

تغییرات میزان رسوراترول در برگ و میوه و اثر احتمالی متیل جازمونات بر آن در دو رقم انگور (*Vitis vinifera* L.) ایرانی

عقیل محمودی پور^{۱*}، محمود اثنی عشری^۱، امید کرمی^۲ و مهدی حصارى^۳

(تاریخ دریافت: ۸۶/۳/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۲/۷)

چکیده

رسوراترول (۳،۴،۵-تری هیدروکسی استیلبن) یک ترکیب پلی فنولیکی ارزشمند است که از سرطان و بیماری‌های قلبی و عروقی در انسان جلوگیری می‌کند. این ماده از برگ و میوه دو رقم انگور ایرانی (رجبی سفید شیراز و کشمشى قرمز) با پیرایش یک شیوه عمومی استخراج و با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مورد ارزیابی کمی قرار گرفت. مقدار رسوراترول موجود در میوه و برگ رقم رجبی سفید شیراز بیش از رقم کشمشى قرمز و میزان این ماده در میوه‌های هر دو رقم بیش از برگ‌های آنها بود. میزان تجمع رسوراترول در هر دو رقم در ابتدای رشد و نمو میوه (۴ هفته پس از مرحله تمام گل) بیشتر از مراحل بعد (۸ هفته پس از مرحله تمام گل و رسیدن کامل میوه) اندازه‌گیری شد به طوری که مقدار تجمع آن از ابتدای رشد و نمو میوه تا مرحله رسیدن کامل سیر نزولی داشت و در موقع رسیدن کامل میوه به کمترین میزان خود رسید. میوه‌ها و برگ‌های دو رقم مورد آزمایش تحت تأثیر متیل جازمونات (با غلظت ۱ میلی مولار) قرار گرفت و میزان رسوراترول آنها پس از تیمار اندازه‌گیری شد و این میزان به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت. میوه‌های هر دو رقم تحت تأثیر تیمارهای مذکور در مرحله ۴ هفته پس از تمام گل واکنش بهتری نشان داده و رسوراترول بیشتری انباشته کردند، ولی میزان تجمع این ماده در مراحل بعدی (۸ هفته پس از مرحله تمام گل و رسیدن کامل میوه) سیر نزولی داشت، به طوری که اثر تیمارهای یاد شده روی تولید رسوراترول در میوه‌های کاملاً رسیده به حداقل خود رسید.

واژه‌های کلیدی: انگور، رسوراترول، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، متیل جازمونات

مقدمه

این ترکیبات هم‌چنین در شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*) از رشد قارچ‌ها جلوگیری می‌کنند (۱، ۱۳، ۱۴ و ۲۰). از مهم‌ترین استیلبن‌ها می‌توان به رسوراترول و پیسید (Picied) اشاره نمود که هر دو از لحاظ ساختار شیمیایی جزء ترکیبات پلی فنولیکی (Polyphenolic compounds) بوده و به صورت ایزومرهای سیس و ترانس (Cis and trans isomers)

رسوراترول (Resveratrol) یک ترکیب پلی فنولیکی با وزن مولکولی کم است که به گروهی از فیتوالکسین‌ها (Phytoalexins) به نام استیلبن‌ها (Stilbenes) تعلق دارد (۱۹). استیلبن‌ها نقش مهمی در سیستم دفاعی گیاهان در مقابله با عوامل بیماری‌زا و به‌ویژه قارچ‌ها بازی می‌کنند (۵، ۱۲ و ۱۶).

۱. به ترتیب کارشناس ارشد و استادیار باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

۲. مربی بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

۳. مربی خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: aghil_mahmoodi@yahoo.com

وجود دارند. ایزومر ترانس رسوراترول در گیاهان تولیدکننده استیلبن ها غالب بوده و فرم سیس کمتر دیده می شود. پیسید نیز ایزومر گلوکوزیدی (متصل به قند) رسوراترول محسوب می شود که در برخی از گیاهان تولیدکننده استیلبن ها از جمله انگور در مقادیر نسبتاً بالایی تجمع می یابد (۱۸).

به طور کلی این فیتوالکسین در گیاهان خانواده ویتاسه (Vitaceae)، پیناسه (Pinaceae) و آراشاسه (Arachaceae) تحت تأثیر تنش های بیولوژیک و غیر بیولوژیک تولید می شود. در بین گیاهان خانواده های مذکور، انگور و بادام زمینی (*Arachis hypogaea*) مهم ترین تولید کننده رسوراترول بوده و انگور و فرآورده های آن اصلی ترین منبع این ماده در رژیم غذایی انسان می باشند (۱۵، ۱۷، ۱۸، ۲۰ و ۲۶). رسوراترول یک ترکیب آنتی اکسیدان است که بیشتر در انگورهای قرمز تجمع می یابد (۱۶) و می تواند در حفظ سلامتی انسان نقش مؤثری داشته باشد، به طوری که از رشد سلول های سرطانی جلوگیری کرده و ابتلا به بیماری های قلبی عروقی را کاهش می دهد (۹ و ۱۰).

این ماده به طور طبیعی در مقادیر اندک در اندام های مختلف درخت مو مانند ساقه، برگ و میوه ساخته می شود اما در پاسخ گیاه به تنش های بیولوژیک و غیر بیولوژیک میزان آن افزایش فراوان می یابد (۱۱ و ۱۶).

در انگورهای اروپایی (*Vitis vinifera*) بخش اعظم رسوراترول موجود در گیاه در قسمت پوست میوه (حبه ها) انباشته شده و بخش بسیار اندکی از آن در گوشت میوه و دانه ها تجمع می یابد در حالی که در انگورهای آمریکایی (Muscadineae) علاوه بر پوست حبه، دانه ها نیز مقادیر متنابهی از رسوراترول را در خود انباشته می کنند (۶).

واتر هوس و لامولارانتوس در سال ۱۹۹۴ گزارش نمودند که رسوراترول و پیسید (فرم اتصال به قند آن) در پوست حبه انگورهای اروپایی وجود دارند (۲۸). هم چنین سولیس و همکاران در سال ۱۹۹۵ مقادیر رسوراترول ترانس را در آب میوه ۱۰ رقم انگور مورد ارزیابی کمی قرار دادند (۲۵).

جازمونیک اسید (Jasmonic acid) و متیل استر آن

(جازمونات) هورمون های طبیعی گیاهی هستند که در تنظیم رشد و نمو گیاهان و کنترل آن نقش بسیار مهمی دارند. این ترکیبات در فرایندهایی مانند پیری و در برخی گیاهان که دارای پیچک هستند در پیچاندن آن و مهم تر از همه در واکنش های دفاعی گیاهان دخالت دارند (۳، ۸ و ۲۷).

لارونده و همکاران در سال ۲۰۰۳ گزارش کردند که محلول پاشی متیل جازمونات روی حبه ها و برگ های انگور رقم کبسه ساوینون (Cabernet sauvignon) سبب افزایش تجمع متابولیت های ثانویه مانند ترانس رسوراترول و پیسید در آنها می گردد. اثر متیل جازمونات در افزایش تولید دو متابولیت مذکور روی حبه هایی که ۱۵ روز پس از مرحله آغاز رسیدگی (Veraison) تیمار شده بودند، بیشتر از حبه هایی بود که ۳۰ روز پس از ورایزون محلول پاشی گردیده بودند. این وضعیت نشان می دهد که توانایی متیل جازمونات در تحریک تجمع استیلبن های ترانس رسوراترول و پیسید در حبه های کاملاً رسیده کاهش می یابد. آنها هم چنین دریافتند که برگ های انگور در هر مرحله از رشد و نمو در برابر تیمار فوق واکنش نشان داده و تولید استیلبن های مذکور در آنها تحریک می گردد. این محققین بیان کردند که توانایی سنتز استیلبن ها، از جمله رسوراترول و پیسید در واکنش به تنش های بیولوژیک مانند متیل جازمونات افزایش می یابد و پیش تیمار این ماده می تواند به عنوان یک محرک سنتز استیلبن ها عمل کند. هم چنین مقدار بسیار اندک متیل جازمونات موجود در اتمسفر می تواند میزان انباشته شدن استیلبن های رسوراترول و پیسید در حبه ها و برگ های انگور را تحریک نماید (۲۱).

اثنی عشری و همکاران در سال ۲۰۰۶ در بررسی های خود میزان رسوراترول را در ۱۴۷ رقم انگور ایرانی با استفاده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) مورد اندازه گیری قرار دادند و اعلام کردند با این که مقدار رسوراترول در ارقام قرمز و سیاه به طور نسبی بیشتر است ولی برخی از ارقام زرد نیز حاوی مقادیر بالایی از رسوراترول هستند (۷).

این تحقیق با هدف بررسی میزان رسوراترول در مراحل مختلف توسعه میوه به علاوه برگ های بالغ دو رقم انگور که

برای استخراج رسوراترول از نمونه‌های تهیه شده، تلفیقی از روش‌های سولیس و همکاران (۲۵) و باوارسکو و همکاران (۲) به کار گرفته شد با کمی تغییرات (Modification) که نهایتاً به شرح ذیل بود: میزان ۱۰ گرم از حبه‌ها و برگ‌های هر یک از ارقام انگور جداگانه توزین شد و هر یک به تنهایی در داخل هاون کاملاً خرد گردید به طوری که از پوست، گوشت و دانه میوه و هم‌چنین برگ‌ها عصاره غلیظی به دست آمد. عصاره مذکور در داخل یک ارلن مایر ۱۰۰ میلی‌لیتر با ۶۰ میلی‌لیتر متانول خالص مخلوط و بمدت ۳۰ دقیقه روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. محلول حاصل به مدت ۲ دقیقه با چرخشی معادل ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و عصاره موجود در بالای لوله آزمایش تخلیه و در ظروف شیشه‌ای که با ورقه آلومینیمی پوشانده شده بودند نگهداری شد. مواد تجمع یافته در ته لوله توسط اسکالپل خارج و مجدداً در هاون خرد گردید و پس از مخلوط نمودن با ۶۰ میلی‌لیتر متانول خالص بمدت ۳۰ دقیقه با همزن مغناطیسی به هم زده شد و بمدت ۲ دقیقه با همان چرخش سانتریفوژ گردید. عمل فوق عیناً برای بار سوم نیز انجام شد به طوری که از هر ده گرم حبه انگور و هم‌چنین برگ‌های آن سه بار با روش مشابه عصاره‌گیری به عمل آمد تا با اطمینان بیشتری رسوراترول موجود در حبه‌ها و برگ‌های مورد آزمایش از آنها خارج و در حلال حل شود. عصاره نهایی در داخل بالون با متانول خالص به حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و سپس در داخل یخچال (۴- درجه سانتی‌گراد) نگهداری گردید تا از آن برای اندازه‌گیری‌های کمی استفاده شود.

لازم به توضیح است که به لحاظ حساس بودن رسوراترول به نور و جهت جلوگیری از تجزیه آن، کلیه عملیات عصاره‌گیری از میوه‌ها و برگ‌های مورد آزمایش در محیط بسیار کم نور صورت گرفت.

ارزیابی کمی رسوراترول

جهت ارزیابی کمی نمونه‌ها ابتدا محلول استاندارد (با غلظت ۱ میلی‌مولار) از رسوراترول جامد (محصول شرکت Sigma

قبلاً به‌عنوان ارقام شاخص در این خصوص گزارش شده بودند، طراحی و در مرحله دوم تأثیر محرک متیل جازمونات بر تولید رسوراترول مورد بررسی قرار گرفت. لذا ضمن استخراج رسوراترول از میوه (در سه مرحله مختلف رشد و نمو) و برگ (در مرحله بالغ) دو رقم انگور ایرانی و اندازه‌گیری کمی آن بوسیله دستگاه کروماتوگراف مایع با عملکرد بالا، میزان ماده مذکور در میوه (در سه مرحله مختلف رشد و نمو) و برگ (در مرحله بالغ) تحت تأثیر محرک متیل جازمونات نیز اندازه‌گیری و با یکدیگر مقایسه گردیدند.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی و استخراج رسوراترول

برگ‌ها و حبه‌های دو رقم از ارقام شاخص انگور ایرانی (رجبی سفید شیراز و کشمش قرمز) که جزو ارقام تولیدکننده رسوراترول گزارش شده‌اند (۷) از مرکز تحقیقات باغبانی دانشکده کشاورزی کرج تهیه گردید.

مقدار ۲۳ میکرولیتر از ماده متیل جازمونات (محصول شرکت Aldrich و دارای خلوص ۹۵ درصد) با استفاده از نمونه‌گیر، جدا و داخل ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول خالص ریخته شد تا میزان غلظت این ماده به ۱ میلی‌مولار برسد.

میوه‌ها (در مراحل مختلف ۴ و ۸ هفته پس از مرحله تمام گل و میوه کاملاً رسیده) و هم‌چنین برگ‌های بالغ ارقام مربوطه از بوته‌های مادری جدا و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند سپس در آزمایشگاه و در درجه حرارت حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد محلول یک میلی‌مولار متیل جازمونات روی میوه‌ها و برگ‌ها طوری که تمام سطوح آنها خیس شود، پاشیده شد. ۲۴ ساعت بعد از تیمار حدود ده گرم از حبه‌ها و برگ‌های تیمار شده به همراه نمونه‌های شاهد (تیمار شده فقط با متانول) و شاهد کاملاً بدون تیمار هر یک به تنهایی توزین و در داخل هاون کاملاً خرد گردید. استخراج و ارزیابی کمی رسوراترول موجود در کلیه نمونه‌ها طبق روش‌هایی که شرح داده شده صورت گرفت (۲ و ۲۵).

سه تکرار) و نرم افزار سس (SAS) و مقایسه میانگین‌ها با بهره-گیری از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (در سطح ۵ درصد) صورت گرفت.

نتایج و بحث

اثر رقم و اندام روی تولید رسوراترول

جدول ۱ مقایسه دو رقم انگور ایرانی (رجبی سفید شیراز و کشمش قرمز) از نظر میزان تولید رسوراترول در میوه و برگ را نشان می‌دهد. چنانکه مشاهده می‌شود رقم انگور روی تولید رسوراترول مؤثر بوده و از این نظر بین دو رقم اختلاف معنی‌داری وجود دارد به طوری که رقم رجبی سفید شیراز نسبت به کشمش قرمز توانایی تولید رسوراترول بیشتری در میوه‌ها و برگ‌های خود دارد. بیشترین میزان تولید رسوراترول از میوه رقم رجبی سفید شیراز به دست آمده در حالیکه کمترین آن مربوط به برگ رقم کشمش قرمز بود. جیندیت و همکاران (۱۵)، اوکودا و یوکوتسوکا (۲۳) و رومرو-پرز و همکاران (۲۴) در بررسی‌های خود نشان دادند که رقم انگور در تولید رسوراترول در شرایط مختلف مؤثر است.

نتایج حاصل از این تحقیق هم‌چنین نشان داد (جدول ۲) که اندام‌های مختلف انگور توانایی متفاوتی از لحاظ تولید رسوراترول از خود نشان می‌دهند و میوه بیش از برگ رسوراترول تولید کرد.

این نتیجه با تحقیقات اکتور و همکاران (۶) و جیندت و همکاران (۱۵) که گزارش کردند میزان تولید رسوراترول در اندام‌های مختلف گیاه انگور با یکدیگر متفاوت است، مطابقت دارد.

بنابراین می‌توان گفت تفاوت‌های مشاهده شده دو رقم مورد آزمایش از نظر میزان تولید رسوراترول، ممکن است ناشی از فعالیت بیشتر ژن استیلین سنتاز (*Stilbene synthase*) در برگ‌ها و میوه‌های رقم رجبی سفید شیراز باشد. اگر چه در گزارش‌های متعدد آمده است که انگورهای قرمز و سیاه که در آنها مقدار زیادی آنتوسیانین تجمع می‌یابد، رسوراترول بیشتری نیز ذخیره

آمریکا) تهیه و ارزیابی به شرح زیر صورت گرفت:

برای حذف ناخالصی ابتدا هر یک از عصاره‌های نمونه‌های موجود را از فیلتر سرسرنگی با قطر ۰/۴۵ میکرومتر گذرانده و در ویال با حجم تقریبی ۲ میلی لیتر ریخته شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از هر یک از نمونه‌ها توسط نمونه‌گیر خودکار (Auto sampler) به دستگاه کروماتوگراف مایع با عملکرد بالا محصول شرکت جی بی سی (GBC) استرالیا با مشخصات زیر تزریق گردید.

HPLC GBC Scientific Equipment

Degasser: LC 1460

HPLC Pump: LC 1150

Auto Sampler: LC 1650

UV Detector: 1205K

Software: Winchrom V1.32

Column Type: 250×4.6mm Exsil ODS 5µm

Column Gard: ODS C18

Sample volume: 20 µL

Pump Program:

0-5 min. 5% acetic acid, 15% methanol, 80% water, flow rate 0.4 mL/min

5-30 min. 5% acetic acid, 20% methanol, 75% water, flow rate 0.5 mL/min

30-45 min. 5% acetic acid, 45% methanol, 50% water, flow rate 0.5 mL/min

45-5min . Condition returning to initial condition (5% acetic acid, 15% methanol, 80% water, flow rate 0.4 mL/min) for column treatment to next injection

Maximum wavelength for detection: 306 nm

با مشاهده پیک‌های مربوط به نمونه‌های ارقام رجبی سفید شیراز و کشمش قرمز و با توجه به زمان بازداری (Retention time) ۳۷ دقیقه‌ای که از روش لوپز و همکاران (۲۲) پیروی می‌کرد، مقادیر سطح زیر پیک کروماتوگرام مربوط به رسوراترول مشخص گردیدند.

جهت تعیین پیک مربوط به هر نمونه در کروماتوگرام حاصل، ۰/۵ میلی لیتر از آن را به ۰/۵ میلی لیتر از محلول استاندارد تهیه شده به غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر افزوده و به دستگاه مجدداً تزریق شد. به منظور تعیین مقدار رسوراترول در نمونه، سطح زیر پیک در کروماتوگرام را یک بار در نمونه تنها و بار دیگر در حضور استاندارد توسط نرم افزار دستگاه استخراج و سپس محاسبات لازم جهت تعیین مقدار خالص سطح زیر پیک انجام گرفت و نهایتاً میزان رسوراترول موجود در نمونه‌ها تعیین گردید. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از طرح کاملاً تصادفی (با

جدول ۱. اثر رقم انگور روی میزان تولید رسوراترول (میلی‌گرم در کیلوگرم وزن تر) از اندام‌های میوه و برگ

رقم	میوه کاملاً رسیده	برگ
رجبی سفید شیراز	۳/۳۵ ^a	۱/۳۵ ^a
کشمشی قرمز	۱/۶۲ ^b	۰/۸۵ ^b

*: حروف مشابه در هر ستون نشانگر معنی‌دار نبودن اختلاف‌هاست ($P < 0/05$).

جدول ۲. اثر اندام روی میزان تولید رسوراترول (میلی‌گرم در کیلوگرم وزن تر) در دو رقم انگور*

اندام	رجبی سفید شیراز	کشمشی قرمز
میوه کاملاً رسیده	۳/۳۵ ^a	۱/۶۲ ^a
برگ	۱/۳۵ ^b	۰/۸۵ ^b

*: حروف مشابه در هر ستون نشانگر معنی‌دار نبودن اختلاف‌هاست ($P < 0/05$).

آنتوسیانین‌ها (در انگورهای رنگی) از جمله تجمع قندها، ویتامین‌ها و ترکیبات دیگر در سلول‌های میوه طی مراحل مختلف رشد و نمو باشد و این موضوع نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

اثر متیل جازمونات روی تولید رسوراترول توسط میوه در مراحل مختلف رشد

جدول ۴ اثر متیل جازمونات روی تولید رسوراترول در مراحل مختلف رشد و نمو میوه دو رقم مورد آزمایش را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود این ماده سبب افزایش رسوراترول در میوه‌ها می‌گردد اما این افزایش در همه مراحل رشد و نمو میوه یکسان نبوده و در مراحل اولیه آن نقش بیشتری دارد به طوری که هر دو رقم در مرحله ۴ هفته پس از تمام گل بالاترین و میوه رسیده (شاهد بدون تیمار) کمترین میزان رسوراترول را تولید کردند. نکته قابل توجه این است که یک روند کاهشی عمومی در میزان رسوراترول طی رسیدن میوه‌ها، چه در نمونه‌های تیمار شده و چه در نمونه‌های شاهد وجود دارد اما در رقم کشمش قرمز نمونه تیمار شده ۸ هفته پس از تمام گل، میزان رسوراترول کمتری نسبت به نمونه شاهد ۴ هفته پس از تمام گل تولید نموده است. احتمال می‌رود در این نمونه خاص فاکتور زمان که تأثیرگذار بر روند کاهشی میزان رسوراترول است

می‌کنند (۱۶ و ۲۲) اما نتایج این پژوهش عکس گزارش‌های مذکور را نشان داد. بنظر می‌رسد علاوه بر رنگ میوه عوامل متعدد دیگری وجود دارند که در تولید این ماده در میوه و انگور و دیگر اندام‌های آن دخالت می‌کنند و این موضوع نیاز به مطالعات بیشتر و عمیق‌تری دارد.

اثر دوره رشد و نمو میوه انگور روی تولید رسوراترول

جدول ۳ اثر دوره رشد و نمو میوه دو رقم انگور در مراحل مختلف را روی تولید رسوراترول نشان می‌دهد. نتایج حاصل بیانگر آن است که میوه‌های هر دو رقم در مرحله ۴ هفته پس از تمام گل دارای بیشترین میزان رسوراترول بوده و این مقادیر در مراحل بعدی یعنی ۸ هفته پس از مرحله تمام گل و رسیدن کامل میوه به تدریج کاهش می‌یابد.

جیندیت و همکاران (۱۴) نیز نشان دادند که میوه‌های انگور در مراحل مختلف رشد و نمو مقادیر متفاوتی از رسوراترول در خود انباشته می‌کنند و این مقادیر در مراحل اولیه رشد و نمو بیش از مرحله رسیدگی کامل است و این نتایج با گزارش‌های آنان مطابقت دارد. یکی از دلایل عمده کاهش تدریجی رسوراترول از مرحله اولیه رشد و نمو تا مرحله رسیدن کامل میوه، ممکن است مربوط به رقابت مسیرهای متابولیکی تولید رسوراترول و تشکیل

جدول ۳. اثر دوره رشد و نمو میوه روی میزان تولید رسوراترول (میلی گرم در کیلوگرم وزن تر) در دو رقم انگور ایرانی*

دوره رشد و نمو میوه			
رقم	۴ هفته پس از تمام گل	۸ هفته پس از تمام گل	میوه رسیده
رجبی سفید شیراز	۴/۰۸ ^a	۳/۷۸ ^b	۳/۳۵ ^c
کشمشی قرمز	۲/۷۰ ^a	۲/۲۱ ^b	۱/۶۲ ^c

*: حروف مشابه در هر ستون نشانگر معنی دار نبودن اختلاف هاست ($P < 0/05$).

جدول ۴. اثر متیل جازمونات روی میزان تولید رسوراترول (میلی گرم در کیلوگرم وزن تر) در مراحل مختلف رسیدگی میوه دو رقم انگور*

نمونه	رجبی سفید شیراز	کشمشی قرمز
۴ هفته پس از تمام گل (شاهد بدون تیمار)	۴/۰۸ ^b	۲/۷۰ ^b
۴ هفته پس از تمام گل (شاهد فقط با متانول)	۴/۱ ^b	۲/۷۵ ^b
۸ هفته پس از تمام گل (شاهد بدون تیمار)	۳/۷۸ ^c	۲/۲۱ ^d
۸ هفته پس از تمام گل (شاهد فقط با متانول)	۳/۷۰ ^c	۲/۲۶ ^d
میوه رسیده (شاهد بدون تیمار)	۳/۳۵ ^d	۱/۶۲ ^f
میوه رسیده (شاهد فقط با متانول)	۳/۳۰ ^d	۱/۶۵ ^f
تیمار شده ۴ هفته پس از تمام گل	۵/۴۷ ^a	۳/۹ ^a
تیمار شده ۸ هفته پس از تمام گل	۴/۰۷ ^b	۲/۴۴ ^c
میوه رسیده تیمار شده	۳/۳۷ ^d	۱/۸۴ ^e

*: حروف مشابه در هر ستون نشانگر معنی دار نبودن اختلاف هاست ($P < 0/05$).

بیش از اثر تحریک کنندگی متیل جازمونات مؤثر واقع گردیده است.

اثر متیل جازمونات روی تولید رسوراترول توسط برگ

داده‌های حاصل از جدول ۵ نشان می‌دهند که پاشیدن متیل جازمونات بر روی برگ‌های دو رقم انگور ایرانی (رجبی سفید شیراز و کشمش قرمز) موجب افزایش سنتز رسوراترول در آنها می‌گردد. چنانکه مشاهده می‌شود بین رسوراترول تولید شده در برگ‌های شاهد (بدون تیمار و فقط با متانول) و تیمار شده هر کدام از ارقام اختلاف معنی داری وجود دارد و این نشان دهنده تحریک

تولید رسوراترول در برگ‌های انگور توسط متیل جازمونات است. لارونده و همکاران (۲۱) با بررسی‌های خود نتیجه گرفتند که محلول پاشی متیل جازمونات بر روی میوه‌ها و برگ‌های انگور سبب افزایش تجمع استیلبن‌ها از جمله رسوراترول می‌گردد. آنان نشان دادند که واکنش میوه‌ها در اوایل رشد و نمو به متیل جازمونات بیش از مرحله رسیدگی کامل است در حالی که برگ‌های انگور بدون توجه به مراحل رشد و نمو در برابر این ماده واکنش نشان داده و تجمع استیلبن‌ها به‌ویژه رسوراترول را افزایش می‌دهد. نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج فوق هم‌آهنگ است.

جدول ۵. اثر متیل جازمونات روی میزان تولید رسوراترول (میلی گرم در کیلوگرم وزن تر) برگ دو رقم انگور*

نمونه	رجبی سفید شیراز	کشمشی قرمز
برگ (شاهد بدون تیمار)	۱/۳۵ ^b	۰/۸۵ ^b
برگ (شاهد فقط با متانول)	۱/۴۲ ^b	۱ ^b
برگ تیمار شده	۲/۲۶ ^a	۱/۸۳ ^a

*: حروف مشابه در هر ستون نشانگر معنی دار نبودن اختلاف هاست ($P < 0/05$).

جدول ۶. مقایسه اثر متیل جازمونات روی میزان تولید رسوراترول (میلی گرم در کیلوگرم وزن تر) توسط میوه (در مراحل مختلف رشد و نمو) و برگ دو رقم انگور*

نمونه	رجبی سفید شیراز	کشمشی قرمز
میوه		
۴ هفته پس از تمام گل (شاهد بدون تیمار)	۴/۰۸ ^b	۲/۷۰ ^b
۴ هفته پس از تمام گل (شاهد فقط با متانول)	۴/۱ ^b	۲/۷۵ ^b
۸ هفته پس از تمام گل (شاهد بدون تیمار)	۳/۷۸ ^c	۲/۲۱ ^d
۸ هفته پس از تمام گل (شاهد فقط با متانول)	۳/۷۸ ^c	۲/۲۶ ^d
رسیده (شاهد بدون تیمار)	۳/۳۵ ^d	۱/۶۲ ^f
رسیده بدون تیمار (شاهد فقط با متانول)	۳/۳۶ ^d	۱/۶۵ ^f
تیمار شده ۴ هفته پس از تمام گل	۵/۴۷ ^a	۳/۹ ^a
تیمار شده ۸ هفته پس از تمام گل	۴/۰۷ ^b	۲/۴۴ ^c
رسیده تیمار شده	۳/۳۷ ^d	۱/۸۴ ^e
برگ		
شاهد (بدون تیمار)	۱/۳۵ ^e	۰/۸۵ ^g
شاهد (فقط با متانول)	۱/۴۲ ^e	۱ ^g
تیمار شده	۲/۲۶ ^d	۱/۸۳ ^e

*: حروف مشابه در هر ستون نشانگر معنی دار نبودن اختلاف هاست ($P < 0/05$).

مقایسه اثر متیل جازمونات روی تولید رسوراترول توسط میوه (در مراحل مختلف رشد و نمو) و برگ

داده‌های جدول ۶ نشان می‌دهند که تیمار متیل جازمونات روی میوه هر دو رقم سبب افزایش تجمع معنی دار رسوراترول نسبت به برگ می‌گردد و در این وضعیت بهترین واکنش متعلق به میوه

هر دو رقم در مرحله ۴ هفته پس از مرحله تمام گل است. با توجه به اطلاعات موجود در خصوص ژن استیلین سیتاز چنین به نظر می‌رسد که نه تنها فعالیت ژن مذکور و تولید رسوراترول در مراحل اولیه رشد و نمو میوه بیش از مراحل بعدی رشد آن و برگ است، بلکه تیمار متیل جازمونات ضمن

فعالیت ژن‌های مربوطه و واکنش‌های منجر به تولید رسوراترول در مراحل اولیه رشد و نمو بیش از مراحل بعدی است که جهت اثبات آن به مطالعات سلولی و مولکولی بیشتری است. یکی از محرک‌هایی که تولید رسوراترول را افزایش می‌دهد، متیل جازمونات است که با تیمار روی برگ‌ها و میوه‌ها موجب افزایش معنی‌دار میزان تولید آن شده و شدت تأثیر آن در مراحل اولیه رشد و نمو میوه (۴ هفته پس از مرحله تمام گل) بیش از مراحل بعدی بوده به طوری که تأثیر آن در مورد میوه‌های کاملاً رسیده به حداقل خود می‌رسد. بنابراین این امکان وجود دارد که محرک متیل جازمونات ضمن تشدید فعالیت ژن‌ها و واکنش‌های شرکت کننده در بیوسنتز رسوراترول، مقدار آن را در اندام‌های تیمار شده افزایش دهد. با توجه به فواید بیولوژیکی بسیار مهم رسوراترول در انسان می‌توان اظهار نظر نمود که تولید این ماده به صورت دارویی با آزمایش‌ها و مطالعات دقیق‌تر و بهینه‌سازی شرایط و عوامل، امکان‌پذیر خواهد بود.

تشدید فعالیت ژن مذکور و تولید رسوراترول بالاتر در همه نمونه‌ها بیشترین اثر را روی میوه هر دو رقم در مرحله ۴ هفته پس از تمام‌گل داشته است. البته این موضوع نیاز به آزمایش‌ها دقیق‌تر در سطح مولکولی دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به آزمایش‌ها این پژوهش، رقم و نوع اندام در گیاه انگور و هم‌چنین مراحل مختلف رشد و نمو میوه روی مقدار ماده رسوراترول مؤثر است. به طور کلی این میزان در انگورهای سیاه و قرمز بالاتر از ارقام زرد و سفید است، اما چنانکه در این تحقیق مشخص گردید برخی از ارقام سفید و زرد (مانند رقم رجبی سفید شیراز) نیز مقادیر متنابهی از رسوراترول را در اندام‌های خود انباشته می‌کنند. میزان تولید این ماده در میوه‌های هر دو رقم مورد آزمایش بیش از برگ‌ها و در مراحل اولیه رشد و نمو میوه‌ها بالاتر از مراحل بعدی بوده است. چنین به نظر می‌رسد که

منابع مورد استفاده

- Adrian, M., P. Jeandet, J. Veneau, L. A. Weston, R. Bessis. 1997. Biological activity of resveratrol, a stilbene compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *J. Chem. Ecol.* 23: 1689-1702.
- Bavaresco, L., D. Petegolli, E. Cantu, M. Fregoni, G. Chiusa and M. Trevisan. 1997. Elcitation and accumulation of stilbene phytoalexins in grapevine berries infected by *Botrytis cinerea* Vitis. *Italian J. Food Sci.* 36 (2): 77-83.
- Creelman, R.A. and J.E. Mullet. 1997. Biosynthesis and action of jasmonate in plants. *Plant Mol. Biol.* 48:355-381
- Dercks, W. and L. L. Creasy. 1989. The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara viticola* grapevine interaction. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34: 189-202.
- Dixon, R.A. and M. Harrison. 1990. Activation, structure and organization of genes involved in microbial defence in plants. *Adv. in Genet.* 28: 165-234.
- Ector, B., J. Magee, C. Hegwood and M. Coign. 1996. Resveratrol concentration in muscadine berries, juice, pomace, purees, seeds and wines. *Am. J. Enol. Viticult.* 47:57-62.
- Esna-Ashari, M., M. Gholami, M. Zolfigol, M. Shiri, A. Mahmoodi Pour and M. Hesari. 2006. Analysis of trans-resveratrol in 147 Iranian grape cultivars by High-Performance liquid Chromatography. 27th International Horticultural Congress and Exhibition (IHC).
- Falkenstein, E., B. Groth, A. Mithofer and E. W. Weiler. 1991. Methyl jasmonate and a-linolenic acid are potent inducers of tendrils coiling. *Plantarum* 185:316 – 22.
- Folts, J.D. 2002. Potential health benefits from flavonoids in grape products on vascular disease. *Adv. Exp. Med. and Biol.* 505:95-111.
- Frankel, E. N., A. L. Waterhouse and P. L. Teissedre. 1995. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Sci. Food Agric.* 43: 890-894.
- Fritzemeier, K. and H. Kindl. 1981. Coordinate induction by UV light of stilbene synthase phenylalanine ammonialyase and cinnamate 4-hydroxylase in leaves of Vitaceae. *Plantarum* 151:48-52.
- Hain, R., B. Bieseler, H. Kindl, G. Schroder and R. Stodker. 1990. Expression of a stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of phytoalexin resveratrol. *Plant Mol. Biol.* 15: 325-335.

13. Hoos, G. and R. Blaich. 1990. Influence of resveratrol on germination of conidia and mycelial growth of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola*. J. Phytopathol. 129: 102-110.
14. Jeandet, P., R. Bessis and B. Gautheron. 1991. The production of resveratrol by grape berries in different developmental stages. Am. J. Enol. Viticult. 42:41-46.
15. Jeandet, P., R. Bessis, M. Sbaghi and P. Meunier. 1995. Production of the phytoalexin resveratrol by grapes as a response to *Botrytis* attack under natural conditions. J. Phytopathol. 143:135-139.
16. Jeandet, P., A.C. Douillet-Breuil, R. Bessis, S. Debord, M. Sbaghi and M. Adrian. 2002. Phytoalexins from the Vitaceae : biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity and metabolism. J. Agric. Food Chem. 50: 2731-2741.
17. Kodan, A., H. Kuroda and F. Sakai 2001. Simultaneous expression of stilbene synthase genes in Japanese red pine (*Pinus densiflora*). J. Wood Sci. 47: 58-62.
18. Krasnow, M. N and T.M. Murphy. 2004. Polyphenol glucosylating activity in cell suspensions of grape (*Vitis Vinifera*). J. Agric. Food Chem. 52: 3467-3472.
19. Langcake, P. and Pryce, R. J. 1977. The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet fellowship irradiation Phytochemistry 16:1193-1196.
20. Langcake, P. and R.J. Pryce 1976. The Production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. Physiol. Plant Pathol. 9:77-86.
21. Larronde, F., J. P. Gaudillere, S. Krisa, A. Decendit, G. Deffieux and J. M. Merillon. 2003. Airborne methyl jasmonate induces stilbene accumulation in the leaves and berries of grapevine plants. Am. J. Enol. Viticulture, 54: 63-66.
22. Lopez, M., F. Martinez, C. Del Valle, C. Orte and M. Miro. 2001. Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. J. Chromatog. A. 922: 359-363.
23. Okuda, T. and K. Yokotsuka. 1996. trans-Resveratrol concentrations in berry skins and wines from grapes grown in Japan. Am. J. Enol. Viticult. 47:93-99.
24. Romero-Perez, A., M. Ibern-Gomez. R. Lamuela-Raventos and M. Torre-Boronat. 1999. Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices. J. Agric. and Food Chem. 47:1533-1538.
25. Soleas, G., D. Goldberg, E. Diamandis, A. Karumanchiri, J. Yan and E. Ng. 1995. A derivatized gas chromatographic-mass spectrometric method for the analysis of both isomers of resveratrol in juice and wine. Am. J. Enol. Viticult. 46:346-353.
26. Tassoni, A., S. Fornale, M. Franceschetti, F. Musiani, B. Perry and N. Bangi. 2005. Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. New Phytol. 166: 895-905.
27. Ueda, J., J. Kato, H. Yamane and N. Takahashi. 1981. Inhibitory effect of methyl jasmonate and its related compounds on kinetin-induced retardation of oat leaf senescence. Physiol. Planta. 52:305-9.
28. Waterhouse, A.L. and R.M. Lamuela-Raventos. 1994. The occurrence of piceid, a stilbene glucoside, in grape berries. Phytochemistry 37: 571-573.