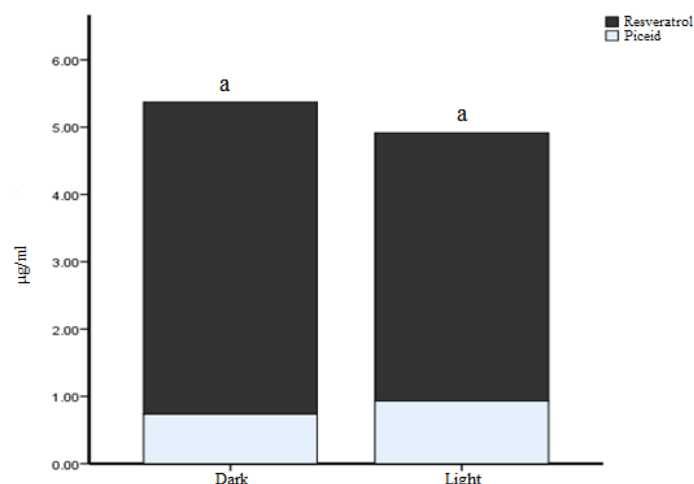
شکل ۱. اثر تیمارهای تاریکی و نور روی پارامترهای رشد سلول شامل: وزن تازه سلول (FCW)، وزن خشک سلول (DCW)، pH، محیط، حجم محیط مصرفی (SMV) و هدایت الکتریکی محیط (EC).
* وزن تازه سلول و وزن خشک سلول به صورت گرم در هر ۸۰ میلی لیتر از محیط بیان شدند و واحدها برای حجم محیط مصرفی و هدایت الکتریکی به ترتیب میلی 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.



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

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 تیمار شده با ده دقیقه از اشعه فرابنفش C (۶۰/۶۷ میلی‌لیتر) و کشت‌های غیرتیمار شده (۳۷ میلی‌لیتر) مشاهده شد، لذا این منطقی به نظر می‌رسد که هر چه وزن تازه 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، تجزیه همبستگی،

تأثیر محرک اشعه فرابنفش C بر فراسنجه‌های تولید و رشد یاخته

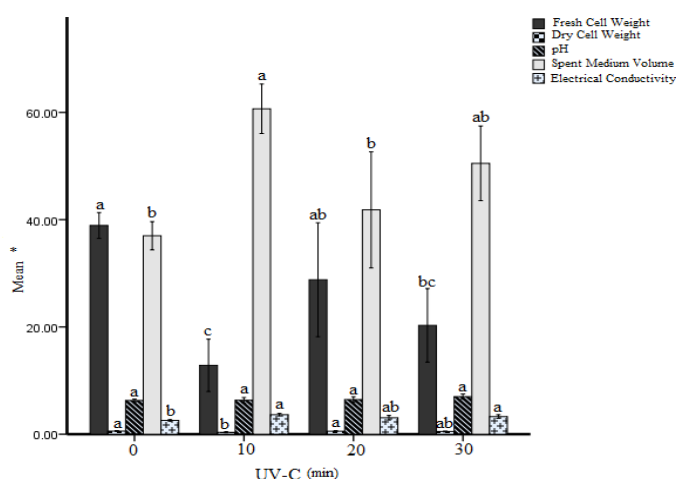
همان‌گونه که در شکل ۴ نشان داده شده، تفاوت معنی‌داری در میان شماری از عامل‌های اندازه‌گیری‌شده مربوط به رشد یاخته مانند وزن تازه یاخته، وزن خشک یاخته، حجم محیط کشت مصرفی و همچنین هدایت الکتریکی مشاهده شد. وزن تازه و خشک یاخته‌های تیمار شده با اشعه فرابنفش C به‌طور آشکاری در مقایسه با کشت‌های شاهد کاهش 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 اشعه فرابنفش C (۱۲/۸۵ و ۰/۳۶ گرم) مشاهده شدند. به‌طور همسان دو زمان دیگر استفاده‌شده از اشعه 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 اشعه 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 اشعه فرابنفش C برای مدت ۱۰ و ۲۰ دقیقه، اثر معنی‌داری در وزن خشک

معنی‌دار آماری از نظر غلظت پیسید تحت تأثیر تیمارهای زمانی تابش اشعه فرابنفش C مشاهده نشد. با این وجود، با توجه به شکل ۶ می‌توان دید که غلظت رسوراترول بین کشت‌های تعلیقی یاخته‌ای تیمار شده با ده دقیقه از اشعه فرابنفش C و کشت‌های دیگر تفاوت دارد. این نتیجه نشان می‌دهد، محرک اشعه فرابنفش C برای تحریک تولید رسوراترول درون یاخته‌های کشت‌های تعلیقی یاخته‌ای در مقایسه با تولید رسوراترول گلوکوزید یا پیسید مؤثرتر است. در نهایت بیشتر تولید رسوراترول در یاخته‌های روئیده در محیط تحت تأثیر ده دقیقه تابش اشعه 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 تولید شده در تیمارهای زمانی ۲۰ و ۳۰ دقیقه تابش نیز به ترتیب ۱/۱۵ و ۱/۴۲ برابر کشت‌های شاهد بودند. نتایج به دست آمده در این پژوهش با یافته‌های *Xu et al.* (2015) و *Liu et al.* (2010) که زمان ۲۰ دقیقه را به عنوان بهترین برای تولید استیلبنوئیدها به ترتیب در کشت‌های یاخته‌ای Cabernet Sauvignon و پینه‌های به دست آمده از *V. labrusca* × *V. riparia* معرفی کردند، مغایر بودند. مقایسه این نتایج و نتایج بررسی‌های دیگران نشان می‌دهد، تولید استیلبن‌ها تحت تأثیر تیمارهای اشعه فرابنفش C در کشت‌های تعلیقی یاخته‌ای ناشی از رقم‌های انگور در زمان‌های مختلف نتایج متفاوتی خواهد داشت. در مجموع 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 به عنوان 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 استفاده شده به عنوان محرک در کشت‌های یاخته‌ای انگور کمتر باشد، محتوای متابولیت‌های ثانوی تولید شده مانند رسوراترول بیشتر خواهد بود. *Van der Plas et al.* (1995) نیز در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، تولید درون شیشه‌ای متابولیت‌های ثانوی به‌طور

وجود ضریب همبستگی منفی معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ درصد (-۰/۹۸) بین هدایت الکتریکی و وزن تازه یاخته را نشان داد. بنابراین اگر هدایت الکتریکی افزایش پیدا کند، وزن تازه یاخته کاهش پیدا خواهد کرد. این نتیجه به روشنی در کشت‌های تعلیقی یاخته‌ای مشاهده شده است، به طوری که بیشترین و کمترین مقادیر عددی مربوط به هدایت الکتریکی به ترتیب در کشت‌های یاخته‌ای تحریک شده با ده دقیقه از اشعه فرابنفش C (۳/۶۵ میلی‌زیمنس بر سانتی‌متر) و کشت‌های شاهد (۲/۵۷ میلی‌زیمنس 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 فلاونوئیدهای مربوط به کشت‌های یاخته‌ای تیمار شده با زمان‌های مختلف تابش اشعه 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 اشعه 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 اشعه فرابنفش C می‌توانند در تجمع فنول‌ها و فلاونوئیدها 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 استفاده شده (ده دقیقه) از محرک اشعه فرابنفش C به عنوان بهترین تیمار برای تولید فنول‌ها و فلاونوئیدها تأیید می‌کند. بر پایه شکل ۶، هیچ تفاوت

مورد نظر بیشتر باشد از میزان پیسید کاسته خواهد شد. از آنجایی که 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 اشعه 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 استیلینوئیدها (رسوراترول + پیسید) در شکل ۸ نشان داده شده است. بر پایه این داده‌ها، تیمار زمانی ده دقیقه از تابش اشعه فرابنفش C را می‌توان به‌عنوان زمان بهینه برای استفاده از این محرک برای تولید استیلینوئیدهای بررسی‌شده معرفی کرد. در نهایت، این تیمار بهترین تیمار به کار گرفته شده در این پژوهش برای تولید فنول‌ها، فلاونوئیدها و همچنین استیلینوئیدها معرفی می‌شود.

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 تجزیه همبستگی بین وزن تازه 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 استیلینوئیدها تولید خواهد شد، در این تحقیق، مشخص شد که یک همبستگی منفی غیر معنی‌دار بین میزان رسوراترول و پیسید در یاخته‌های تیمار شده با تیمارهای زمانی مختلف اشعه فرابنفش C وجود دارد (شکل ۷). به‌طوری‌که هر چه میزان رسوراترول در تیمارهای

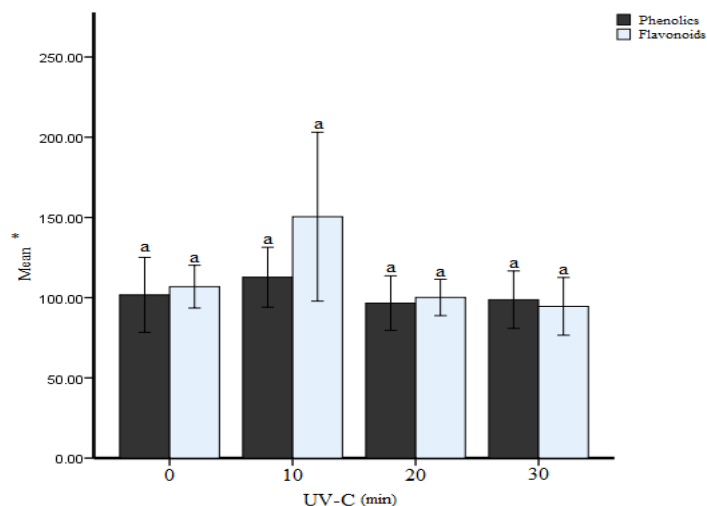


شکل ۴. اثر تیمارهای نور UV-C روی پارامترهای رشد سلول شامل: وزن تازه سلول (FCW)، وزن خشک سلول (DCW)، pH، محیط، حجم محیط مصرفی (SMV) و هدایت الکتریکی محیط (EC).

* 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.

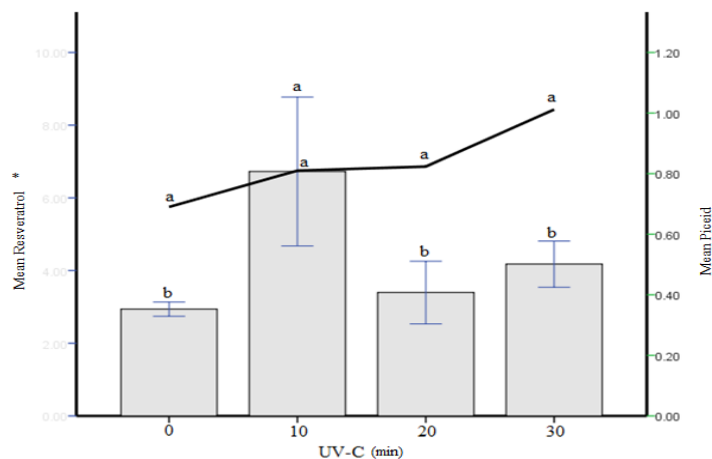
Figure 4. Effect of UV-C treatments on the cell growth parameters including: Fresh Cell Weight (FCW); Dry Cell Weight (DCW); pH value; Spent Medium Volume (SMV) and Electrical Conductivity (EC).

* 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



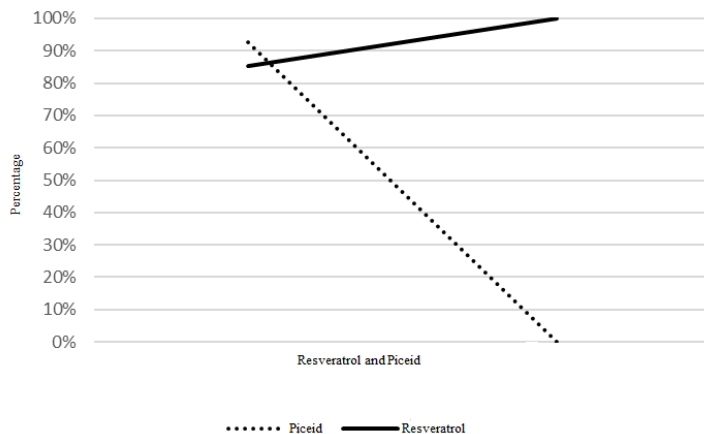
شکل ۵. اثر تیمارهای نور UV-C روی پارامترهای تولید سلول شامل: فنولها (P) و فلاونوئیدها (F).
 * فنولها و فلاونوئیدها به ترتیب به صورت میلی گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک سلول و میلی گرم کاتکین در هر گرم وزن خشک سلول بیان شدند.

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

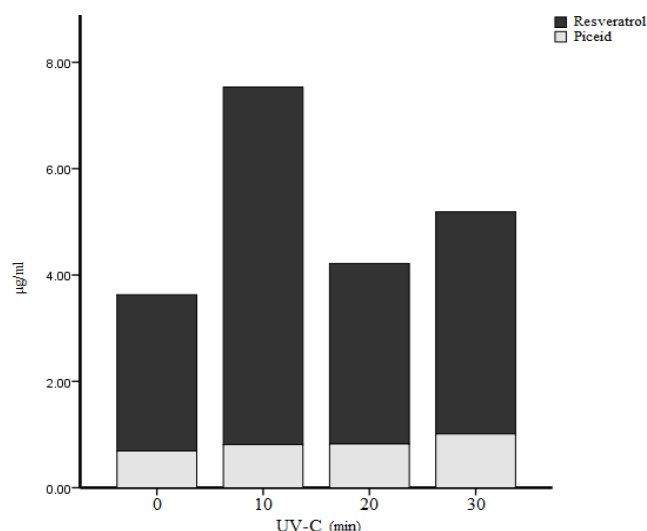


شکل ۶. اثر تیمارهای نور UV-C روی تولید رسوراترول و پیسید.
 * رسوراترول و پیسید به صورت میکروگرم بر میلی لیتر بیان شدند.

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



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

اشعه فرابنفش C در این تحقیق به‌عنوان تیمار بهینه و مؤثرتر برای توسعه فرآیندهای ترکیبی تعیین شد. بر پایه 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 همه این سازوکارها مورد نیاز است، نتایج کار ما پیشنهاد می‌کند، به‌احتمال حذف تابش نور مرئی از یاخته‌ها و تیمار آن‌ها با زمان‌های مختلف محرک اشعه فرابنفش C به‌ویژه زمان کمتر ده دقیقه در مسیر زیست‌ساختی رسوراترول نسبت به مسیر زیست‌ساختی دیگر مؤثرتر خواهد بود.

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 به‌وسیله 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

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. & Courrot, E. (2011). Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2 L stirred bioreactor. *Process Biochemistry*, 46, 1056-1062.

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.

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. Méillon (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.