بررسی تولید آنتوسیانین از کشت درون شیشه‌ای انگور یاقوتی

رهام حسن‌پور [۱*]، بهنام بهروزنام [۲]، عبدالحسین ابوطالبی[۲]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد باغبانی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم

۲-استادیار بخش باغبانی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم

*نویسنده مسئول: رهام حسن‌پور Roham.2100@yahoo.com

چکیده

از آن‌جا که آنتوسیانین‌ها مسئول تولید رنگ‌های جذب کننده در گیاهان هستند، با توجه به انواع سرطان ناشی از مواد رنگ دهنده‌ی مصنوعی که رو به افزایش هستند، تولید آنتوسیانین‌ها در شرایط درون شیشه‌ای، توجه ویژه‌ی بخش‌های صنعتی و علمی را متوجه خود کرده است. در این پژوهش میزان تولید آنتوسیانین از ریزنمونه‌های انگور یاقوتی(*Vitis vinifera* L.) در شرایط کشت درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. هدف این تحقیق تعیین نقش غلظت‌های مختلف نفتالین استیک اسید و کینتین(. ، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و ساکارز(۳۰ و ۵۰ گرم در لیتر) برای تولید آنتوسیانین در پینه تولید شده از ریزنمونه‌های انگور بود. ریزنمونه‌ها واکنش‌های متفاوتی از خود نشان دادند. بر اساس نتایج بهترین غلظت جهت تولیدآنتوسیانین در پینه، در تیمار حاوی یک میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید، یک میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۵۰ گرم در لیتر ساکارز به میزان ۰/۵۹۴ میلی‌گرم در گرم پینه به دست آمد.

واژگان کلیدی: آنتوسیانین، درون شیشه‌ای، انگور یاقوتی

مقدمه

انگور یکی از مهم‌ترین میوه‌هایی است که از زمان بسیار قدیم مورد استفاده بشر بوده است. انگور با اسم علمی *Vitis vinifera* L.گیاهی‌ست از خانواده Vitaceae که به آن Amplidaceae یا Samarantaceae هم می‌گویند. میوه انگور به رنگ‌های مختلفی دیده می‌شود. از جمله سبز، زرد، قرمز، بنفش و سیاه. در ارقام قرمز، بنفش و سیاه آنتوسیانین‌ها مسئول تولید رنگ هستند. آنتوسیانین‌ها جز متابولیت‌های ثانویه محسوب می‌شوند. آنتوسیانین‌ها جزء ترکیب‌های فنولیکی هستند. ترکیب‌های فنولیکی ترکیب‌های آروماتیکی هستند که از طریق مسیر اسید شیکیمیک یا مسیر اسیدمالونیک به روش‌های مختلف ساخته می‌شوند. با توجه به تنوع شیمیایی آن‌ها، ترکیب‌های فنولی نقش‌های متفاوتی را در گیاهان ایفا می‌کنند. بسیاری از آن‌ها در دفاع بر علیه گیاه‌خواران و پاتوژن‌ها نقش دارند و مابقی در حمایت مکانیکی، جذب حشره‌های گرده‌افشان، پراکنده کردن میوه‌ها و یا در کاهش رشد گیاهان رقیب نقش ایفا می‌کند. علی‌رغم پیشرفت‌ها در زمینه شیمی، مصنوعات ما هنوز به منابع بیولوژیکی برای تولید تعدادی از متابولیت‌های ثانویه از جمله مواد دارویی نیازمندیم. با توجه به این‌که در طبیعت سرعت تولید متابولیت‌های ثانویه پائین بوده و مدت زمان

طولانی برای تولید لازم است، بنابراین میزان تولید، اقتصادی نبوده و به نظر می‌رسد که برای تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی، از فنون کشت بافت گیاهی به طور بهینه استفاده گردد. تولید ترکیب‌هایی با حجم کم و قیمت بالا از قبیل ترکیب‌های ضدسرطان و ضدایدز از جمله مواردی است که می‌توان با این تکنیک به طور اقتصادی تولید نمود. امید است که با پیشرفت علم در این زمینه، تنظیم مسیر تولیدی متابولیت‌های ثانویه و همچنین توانایی ظهور صفت‌های مطلوب به وسیله انتقال ژن، این تکنولوژی به سمت تولید طیف وسیعی از مواد دارویی طبیعی پیش برود. در این پژوهش هم هدف بر این است تا در این زمینه گام مثبتی برداشته شود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش بر روی انگور یاقوتی *Vitis vinifera* L. انجام گرفت. نمونه‌های گیاهی از شاخه‌های سال جاری تهیه شده و به قطعاتی به طول ۰/۵ تا یک سانتی‌متر همراه با یک جوانه جانبی تهیه گردیدند. برای تهیه محیط کشت از محیط پایه MS استفاده شد. محیط‌ها با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد نفتالین استیک اسید و کینتین و ساکارز تیمار شدند. نفتالین استیک اسید و کینتین هر کدام با چهار غلظت ۰، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر و ساکارز با دو غلظت ۳۰ و ۵۰ گرم در لیتر استفاده شد. پس از آماده شدن محیط کشت‌های حاوی ریز نمونه، آن‌ها را به اتاقک رشد با دما و نور کنترل شده منتقل کردیم. در طول دوره کشت دمای محیط را بر روی ۲۷–۲۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم کردیم. پس از ۲۸ روز نمونه‌ها آماده زیرکشت شدند. برای زیرکشت از همان تیمارهای قبلی استفاده کردیم. پس از ۳۲ روز پینه به حد مطلوب و بهینه رسیدند و آماده استخراج آنتوسیانین شدند. برای اندازه‌گیری، ۰/۵ گرم از بافت پینه را به هاون چینی منتقل کرده و ۱۰۰ میلی‌لیتر بلانک(اتانول حاوی یک درصد HCl) به آن اضافه گردید. سپس نمونه به مدت چند دقیقه به طور کامل له گردید که محلولی به رنگ قرمز به دست آمد. محلول به دست آمده به مدت ۵ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. برای اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین از دستگاه اسپکتوفتومتر استفاده شد و برای شاهد اسپکتوفتومتر هم از همان اتانول اسیدی استفاده شد. میزان آنتوسیانین در طول موج‌های ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر قرائت گردید و سپس با استفاده از فرمول زیر میزان آنتوسیانین محاسبه گردید(۳).

$$AC = A530 - 0/25\ A\ 657$$

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار MSTAT-C و مقایسه معدل‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج جدول مقایسه میانگین‌ها بین تیمارهای مختلف در رابطه با شاخص اندازه‌گیری شده، تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد آزمون دانکن وجود داشت. در رابطه با کینتین بالاترین میزان آنتوسیانین در تیمار حاوی یک میلی-گرم در لیتر کینتین به میزان ۰/۳۵۲ میلی‌گرم در گرم پینه به دست آمد. در رابطه با نفتالین استیک اسید بالاترین میزان آنتوسیانین در تیمار حاوی یک میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید به میزان ۰/٤۷۷ میلی‌گرم در گرم پینه به دست آمد. در این رابطه بین همه تیمارها در سطح آماری یک درصد آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری وجود داشت. این نتیجه با نتایج هونالت مطابقت دارد. در رابطه با ساکارز بالاترین میزان آنتوسیانین در تیمار حاوی ۵۰ گرم در لیتر ساکارز به میزان ۰/۳۸٦ میلی‌گرم در گرم پینه به دست آمد. در این رابطه بین دو تیمار ۳۰ و ۵۰ گرم در لیتر در سطح یک درصد آزمون دانکن اختلاف معنی داری وجود داشت. این نتیجه با نتایج حسن‌پور و همکاران مطابقت ندارد، اما با نتایج میساوا، ننک، آسترید و هیپولیته مطابقت دارد.

در رابطه با اثر متقابل غلظت‌های مختلف نفتالین استیک اسید، کینتین و ساکارز با شاخص‌های اندازه‌گیری شده تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد آزمون دانکن وجود داشت. بالاترین میانگین تولید آنتوسیانین در پینه‌های کشت شده بر روی محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید، یک میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۵۰ گرم در لیتر ساکارز با میانگین ۰/۵۹٤ میلی‌گرم در گرم پینه به دست آمد.

اثر متقابل غلظت‌های مختلف نفتالین استیک اسید، کینتین و ساکارز بر روی میزان آنتوسیانین پینه

تیمار	غلظت kin (mg/L)	غلظت NAA (mg/L)	غلظت ساکارز (g)	میزان آنتوسیانین پینه (mg/g)
۱	۰	۰	۳۰	۰/۰۰ o
۲	۰	۰/۵	۳۰	۰/۲۲۰ n
۳	۰	۰/۷۵	۳۰	۰/۲۹۳ klm
٤	۰	۱	۳۰	۰/۳۳۲ J
۵	۰/۵	۰	۳۰	۰/۰۰۰ o
٦	۰/۵	۰/۵	۳۰	۰/۳۷۵ hi
۷	۰/۵	۰/۷۵	۳۰	۰/٤۰۹ fg
۸	۰/۵	۱	۳۰	./٤٤۳ e
۹	۰/۷۵	۰	۳۰	۰/۰۰۰ o
۱۰	۰/۷۵	۰/۵	۳۰	۰/۲۷۵ m
۱۱	۰/۷۵	۰/۷۵	۳۰	۰/۳۸۷ ghi
۱۲	۰/۷۵	۱	۳۰	۰/۳٦۳ i
۱۳	۱	۰	۳۰	۰/۰۰۰ o

۱٤	۱	۰/۵	۳۰	۰/۳۱۰ jkl
۱۵	۱	۰/۷۵	۳۰	۰/۳۳۱ j
۱٦	۱	۱	۳۰	۰/۳۸۵ ghI
۱۷	۰	۰	۵۰	۰/۰۰۰ o
۱۸	۰	۰/۵	۵۰	۰/۲۸۸ lm
۱۹	۰	۰/۷۵	۵۰	۰/۳۱٦ jk
۲۰	۰	۱	۵۰	۰/۳۷۰ i
۲۱	۰/۵	۰	۵۰	۰/۰۰۰ o
۲۲	۰/۵	۰/۵	۵۰	۰/۳۹٦ fgh
۲۳	۰/۵	۰/۷۵	۵۰	۰/۵۳۲ c
۲٤	۰/۵	۱	۵۰	۰/۵٦۹ b
۲۵	۰/۷۵	۰	۵۰	۰/۰۰۰ o
۲٦	۰/۷۵	۰/۵	۵۰	۰/۳۱۸ j
۲۷	۰/۷۵	۰/۷۵	۵۰	۰/٤۱۵ f
۲۸	۰/۷۵	۱	۵۰	۰/٤٦۱ de
۲۹	۱	۰	۵۰	۰/۰۰۰ o
۳۰	۱	۰/۵	۵۰	۰/٤۷۵ d
۳۱	۱	۰/۷۵	۵۰	۰/۵۵۰ bc
۳۲	۱	۱	۵۰	۰/۵۹٤ a

ستون‌هایی که دارای حروف مشترک هستند در سطح آماری یک درصد آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با هم ندارند

نتیجه‌گیری کلی

از آن‌جا که انگور علاوه بر اهمیت آن به عنوان یک گیاه با ارزش جهت تولید انبوه، می‌تواند در پینه‌ای که بر روی محیط کشت تولید می‌کند آنتوسیانین تولید نماید، ارزش تکثیر و تولید این گیاه بیشتر احساس می‌شود. هدف عمده این پژوهش، تولید متابولیت‌های ثانویه از پینه این گیاه می‌باشد. . در این پژوهش، ریزنمونه‌ها در محیط‌های کشت که از نظر تنظیم کننده‌های رشد متفاوت بودند واکنش‌های مختلفی نشان دادند. جهت تولید آنتوسیانین در پینه، بهترین نتایج در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید، یک میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۵۰ گرم در لیتر ساکارز به دست آمد. با توجه به این‌که بیشترین میزان تولید آنتوسیانین در بالاترین غلظت‌های این آزمایش به دست آمده، توصیه می‌شود در آزمایش‌های بعدی از غلظت‌های بالاتری از تنظیم کننده‌های رشد در مورد تولید آنتوسیانین استفاده شود. همچنین با توجه به این‌که گفته شد تنظیم کننده‌های رشد دیگر، اثرهای متفاوتی بر روی تولید آنتوسیانین در پینه دارند،

توصیه می‌شود از انواع دیگر اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها در غلظت‌های مختلف استفاده شود. امید است نتایج این پژوهش راهکار موثری برای تولید انبوه متابولیت‌های ثانویه و همچنین استفاده از انواع دیگر تنظیم کننده‌های رشد در غلظت‌های دیگر برای ریزازدیادی گیاهان مختلف باشد.

منابع

۱-حسن پور. ح و همکاران، ۱۳۸٦، بهینه‌سازی کشت بافت آویشن شیرازی برای تولید اسید رزماریک، فصل‌نامه علمی پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، جلد ۱۵، شماره ۱، ۹-۱.

۲- شمس اردکانی. م و همکاران، ۱۳۸٤، تولید و نگهداری کشت سلولی گیاه بومادران و مقایسه متابولیت‌های تولید شده در کالوس با گیاه کامل، فصل‌نامه گیاهان دارویی، سال پنجم، شماره هفدهم، ۲٦-۲۱.

3-Rapisarda P. Fanwlla F. Maccarone E, 2000. Reliability of analytical methods for determining anthocyanins in blood orange juices. J. agric. Food chem. 48. 2249-2252.

Abstract

Anthocyanins, responsible for the various attractive colors in plants, are becoming important alternative to many synthetic colorants due to increase public cancers over safety of artificial food colors. Production of anthocyanin by plant cell culture has been suggested as a feasible technology that has attracted considerable industrial and academic interests in the two past decade. In this research, an approach was conducted to producing anthocyanin in plant cell culture of grape(Vitis vinifera L.) explants. The focus was to determine the role of different concenteration of plant growth regulators(NAA; 0, 0.5, 0.75, 1 mgl^{-} & kinetin; 0, 0.5, 0.75, 1 mgl^{-}) and sacrose(3% and 5%) for production of anthocyanin in callus produced by grape explant. Due to concentrations of plant growth regulators the explants showed different reaction and the results demonstrated that the best treatment for production of anthocyanin in callus was MS media contains 1 mgl^{-} NAA and 1 mgl^{-} kinetin with 5% sacrose.

Key word: anthocyanin in vitro Vitis vinifera L.