



## تولید آنتوسیانین در کشت کالوس سیب: اثر منبع نیتروژن و غلظت منیزیم

فرشاد کاکاوند<sup>۱</sup>، ناصر مهنا<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران؛ آدرس فعلی: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قزوین، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، قزوین، ایران  
<sup>۲</sup> دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران  
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۸/۳۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۵/۰۴

### چکیده

آنتوسیانین‌ها بدلیل توانایی آن‌ها در محافظت انسان در برابر بیماری‌های مزمن، توجه زیادی را به خود معطوف ساخته‌اند. تولید آنتوسیانین‌های طبیعی از مواد گیاهی تازه با محدودیت‌های متعددی مواجه است. بنابراین، استفاده از بیوتکنولوژی گیاهی جهت تولید آنتوسیانین بدون محدودیت‌های ذکر شده مورد توجه قرار گرفته است. از طرف دیگر، برخی از سیب‌های زینتی می‌توانند آنتوسیانین را در اندام‌های مختلف خود از جمله بافت کالوس درون شیشه‌ای تولید کنند. در این تحقیق، به منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف منیزیم و منبع نیتروژن محیط کشت بر روی تولید درون‌شیشه‌ای آنتوسیانین از کالوس یک ژنوتیپ سیب زینتی گوشت قرمز، ابتدا از ریزنمونه‌های برگ گیاهچه‌های درون شیشه‌ای جهت تولید کالوس استفاده گردیده و پس از بدست آوردن کالوس به مقدار مورد نیاز، تیمارهای مورد نظر در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و چهار نمونه در هر تکرار اعمال گردید. افزودن منیزیم به محیط کشت میزان تولید آنتوسیانین را تا سه برابر افزایش داد و بیشترین میزان آنتوسیانین در بالاترین غلظت منیزیم (۴۰ میلی‌مولار) مشاهده گردید. البته در این غلظت میزان رشد کالوس‌ها کاهش یافت. تغییر منبع نیتروژن نیز بر تولید آنتوسیانین اثر گذاشت و بهترین منبع نیتروژن برای تولید آنتوسیانین، ترکیب آمونیوم ۱۰ میلی‌مولار بعلاوه نیترات ۱۸/۸ میلی‌مولار و آمونیوم ۵ میلی‌مولار بعلاوه نیترات ۲۵ میلی‌مولار بود.

کلمات کلیدی: آمونیوم، آنتوسیانین، کالوس، منیزیم، نیترات.

## مقدمه

cyanidin-7-O- و cyanidin-3-O-xyloside  
 arabinoside وجود دارد (Mulabagal *et al.*, 2007). تحقیقات نشان داده‌اند که سیب‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای مانند کشت کالوس نیز دارای توانایی تولید آنتوسیانین می‌باشد (Akbari, 2011). تامین این متابولیت ثانویه از منابع گیاهی با توجه به محدودیت‌های فصلی و شرایط خاص رشد گیاه با محدودیت‌هایی مواجه است. امروزه استفاده از بیوتکنولوژی جهت تولید متابولیت‌های ثانویه بدون محدودیت‌های ذکر شده مورد توجه قرار گرفته است و تولید آنتوسیانین در شرایط درون‌شیشه‌ای در گونه‌های مختلف گیاهی از جمله توت‌فرنگی (Sato *et al.*, 1996)، انگور (Sinilal *et al.*, 2011) و گل سرخ محمدی و گل سرخ مینیاتور (Abdirad *et al.*, 2011) گزارش شده است. تولید آنتوسیانین از طریق کشت سوسپانسیون سلولی *Aralia cordata* در مقیاس بزرگ (۵۰۰ لیتری) انجام شده است (Kobayashi *et al.*, 1993). فاکتورهای مختلفی بر تولید درون‌شیشه‌ای آنتوسیانین اثر می‌گذارند و جهت تولید حداکثر درون‌شیشه‌ای آنتوسیانین، بهینه‌سازی هر یک از آنها الزامی می‌باشد. اثر نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (Akbari, 2011) و اثر غلظت فسفر، کلسیم و نیتروژن (Sugaya *et al.*, 2001) و همچنین تاثیر غلظت و نوع منبع کربوهیدرات (Zahedzadeh *et al.*, 2014) بر تولید آنتوسیانین از کشت کالوس سیب مورد بررسی قرار گرفته است.

آنتوسیانین از جمله فلاونوئیدهایی است که دارای ارزش بسزایی در رژیم غذایی انسان می‌باشد. خواص آنتی‌اکسیدانی این رنگدانه گیاهی جهت تمیز کردن<sup>۱</sup> رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن به خوبی اثبات گردیده است (Chun *et al.*, 2003). آنتوسیانین‌ها همچنین باعث افزایش کارکرد ایمنی بدن و ترمیم ناهنجاری‌های بینایی می‌گردند و خصوصیات ضد التهابی نیز دارند (Shin *et al.*, 2006). آنتوسیانین‌ها با کاهش بیماری‌های گرفتگی عروق قلب که به اصطلاح French paradox نامیده می‌شوند، مرتبط هستند. تحقیقات زیادی روی ارتباط آنتوسیانین با کاهش رشد و شروع سرطان انجام گردیده است (Smith *et al.*, 2000). سیب‌های زینتی (*Malus pumila*) آنتوسیانین‌دار که اکثر آنها از وارسته *Niedzwetzkyana* منشأ گرفته‌اند، از جمله گیاهانی هستند که توانایی تولید آنتوسیانین در اندام‌های مختلف خود از قبیل برگ و میوه را دارند. بر اساس پژوهش مولاباگال و همکاران (۲۰۰۷)، نشان داده شد که بیش از ۹۹ درصد آنتوسیانین سیب *Niedzwetzkyana* از نوع cyanidin-3-O-glucosyl rutinoside است؛ در حالیکه در سایر سیب‌ها آنتوسیانین‌های دیگری نیز مانند cyanidin-3-O-glucoside ، cyanidin-3-O-galactoside ، cyanidin-3-O-arabinoside

<sup>1</sup> Scavenging

ظاهرا غیر مرتبط با سیب *Niedzwtzkyana* می باشد. جهت تکثیر گیاهچه ها، از محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین، ۱۰۰ میلی گرم در لیتر سکوسترون آهن و ۳۰ میلی گرم در لیتر ساکارز استفاده شد. pH محیط کشت توسط هیدروکسید سدیم و اسید کلریدریک یک نرمال حدود  $5/7 \pm 0/05$  تنظیم گردید. سپس آگار به میزان ۸ گرم در لیتر به محیط کشت اضافه شد. گیاهچه های سیب در این محیط، کشت شدند و بازکشت گیاهچه ها در محیط کشت جدید به فواصل سه هفته از آغاز کشت انجام گردید (Zahedzadeh et al., 2014). کشت کالوس: قطعات برگگی به اندازه نیم سانتی متر مربع در محیط کالوس زایی قرار داده شدند. جهت القا کالوس و پرآوری آن از محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی گرم در لیتر NAA، یک میلی گرم در لیتر 2,4-D، نیم میلی گرم در لیتر کینتین و ۳۰ میلی گرم در لیتر ساکارز استفاده گردید. ریزنمونه ها بعد از کشت در تاریکی قرار داده شده و با فواصل سه هفته، جهت به دست آوردن کالوس مورد نیاز، در محیط کشت مذکور بازکشت گردیدند.

محیط کشت تولید آنتوسیانین: کالوس های بدست آمده در پتری دیش های حاوی ۲۵ میلی لیتر محیط کشت کالوس زایی کشت گردیدند. کشت های کالوس در دمای  $24 \pm 1$  درجه سانتیگراد و فتوپریود ۸/۱۶ (شدت نور ۱۰۰ میکرو مول در متر مربع در ثانیه) قرار داده شدند. جهت بررسی اثر منبع نیتروژن محیط

پایداری و رنگ آنتوسیانین ها بستگی به شرایط خارج واکوئل از قبیل pH، تجمع مشترک با فلاونوئیدهای بی رنگ و تشکیل کمپلکس با یون های فلزی دارد (Tanaka et al., 2008). یون های فلزی از قبیل منیزیم، منگنز، مس و روی هنگامی که در واکوئل ها تجمع می یابند با آنتوسیانین ها تشکیل کمپلکس می دهند که موجب افزایش پایداری و تغییر رنگ آنها می گردند (Sinilal et al., 2011). منبع نیتروژن یکی از فاکتورهای مهمی است که بر تولید آنتوسیانین در کشت سلول گیاهی اثر می گذارد و نسبت آمونیوم به نترات نیز اثر قابل توجهی بر تولید متابولیت های ثانویه گیاهی دارد (Simoes et al., 2009).

تحقیقات کمی در مورد توانایی تولید آنتوسیانین در سیب در شرایط درون شیشه ای و عوامل موثر بر آن وجود دارد. لذا در این تحقیق اثر منبع نیتروژن محیط کشت و غلظت منیزیم بر تولید آنتوسیانین در یک ژنوتیپ سیب زینتی آنتوسیانین دار مورد بررسی قرار گرفته است.

#### مواد و روش ها

ماده گیاهی: جهت تهیه ریزنمونه های کالوس، ابتدا گیاهچه های درون شیشه ای ژنوتیپی از سیب زینتی آنتوسیانین دار موجود در ایستگاه باغبانی خلعت پوشان، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز پرآوری گردیدند. این سیب به عنوان یک سیب زینتی گوشت قرمز شناخته می شود و هیبریدی از گونه *Malus pumila* و

1989). محتوای آنتوسیانین بر اساس میلی گرم سیانیدین-۳-گلوکوزاید در کیلوگرم وزن تر کالوس با استفاده از ضریب خاموشی ۲۹۶۰۰ و وزن ملکولی ۴۴۹/۲ بیان گردید ( Wrolstad, 1976).

تجزیه و تحلیل آماری: آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد و در هر تکرار ۴ ریزنمونه قرار داده شد. بررسی نرمال بودن داده ها با روش کولموگروف-اسمیرنوف با تصحیح لیلیفورس انجام گردید. مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن انجام شد. تجزیه و تحلیل داده ها به کمک نرم افزار آماری IBM SPSS ver. 21 (IBM corp. 2012) در سطح معنی داری ۱٪ صورت گرفت.

### نتایج

نتایج تجزیه واریانس اثر تیمار منبع نیتروژن بر محتوای آنتوسیانین، قطر کالوس و شاخص رشد کالوس سیب در جدول شماره ۱ و میانگین های مربوطه در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. میزان آنتوسیانین در تیمارهای مختلف از ۶/۰۱ الی ۱۰/۹ (میلی گرم در کیلوگرم وزن تازه کالوس) متفاوت بود. در محیط کشت حاوی ۱۰ میلی مول آمونیوم به علاوه ۱۸/۸ میلی مول نترات بیشترین میزان آنتوسیانین مشاهده گردید (۱۰/۹ میلی گرم آنتوسیانین در کیلوگرم وزن تر کالوس) که اختلاف معنی داری با سایر تیمارها از نظر میزان آنتوسیانین داشت و کمترین

کشت (آمونیوم یا نترات) بر تولید آنتوسیانین، محیط کشت MS که نیتروژن آن تغییر یافته بود، به روش زیر تهیه گردید: کلرید آمونیوم و نترات پتاسیم در غلظت های مختلف (مطابق با جدول شماره ۲) با یکدیگر ترکیب شده و به محیط کشت MS فاقد نیتروژن اضافه گردیدند. در همه این ترکیبات غلظت نیتروژن کل ۳۰ میلی مولار بود. غلظت های مختلف منیزیم (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ میلی مولار) به محیط کشت MS فاقد منیزیم اضافه گردید تا غلظت بهینه منیزیم جهت تولید آنتوسیانین مشخص گردد.

اندازه گیری رشد کالوس ها: سه هفته پس از انجام تیمارهای القای آنتوسیانین قطر کالوس ها اندازه گیری گردید. همچنین در پایان آزمایش شاخص رشد کالوس بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید:

$$GI = ((W_2 - W_1) / W_1) * 100$$

GI: شاخص رشد

W2: وزن کالوس در پایان آزمایش

W1: وزن کالوس در آغاز آزمایش

اندازه گیری آنتوسیانین: آنتوسیانین کل در پایان آزمایش از کالوس های تیمار شده با استفاده از متانول اسیدی (با نسبت حجمی ۹۹٪ متانول و ۱٪ اسید کلریدریک) و در دمای چهار درجه سانتیگراد در طی یک شب، استخراج گردید و پس از سانتریفیوژ کردن در دمای چهار درجه سانتیگراد و دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، فاز مایع جدا گردید و در طول موج ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب اندازه گیری شد ( Mizukami et al.,

میزان آنتوسیانین در محیط کشت‌های حاوی ۲۵ میلی‌مول آمونیوم به علاوه پنج میلی‌مول نیترات (۶/۴۰ میلی‌گرم آنتوسیانین در کیلوگرم وزن تر کالوس) و در محیط کشت حاوی ۳۰ میلی‌مول آمونیوم (۶/۰۲ میلی‌گرم آنتوسیانین در کیلوگرم وزن تر کالوس) ثبت گردید.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر تیمار منبع نیتروژن بر محتوای آنتوسیانین، قطر کالوس، و شاخص رشد کالوس سیب.

**Table 1- Analysis of Variance effect of treatment nitrogen source on total anthocyanin, callus diameter, growth index of apple callus.**

منابع تغییرات Sources of variations	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean of Squares	شاخص رشد Callus Growth Index (%)	قطر کالوس (میلی‌متر) Callus Diameter (mm)	محتوای آنتوسیانین (میلی‌گرم در کیلوگرم وزن تر) Anthocyanin content (mgkg <sup>-1</sup> FW)
منبع نیتروژن (Nitrogen Source)	8	9236.132**	949.296**	358.111**	
اشتباه آزمایشی (Standard Error)	36	3512.768	2.758	6.666	

\*\* p ≤ 0.1

بود، شاخص رشد زیاد بود البته هنگامی که در محیط کشت اصلاً نیتروژن آمونیومی وجود نداشت (محیط کشت حاوی ۳۰ میلی‌مول نیترات) شاخص رشد به صورت معنی‌داری کاهش یافته بود (۹۹/۵۲٪) (شکل ۱). بیشترین میزان قطر کالوس در محیط کشت حاوی ۱۰ میلی‌مول آمونیوم و ۱۸/۸ میلی‌مول نیترات مشاهده گردید (۲۲ میلی‌متر). در این محیط کشت قطر کالوس به صورت معنی‌داری بیشتر از سایر ترکیبات نیتروژن محیط کشت بود. با افزایش غلظت آمونیوم در محیط کشت، میزان

شاخص رشد کالوس، میزان آنتوسیانین و قطر کالوس‌ها به صورت معنی‌داری تحت تاثیر مقادیر مختلف منابع نیتروژن در محیط کشت قرار گرفت. شاخص رشد کالوس در محیط کشت حاوی پنج میلی‌مول آمونیوم و ۲۵ میلی‌مول نیترات به صورت معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود (۱۵۳/۴٪) و همچنین کمترین میزان شاخص رشد در محیط کشت حاوی ۳۰ میلی‌مول آمونیوم بدون نیترات مشاهده گردید (۷۶/۱٪). به صورت کلی در محیط کشت‌هایی که غلظت نیتروژن نیتراتی بیشتر از نیتروژن آمونیومی

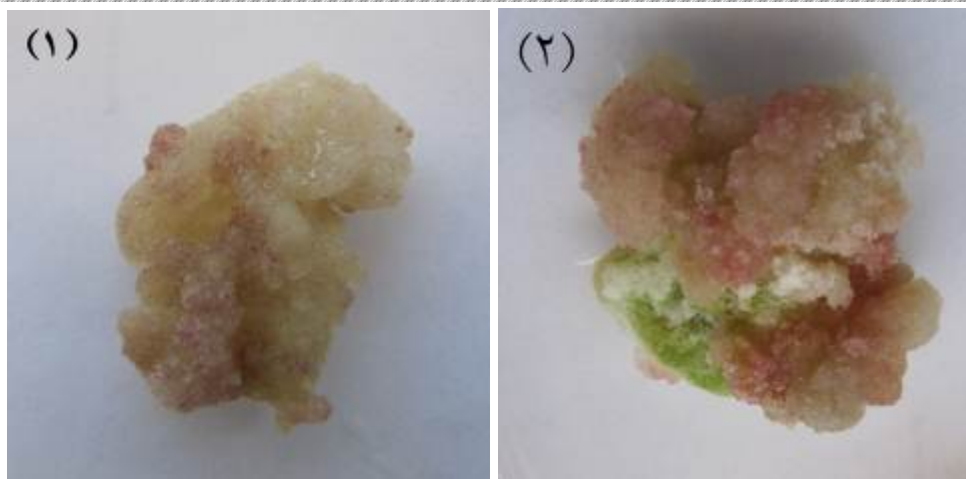
صورتی که میزان آنتوسیانین در محیط کشت غنی شده با ۴۰ میلی مول سولفات منیزیم (۲۲/۴۱ میلی گرم در کیلوگرم وزن تازه کالوس) به صورت معنی داری بیشتر از سایر تیمارها بود. کمترین میزان آنتوسیانین در محیط کشت شاهد (۷/۳۹ میل گرم در کیلوگرم وزن تازه کالوس) مشاهده گردید.

قطر کالوس کاهش یافت به طوری که در محیط کشت حاوی ۳۰ میلی مول آمونیوم کمترین میزان قطر کالوس ثبت گردید (۱۸ میلی متر). غلظت‌های مختلف منیزیم به صورت معنی داری بر محتوای آنتوسیانین در کشت‌های درون شیشه‌ای کالوس سیب زینتی اثر گذاشتند (شکل ۲). با افزایش غلظت منیزیم در محیط کشت، میزان آنتوسیانین افزایش یافت به

جدول ۲- اثر ترکیب منبع نیتروژن بر محتوای آنتوسیانین، شاخص رشد و قطر کالوس در کشت کالوس سیب.

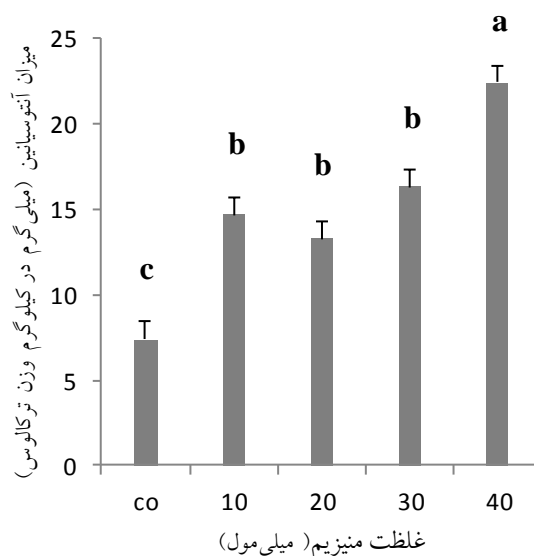
**Table 2- Effect of combination nitrogen source on anthocyanin content, growth index and callus diameter in callus culture of apple.**

غلظت نیتروژن Nitrogen concentration		محتوای آنتوسیانین (میلی گرم در کیلوگرم وزن تر) Anthocyanin content (mgkg <sup>-1</sup> FW)	شاخص رشد کالوس (درصد) Callus Growth Index (%)	قطر کالوس (میلی متر) Callus Diameter (mm)
کلرید آمونیوم (میلی مول) NH <sub>4</sub> CL (mM)	نیترات پتاسیم (میلی مول) KNO <sub>3</sub> (mM)			
0.0	30.0	5.45	69.526	20.0
1.0	28.2	5.8	115.418	20.0
2.5	28.2	7.47	118.123	20.0
5.0	25.0	9.68	153.42	21.33
10.0	18.8	10.9	112.5	22.0
15.0	15.0	7.45	109.47	19.5
20.0	9.4	6.54	108.98	21.33
25.0	5.0	4.07	101.909	18.5
30.0	0.0	3.02	56.198	18.0



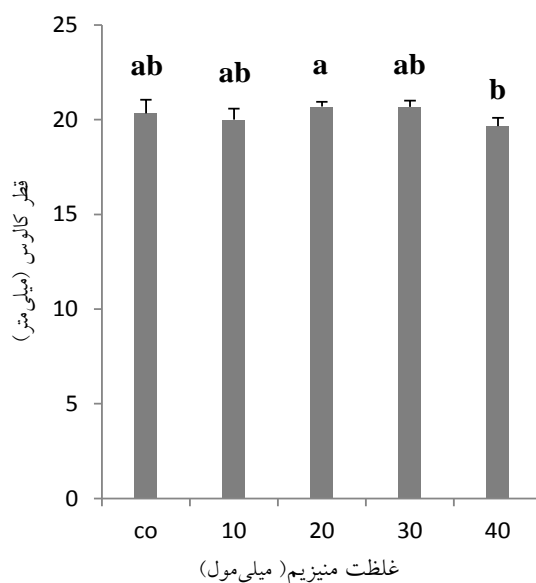
شکل ۱- کالوس سیب در تیمارهای مختلف نیترات و آمونیوم: (۱) تیمار ۳۰ میلی مول آمونیوم، (۲) تیمار ۱۰ میلی مول آمونیوم و ۱۸/۸ میلی مول نیترات.

Figure 1- Apple callus from different treatments of nitrate and ammonium: (1) treatment of 30mM ammonium, (2) treatment of 10 mM ammonium and 18.8 mM nitrate .



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف منیزیم بر میزان آنتوسیانین کل در سیب (حروف غیر مشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد است).

Figure 2- Effect of different concentrations of magnesium on total anthocyanin content in apple. Different letters above each column indicate significant differences ( $p < 0.01$ ).



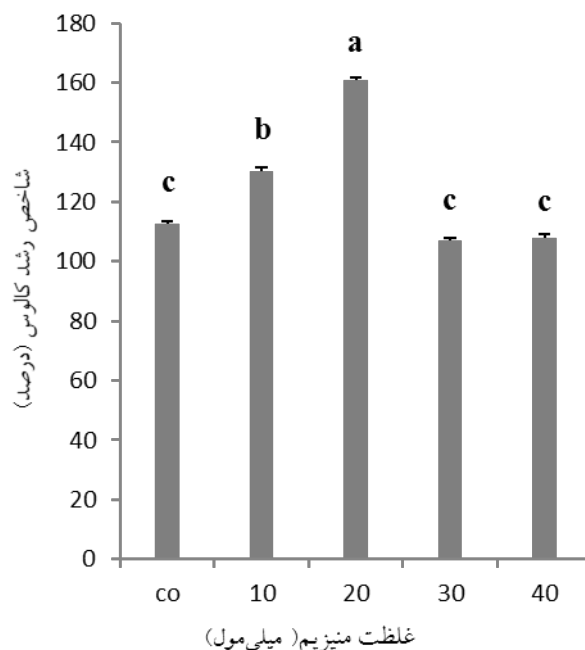
شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف منیزیم بر قطر کالوس (حروف غیر مشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد است).

**Figure 3- Effect of different concentrations of magnesium on callus diameter. Different letters above each column indicate significant differences ( $p < 0.01$ ).**

بیشترین میزان شاخص رشد کالوس (۱۶۰/۷۶٪) در محیط کشت تکمیل شده با ۲۰ میلی مول سولفات منیزیم بدست آمد و این محیط کشت اختلاف معنی‌داری با سایر محیط‌های کشت از نظر شاخص رشد داشت. افزایش غلظت سولفات منیزیم به بیش از ۲۰ میلی مول موجب کاهش شاخص رشد کالوس‌ها گردید به صورتی‌که کمترین میزان شاخص رشد کالوس (۱۰۸/۰۵٪) در محیطی که به آن ۴۰ میلی مول منیزیم افزوده شده بود مشاهده گردید (شکل ۴).

قطر کالوس‌ها به صورت معنی‌داری تحت تاثیر غلظت‌های مختلف منیزیم در محیط کشت قرار گرفتند (شکل ۳). بیشترین قطر کالوس در محیط کشت تکمیل شده با ۲۰ میلی مول سولفات منیزیم (۲۰/۷ میلی متر) و در محیط کشت تکمیل شده با ۴۰ میلی مول سولفات منیزیم کمترین میزان قطر کالوس (۱۹/۶ میلی متر مشاهده گردید). قطر کالوس تنها در تیمارهای ۲۰ و ۴۰ میلی مول منیزیم، اختلاف معنی‌دار با یکدیگر داشتند.





شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف منیزیم بر شاخص رشد کالوس سیب (حروف غیر مشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد است).

**Figure 4: Effect of different concentrations of magnesium on callus growth index of apple. Different letters above each column indicate significant differences ( $p < 0.01$ ).**

#### بحث

بر اساس نتایج بدست آمده از این آزمایش، تاثیر آمونیوم نسبت به نیترات در تولید آنتوسیانین کمتر بود. در محیط کشتی که تنها منبع نیتروژن آن آمونیوم بود (۳۰ میلی مول آمونیوم)، کمترین میزان آنتوسیانین تولید گردید و با افزایش غلظت نیترات در محیط کشت بر میزان تولید آنتوسیانین بتدریج افزوده شد و در محیط کشت های حاوی ۱۰ میلی مول نیتروژن آمونیومی به علاوه ۱۸/۸ میلی مول نیتروژن نیتراتی و ۵ میلی مول نیتروژن آمونیومی به علاوه ۲۵ میلی مول نیتروژن نیتراتی بیشترین میزان آنتوسیانین مشاهده گردید. افزایش میزان آنتوسیانین در کشت‌های

اگر چه اثر منبع نیتروژن و غلظت منیزیم در ایجاد دستورالعمل‌های تولید آنتوسیانین از کشت‌های درون شیشه‌ای خیلی مورد توجه قرار نگرفته است ولی این دو عامل بر تولید آنتوسیانین از کشت کالوس سیب زیتتی به صورت قابل توجهی اثر گذار بودند. بوسیله بهینه‌سازی غلظت نیتروژن و نسبت آمونیوم به نیترات در محیط کشت می‌توان شرایط مناسب برای تولید آنتوسیانین و رشد سلول‌ها را مشخص نمود (Sakamoto *et al.*, 1993).

(Sakamoto *et al.*, 1993). اثر مثبت کاهش غلظت نیتروژن آمونیومی بر بیوسنتز آنتوسیانین در ارتباط با تغییر در متابولیسم اولیه سلول‌ها می‌باشد (Sato *et al.*, 1996).

در مورد فاکتورهای رشدی کالوس (قطر و شاخص رشد کالوس) نیز می‌توان اظهار داشت که در محیط‌های حاوی مقادیر بیشتر نیترات به آمونیوم، رشد کالوس بیشتر بوده است اما در محیط فاقد نیتروژن آمونیومی شاخص رشد و قطر کالوس کاهش زیادی داشته است. در کشت‌های کالوس *Roselle (Hibiscus sabdariffa)* رشد سلول‌ها وقتی که نیترات به عنوان تنها منبع نیتروژن استفاده شد، بالاترین مقدار بود و با افزایش غلظت آمونیوم رشد کاهش یافت. محیط کشت حاوی آمونیوم به نیترات به نسبت مولی یک به چهار برای تولید آنتوسیانین از کالوس *Roselle* موثر بود (Mizukami *et al.*, 1991).

تیمار منیزیم بر روی چندین گیاه زینتی از طریق اسپری کردن یا آبیاری نشان داده شده که موجب افزایش تجمع آنتوسیانین در گل‌ها و شاخساره آنها می‌گردد (Nissim-Levi *et al.*, 2007). تیمار منیزیم باعث تشکیل کمپلکس پایدار آنتوسیانین-فلز پایدار می‌گردد و در نهایت از تجزیه آنتوسیانین جلوگیری می‌نماید (Shaked-Sachray *et al.*, 2002). در این آزمایش افزودن منیزیم به محیط کشت موجب افزایش ۲ تا ۳ برابر در مقدار آنتوسیانین در کالوس‌ها گردید. این نتایج مطابق با یافته‌های

درون شیشه‌ای سیب‌زمینی شیرین (Konczak-*Islam et al.*, 2001) و *Aralia cordata* (Sakamoto *et al.*, 1993) در غلظت پایین نیتروژن آمونیومی و همچنین نسبت بالای نیترات به آمونیوم در محیط کشت نیز گزارش گردیده است.

نسبت‌های مختلف نیتروژن آمونیومی به نیتروژن نیتراتی در کشت‌های درون شیشه‌ای گونه‌های مختلف گیاهی جهت تولید حداکثر آنتوسیانین نیاز است. در این آزمایش نسبت‌های مولی آمونیوم به نیترات یک به دو و یک به پنج بهتر از سایر نسبت‌های مولی این دو فرم نیتروژن بودند. در کشت سوسپانسیون توت‌فرنگی بیشترین میزان عملکرد آنتوسیانین در محیط کشت حاوی ۵ میلی‌مول کلرید آمونیوم بعلاوه ۲۵ میلی‌مول نیترات پتاسیم مشاهده شده است (Sato *et al.*, 1996).

در کشت سوسپانسیون انگور هنگامی که محیط کشت حاوی نیترات به آمونیوم به نسبت یک به یک بود آنتوسیانین تجمع یافت (Yamakawa *et al.*, 1983) و همچنین در کشت کالوس *Cleome rosea* در محیط کشت ۱/۲ غلظت MS حاوی نسبت‌های مختلف آمونیوم به نیترات، بیشترین میزان آنتوسیانین در محیط کشت حاوی یک قسمت آمونیوم و چهار قسمت نیترات مشاهده شد (Simoes *et al.*, 2009). بهترین نسبت آمونیوم به نیترات برای تولید آنتوسیانین در شرایط تاریکی در کشت سوسپانسیون سلولی *Aralia cordata* نسبت یک به چهار بود

افزودن بیش از ۲۰ میلی مول منیزیم به محیط کشت سیب، موجب کاهش شاخص‌های رشد کالوس می‌گردد. این نتایج از فرضیه‌ایی که بر اساس آن تغییرات محیط کشت به عنوان یک استراتژی جهت القا تولید متابولیت‌های ثانویه مطرح می‌باشد، حمایت می‌کند (Collin, 2001). کشت‌های درون شیشه‌ایی می‌توانند در مدت زمان کوتاه، مقادیر زیادی از آنتوسیانین را تولید نمایند. تولید آنتوسیانین از کشت‌های درون شیشه‌ایی سیب زینتی، می‌تواند به عنوان یک روش جدید برای تولید آنتوسیانین مورد استفاده قرار بگیرد.

#### سپاسگزاری

قسمتی از هزینه‌های این پژوهش برای انجام پایان‌نامه کارشناسی ارشد فرشاد کاکاوند توسط دانشگاه تبریز تامین شده است که بدین وسیله قدردانی می‌گردد.

Sinilal *et al.* (2011) است. آن‌ها گزارش نمودند که در کشت سوسپانسیون انگور، افزودن منیزیم به محیط کشت موجب افزایش ۲/۵ تا ۴ برابری غلظت آنتوسیانین می‌گردد بدون اینکه تغییر اساسی در بیان ژنهای بیوستتر آنتوسیانین ایجاد کند. به نظر می‌رسد که این تیمار، از تجزیه آنتوسیانین در سلول‌ها جلوگیری نموده و نسبت آنتوسیانین‌های مختلف تعیین کننده رنگ سلول را با افزایش غلظت نسبی مولکول‌های رنگدانه با پایداری کمتر، تغییر می‌دهد. نتایج نشان می‌دهند که حداقل تیمار منیزیم از طریق بازدارندگی از کاتابولیسم منیزیم بر تجمع آنتوسیانین اثر می‌گذارد. همچنین تیمار منیزیم در گل مینا موجب افزایش سنتز آنتوسیانین نگردید زیرا فعالیت فنیل آلانین آمونیلاز و چالکون ایزومراز افزایش نیافت (Shaked-Sachray *et al.*, 2002). هنوز فرآیندی که تیمار منیزیم از طریق آن بر روی تجمع آنتوسیانین اثر می‌گذارد، به خوبی مشخص نگردیده است. در کشت کالوس سیب غلظت‌های بالای منیزیم اثر منفی بر رشد سلول‌ها دارد و

#### منابع

- Abdirad S, Rezanejad F, Kalantari K F (2011). The Effect of Different Light Intensities on Callogenesis and Calli Pigments Content of Shoot and Floral Explants of *Rosa damascena* Mill. and *Rosa miniature*. Iranian Journal of Agricultural Biotechnology 5: 43-65.
- Akbari T (2011). Effect of explant and plant growth regulators on callugenesis and anthocyanin in apple. Master thesis. University of Tabriz. pp. 453.
- Chun OK, Kim DO, Lee CY (2003). Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 8067-8072.
- Collin HA (2001). Secondary product formation in plant tissues cultures. Plant Growth Regulation 34: 119-134.
- Kobayashi Y, Akita M, Sakamoto K, Liu H, Shigeoka T, Koyano T, Kawamura M, Furuya T (1993). Large-scale production of anthocyanin by *Aralia cordata* cell suspension cultures. Applied Microbiology and Biotechnology 40: 215-218.

- Konczak-Islam I, Nakatani M, Yoshinaga M, Yamakawa O (2001). Effect of ammonium ion and temperature on anthocyanin composition in sweet potato cell suspension culture. *Plant Biotechnology* 18: 109–117.
- Mizukami H, Nakamura M, Tomita K, Higuchi K (1991). Effect of macronutrients on anthocyanin production in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) callus cultures. *Plant Tissue Culture Letters* 8:14-20.
- Mulabagal V, Van Nocker S, Dewitt D L, Nai, M G (2007). Cultivars of apple fruits that are not marketed with potential for anthocyanin production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 8165-8169.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nissim-Levi A, Ovadia R, Foreer I, Oren-Shamir M (2007). Increased anthocyanin accumulation in ornamental plants due to magnesium treatment. *Journal of Horticulture Science and Biotechnology* 82:481–487.
- Sakamoto K, Lida K, Sawamura K, Hajiro K, Asada Y, Yoshikawa T, Furuya T (1993). Effects of nutrients on anthocyanin production in cultured cells of *Aralia Cordata*. *Phytochemistry* 33: 357-359.
- Sato K, Nakayama M, Shigeta J (1996). Culturing conditions affecting the production of anthocyanin in suspended cell cultures of strawberry. *Plant Science* 113: 91–98.
- Shaked-Sachray L, Weiss D, Reuveni M, Nissim-Levi A, Oren-Shamir M (2002). Increased anthocyanin accumulation in aster flowers at elevated temperatures due to magnesium treatment. *Physiologia Plantarum* 114:559–565.
- Shin WH, Park SJ, Kim EJ (2006). Protective effect of anthocyanins in middle cerebral artery occlusion and reperfusion model of cerebral ischemia in rats. *Life Science* 79: 130-137.
- Simoes C, Bizarri CHB, Cordeiro LDS, Castro TCD, Coutada LCM, Silva AJRD, Albarello N, Mansur E (2009). Anthocyanin production in callus cultures of *Cleome rosea*: Modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESIMS. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 895-903.
- Sinilal B, Ovadia R, Nissim-Levi A, Perl A, Carmeli-Weissberg M, Oren-Shamir M (2011). Increased accumulation and decreased catabolism of anthocyanins in red grape cell suspension culture following magnesium treatment. *Planta* 234: 61–71.
- Smith MAL, Marley KA, Seigler D, Singletary K, Meline WB (2000). Bioactive properties of wild blueberry fruits. *Journal of Food Science* 65: 352-356.
- Sugaya S, Gemma H, Iwahori S, Li Z H (2001). The effect of calcium, nitrogen and phosphorus on anthocyanin synthesis in Fuji apple callus. *Acta Hort* 653: 209-214.
- Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant Journal* 54:733-749.
- Wrolstad RE (1976). Color and pigment analysis in fruit products. Agricultural Experiment Station of Oregon State University. Station Bulletin 621.
- Yamakawa T, Kato S, Ishida K, Kodama T, Minoda Y (1983). Production of anthocyanin by *Vitis* cell in suspension culture. *Agricultural and Biological Chemistry* 47: 2185-2191.
- Zahedzadeh F, Mahna N, Kakavand F, Zaare-Nahandi F, Panahandeh Yengejeh J (2014). Effect of concentration and source of carbohydrate on *in vitro* production of anthocyanin in apple. *Iranian Journal of Agricultural Biotechnology* 12: 38-48.

## Anthocyanin Production through Callus Culture of Apple: Effect of Nitrogen Source and Concentration of Magnesium

Kakavand F.<sup>1</sup>, Mahna N.<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> MSc. student, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz., Tabriz, Iran; Present address: Young Researchers and Elite Club, Qazvin Branch, Islamic Azad University, Qazvin ,Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz., Tabriz, Iran.

### Abstract

Anthocyanins have attracted a great deal of attention due to their capability in protecting humans from chronic diseases. Production of natural anthocyanins from fresh plant material has many limitations. Therefore, the use of plant biotechnology for the production of anthocyanin has been put in focus without such restrictions. From the other hand, some crab apples can produce anthocyanins in their various organs including *in vitro*-grown calli. In this study, in order to investigate the effect of different concentrations of magnesium and nitrogen source for *in vitro* production of anthocyanin from callus cultures of a red-fleshed crab apple genotype, leaf explants from *in vitro* grown seedling was exploited to produce callus. After obtaining sufficient amount of callus, treatments were exerted in a completely randomized design with four replications for each treatment and four explants in each replication. With addition of magnesium to the medium, anthocyanin production increased up to 3 fold and the highest concentration of anthocyanins was observed in the highest magnesium concentration (40 mM). However, at this concentration, the growth rate of calli reduced. Changing the nitrogen source also affected the production of anthocyanins. The best nitrogen source for the production of anthocyanin was the combination of 10 mM ammonium and 18.8 mM nitrate as well as 5 mM ammonium and 25 mM nitrate.

**Keywords:** *Ammonium, Anthocyanin, Callus, Magnesium, Nitrate.*

---

\* Corresponding Author: Mahna N.

Tel: 041 3339 2027

Email: mahna@tabrizu.ac.ir

