زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس

تأثیر غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک بر بیان ژن استیلبن‌سنتاز و تولید رزوراترول در انگور رقم سلطانی

سیمین سبزچی[1]، حمید حاتمی‌ملکی[2]*، علیرضا مطلبی آذر[3]، فریبرز زارع نهندی[3]، مریم رفیعی[4]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

2- دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

3-دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

4- دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

*نویسنده مسئول: hatamimaleki@yahoo.com

کد پستی : 83111 – 55181

دریافت: 1398/4/22 پذیرش:1400/3/22

چکیده:

اهداف: متابولیت‌های ثانویه گیاهی به‌سبب تنوع و نقششان در گیاهان و سلامتی انسان مورد توجه قرار گرفته‌اند. انگور یکی از گیاهان با ترکیبات دوم و با خواص دارویی است. این ترکیبات شامل رزوراترول است که ترکیبی فنلی از گروه استیلبنوئیدهاست. به‌منظور بررسی افزایش تولید پلی‌فنل رزوراترول تحت تأثیر الیسیتورها، آزمایشی با طرح تصادفی با 4 تکرار در انگور رقم سلطانی انجام شد.

مواد و روش‌ها: هورمون اسیدسالیسیلیک به‌عنوان الیسیتور در غلظت‌های مختلف صفر، 10^{-4}، 10^{-5}، 10^{-6} مولار مورد استفاده قرار گرفت و به محیط کشت MS بدون هورمون به‌منظور بررسی تنش اضافه شد. در سطح مولکولی، تاثیر اسیدسالیسیلیک در بیان ژن استیلبن‌سنتاز توسط RT-PCR نیمه کمی ارزیابی شد. در آزمایش بیوشیمیایی، میزان تولید رزوراترول توسط دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: آنالیز بیان ژن استیلبن‌سنتاز نشان داد که اسیدسالیسیلیک با غلظت 10^{-4} مولار تأثیر مثبت و افزایشی در بیان ژن داشته و افزایش 35/48 درصدی در مقایسه با شاهد نشان داد و همچنین غلظت 10^{-5} مولار بیان ژن را 5/65 درصد در مقایسه با شاهد افزایش داد. در آزمایش بیوشیمیایی افزایش در میزان تولید رزوراترول در تیمار 10^{-4} مولار در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده شد (6/10 میکروگرم) و تیمار 10^{-5} مولار (3/25 میکروگرم) تفاوت معنی‌داری با نمونه شاهد نشان نداد.

نتیجه‌گیری: اسیدسالیسیلیک به‌عنوان یک الیسیتور و محرک تولید رزوراترول می‌تواند بیان ژن استیلبن-سنتاز و در پی آن خواص دارویی گیاه انگور را افزایش دهد.

کلیدواژگان: انگور، الیسیتور، ترکیبات فنولی، کروماتوگرافی، متابولیت‌های دوم

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-03-15]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.2.2]

مقدمه

تولید متابولیت‌های دوم در گیاهان موضوعی مهم در تولیدات کشاورزی است زیرا علاوه بر نقش کلیدی آنها در رشد، نمو، واکنش مقاومت و حساسیت گیاهان در برابر تنش‌های محیطی، از نقطه نظر سلامت مصرف-کنندگان نیز حائز اهمیت هستند. گیاه انگور ویتیس وینیفرا (Vitis vinifera L.) یکی از گیاهان مهم باغی از خانواده انگور (Vitaceae) است که در سطح وسیع در دنیا کشت می‌شود. انگور علاوه‌بر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی فراوان، حاوی انواع زیادی از ترکیبات و متابولیت‌های اول و دوم است که بسته به نوع گونه گیاهی مقدار آن متفاوت می‌باشد[1]. تولید ترکیبات دوم در برگ انگور در مقایسه با سایر اندام‌های گیاهی بیشتر بوده و روند آن به این صورت است که در مرحله رشد رویشی گیاه آغاز شده و پس از گلدهی و تشکیل غوره و سپس در انگور رسیده ادامه پیدا می‌کند.

یکی از ترکیبات دوم ثانویه مهم انگور، رزوراترول (3، 5، 4-trihydroxystilbene) است که جزو استیلبنوئیدها (ترکیبات فنلی) است و بیوسنتز آن در گیاهان توسط آنزیم استیلبن‌سنتاز(*Stilbene Synthase*) کاتالیز می‌شود. تحقیقات نشان داده است که رزوراترول یک پلی‌فنول طبیعی است که در سیستم دفاعی گیاه و در پاسخ به تنش‌های محیطی تولید می‌شود[2]. در شرایط طبیعی و نرمال این ترکیب به میزان اندک در گیاه انگور وجود داشته و ثابت شده در شرایط تنش‌های زیستی و غیرزیستی رونوشت‌برداری از ژن *STS* افزایش یافته و به دنبال آن محتوای رزوراترول برگ گیاه افزایش پیدا می‌کند. در تحقیقات متعددی که بر روی انگور انجام شده تأثیر مثبت الیسیتورهای گوناگون برافزایش بیان ژن *STS* گزارش شده است. برای مثال، جاسمونیک‌اسید نقش کلیدی در مسیر انتقال پیام برای تحریک تولید متابولیت-های ثانویه مرتبط با سیستم دفاعی گیاه دارد[3]. در انگور تحریک قابل توجه تجمع استیلبن با اضافه کردن متیل جاسمونات، 6 روز بعد از شروع کشت گزارش شده است[4]. همچنین متیل‌جاسمونات سبب افزایش 3 برابری ترانس- رزوراترول، 18 ساعت پس از انکوباسیون شد، درحالی که متیل جاسمونات و ساکارز با همدیگر تجمع ترانس- رزوراترول را تا 6 برابر، 6 ساعت بعد از انکوباسیون افزایش دادند[5]. الیسیتور دیگری که بر میزان بیان ژن *STS* تأثیر مثبت دارد، اسیدسالیسیلیک (Salicylic acid) است که گزارش‌های کمی در این مورد وجود دارد. اسیدسالسیلیک یک هورمون رشد گیاهی است که در مسیر پیام‌رسانی در پاسخ به تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی نقش ایفا می‌کند [6]. اسیدسالسیلیک به‌عنوان ماده سیگنالینگ عمل کرده است[7] و باعث فعال شدن فاکتورهای رونویسی مرتبط با ژن‌های مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه شده و درنهایت رونویسی از ژن‌ها را افزایش می‌دهد[8]. در مطالعه‌ای روی ویتیس آمورنسیس روپر(Vitis amurensis Ruper)، ژن‌های PAL و STS که به ترتیب کد کننده فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و استیلبن‌سینتاز که آنزیم‌های کلیدی دخیل در بیوسنتز رزوراترول هستند بررسی شدند. کشت سلولی از ویتیس آمورنسیس روپر با سطوح رزوراترول پایین به‌عنوان مدل انتخاب شد. اسید-سالیسیلیک، برای افزایش تولید رزوراترول در این کشت استفاده شد. بیان ژن‌های PAL و STS با استفاده از تکنیک‌های PCR رونوشت معکوس و real- time PCR آنالیز شدند. نتایج نشان داد که اسیدسالیسیلیک می‌تواند بیان ژن‌های *VaPAL3*، *VaSTS6, VaSTS5, VaSTS4, VaSTS2* ، *VaSTS8 , VaSTS3,* از خانواده‌های ژنی *VaPAL* و VaSTS را افزایش دهد[9].

کشور ایران با توجه به اقلیم مناسب، دارای ذخایر ژنتیکی غنی از انگور می‌باشد. با توجه به اینکه میوه انگور جزء میوه‌های موردپسند در دنیاست، بنابراین می‌توان با افزایش خواص دارویی آن در کنار سایر ویژگی‌های

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-03-15]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.2.2]

تغذیه‌ای، سلامت جامعه را نیز ارتقا بخشید. این تحقیق با هدف مطالعه و ارزیابی اثر اسیدسالیسیلیک به‌عنوان الیسیتور در افزایش بیان ژن استیلبن‌سنتاز و به تبع آن ماده رزوراترول در برگ انگور رقم سلطانی (بی‌دانه سفید) انجام شده است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهان باغی و کشت بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام شد. گیاهچه‌های انگور رقم سلطانی در شرایط درون شیشه‌ای که بدون از آلودگی بودند از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شدند. در آزمایشگاه کشت بافت، با توجه به محدود بودن تعداد شاخساره‌ها، ابتدا تکثیر شاخساره‌ها و پرآوری نمونه‌ها انجام شد. به این منظور، شاخساره‌های دارای سه گره به محیط کشت پرآوری انگور انتقال داده شد. ریزازدیادی در 4 مرحله انجام شد. در ابتدا، در مرحله‌های اول و دوم، محیط کشت MS بدون هورمون استفاده شد و در دو مرحله بعدی، به محیط کشت MS، 0/5 (M /L) BAP اضافه شد و درنهایت از گیاهچه‌های اولیه، تعداد 20 شیشه گیاهچه حاوی تعداد 4 ریزنمونه در هر شیشه به‌دست آمد. در این پژوهش، از محیط کشت MS برای تکثیر و پرآوری و همچنین اعمال تیمار اسیدسالیسیلیک استفاده شد.

تیمار اسیدسالیسیلیک: ابتدا استوک اسیدسالیسیلیک با غلظت 10^{-2} مولار آماده شد. به‌منظور اعمال غلظت‌های مختلف از اسیدسالیسیلیک، از 4 ارلن 250 میلی‌لیتری حاوی مقادیر صفر (شاهد)، 10^{-6}، 10^{-5} و 10^{-4} مولار از اسیدسالیسیلیک استفاده گردید که از طریق محیط کشت MS بدون هورمون به حجم رسانیده شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با 4 تکرار برای هر تیمار انجام شد. در این بررسی هر یک از تیمارها در 4 شیشه (تکرار) اعمال شدند و هر شیشه محتوی 4 ریزنمونه انگور بود.

بعد از 15 روز، اولین مرحله از نمونه‌برداری که مرتبط با مطالعات مولکولی بود انجام شد. استخراج RNA کل از نمونه‌های گیاهی با استفاده از کیت Ribospin Plant ساخت شرکت GeneAll (GeneAll Biotech, Korea) انجام شد و به‌منظور انجام واکنش رونوشت‌برداری معکوس و ساخت cDNA از کیت M-MuLV Reverse Transcriptase ساخت شرکت فرمنتاز (M-MuLV-RT, Fermentas, Lithuanian) استفاده شد. محلول مستر-میکس مطابق با (جدول1) تهیه شد.

جدول 1- مواد موجود در مسترمیکس (به ازای هر نمونه)

مواد موردنیاز	حجم مورداستفاده
بافر5x	4 میکرولیتر
آنزیم RNAase	1 میکرولیتر
Dntp mix	2 میکرولیتر
Reverse M-Mul RT	1 میکرولیتر
آب	10 میکرولیتر

پس از آماده شدن مسترمیکس، برای هر نمونه 18 میکرولیتر از آن، یک میکرولیتر پرایمر oligodt و یک میکرولیتر نمونه RNA اضافه شدند. پس از آماده‌سازی، نمونه‌ها درون دستگاه PCR گذاشته شده و برای انجام

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-03-15]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.2.2]

واکنش تکثیر، به ترتیب 3 بازه دمایی 42 درجه سانتی-گراد به مدت 60 دقیقه، 70 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه و درنهایت 25 درجه سانتی‌گراد به مدت 1 دقیقه اعمال شد.

به منظور اندازه‌گیری بیان ژن استیلبن‌سنتاز، از دو آغازگر (primer) استفاده شد. که اولین آغازگر، آغازگر اختصاصی ژن STS و دیگری ژن خانه‌دار (Housekeeping genes) اکتین بود. طراحی این آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 و اطلاعات ژنومی انگور در پایگاه داده NCBI انجام شد و ساخت آغازگرها توسط شرکت ژن فن‌آوران انجام شد. توالی‌های مورد استفاده برای آغازگر STS و Actin به شرح (جدول 2) بود:

جدول 2- توالی‌های مورد استفاده در ساخت آغازگرهای STS و Actin و اندازه قطعه

نام	Forward/Reverse	توالی آغازگر	قطعه
STS	F	GTTGCCCCTGAAGAACACCC	410 bp
	R	GACAATTTCCCGTTCAGCAGT	
Actin	F	GATTCTGGTGATGGTGTGAGT	295 bp
	R	GACAATTTCCCGTTCAGCAGT	

ترکیب واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل یک میکرولیتر از هریک از آغازگرها، یک میکرولیتر DNA الگو، 10 میکرولیتر مسترمیکس و 7 میکرولیتر آب دیونیزه بودند که طی مراحل دمایی ارائه شده در (جدول 3) تکثیر یافتند.

جدول 3- مراحل دمایی چرخه‌های واکنش PCR

	دمای مورد نظر	مدت‌زمان
مرحله آغاز	94	5 دقیقه
مرحله واسرشتگی	94	1 دقیقه
مرحله اتصال	53	1 دقیقه
مرحله تکثیر	72	1 دقیقه و 30 ثانیه
تکثیر نهایی	72	5 دقیقه
	25	1 دقیقه

پس از انجام PCR، محصولات PCR بر روی ژل آگارز 0/6 درصد بارگذاری شدند (شکل 1). سپس از ژل‌ها عکس گرفته (شکل 1) و نتیجه عکس با برنامه ImageJ آنالیز شد و میزان ارزش رنگ خاکستری (Gray value) از باندهای ژن STS و Actin محاسبه شد. برای محاسبه درصد افزایشی میزان بیان ژن نسبت به تیمار شاهد از (رابطه 1) استفاده شد که در این رابطه، A تیمار شاهد است.

رابطه 1) (B-A)/A*100

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-03-15]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.2.2]

در مرحله بعدی، بعد از گذشت حدود یک ماه از تیمار، محتوای رزوراترول برگ در 3 تکرار از هر تیمار و با استفاده از کارماتوگرافی مایع- فاز معکوس انجام شد. در این راستا، 0/5 گرم نمونه برگی از هر تکرار مربوط به هر تیمار برداشت شد و پس از پودر کردن در ازت مایع، 5 میلی‌لیتر متانول آبی 80 درصد که دو درصد آن Hcl بود، به هر نمونه اضافه شد. نمونه‌ها به مدت 20 دقیقه و با دور 4000 سانتریفیوژ شده و سپس فاز بالایی مایع از فیلتر سرنگی 0/45 میکرومتری عبور داده شدند. برای تهیه استاندارد رزوراترول (analytical standard (SIGMA-ALDRICH R 5010))، ابتدا 0/2 میلی‌گرم از استاندارد وزن شده و درون 10 میلی‌لیتر متانول خالص ریخته شد. سپس برای تهیه غلظت رقیق‌تر، 0/4 میلی‌لیتر از محلول آماده را برداشته و دوباره با متانول خالص به حجم 10 میلی‌لیتر رسانیده شد و برای تهیه غلظت بعدی از محلول دوم ساخته شده به روش قبل، 0/4 میلی‌لیتر برداشته شد و دوباره با متانول به حجم رسانیده و درنهایت 3 غلظت از استاندارد رزوراترول ساخته شدند. شناسایی رزوراترول با یک سیستم HPLC با ستون Agilent ZORBAX SB-C18 (طول 15 سانتی‌متر و 3/5 میکرومتر قطر) و دمای ستون 25 درجه سانتی‌گراد انجام شد. فاز متحرک شامل دو محلول A (آب به همراه 0/1 درصد اسیدفرمیک) و B(استونیتریل به همراه 0/1 درصد اسیدفرمیک) بود که به‌صورت گرادیانت، سرعت جریان (Flow rate) 0/3 میلی‌لیتر در دقیقه و جریان تزریق پنج میکرولیتر بود (جدول 4).

جدول 4- مشخصات برنامه‌ای دستگاه HPLC جهت بررسی میزان ماده رزوراترول

زمان (دقیقه)	A%	B%	سرعت جریان
0	90	10	0/3
25	88	22	0/3
45	50	50	0/3
55	5	95	0/3
60	5	95	0/3
63	90	10	0/3
66	90	10	0/3

با توجه به داده‌های حاصل از نمونه‌های استاندارد معادله خط مطابق (فرمول 2) به دست آمد که با جایگذاری داده‌های به دست آمده برای هر تیمار در معادله خط، غلظت رزوراترول موجود در هر تیمار به دست آمد. سپس مقدار متوسط ماده رزوراترول برای هر نمونه محاسبه گردید.

فرمول 2) 8E-06x-1/4891

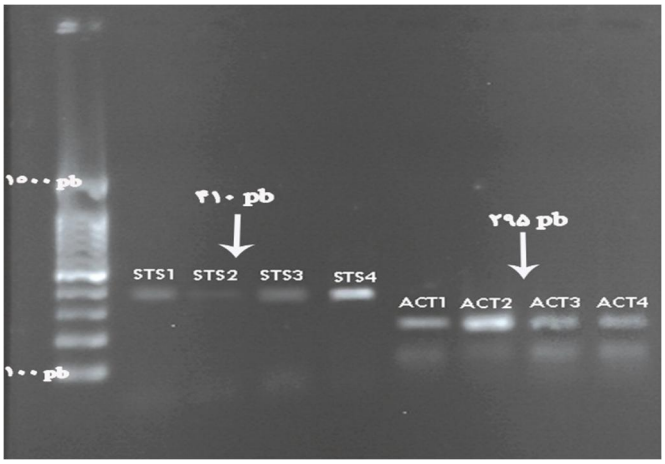
یافته‌ها

اندازه‌گیری نیمه کمی بیان ژن نشان داد که تیمار سوم با غلظت 10^{-5} مولار اسیدسالسیلیک رشد 5/65 درصدی در بیان ژن استیلبن‌سنتاز نسبت به تیمار شاهد و تیمار چهارم با غلظت 10^{-4} مولار اسیدسالسیلیک، رشد 35/48 درصدی نسبت به تیمار شاهد دارند. با توجه به افزایش بیان ژن در تیمار سوم و چهارم نسبت به تیمار شاهد می‌توان اظهار داشت اسیدسالسیلیک تأثیر مثبت و افزایشی بر

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-03-15]

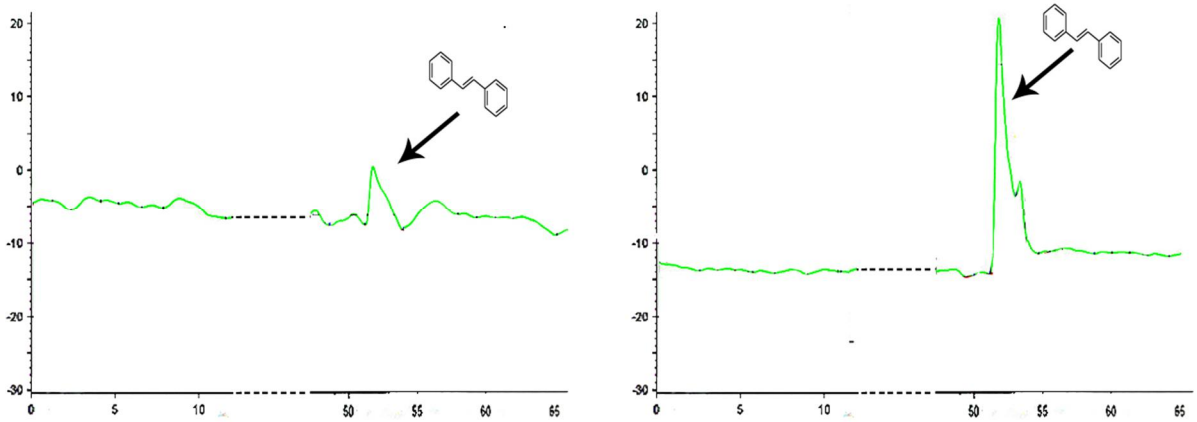
[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.2.2]

میزان بیان ژن استیلبن‌سنتاز داشته است. و این میزان افزایش در تیمار چهارم بسیار زیاد و قابل‌توجه می‌باشد. تیمار دوم که حاوی غلظت 10^{-6} مولار اسیدسالیسیلیک بود براثر شرایط محیطی گیاهان تقریباً از بین رفته بودند و به همین دلیل داده‌های صحیحی به دست نیامد و رشد را منفی نشان داد.



شکل 1- باندهای حاصل از الکتروفورز توسط آغازگرهای STS و Actin. .

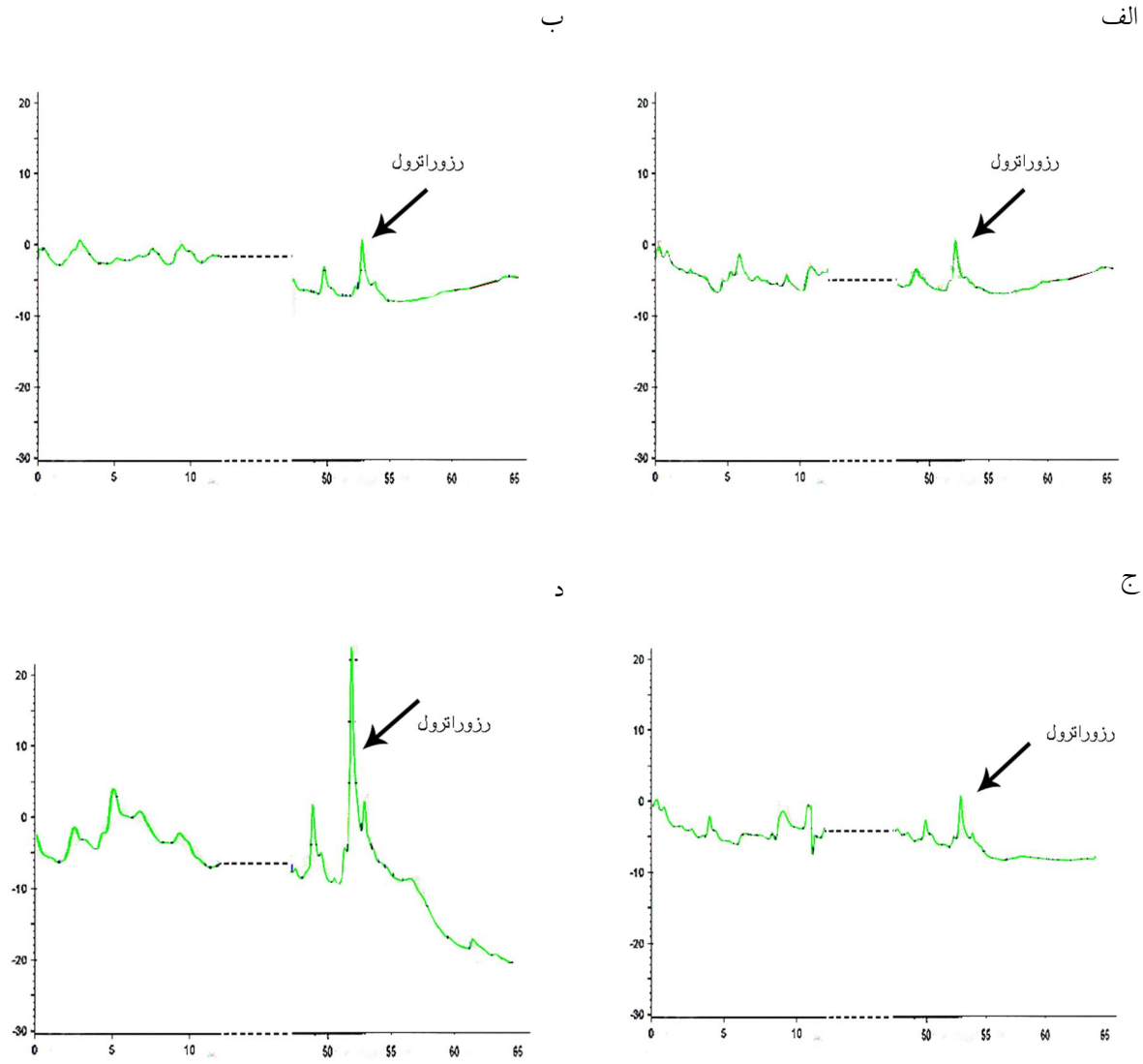
در گام بعدی آنالیز داده‌ها، از نمونه‌های تزریق شده به دستگاه HPLC نتایج زیر به دست آمد:



شکل 2- پیک خروجی دو نمونه استاندارد رزوراترول در غلظت‌های 10^{-4} و 10^{-8} مولار در دستگاه HPLC

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-03-15]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.2.2]

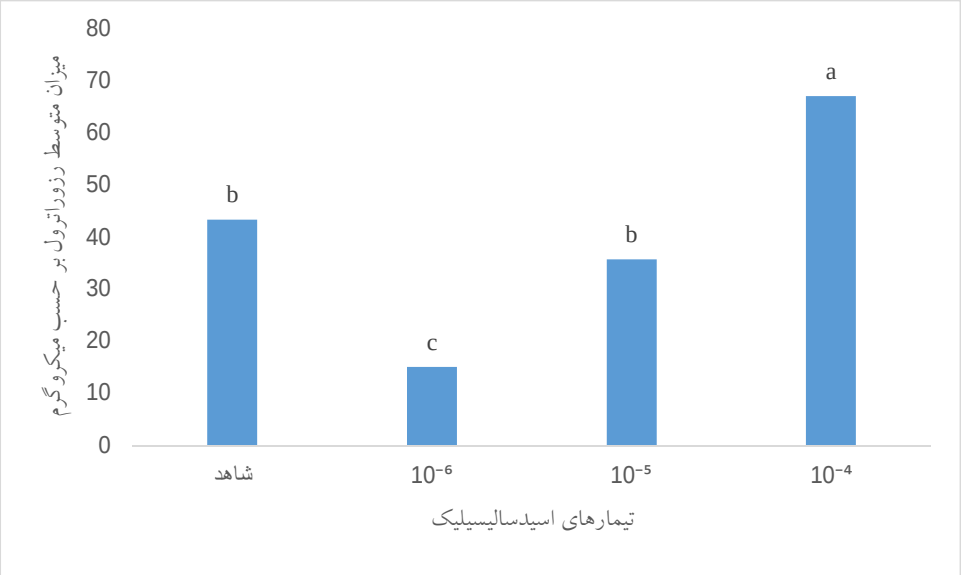


شکل3- پیک خروجی رزوراترول از تیمارهای مختلف الف: نمونه شاهد ب: تیمار 10^{-6} ج: تیمار 10^{-5} د: تیمار 10^{-4}

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان می‌دهد که در تیمارهای اسیدسالیسیلیک با افزایش غلظت اسید-سالیسیلیک، محتوای رزوراترول نیز افزایش پیدا می‌کند (شکل 4). آنالیز داده‌های HPLC نشان داد که تفاوت معنی‌دار و قابل توجهی مابین تیمار چهارم حاوی 10^{-4} مولار اسیدسالیسیلیک با نمونه شاهد وجود داشت. تفاوت غیرمعنی‌داری مابین تیمار سوم حاوی 10^{-5} مولار اسید-سالیسیلیک و تیمار شاهد به لحاظ تولید رزوراترول وجود داشت، اما روند افزایشی مشاهده شد. تیمار اسید-سالیسیلیک در کل تولید رزوراترول را در انگور افزایش می‌دهد، میزان رزوراترول در تیمار شاهد 3/94 میکروگرم و در تیمار 10^{-5} مولار 3/25 میکروگرم بود که بسیار نزدیک به هم هستند، اما در تیمار 10^{-4} مولار ، 6/10 میکروگرم بود، که نشان دهنده تأثیر مثبت تیمار اسید-سالیسیلیک بر روی میزان تولید رزوراترول در واریته انگور سلطانی است.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-03-15]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.2.2]



شکل 4- مقایسه میانگین تیمارهای مختلف اسیدسالیسیلیک از نظر محتوای رزوراترول برگ

بحث

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که اسیدسالیسیلیک دارای اثر القایی مثبت در انگور بوده و می‌تواند بیان ژن-های مسیر سنتز رزوراترول و به تبع آن تولید این متابولیت دومی را تحت تأثیر قرار دهد. اندازه‌گیری بیان ژن مسیر سنتز رزوراترول (STS) در سطح مولکولی، نشان دهنده وجود تأثیر مثبت و افزایشی اسیدسالیسیلیک بر میزان بیان ژن استیلبن‌سنتاز می‌باشد. گروهی از محققان در آزمایش‌های خود اثرات افزایشی اسیدسالیسیلیک را بر بیان ژن STS اثبات کردند[10]. مین چانگ و همکاران گزارش کردند که در گیاه بادام‌زمینی اسیدسالیسیلیک با تنظیم بیان ژن و سطح رونویسی می‌تواند بر روند تولید رزوراترول تأثیر مثبت و افزایشی داشته باشد[2]. همچنین لانز و همکاران عنوان کردند که بیان ژن STS توسط اسیدسالیسیلیک روند افزایشی پیدا می‌کند[11] گروهی از سایر محققان مشاهده کردند که تیمار اسیدسالیسیلیک، تجمع mRNAs و سنتز پروتئین‌ها را در انگور و بری‌ها افزایش می‌دهد[12]. در تحقیقی برای کشت سوسپانسیون سلولی انگور از الیسیتورهای مختلف از جمله اسید-سالیسیلیک استفاده شد و نتایج نشان داد که رزوراترول درون سلولی چندین برابر افزایش پیدا کرد[13]. در تحقیقی با اعمال 50 میکرومول اسیدسالسیلیک روی انگور ریبس نیگرم (*Ribes nigrum*) مشاهده کردند که میزان رزوراترول نسبت به نمونه شاهد رشد قابل‌ملاحظه‌ای نشان داد[10]. در مطالعه‌ای دیگر تیمار 500 میکرومول اسیدسالیسیلیک باعث افزایش 6/2 برابری میزان رزوراترول نسبت به نمونه شاهد شد[14]. فانگ مشاهده کرد اسیدسالیسیلیک می‌تواند درکشت درون شیشه‌ای رقم انگور اروپایی میزان رزوراترول را در درون بافت‌ها افزایش دهد[15]. مشاهدات نشان داد که کاربرد 150 میلی-گرم در لیتر تیمار اسیدسالیسیلیک در گیاه انگور، سبب افزایش معنی‌داری در ترکیبات دومی آن می‌شود، که مشابه مطالعات بر روی برگ کاهو بود[16]. در مطالعه‌ای روی آلوئه‌ورا، تیمار با اسیدسالیسیلیک اثرات افزایشی بر تولید پلی‌فنول‌ها داشت[17]. در مطالعه اثر ترکیبی اسید-سالیسیلیک و اشعه UV، محققین عوامل مؤثری در افزایش آنزیم استیلبن در کشت سلولی گیاه انگور اروپایی (European grapevine) مطرح کردند[18]. گروهی از

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-03-15]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.2.2]

محققان با اسپری اسیدسالیسیلیک روی انگور توانستند سبب افزایش میزان رزوراترول در گیاه شوند و همچنین عنوان کردند که این ترکیب توسط تولید سیگنال‌هایی در انگور سبب تولید رزوراترول می‌شود[19]. که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر نیز مطابقت دارند. اسید-سالیسیلیک نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌های PAL و فنیل پروپانوئید دارد. در مطالعه‌ای تیمار انگور با 15 میلی‌لیتر اسیدسالیسیلیک در شرایط درون شیشه‌ای، سبب افزایش بیان ژن‌های PAL و فنیل‌پروپانوئید شد[12]. استیلبن‌ها توسط مسیر فنیل‌پروپانوئید سنتز می‌شوند. آنزیم‌های فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز(PAL)، سینامات 4-هیدروکسیلاز(C4H) و 4- کومارات: کوآنزیم‌آ لیگاز(4CL) ، فنیل‌آلانین را برای تشکیل 4- کوماریول-کوآنزیم‌آ کاتالیز می‌کند[7]. آنزیم استیلبن‌سنتاز (STS)، فرآیند ترکیب 4-کوماریول-کوآنزیم‌آ و سه مولکول مالونیل-کوآنزیم‌آ را برای سنتز رزوراترول کاتالیز می‌کند[20]. چالکون‌سنتاز(CHS) نیز از پیش ماده‌ای مشابه STS برای تولید چالکون (پیش ماده فلاونوئید) استفاده می‌کند[21]. استیلبن‌ها می‌توانند توسط تعدادی از تنش‌ها، مثل تشعشع فرابنفش[22]، حمله پاتوژن‌ها[23] و الیسیتور-های شیمیایی شامل متیل‌جاسمونات، اسیدسالیسیلیک، پلی‌ساکارید، پراکسیدهیدروژن و سیکلودکسترین تحریک به تولید شوند[24 و 5]. یک الیسیتور به‌عنوان ترکیبی (طبیعی یا سنتتیک) زمانی که در غلظت کم در یک سیستم سلولی زنده به کار می‌رود، بیوسنتز متابولیت‌های خاصی را آغاز ویا بهبود می‌بخشد[25]. جاسمونات‌ها و اسیدسالیسیلیک می‌توانند برای تحریک واکنش‌های کاتالیتیک توسط آنزیم‌های ویژه دخیل در بیوسنتز ترکیبات فنلی به کار روند[26]. تأثیر کاربرد خارجی اسیدسالیسیلیک به فاکتورهای متعددی شامل گونه‌ها و مراحل رشدی مختلف، نحوه کاربرد و غلظت آن بستگی دارد[27] که در این تحقیق نیز تأثیر غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک بر میزان تولید رزوراترول مشاهده شد.

نتیجه‌گیری

از نتایج این تحقیق و مطالعات سایر محققان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تیمار با اسیدسالیسیلیک تأثیرات مثبتی بر بیان ژن استیلبن‌سنتاز و همچنین افزایش میزان تولید رزوراترول در گیاه دارد.

منابع

1- Bennett RN, Wallsgrove RM. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. New Phytologist. 1994; 127:617-33.

2- Chung IM, Park MR, Chun JC, Yun SJ. Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stresses and hormones in peanut plants. *Plant Science*, 2003;*164*(1):103-9.

3- Ahn SY, Kim SA, Han JH, Choi SJ, Yun HK. Induction of defense-related responses and suppression of grey mold in grapevines treated with defense response signaling molecules. J. Am. Pomol. Soc. 2013;67:104–16.

4- Krisa S, Larronde F, Budzinski H, Decendit A, Deffieux G, Michel MJ. Stilbene production by (*Vitis vinifera*) cell suspension cultures: methyl jasmonate induction and 13C biolabeling. J. Nat. Prod. 1999;62:1688–90.

5- Belhadj A, Telef N, Saigne C, Cluzet S, Barrieu F, Hamdi S, Mérillon JM. Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. Plant Physiol. Biochem. 2008;46:493–99.

6- Miura K, Tada Y. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. Front. Plant Sci. 2014; 5:4.

7- Dixon RA, Paiva NL. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*. 1995;*7*(7): 1085-97.

8- Sato F, Hashimoto T, Hachiya A, Tamura Ki, Choi KB, Morishige T, . . . Yamada Y. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-03-15]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.2.2]

Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001;*98*(1):367-72.

9- Kiselev KV, Dubrovina AS, Isaeva GA, Zhuravlev YN. The Effect of salicylic acid on phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase gene expression in (*Vitis amurensis*)cell culture. Russian Journal of Plant Physiology. 2010;3:415–21.

10- Kiselev K, Dubrovina A, Bulgakov V. Phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase gene expression in rolB transgenic cell cultures of (Vitis amurensis *Applied microbiology and biotechnology*. 2009;*82*(4):647-55.

11- Lanz T, Schröder G, Schröder J. Differential regulation of genes for resveratrol synthase in cell cultures of Arachis hypogaea L. *Planta*. 1990;*181*(2):169-75.

12- Chen J Y, Wen PF, Kong WF, Pan QH, Zhan JC, Li JM, . . . Huang WD. Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. *Postharvest Biology and Technology*. 2006;*40*(1):64-72.

13- Vuong TV, Francoa C, Zhang W. Treatment strategies for high resveratrol induction in (Vitis vinifera L.) cell suspension culture. Biotechnol. Rep. 2014;1(2):15–21.

14- Roat C. Ramawat K. Elicitor-induced accumulation of stilbenes in cell suspension cultures of (Cayratia trifolia (L.) Domin). *Plant Biotechnology Reports.* 2009;*3*(2):135-38.

15- Fang F. Huang WD. Salicylic acid modulated flavonol biosynthesis in three key phases during grape berry development. *European Food Research and Technology*. 2013;*237*(3):441-48.

16- Campos-Vargas R, Nonogaki H, Suslow T, Saltveit ME. Heat shock treatments delay the increase in wound-induced phenylalanine ammonia-lyase activity by altering its expression, not its induction in Romaine lettuce (Lactuca sativa) tissue. *Physiologia Plantarum.* 2005; *123*(1):82-91.

17- Goyal S, Ramawat K. Increased isoflavonoids accumulation in cell suspension cultures of (*Pueraria tuberosa*) by elicitors. 2008;7:378-82.

18- Xu A, Zhan JC, Huang WD. 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* (*PCTOC*). 2015;*122*(1):197-211.

19- Li X, Zheng X, Yan S, Li S. Effects of salicylic acid (SA), ultraviolet radiation (UV-B and UV-C) on trans-resveratrol inducement in the skin of harvested grape berries. *Frontiers of agriculture in China.* 2008;*2*(1):77-81.

20- Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: a molecule whose time has come and gone. Clin Biochem. 1997;30:91–113.

21- Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. Plant Physiol. 2001;126:485–93.

22- Wang W, Tang K, Yang HR, Wen PF, Zhang P, Wang HL, Huang WD. Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants(Vitis vinifera L. cv. Cabernet Sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation. Plant Physiol Biochem. 2010b;48:142–52.

23- Pezet R, Gindro K, Viret O, Spring JL. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. Physiol Mol Plant Pathol. 2004;65:297–303.

24- Cai ZZ, Kastell A, Mewis I, Knorr D, Smetanska I. Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and phenolic acid accumulation in cell suspension cultures of (Vitis vinifera). Plant Cell Tissue Organ Cult. 2012;108:401–9.

25- Namdeo A. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review, Review. 2007;1:69–79.

26- Beckers GJ, Spoel SH. Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. Plant Biol. 2006;8:1–10.

27- Horvath E, Szalai G, Janda T. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signalling. J Plant Growth Regul. 2007;26:290–300.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-03-15]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.2.2]

Biotechnology-Tarbiat Modares University

The Effect of Different Concentrations of Salicylic Acid on Expression of Stilbene Synthase Gene and Production of Resveratrol in Grape cv. Soltani

Sabzchi S.[1], Hatami Maleki H. [*2], Motalebi Azar A.[3], Zaree Nahandi F.[3], Rafiee M.[4]

1- M.Sc., Department of Plant Production & Genetics, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran
2- Associate Professor, Department of Plant Production & Genetics, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran
3- Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
4- PhD. student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran

*Corresponding Author: hatamimaleki@yahoo.com
Postal code: 55181-83111

Received: 2021/6/16 Accepted: 2021/6/16

Abstract:

Aims The secondary metabolites of plants have been considered due to their diversity and roles in plants and human health. Grapevine is one of the plants that have secondary compounds with medicinal properties. such compounds include resveratrol which is a phenolic compound from the stilbenoid group. In order to investigate the resveratrol production under the effect of an elicitor, a CRD design with four replications using Soltani cultivar was done.

Materials & Methods. The salicylic acid (SA) was used as an elicitor with variable concentrations including 0, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} and was introduced into MS medium without hormones to examine it`s stress effects. At the molecular level, the effect of SA on the expression of stilbene-synthase gene was evaluated by semi-quantitative RT-PCR. In the biochemical experiment, the rate of resveratrol production was measured by HPLC.

Findings Stilbene-synthase expression analysis showed that SA with a concentration of 10^{-4} M had a positive and incremental effect on gene expression and showed a 35.48% of increase compared to the control state, and also the concentration of 10^{-5} M increased the gene expression 5.65% in relation with control state. In the biochemical experiment, increasing in production of resveratrol was observed in 10^{-4} M treatment compared to the control treatment (6.1 µg) and 10^{-5} M treatment (3.25 µg) did not show a significant difference with the control sample.

Conclusion SA as an elicitor and stimulant of resveratrol production could enhance the expression of stilbene-synthase gene followed by enhancing the medicinal properties of the Vitis plant.

Keywords: Grape; Elicitor; Phenolic compounds; Chromatoghraphy; Secondary Metabolites

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-03-15]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.2.2]