مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

تأثیر غلظت و منبع کربوهیدرات بر تولید درون شیشه‌ای آنتوسیانین در سیب

فاطمه زاهدزاده[1]، ناصر مهنا*[2]، فرشاد کاکاوند[1]، فریبرز زارع نهندی[3]، جابر پناهنده[3]

[1]دانشجوی کارشناس ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

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

[3]استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت: 1391/09/01، تاریخ پذیرش: 1392/02/20

چکیده

کشت سلول‌های گیاهی یک روش ایده‌آل برای تولید مقادیر زیاد برخی از متابولیت‌های ثانویه‌ی مهم مانند آنتوسیانین به صورت تجارتی است. در بین سیب‌های وحشی (*Malus sp.*) بومی آسیای مرکزی و سیبری، ژنوتیپ‌ها و هیبریدهایی وجود دارند که توانایی تولید آنتوسیانین را در بیشتر بافت‌های خود حتی به صورت درون شیشه‌ای دارا هستند. عوامل بسیاری بر تولید آنتوسیانین در شرایط درون شیشه‌ای تأثیرگذار می‌باشند. در این پژوهش به منظور تعیین بهترین منبع کربوهیدرات و بهینه کردن غلظت‌های مختلف ساکارز، گلوکز، فروکتوز، مالتوز، مانیتول، جهت تولید درون شیشه‌ای آنتوسیانین، از ریز نمونه‌های برگی گیاهچه‌های یک ژنوتیپ سیب وحشی جهت تولید کالوس استفاده گردید. نتایج نشان داد که از میان غلظت‌های مختلف مانیتول جهت تولید آنتوسیانین، غلظت 3 درصد آن به همراه ساکارز 3 درصد بیشترین تأثیر را داشت. با افزایش غلظت مانیتول، میزان شاخص رشد کالوس و وزن تر کالوس کاهش و وزن خشک کالوس افزایش یافت. همچنین بین تیمارهای ساکارز بیشترین میزان تولید آنتوسیانین و کمترین میزان شاخص رشد در غلظت 6 درصد مشاهده گردید. تیمارهای گلوکز، فروکتوز و مالتوز تأثیر کمتری بر تولید آنتوسیانین داشتند.

کلمات کلیدی: *سیب، آنتوسیانین، کربوهیدرات، درون شیشه‌ای.*

*نویسنده مسئول: ناصر مهنا تلفن: 09141034096 Email: n.mahna@gmail.com

مقدمه

متابولیت‌های ثانویه موادی هستند که مستقیماً مورد نیاز گیاه نیستند و در واکنش به عوامل و شرایط مختلف تولید می‌شوند. مشکلاتی برای تولید مستقیم متابولیت‌های ثانویه از گیاهان وجود دارد که می‌توان با استفاده از تولید آن‌ها در شرایط درون شیشه‌ای بر این مشکلات غلبه نمود. کشت بافت، روش مهمی برای تولید مستقیم رنگ‌دانه‌ها در سطح وسیع می‌باشد. تحقیقات در رابطه با تولید آنتوسیانین‌ها نشان داده‌اند که همیشه در مقادیر زیاد نمی‌توان این متابولیت ثانویه را از طریق کشت بافت گیاهی تولید نمود ولی با این وجود در پژوهش‌های اخیر عوامل موثر بر تجمع آنتوسیانین در کشت سلول و کالوس شامل شدت نور، اشعه‌ی فرابنفش، منبع نیتروژن، تنش‌های اسمزی و الیسیتورها مورد بررسی قرار گرفته است (Raluca *et al*., 2010) این مواد تنها در معدودی از گونه‌های گیاهی تشکیل می‌شوند.

در بین سیب‌های وحشی بومی آسیای مرکزی و سیبری که بیشتر متعلق به گونه های (*Malus pumila*) و یا (*Malus pumila* var. niedzwetzkyana) هستند، ژنوتیپ‌ها و هیبریدهایی وجود دارند که توانایی تولید آنتوسیانین را در بیشتر بافت‌های خود دارا بوده و توانایی تولید آنتوسیانین در شرایط درون شیشه-ای را دارند و می‌توان با استفاده از کشت کالوس این گیاهان آنتوسیانین تولید کرد (Akbari, 2011; Kakavand, 2012).

عوامل بسیاری بر تولید آنتوسیانین در شرایط درون شیشه‌ای تأثیرگذار می‌باشند. تاثیر دما، نور و سایر فاکتورها در انگیزش تجمع آنتوسیانین در هر رقم متفاوت می‌باشد. هر مرحله از مسیرهای بیوشیمیایی آنتوسیانین از نظر ژنتیکی برنامه‌ریزی شده است و هر رقم پاسخ متفاوتی در شرایط مختلف می‌دهد (Ritenour *et al*., 2007). القای کالوس و تشکیل آنتوسیانین به طور معنی‌داری وابسته به منبع کربن می‌باشد. منابع کربن یکی از مهم‌ترین سوبستراها برای مسیرهای بیوسنتزی فنول‌ها هستند (Castandea-Ovindo *et al*., 2009). با توجه به این که تاکنون تحقیقی در رابطه با بررسی مقایسه‌ای اثر منابع کربوهیدرات و غلظت‌های آن‌ها در محیط کشت و همچنین اثر مانیتول بر تولید آنتوسیانین از طریق کشت کالوس سیب انجام نگردیده است، بنابراین، در این پژوهش اثر غلظت‌ها و منابع مختلف کربوهیدرات‌ها شامل ساکارز، گلوکز، فروکتوز، مالتوز و همچنین مانیتول بر تولید درون شیشه‌ای آنتوسیانین در کشت کالوس سیب انجام گردید.

مواد و روش‌ها

از ریزنمونه‌های به دست آمده از کشت مریستم و ریز ازدیادی یک سیب وحشی موجود

در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز که متعلق به گونه ای از جنس مالوس (*Malus sp.*) با ژنوتیپ R1R1 (Unpublished data) مربوط به صفت تولید آنتوسیانین در گوشت میوه می باشد، استفاده شد (شکل 1). جهت تکثیر گیاهچه‌ها از محیط کشت MS حاوی BAP (1.5 mg/l)، سکوسترن آهن (FeEDDHA) (100 mg/l) و ساکارز (30 mg/l) استفاده شد. بازکشت گیاهچه‌ها در محیط کشت جدید به فواصل هر سه هفته از آغاز کشت به مدت 4 ماه انجام گردید. جهت کالوس‌زایی از محیط کشت MS حاوی KIN (0.5mg/l)، NAA (1 mg/l) و 2,4-D (1.5 mg/l) استفاده گردید (شکل 2).

شکل 1- گیاهچه‌های درون شیشه‌ای سیب وحشی آنتوسیانین دار مورد استفاده در این آزمایش.

Figure 1- *In vitro* plantlets of the anthocyanin producing wild apple used in this research.

شکل 2- کالوس سیب وحشی آنتوسیانین دار مورد استفاده در این آزمایش.

Figure 2- Callus of the anthocyanin producing wild apple used in this research.

تیمارهای به‌کار رفته و مورد بررسی در این آزمایش شامل غلظت‌های مختلف مانیتول (1، 2، 3، 4، 5 درصد) به همراه ساکارز 3 درصد و غلظت‌های مختلف ساکارز، گلوکز، فروکتوز و مالتوز هرکدام شامل چهار غلظت (3، 4، 5، 6 درصد) بود. در مجموع 21 تیمار در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و چهار نمونه در هر تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از اعمال تیمارها، در پایان هفته‌ی سوم وزن تر و خشک (در دمای 60 درجه‌ی سانتی‌گراد آون به مدت 24 ساعت) کالوس‌ها اندازه‌گیری شد. شاخص رشد کالوس نیز از فرمول زیر محاسبه شد:

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

G_i: شاخص رشد

W_2: وزن کالوس در پایان آزمایش

W_1: وزن کالوس در آغاز آزمایش

آنتوسیانین کل در هفته سوم آزمایش از کالوس‌های تیمار شده با استفاده از متانول اسیدی (99٪ متانول و 1٪ اسید کلریدریک حجمی به حجمی) استخراج گردید و پس از سانتریفیوژ کردن در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و 12000 دور به مدت 10 دقیقه، فاز مایع جدا گردیده و در طول موج 530 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب اندازه‌گیری شد (متانول اسیدی به عنوان شاهد در نظر گرفته شد) (Mizukami *et al.*,1989) (با واحد شاخص شدت رنگ در گرم وزن تر cv/gr FW). مقدار آنتوسیانین کل به روش Wrolstad (1976) نیز محاسبه گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS ver. 21 (IBM corp. 2012) انجام گرفت. قبل از انجام آنالیز داده‌ها، صادق بودن مفروضات اولیه تجزیه واریانس پارامتریک داده‌های صفات اندازه‌گیری و محاسبه

شده مورد بررسی و آزمون قرار گرفت. تبعیت داده‌ها از توزیع نرمال با استفاده از روش‌های کولموگروف- اسمیرنوف با تصحیح لیلیفورس و روش شاپیرو- ویلک مورد آزمون قرار گرفت. مشاهده شد که بعضی از تیمارها از توزیع نرمال تبعیت نمی کنند. برای حل این مشکل داده‌ها از نظر وجود داده‌های پرت مورد بررسی قرار گرفتند و داده‌های پرت حذف شدند. سپس، توان باکس برای تبدیل داده‌ها برآورد گردید و داده‌ها بر اساس این توان مورد تبدیل واقع شدند. گرچه، با این تمهیدات توزیع داده‌های مربوط به صفت محتوای آنتوسیانین کل نرمال شدند ولی داده‌های سایر توزیع نرمال نداشتند. همچنین، آزمون لون برای بررسی یکنواختی واریانس‌های درون تیماری برای همه صفات معنی‌دار گردید. برای حل این مشکل ناچار دو روش زیر دنبال گردید:

1) جدا کردن تیمارهای مانیتول- ساکارز و ساکارز از بقیه تیمارها و آنالیز و تجزیه واریانس جداگانه آن‌ها بعد از تبدیل داده با استفاده از توان باکس برای داده‌های محتوای آنتوسیانین کل.

2) آنالیز غیر پارامتریک داده‌ها بر اساس روش تجزیه واریانس یک طرفه کروسکال-والیس و مقایسه چند دامنه‌ای میانگین‌های رتبه‌ای بر اساس همین روش در مورد همه‌ی صفات مورد اندازه گیری.

برای مقایسه میانگین داده‌ها در روش پارامتریک، به دلیل نامتعادل بودن طرح ترجیحا از روش توکی و توکی-ب استفاده شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها در روش غیرپارامتریک از روش مقایسه چند دامنه ای کروسکال – والیس Stepwise (step-down) استفاده گردید. همچنین، برای صفت آنتوسیانین کل، بررسی رگرسیونی برای هر کدام از گروه‌های تیماری کربوهیدرات‌ها از نظر وجود رابطه‌ی خطی، درجه دو و درجه سه انجام گرفت.

نتایج و بحث

در این پژوهش بیشترین میزان تولید آنتوسیانین در منابع کربوهیدرات مورد استفاده در هفته‌ی سوم بعد از اعمال تیمارها مشاهده شد که در تیمار همزمان مانیتول و ساکارز 3 درصد بود (جدول 1). غلظت‌های بالاتر باعث کاهش میزان آنتوسیانین شدند که مشابه با نتایج تولید آنتوسیانین در کالوس‌های هویج تحت تأثیر مانیتول و ساکارز بود (Ranjendran *et al.*, 1992). رابطه‌ی رگرسیونی معنی‌داری از نوع درجه دو بین غلظت‌های مختلف مانیتول-ساکارز و میزان آنتوسیانین وجود داشت (جدول 2). با افزایش غلظت مانیتول میزان آنتوسیانین نیز تا غلظت 3 درصد افزایش نشان داد و سپس میزان آنتوسیانین با افزایش غلظت بیشتر از 3 درصد کاهش یافت (شکل 3) رابطه‌ی رگرسیونی معنی‌داری از نوع درجه دو بین غلظت‌های مختلف ساکارز و میزان آنتوسیانین نیز دیده شد (جدول 3).

جدول 1- مقایسه‌ی چند دامنه‌ای میانگین‌های رتبه‌ای شاخص شدت رنگ، مقدار آنتوسیانین کل، شاخص رشد کالوس، قطر کالوس، وزن تر و خشک کالوس تحت تأثیر تیمارهای کربوهیدرات.

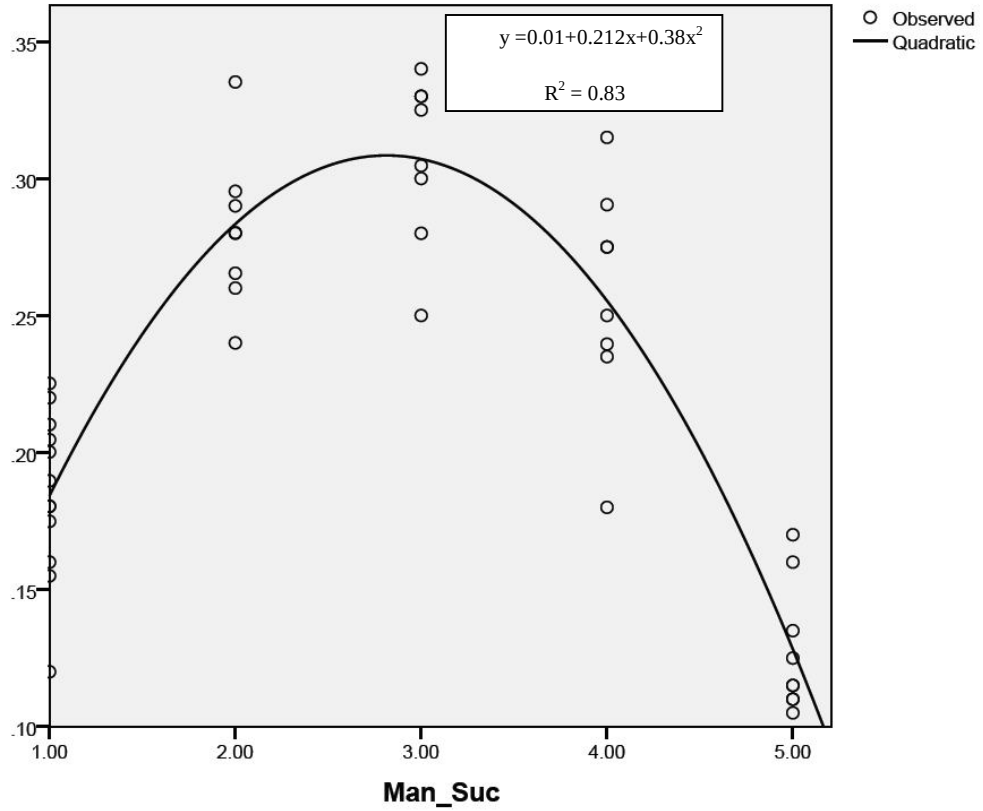
Table1- Mean comparison of ranked data for color intensity index, total anthocyanin, callus growth index, callus diameter, dry and wet weight resulted from carbohydrate treatments.

وزن خشک کالوس (میلی گرم) Callus dry weight (mg)	وزن تر کالوس (میلی گرم) Callus wet weight (mg)	قطر کالوس (میلی متر) Callus diameter (mm)	شاخص رشد کالوس Callus growth index	آنتوسیانین کل (میلی گرم در کیلوگرم وزن تر کالوس) Total anthocyanin (mg/KgFW)	شاخص شدت رنگ cv/gr FW Color intensity index	تیمار Treatment
97.22±7.95^{abcd}	845.62±27.55^{ab}	16±0.42^{cd}	72.40±4.73^{ab}	27.28±1.28^{bc}	0.18±0.008^{bc}	M 1% + S 3%
104.44±9.36^{abcd}	833.12±21.94^{ab}	15.25±0.29^{cde}	66.6±4.38^{ab}	40.30±1.47^{a}	0.28±0.009^{a}	M 2% + S 3%
107.63±10.29^{abcd}	802.65±18.77^{ab}	15.68±0.39^{cde}	60.50±3.7^{ab}	45.32±1.58^{a}	0.30±0.010 ^{a}	M 3% + S 3%
122.23±11.58^{ab}	758.62±21.16^{ab}	14.62±0.45^{de}	59.60 ±3.67^{b}	35.93±2.14 ^{a}	0.25±0.014^{a}	M 4% + S 3%
144.16±25.25^{a}	768.75±12.58^{b}	14.06±0.42^{de}	53.75±2.51^{a}	18.75±1.14^{cdef}	0.12±0.007^{cdef}	M 5% + S 3%
96.47±21.83^{abcd}	896.25±20.57^{a}	17.62±0.48^{ab}	79.25±4.11^{ab}	18.68±1.33^{def}	0.12 ±0.009^{def}	S 3%
135.33±28.25^{abc}	878.75±20.28^{ab}	16.43±0.36^{abc}	75.25±4.05^{ab}	22.8±1.46^{bcde}	0.15±0.009^{bcde}	S 4%
68.84±12.40^{cd}	845.93±11.53^{ab}	15.12±0.37^{cde}	69.19±2.30^{ab}	27.72±1.32^{b}	0.18±0.008^{b}	S 5%
114.60±13.97^{abcd}	848.43±29.43^{ab}	14.87±0.30^{cde}	69.69±5.88^{ab}	40.54±2.59^{a}	0.27±0.017^{a}	S 6%
62.36±6.77^{d}	848.75±26.95^{ab}	15.37±0.45^{cde}	69.75±5.39^{ab}	22.32±3.02^{bcdef}	0.15±0.020^{bcdef}	G 3%
126.60± 22.55^{abc}	843.43±26.23^{ab}	15.06±0.42^{cde}	68.69±5.24^{ab}	14.64±2.80^{ef}	0.09±0.019^{ef}	G 4%
142.84±18.73^{a}	846.87±31.32^{ab}	14.93±0.32^{de}	69.38±6.26^{ab}	14.78±1.38^{def}	0.1±0.009^{def}	G 5%
110.81±5.90ab^{c}	846.25±30.63^{ab}	15.25±0.60^{cde}	69.25±6.12^{ab}	14.23±2.00^{ef}	0.09±0.013^{ef}	G 6%
94.07±17.32^{abcd}	847.18±17/84^{ab}	15.75±0.73^{cde}	69.44±3.57^{ab}	13.84±2.93^{f}	0.09±0.019^{f}	F 3%
89.14±7.28^{abcd}	841.56±23.02^{ab}	15.37±0.51^{cde}	68.31±4.6^{ab}	16.6±2.50^{def}	0.11±0.016^{def}	F 4%
99.57±13.75^{abcd}	827.18±21.89^{ab}	15.56±0.53^{cde}	65.44±3.57^{ab}	20.63±2.60^{bcedf}	0.14±0.017^{bcdef}	F 5%
114.37±7/00^{abcd}	824.37±26.27^{ab}	13.75±0.29^{e}	64.88±5.25^{ab}	23.25±5.88^{f}	0.15±0.039^{f}	F 6%
93.31±11.48^{abc}	893.43±22.94^{a}	17.43±0.40^{a}	78.69±4.59^{a}	13.64±1.51^{f}	0.09±0.010^{f}	Ma 3%
107.15±14.27^{abcd}	868.43±19.10^{ab}	15.93±0.38^{cd}	73.69±3.82^{ab}	13.62±1.37^{f}	0.09±0.009^{f}	Ma 4%
78.71±8.05^{abcd}	882.5±27.44^{ab}	16±0.55^{cde}	76.50±5.48^{ab}	14.73±1.98^{ef}	0.1±0.013^{ef}	Ma 5%
74.70±7.73^{bcd}	825.18±47.58^{ab}	15.37±0.42^{cde}	68.71±9.38^{ab}	26.84±2.54^{bcd}	0.18±0.017^{bcd}	Ma 6%

میانگین‌های با حروف غیر یکسان در هر ستون، نشانگر اختلاف معنی‌دار در سطح 5 درصد با آزمون کروسکال- والیس می‌باشند.

Means with different letters in each column indicates significant difference ($p<0.05$) using Kruskal-Wallis test.

M (Mannitol) (مانیتول); S (Sucrose) (ساکارز), G (Glucose) (گلوکز); F (Fructose) (فروکتوز); Ma (Maltose) (مالتوز)



شکل 3- منحنی رگرسیونی برای غلظت‌های مختلف مانیتول- ساکارز و میزان آنتوسیانین.

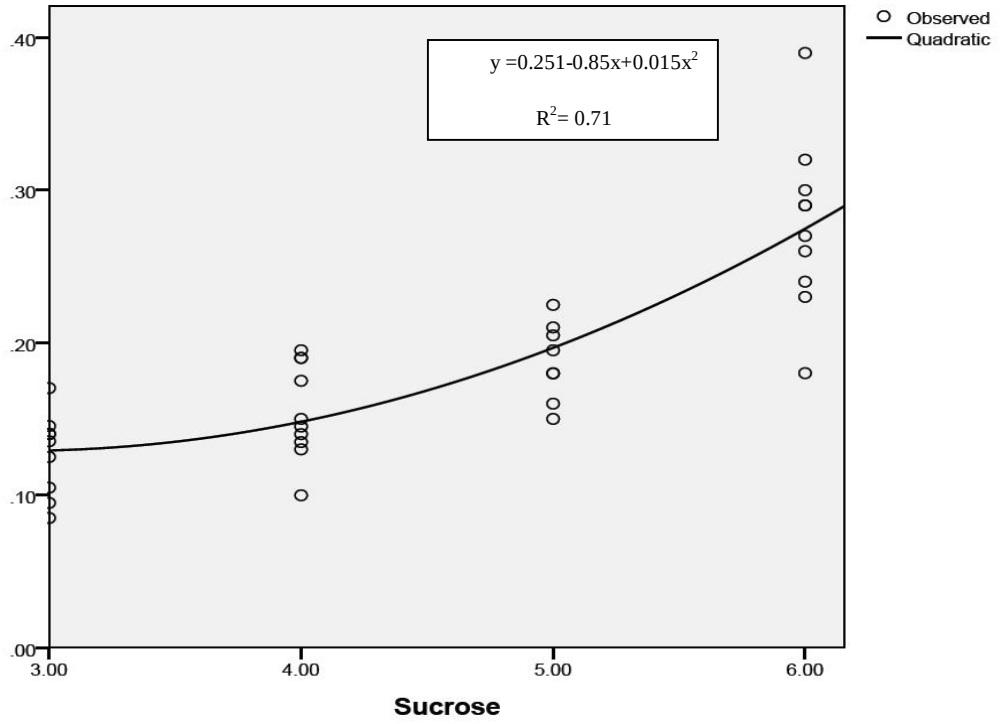
Figure 3- Regression curve for concentration of mannitol-sucrose and anthocyanin level.

جدول 2- تجزیه‌ی رگرسیونی غلظت‌های مختلف مانیتول-ساکارز و میزان آنتوسیانین.

Table 2- Regression analysis of diverse concentration of mannitol-sucrose and anthocyanin level.

	درجه آزادی (Degree of freedom)	میانگین مربعات (Mean of squares)
رگرسیون (Regression)	2	0.096**
باقیمانده (Residual)	42	0.001

** معنی‌دار در سطح احتمال 1 درصد **(Significant with p<0.01)**



شکل 4- منحنی رگرسیونی برای غلظت‌های مختلف ساکارز و میزان آنتوسیانین.

Figure 4- Regression curve for concentration of sucrose and anthocyanin level.

با افزایش غلظت ساکارز از 3 درصد تا 4 درصد میزان آنتوسیانین با شیب کمتری افزایش نشان داد؛ در حالیکه در غلظت های بالاتر روند افزایش شدیدتر بود، به طوری که بیشترین میزان آنتوسیانین در بالاترین غلظت (6 درصد) مشاهده شد (شکل 4). همچنین، بین غلظت‌های مختلف مالتوز و میزان آنتوسیانین یک رابطه‌ی رگرسیونی درجه دو معنی دار مشاهده شد (جدول 4). با افزایش غلظت مالتوز میزان آنتوسیانین نیز بعد از کاهش ناچیزی تا بالاترین غلظت روند افزایشی داشت (شکل 5). کاهش رشد کالوس در غلظت-های بالای ساکارز می‌تواند به دلیل جلوگیری از جذب عناصر غذایی باشد که احتمالاً ناشی از افزایش فشار اسمزی است. در نتیجه‌ی فشار اسمزی بالا فنیل آلانین در سلول‌ها تجمع می‌یابد که می‌تواند در تولید آنتوسیانین مورد استفاده قرار گیرد (Ram *et al.*, 2011)؛ و از طرفی، همزمان با کاهش تراکم سلول‌ها مقدار نفوذ نور افزایش می‌یابد که این عوامل موجب افزایش محتوی آنتوسیانین در سلول‌های رنگدانه‌ای می‌گردد (Saito *et al.*, 1999). افزایش غلظت ساکارز بیشتر از 3 درصد موجب افزایش آنتوسیانین در گیاه چای ترش (*Hibiscus sabdariffa*) شده است (Mizukami *et al.*,1989)، از میان منابع کربن مورد استفاده برای این گیاه ساکارز و گلوکز بیشترین تأثیر را بر تولید آنتوسیانین داشتند ولی فروکتوز و مالتوز به میزان کمتری تولید آنتوسیانین را افزایش دادند. میزوکامی و

همکاران (1989) نیز بدون اشاره به دلایل، این امر را تایید کرده اند که پاسخ‌های مطلوب تولید آنتوسیانین تنها به منابع محدودی از کربن از جمله ساکارز و گلوکز محدود می‌گردد.

قندها به ویژه ساکارز به عنوان مولکول‌های پیام‌رسان در فعال کردن سیکلین‌ها[1] و کینازهای وابسته به سیکلین[2] عمل می‌کنند که موجب فعال شدن عوامل رونویسی می‌شوند. هم‌چنین در چرخه سلولی، موجب بالا رفتن شاخص میتوز (و در نتیجه تولیدکالوس) و نیز تولید آنتوسیانین-ها بدنبال فعال شدن سلول می‌گردد (Solfanlli, 2006). ارتباط معکوسی بین رشد سلولی و تجمع متابولیت‌های ثانویه وجود دارد که مشخصه‌ی رایجی در کشت سلول‌های گیاهی می‌باشد (Mantel and Smith, 1983). استرس اسمزی بالا نیز احتمالاً بر محتوای آب واکوئل تأثیر می‌گذارد. بنابراین، تجمع آنتوسیانین به وسیله‌ی غلظت‌های بالای ساکارز نیز می‌تواند محدود گردد. ساکارز به عنوان بهترین منبع کربن برای تولید آنتوسیانین و رشد سلول‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی هویج نیز شناخته شده است و بعد از ساکارز، گلوکز، گالاکتوز، مالتوز و فروکتوز به ترتیب جهت تولید و رشد سلول‌ها قرار داشتند. زمانی که محققان آنتوسیانین را استخراج نمودند و نوع آن را مشخص کردند، دریافتند که نوع آنتوسیانین در محیط کشت با منابع مختلف متفاوت نمی‌باشد، بنابراین منبع کربن بر سیستم آنزیمی زیست‌سازی آنتوسیانین اثرگذار نمی‌باشد (Narayan *et al.*, 2005). افزایش غلظت منابع کربن اثر مثبتی بر غلظت متابولیت‌ها دارد. ظرفیت الکتریکی سلول‌های کشت شده، یک اختلاف در ساختار غشای بین سلول‌های کشت شده در غلظت‌ها مختلف ساکارز نشان داده است که این امر از این فرضیه که نفوذپذیری غشای سلول‌ها در غلظت‌های بالای ساکارز افزایش می‌یابد، حمایت می‌کند (Zhang and Furausaki, 1997). تغییر غلظت منابع کربوهیدرات در محیط کشت کالوس‌زایی سیب مورد بررسی در این پژوهش بر میزان فاکتورهای رشدی از قبیل وزن تر، وزن خشک، قطر کالوس و شاخص رشد نیز اثرگذار بود. بر این اساس بیشترین وزن تر کالوس، قطر کالوس و شاخص رشد کالوس متعلق به ساکارز 3 درصد بود. در این تیمار، رشد کالوس‌ها نسبت به سایر تیمارها سریع‌تر بود و بیشترین میزان بیومس تولید گردید و کمترین میزان رشد کالوس در مانیتول 5 درصد به همراه ساکارز 3 درصد به دست آمد.

سپاسگزاری

قسمتی از بودجه این تحقیق از هزینه پایان‌نامه کارشناسی ارشد فاطمه زاهدزاده تأمین شده است که در دانشگاه تبریز به انجام رسیده است.

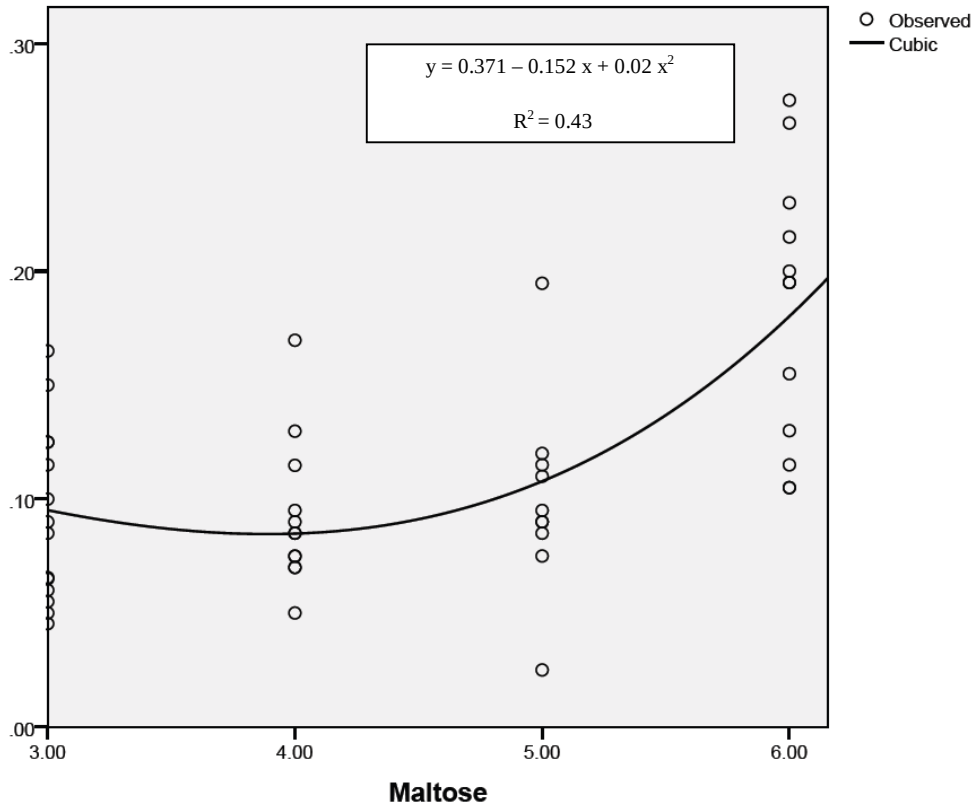
[1] Cyclin
[2] Cyclin- dependent kinase

جدول 3- تجزیه‌ی رگرسیون غلظت‌های مختلف ساکارز و میزان آنتوسیانین.

Table 3- Regression analysis of diverse concentrations of sucrose and anthocyanin level.

(Mean of squares) میانگین مربعات	(Degree of freedom) درجه آزادی	
0.061**	2	رگرسیون (Regression)
0.001	34	باقیمانده (Residual)

** معنی‌دار در سطح احتمال 1 درصد (Significant with p<0.01)



شکل5- منحنی رگرسیونی برای غلظت‌های مختلف مالتوز و میزان آنتوسیانین.

Figure 5- Regression curve for different concentrations of maltose and anthocyanin level.

جدول 4- تجزیه‌ی رگرسیون غلظت‌های مختلف مالتوز و میزان آنتوسیانین.

Table 4- Regression analysis of diverse concentrations of maltose and anthocyanin level.

(Mean of squares) میانگین مربعات	(Degree of freedom) درجه آزادی	
0.034**	2	رگرسیون (Regression)
0.002	45	باقیمانده (Residual)

** معنی‌دار در سطح احتمال 1 درصد (Significant with p<0.01)

منابع

Akbari T (2011). Effect of explant and plant growth regulators on callugenesis and anthocyanin in apple. Master thesis. University of Tabriz. pp. 453.

Castandea-Ovando A, Pacheco-Hernandez M, Paez-Hernandez M (2009). Chemical studies of anthocyanins. Food Chemistry 113: 859-995.

Kakavand F (2012). Effect of sucrose, Nitrogen and Light Intensity on *In vitro* Production of anthocyanin in Makamik apple. MSc. Thesis. University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Mantel SH, Smith H (1983). Cultural factors that influence secondary metabolite accumulations in plant cell and tissue cultures. In: Mantel SH, Smith H (Eds.), Plant Biotechnology. pp. 75-108.

Matkowsk A (2008). Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants. Biotechnology Advances 26: 548-560.

Mizukami H, Tomita K, Ohashi H (1989). Anthocyanin accumulation and changes in activates of phenylalanine ammonia-layse and chalcone synthase in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) callus cultures. Plant Cell Reports 8: 467-470.

Narayan MS, Thimmaraju R, Bhagyalakshmi (2005). Interplay of growth regulators during soild-state and liquid-state batch cultivation of anthocyanin producing cell line of *Daucus carota*. Process Biochemisty 40: 351-358.

Raluca M, Monica M, Brezeanu A, Cogalniceana G (2010). Two-stage system a possible strategy for the enhancement of anthocyanin biosynthesis in a long term grape callus cultures. Romanian Biotechnological letters 15: 413-452

Ram M, Prasad KV, Kaur CH, Singh SK, Arora A, Kumar S (2011). Induction of anthocyanin pigments in callus cultures of *Rosa hybrid* L. in response to sucrose and ammonical nitrogen levels. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 104: 171-179.

Ranjendran L, Ravishanka GA, Venkataraman LV, Prathiba KR (1992). Anthocyanin production in callus cultures of Daucus carota as influenced by nutrient stress and osmoticum. Biotechnology letters 14: 707-712.

Ritenour M, Khemira H (2007). Red color development of apple. Washington State University. Tree fruit research and Extension center. http://postharvest.tfrec.wsu.edu/rep2007A.pdf.

Saito A, Suzuki M (1999). Plant regeneration from meristem-derived callus protoplast of apple (Malus × domestica cv. Fuji). Plants Cell Reports 18: 549-553.

Solfanlli C, Poggi A, Loreti E, Alpi A, Perata P (2006). Sucrose- specific induction of the anthocyanin pathway in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology 140: 637-646.

Wrolstad R E (1976). Color and pigment analysis in fruit products. Agricultural Experiment Station Oregon State University Station Bull 624.

Zhang W, Furausaki S (1997). Production of anthocyanins by plant cell cultures. Biotechnology and Bioprocess Engineering 4: 231- 252.

Effect of concentration and source of carbohydrate on *in vitro* production of anthocyanin in apple

Zahedzadeh F.[1], Mahna N.[*2], Kakavand F.[1], Zaare-Nahandi F.[3], Panahandeh Yengejeh J.[3]

[1]M.Sc. student, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
[2] Associate Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
[3] Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Abstract

In vitro culture of plant cells is an ideal method for commercial production of large amounts of several important secondary metabolites. There are some wild apples (*Malus sp.*) native to Central Asia and Siberia that can produce anthocyanin in their various organs even *in vitro* and contain compounds such as flavonoids and polyphenols, which have antioxidant activity. There are numerous factors affecting anthocyanin production in *in vitro* condition. The aim of this study was to determine the best source and optimum concentration of carbohydrates including sucrose, glucose, fructose, maltose and mannitol to produce anthocyanin in callus culture of an *in vitro* grown anthocyanin producing wild apple. The results showed that the mannitol concentration of 3% plus 3% sucrose was the most effective carbohydrate treatment for anthocyanin production. Increasing mannitol concentration to more than 3% resulted in reduced anthocyanin production. Increasing mannitol concentration, decreased callus growth index and callus fresh weight; while, callus dry weight increased. The highest anthocyanin production and the lowest callus growth index were observed in 6% among the other sucrose concentrations. Glucose, fructose and maltose had weaker effects on anthocyanin content.

Key words: *Anthocyanin, carbohydrate, apple, in vitro.*

[*] Corresponding Author: Mahna N. Tel09141034096 Email: n.mahna@gmail.com