مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

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

فرشاد کاکاوند[۱]، ناصر مهنا[۲*]

[۱] 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

[۲] دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۸/۳۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۵/۰٤

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 ازکالوس 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 کاملا 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 (٤۰ 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.***

[*] نویسنده مسئول: ناصر مهنا تلفن: ۲۰۲۷ ۳۳۳۹ – ۰٤۱ Email: mahna@tabrizu.ac.ir

مقدمه

آنتوسیانین از جمله فلاونوئیدهایی است که دارای ارزش بسزایی در رژیم غذایی انسان می‌باشد. خواص آنتی‌اکسیدانی این رنگدانه گیاهی جهت تمیز کردن[1] رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن به خوبی اثبات گردیده است (Chun *et al.*, 2003). آنتوسیانین‌ها همچنین باعث افزایش کارکرد ایمنی بدن و ترمیم ناهنجاری های 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 واریته Niedzwetzkyana منشا 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 سیب ها آنتوسیانین های دیگری نیز مانند cyanidin-3-O-glucoside، cyanidin-3-O-galactoside، cyanidin-3-O-arabinoside، cyanidin-3-O-xyloside و cyanidin-7-O-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 درون شیشه‌ای 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 درون شیشه ای آنتوسیانین اثر می گذارند و جهت تولید حداکثر درون شیشه ای آنتوسیانین، بهینه‌سازی هر یک از آنها الزامی می‌باشد. اثر نوع ریز نمونه و تنظیم کننده‌های 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.

[1] Scavenging

پایداری و رنگ آنتوسیانین‌ها بستگی به شرایط خارج واکوئل از قبیل pH، تجمع مشترک با فلاونوئیدهای بی‌رنگ و تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی دارد (Tanaka *et al.*, 2008). یون‌های فلزی از قبیل منیزیم، منگنز، مس و روی هنگامی که در واکوئل‌ها تجمع می‌یابند با آنتوسیانین‌ها تشکیل کمپلکس می دهند که موجب افزایش پایداری و تغییر رنگ آنها می‌گردند (Sinilal *et al.*, 2011). منبع نیتروژن یکی از فاکتورهای مهمی است که بر تولید آنتوسیانین در کشت سلول گیاهی اثر می‌گذارد و نسبت آمونیوم به نیترات نیز اثر قابل توجهی بر تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی دارد (Simoes *et al.*, 2009).

تحقیقات کمی در مورد توانایی تولید آنتوسیانین در سیب در شرایط درون‌شیشه‌ای 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 روش‌ها

ماده گیاهی: جهت تهیه ریزنمونه‌های کالوس، ابتدا گیاهچه‌های درون شیشه‌ای ژنوتیپی از سیب زینتی آنتوسیانین‌دار موجود در ایستگاه باغبانی خلعت پوشان، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز پرآوری گردیدند. این سیب به عنوان یک سیب زینتی گوشت قرمز شناخته می‌شود و هیبریدی از گونه *Malus pumila* و ظاهرا غیر مرتبط با سیب Niedzwetzkyana می‌باشد. جهت تکثیر گیاهچه‌ها، از محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین، ۱۰۰ میلی‌گرم 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 ۰/۰۵± ۵/۷ تنظیم گردید. سپس آگار به میزان ۸ گرم در لیتر به محیط کشت اضافه شد. گیاهچه‌های سیب در این محیط، کشت شدند و بازکشت گیاهچه‌ها در محیط کشت جدید به فواصل سه هفته از آغاز کشت انجام گردید (Zahedzadeh *et al.*, 2014).

کشت کالوس: قطعات برگی به اندازه نیم سانتی‌متر مربع در محیط کالوس‌زایی قرار داده شدند. جهت القا کالوس و پرآوری آن از محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، نیم میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۳۰ میلی گرم در لیتر ساکارز استفاده گردید. ریزنمونه‌ها 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: کالوس‌های بدست آمده در پتری‌دیش‌های حاوی ۲۵ میلی لیتر محیط کشت کالوس‌زایی کشت گردیدند. کشت‌های کالوس در دمای ۱±۲٤ درجه سانتیگراد و فتوپریود ۸/۱٦ (شدت نور ۱۰۰ میکرو مول در متر مربع در ثانیه) قرار داده شدند. جهت بررسی اثر منبع نیتروژن محیط

کشت (آمونیوم یا نیترات) بر تولید آنتوسیانین، محیط کشت MS که نیتروژن آن تغییر یافته بود، به روش زیر تهیه گردید: کلرید آمونیوم و نیترات پتاسیم در غلظت‌های 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. غلظت‌های مختلف منیزیم (۱۰، ۲۰، ۳۰، ٤۰ میلی‌مولار) به محیط کشت MS فاقد منیزیم اضافه گردید تا غلظت بهینه منیزیم جهت تولید آنتوسیانین مشخص گردد.

اندازه گیری رشد کالوس‌ها: 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

اندازه‌گیری آنتوسیانین: آنتوسیانین کل در پایان آزمایش از کالوس‌های 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 اندازه‌گیری شد (Mizukami *et al.*, 1989). محتوای آنتوسیانین بر اساس میلی گرم سیانیندین-۳-گلوکوزاید در کیلوگرم وزن تر کالوس با استفاده از ضریب خاموشی ۲۹٦۰۰ و وزن ملکولی ٤٤۹/۲ بیان گردید (Wrolstad, 1976).

تجزیه و تحلیل آماری: آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار انجام شد و در هر تکرار ٤ 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 داده‌ها 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 ٦/۰۱ الی ۱۰/۹ (میلی‌گرم در کیلوگرم وزن تازه کالوس) متفاوت بود. در محیط کشت حاوی ۱۰ میلی‌مول آمونیوم به‌علاوه ۱۸/۸میلی مول نیترات بیشترین میزان آنتوسیانین مشاهده گردید (۱۰/۹ میلی‌گرم آنتوسیانین در کیلوگرم وزن تر کالوس) که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها از نظر میزان آنتوسیانین داشت و کمترین

میزان آنتوسیانین در محیط کشت‌های حاوی ۲۵ میلی‌مول آمونیوم به‌علاوه پنج میلی‌مول نیترات (٦/٤٠ میلی‌گرم آنتوسیانین در کیلوگرم وزن تر کالوس) و در محیط کشت حاوی ۳۰ میلی مول آمونیوم (٦/۰۲ 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		
		محتوای آنتوسیانین (میلی‌گرم در کیلوگرم وزن تر) Anthocyanin content ($mgkg^{-1}FW$)	قطر کالوس (میلی‌متر) Callus Diameter (mm)	شاخص رشد (درصد) Callus Growth Index (%)
منبع نیتروژن (Nitrogen Source)	8	358.111**	949.296**	9236.132**
اشتباه آزمایشی (Standard Error)	36	6.666	2.758	3512.768

** $p \leq 0.1$

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 (۱۵۳/٤٪) و همچنین کمترین میزان شاخص رشد در محیط کشت حاوی ۳۰ میلی‌مول آمونیوم بدون نیترات مشاهده گردید (۷٦/۱٪). به صورت کلی در محیط کشت‌هایی که غلظت نیتروژن نیتراتی بیشتر از نیتروژن آمونیومی بود، شاخص رشد زیاد بود البته هنگامی که در محیط کشت اصلا 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

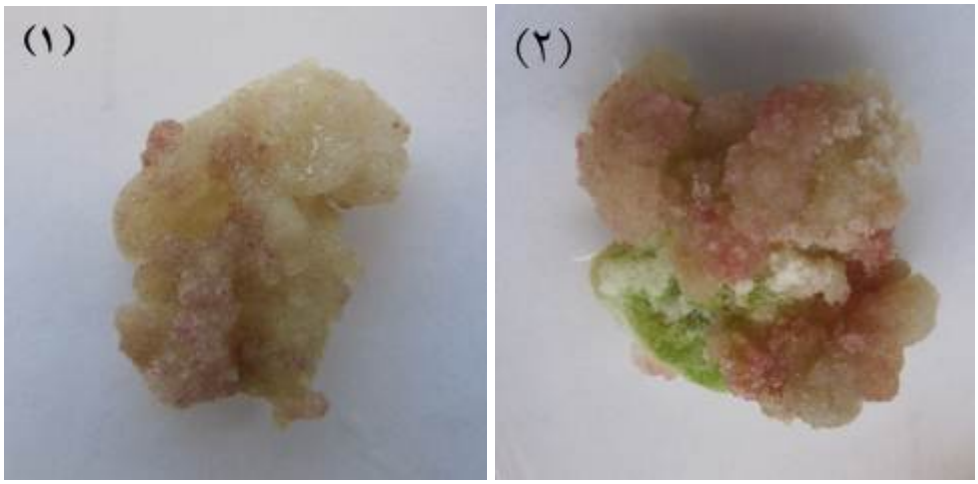
قطر کالوس کاهش یافت به طوری‌که در محیط کشت حاوی ۳۰ میلی مول آمونیوم کمترین میزان قطر کالوس ثبت گردید (۱۸ میلی‌متر).

غلظت‌های مختلف منیزیم به صورت معنی‌داری بر محتوای آنتوسیانین در کشت‌های درون‌شیشه‌ای کالوس سیب زینتی اثر گذاشتند (شکل ۲). با افزایش غلظت منیزیم در محیط کشت، میزان آنتوسیانین افزایش یافت به صورتی‌که میزان آنتوسیانین در محیط کشت غنی شده با ٤۰ میلی‌مول سولفات منیزیم (۲۲/٤۱ میلی گرم در کیلوگرم وزن تازه کالوس) به صورت معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود. کمترین میزان آنتوسیانین در محیط کشت شاهد (۷/۳۹ میل‌گرم در کیلوگرم وزن تازه کالوس) مشاهده گردید.

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

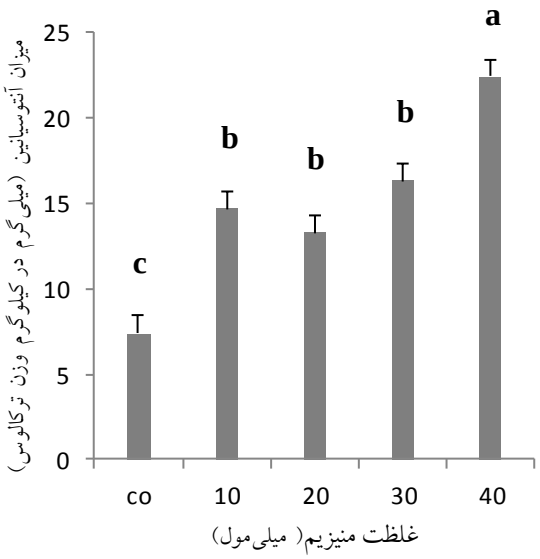
Table 2- Effect of combination nitrogen source on anthocyanin content, growth index and callus diameter in callus culture of apple.

غلظت نیتروژن Nitrogen concentration		محتوای آنتوسانین (میلی‌گرم در کیلوگرم وزن تر) Anthocyanin content ($mgkg^{-1}FW$)	شاخص رشد کالوس (درصد) Callus Growth Index (%)	قطر کالوس (میلی‌متر) Callus Diameter (mm)
کلریدآمونیوم (میلی‌مول) NH_4CL (mM)	نیترات پتاسیم (میلی‌مول) KNO_3 (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



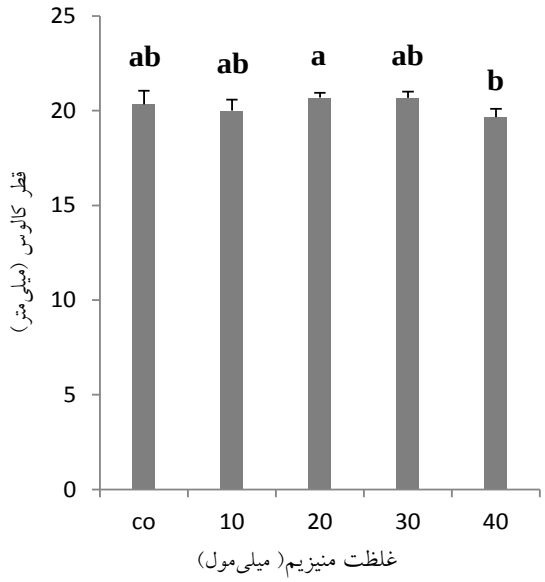
شکل ۱- کالوس سیب در تیمارهای مختلف نیترات و آمونیوم: (۱) تیمار ۳۰ میلی‌مول آمونیوم، (۲) تیمار ۱۰ میلی‌مول آمونیوم و ۱۸/۸ میلی‌مول نیترات.

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 معنی‌دار 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 ($p<0.01$).

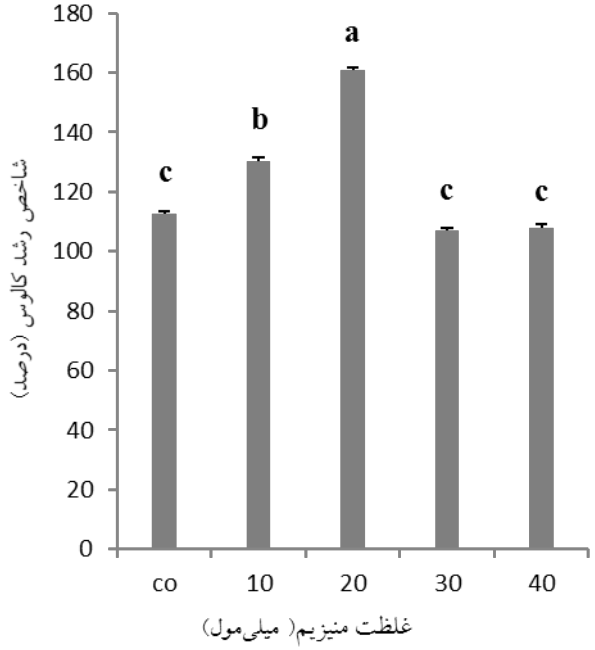


شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف منیزیم بر قطر کالوس (حروف غیر مشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد است).

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

قطر کالوس‌ها به صورت معنی‌داری تحت تاثیر غلظت‌های مختلف منیزیم در محیط‌کشت 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 ٤۰ میلی مول سولفات منیزیم کمترین میزان قطر کالوس (۱۹/٦ میلی متر مشاهده گردید. قطر کالوس تنها در تیمارهای ۲۰ و ٤۰ میلی‌مول منیزیم، اختلاف معنی‌دار با یکدیگر داشتند.

بیشترین میزان شاخص رشد کالوس (۱٦۰/۷٦٪) 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 کالوس ها گردید به صورتی‌که کمترین میزان شاخص رشد کالوس (۱۰۸/۰۵٪) در محیطی که به آن ٤۰ میلی مول منیزیم افزوده شده بود مشاهده گردید (شکل ٤).



شکل ٤- 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

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 زینتی 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).

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 میلی‌مول 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 بعلاوه ۲۵ میلی مول نیتروژن نیترانی بیشترین میزان آنتوسیانین مشاهده گردید. افزایش میزان آنتوسیانین در کشت‌های

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

نسبت های مختلف نیتروژن آمونیومی به نیتروژن نیتراتی در کشت های 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 ازسایر 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 (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 وقتی‌که 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 گل ها 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 می نماید (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

Sinilal *et al.* (2011) است. آن‌ها گزارش نمودند که در کشت سوسپانسیون انگور، افزودن منیزیم به محیط کشت موجب افزایش ۲/۵ تا ٤ برابری غلظت آنتوسیانین می‌گردد بدون اینکه تغییراساسی در بیان ژنهای بیوسنتز آنتوسیانین ایجاد کند. به نظر می رسد که این تیمار، از تجزیه آنتوسیانین در سلول ها 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 درگل مینا موجب افزایش سنتز آنتوسیانین نگردید زیرا فعالیت فنیل آلانین آمونیالاز و چالکون ایزومراز افزایش نیافت (Shaked-Sachray *et al*., 2002). هنوز فرآیندی که تیمار منیزیم از طریق آن بر روی تجمع آنتوسیانین اثر می گذارد، به خوبی مشخص نگردیده است. در کشت کالوس سیب غلظت‌های بالای منیزیم اثر منفی بر رشد سلول‌ها دارد و افزودن بیش از ۲۰ میلی مول منیزیم به محیط کشت سیب، موجب کاهش شاخص‌های رشد کالوس می گردد.. 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.

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.[1], Mahna N.[2*]

[1] 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

[2] 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