اثر ترکیب لیزرهای هلیوم- نئون و دیود بر تولید آنتوسیانین و رشد سلول در کشت سوسپانسیون سیب گوشت قرمز (*Malus sp.*)

هاشم کاظم زاده بنه[1]،ناصر مهنا[1*] ، میترا کرامتی[1]، ابراهیم صفری[2] و رحیم نقشی بند حسنی[1]

[1] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران، [2] گروه فیزیک اتمی و مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه تبریز، تبریز. ایران

(تاریخ دریافت: ١٣٩٤/٠٨/١٨، تاریخ پذیرش نهایی: ١٣٩٤/١١/١٤)

چکیده:

سیب‌های گوشت قرمز گونه‌ها و هیبریدهایی از جنس مالوس می‌باشند که استعداد و توانایی بالایی در تولید آنتوسیانین در اندام‌های خود تحت شرایط درون شیشه‌ای دارند. عوامل مختلفی بر تولید درون شیشه‌ای آنتوسیانین تأثیر می‌گذارند و جهت تولید بالای آن، بهینه سازی هر یک از این عوامل ضروری می‌باشد. نور یکی از مهم‌ترین این عوامل است که در این زمینه مطالعات زیادی صورت گرفته ولی اثر لیزر بررسی نشده است. در این پژوهش، اثر ١٨ تیمار ترکیبی لیزرهای هلیوم- نئون و دیود بر تولید آنتوسیانین و رشد سلول‌های سوسپانسیونی یک ژنوتیپ سیب گوشت قرمز در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شدت‌های متفاوت (لیزر آبی در شدت‌های $mWcm^{-2}$ ٦٧/٠٩، ٣٢/٧٤، ٣٠/٤ و ١٣/٧٣ و لیزر قرمز در شدت‌های ٤٦ /٦، ٤/٨٢، ١/٥٤ و $mWcm^{-2}$ ٠/٦٦٦ و دو شاهد تاریکی و نور مهتابی) مورد بررسی قرار گرفت. با افزایش شدت تابش لیزرهای ترکیبی میزان تولید آنتوسیانین منومریک کل (TMA) و آنتوسیانین کل (TA) افزایش ولی رشد سلول‌ها کاهش یافت. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که احتمالاً شدت‌های بالای تیمارهای ترکیبی لیزر آبی و قرمز به عنوان یک عامل استرس‌زا باعث کاهش رشد و تحریک تولید بالای آنتوسیانین در سلول‌های تحت تنش گردیده و منجر به کاهش صدمات ناشی از استرس می‌شود.

کلید واژه: آنتوسیانین، لیزر هلیوم- نئون، لیزر دیود، سیب گوشت قرمز، کشت سوسپانسیون سلولی

مخففها:TA: آنتوسیانین کل؛TMA: آنتوسیانین منومریک کل؛ LED: نور ساطع شده از لامپ دیود

مقدمه:

مواد گیاهی محدود و کم، انتخاب ژنوتیپ گیاهی مناسب، تغییرات اقلیمی و فصلی، مدت زمان زیاد برای تولید، خسارت‌ها و صدمات ناشی از حشرات و آفات در طول فصل رشد و هزینه بالای تولید از جمله محدودیت‌های تولید آنتوسیانین در شرایط مزرعه‌ای می‌باشد (Zhang and Furusaki, 1999). تولید انبوه و سریع این مواد پیچیده در مقیاس بالا تحت شرایط مزرعه‌ای مشکل و یا غیرممکن می‌باشد. تکنیک کشت سلول‌های گیاهی به عنوان ابزاری مؤثر در مطالعه متابولیت‌های ثانویه و نیز به عنوان تکنیکی برای بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان است (Ramakrishna and Ravishankar, 2011). در شرایط درون شیشه‌ای اساساً گیاهانی گزینش می‌شوند که متابولیت‌های ثانویه تولیدی در آنها بالا باشد. متعاقب انتخاب گیاه، اندام‌هایی از گیاه

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: mahna@tabrizu.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.1.3]

انتخاب می‌شوند که دارای بالاترین غلظت مواد باشند. بعضی از گونه‌ها و هیبریدهای جنس مالوس (*Malus sp.*) استعداد و توانایی بالایی در تولید آنتوسیانین در اندام‌های خود دارند. بعنوان مثال، سیب ندزودزکیانا (*Malus pumila* var. Niedzwetzkyana) جزء سیب‌های زینتی است که منشاء آن آسیای مرکزی و گونه مقاوم به خشکی و سرمای زمستانه می‌باشد و تصور بر این است که جد اولیه اکثریت سیب‌های گوشت قرمز باشد (Dzhangaliev *et al.*, 2003). سیب‌های گوشت قرمز به دلیل دارا بودن سطح بالای آنتوسیانین و دیگر ترکیبات فنلی در پوست و گوشت میوه و در نتیجه، خاصیت آنتی اکسیدانی بالاتر نسبت به سیب‌های تجاری گوشت سفید، در بازار مطلوبیت بیشتری برای مصرف کننده داشته باشند (Vasantha Rupasinghe *et al.*, 2010). آنتوسیانین‌ها بزرگ‌ترین گروه رنگریزه‌های گیاهی محلول در آب در راسته‌های گیاهی هستند که به خانواده ترکیبات فلاونوئیدها تعلق دارند و در مسیر بیوسنتزی این ترکیبات سنتز می‌شوند. آنتوسیانین‌ها به دلیل کمبود الکترون در ساختار مولکولی‌شان، مستعد واکنش با رادیکال‌های آزاد اکسیژن بوده و در خنثی نمودن تنش‌های اکسیداتیو، نقش حفاظتی در بدن ایجاد می‌کنند و از اکسیداسیون چربی‌ها، پروتئین‌ها واسیدهای نوکلوئیک جلوگیری می‌کنند. آنتوسیانین‌ها هم چنین باعث افزایش عملکرد ایمنی بدن، ترمیم ناهنجاری‌های بینایی، کاهش چاقی، بیماری‌های قلبی فرنچ پارادوکس (French paradox) و انواع سرطان‌ها می‌شود (Shin *et al.*, 2006). عوامل مختلفی بر تولید درون شیشه‌ای آنتوسیانین تأثیر می‌گذارند و جهت تولید بالای آن، بهینه سازی هر یک از این عوامل ضروری می‌باشد. یکی از مهم‌ترین این عوامل در گیاهان عالی، وجود نور است و در این زمینه مطالعات زیادی صورت گرفته است. Khatami و *Ganati* (۲۰۱۱) کالوس‌های گیاه *Malva neglecta*را در معرض پرتوی‌های UV-B و UV-C قرار دادند و مشاهده کردند که میزان تولید آنتوسیانین در کالوس‌های تیمار شده در مقایسه با تیمارهای شاهد افزایش معنی داری داشت به گونه‌ای که میزان تولید آنتوسیانین در کالوس‌ها تیمار شده به مدت ۹۰ دقیقه در بالاترین غلظت خود قرار داشت. اما اثر پرتوی UV-B نسبت به پرتوی UV-C بیشتر بود. نتایج حاصل از کاربرد نورهای آبی با طول موج نوری ٤٥٠nm و نور قرمز با طول موج نوری ٦٥٠nm (هر دو با شدت نوری ٤ وات بر مترمربع) به مدت ۸ روز تیماری بروی بافت‌های کالوس توت فرنگی نشان داده است که نور آبی اثر بیشتری بر تولید آنتوسیانین نسبت به نور قرمز و نور متناوب در این بافت‌ها داشته است در حالیکه نسبت به نور سفید اثر کمتری از خود نشان داد (Kurata *et al.*, 2000). ارتباط نزدیکی بین تولید متابولیت‌های ثانویه و ویژگی‌های مختلف نوری از لحاظ کمیت، کیفیت و تداوم وجود دارد (Chalker-Scott, 1999). به طوری که مطالعات صورت گرفته در گیاه قهوه، نشان داده است که نور بطور کلی از دو طریق باعث تحریک متابولیت های ثانویه در این گیاه می‌شود. (۱) باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های مؤثر در متابولیت‌های ثانویه می‌شود؛ و (۲) به عنوان یک عامل استرس برای تولید اولیه متابولیت‌ها عمل می‌کند (Kurata *et al.*, 1997a).

در اکثر مطالعات انجام شده در مورد بیوسنتز آنتوسیانین تحت شرایط این‌ویترو یا این‌ویو (*In vitro or In vivo*) در گونه‌های مختلف گیاهی، از لامپ‌های فلورسنس و LED به عنوان منبع نوری برای تحریک تولید آنتوسیانین استفاده شده است (کاکاوند، ۱۳۹۰). تاکنون مطالعات کمی مبنی بر استفاده از تابش لیزری به عنوان منبع نوری جهت بیوسنتز آنتوسیانین و تأثیر آن بر رشد سلول‌های سوسپانسیونی در گونه‌های گیاهی گزارش شده است. تحقیقات انجام گرفته در دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز در مورد اثرهای تک فام (Monochromatic laser beam) تابش لیزرهای دیود و هلیوم- نئون بر میزان تولید آنتوسیانین در سوسپانسیون سلولی سیب نشان داد که هر دو لیزر منجر به افزایش معنی داری در میزان آنتوسیانین در سلول‌های سوسپانسیونی گردید ولی اثر تابش لیزر دیود به مراتب بیشتر از لیزر هلیوم- نئون بود (Kazemzadeh *et al.*, 2015). بنابراین، از نظر بررسی اثرهای ترکیبی تابش‌های لیزری بر روی تولید آنتوسیانین تا به حال آزمایشی انجام نشده است. در این پژوهش، اثر تیمارهای

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.1.3]

ترکیبی لیزرهای هلیوم- نئون و دیود بر تولید درون شیشه‌ای آنتوسیانین و رشد سلول‌های سوسپانسیونی سیب گوشت قرمز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: نمونه‌های شاخساره‌ای از شاخه‌های یکساله سیب هیبرید گوشت قرمز در فصل تابستان از آموزشکده کشاورزی شهید باکری شهرستان میاندوآب واقع در استان آذربایجان غربی تهیه شد. ابتدا جوانه‌ها با استفاده از روش شرح داده شده توسط Dobranszki و Silva (۲۰۱۰) ضدعفونی شدند و سپس، در زیر هود لامینار فلس‌های جوانه‌های جانبی برداشته شده و در محیط کشت MS تکمیل شده با هورمون بنزیل آدنین، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن سکوسترن FeEDDHA)، ۳ گرم در لیتر PVP (پلی وینیل پیرولیدون) و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز کشت گردیدند. بعد از رشد جوانه‌ها، گیاهچه‌های حاصل در همان محیط کشت پرآوری شدند و سپس ریزنمونه‌های برگی این گیاهچه‌ها جهت القای کالوس در محیط کشت MS تکمیل شده با ۱/۵ میلی لیتر هورمون نفتالین استیک اسید و ۰/۵ میلی لیتر بنزیل آدنین مورد استفاده قرار گرفت. بازکشت گیاهچه‌ها در محیط کشت جدید به فاصله هر سه هفته از آغاز کشت انجام گردید (Mahna and Motallebi-Azar, 2007).

کشت سوسپانسیونی سلولی سیب: بعد از چند بازکشت، کالوس‌های خوب رشد کرده به محیط کشت مایع MS تکمیل شده با ۱۲۰ mM ساکارز، ۱/۲ mM اسیدآمینه آسپارژین، ۲۸٤ µM آسکوربیک اسید، ۳۲۸ µM تیوه اوره، ۵۵۵µM میواینوزیتول، ۲µM کلسیم پانتوتنات، ۸ µM نیکوتینیک اسید، ۳ µM تیامین، ٤/۸µM پیریدکسین-کلریدیک اسید، ۰/۰۰٤µM بیوتین و ٤/۵µM 2,4-D انتقال داده شدند (Pech and Latch, 1975; Codron *et al.*, 1979). برای این کار، ابتدا مقدار مشخصی از بافت کالوس نرم (۲ گرم) پس از توزین در زیر هود، به داخل فلاسک‌های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع MS منتقل گردید. درب این فلاسک‌ها با پنبه چوب و پارافیلم بسته شد. فلاسک‌ها به مدت ۳ هفته تحت شرایط تاریکی بر روی دستگاه شیکر در ۱۲۰ rpm قرار داده شده و در هر هفته محیط کشت تجدید گردید. سوسپانسیون سلولی حاصل با مش ۵۳ میکرومتری استریل غربال و برای تیمار با تابش لیزری به لوله‌های آزمایش L شکل حاوی محیط کشت تازه منتقل شدند. جهت تعیین غلظت سلول‌ها از هموسایتومتر استفاده شد (Kurata *et al.*, 2000b). بعد از این مرحله، سلول‌ها (به جزء تیمار شاهد تاریکی) تحت شرایط نوری با شدت ۲٤ میکرومول در مترمربع در ثانیه (لامپ فلورسنت) و فتوپریود ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. تیمار لیزری بعد از ۱۵ روز انجام و ۱۵ روز دیگر سلول‌ها در همان شرایط قبل از تیمار به رشد خود ادامه دادند.

تیمار با لیزرهای آبی و قرمز: در این پژوهش لیزرهای هلیوم- نئون (لیزر قرمز، ٦٤۰-٦۳۰ نانومتر، با توان ۵ mW وقطر تابش $0.5 \times 1.5\ mm^{2)}$. و دیود (لیزر آبی، ٤۳۷ نانومتر، با توان ۵۰ mW و قطر تابش $0.5 \times 1.5\ mm^2$) از دانشکده فیزیک دانشگاه تبریز تهیه شد. تعداد ۱۸ تیمار ترکیبی (لیزر آبی + لیزر قرمز) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شدت‌های متفاوت (لیزر آبی در شدت‌های ٦۷/۰۹، ۳۲/۷٤، ۳۰/٤ و ۱۳/۷۳ میلی‌وات بر سانتی مترمربع و لیزر قرمز در شدت‌های ٦/٤٦، ٤/۸۲، ۱/۵٤ و ۰/٦٦٦ میلی‌وات بر سانتی مترمربع و دو شاهد تاریکی و نور مهتابی) اعمال شدند. برای این کار، سلول‌های سوسپانسیونی به مدت ۲۰ دقیقه از فاصله ۵۰ سانتیمتری در معرض تابش لیزر آبی در چهارسطح شدت و سپس با همان مدت در معرض تابش لیزر قرمز در چهارسطح شدت تیمار شدند به گونه‌ای که هر سطح از تابش لیزر آبی به ترتیب با چهار سطح از تابش لیزر قرمز ترکیب شدند.

اندازه‌گیری آنتوسیانین کل و آنتوسیانین مونومریک کل: آنتوسیانین کل ۱۵ روز بعد از تیمار سلول‌های سوسپانسیونی با تابش لیزری، با استفاده از متانول اسیدی (۱٪ اسید کلریدریک حجمی- وزنی) در دمای ٤ درجه سانتی گراد در طی یک

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.1.3]

شب، استخراج گردید و پس از سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد، روشناور جدا و میزان جذب آن در طول موج ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد و با فرمول زیر، غلظت آنتوسیانین کل محاسبه گردید (Wrolstad, 1976a; Wrolstad *et al.*, 1990b):

$$C = (L/A$$

که در آن: A = میزان جذب نمونه (عدد قرائت شده توسط اسپکتروفتومتری ضربدر وزن مولکولی سیانیدین ۳- گالاکتوساید ضربدر فاکتور رقت)؛ C = غلظت آنتوسیانین (mg/kg)؛ L= قطر کیووت (بر حسب سانتی متر)؛) = جذب مولی سیانیدین ۳- گالاکتوساید (۳۰۲۰۰)؛ وزن مولکولی سیانیدین ۳- گالاکتوساید = ٤٤۵/۲ گرم؛ فاکتور رقت = وزن اولیه سلول‌ها تقسیم بر حجم نهایی محلول.

آنتوسیانین مونومریک کل نیز با استفاده از روش pH متغیر اندازه‌گیری شد (Giusti and Wrolstad, 2005). در این روش ابتدا آنتوسیانین از سلول‌های تیمار شده با استفاده از متانول اسیدی (۰/۱٪ اسید کلریدریک حجمی- وزنی) در دمای ٤ درجه سانتی گراد در طی یک شب استخراج گردیده و پس از سانتریفیوژ در دمای ٤ درجه سانتی گراد در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، فاز مایع یا سوپرناتانت جدا و با استفاده از دو بافر پتاسیم کلرید با pH ۱/۰ و بافر سدیم استات با pH٤/۵ با نسبت ۳:۱ (v/v) (۰/۵ml) از نمونه سلولی با ۱/۵ml از هر کدام از بافرها بصورت جداگانه) رقیق گردیده و نهایتاً میزان جذب در دو طول موج ۵۳۰ و ۷۰۰ نانومتر قرائت شد و میزان آنتوسیانین منومریک کل سلول‌ها براساس فرمول‌های زیر محاسبه شد (Giusti and Wrolstad, 2005):

$$A_{diff} = (A_{530} - A_{700})_{PH1.0} - (A_{530} - A_{700})_{PH4.5}$$

$$\text{غلظت آنتوسیانین مونومریک } \left(^{mg}/_{l}\right) = \frac{[A_{diff} \times MW \times DF \times 1000]}{\varepsilon}$$

که در آن: A = میزان جذب نمونه‌های رقیق شده در دو طول موج؛ MW = وزن مولکولی سیانیدین ۳- گالاکتوساید = ٤٤۵/۲؛ DF = فاکتور رقت؛)= ضریب خاموشی یا جذب مولار سیانیدین ۳- گالاکتوساید = ۳٤۳۰۰

اندازه‌گیری وزن‌تر و خشک سلول: یک میلی لیتر از سلول‌های سوسپانسیونی در ۲ تکرار برداشته شد و به داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتر منتقل گردید. بعد از سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، مایع رویی دور ریخته شد. وزن میکروتیوب‌ها همراه با سلول‌های رسوب شده در ته میکروتیوب توسط ترازوی دیجیتالی توزین شد. در نهایت وزن‌تر بوسیله تفاضل وزن میکروتیوب همراه سلول رسوب شده با میکروتیوب خالی بدست آمد. وزن خشک سلول‌ها نیز بوسیله قرار دادن میکروتیوب‌های حاوی سلول در دستگاه آون در دمای ٦۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ ساعت و تفاضل آن از وزن میکروتیوب خالی بدست آمد.

اندازه‌گیری حجم سلول بعد از رسوب (Cell Volume after Sedimentation): در این روش قسمت پایین لوله‌های آزمایشی L شکل به مدت ۱۵ دقیقه به حال عمودی نگه داشته شد تا سلول‌ها طور کامل ته نشین شوند. سپس، ارتفاع این رسوب سلولی با استفاده از خط کش مندرج به سانتیمتر اندازه گیری شد و حجم سلول با فرمول زیر محاسبه گردید (Mustafa *et al.*, 2011).

حجم استوانه‌ای شکل لوله آزمایش $=\pi \times r^2 \times h$

h= ارتفاع رسوب سلولی؛ r= شعاع استوانه شیشه‌ای؛ π= ۳/۱٤

تجزیه‌ی آماری داده‌ها: این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۸ تیمار و ۳ تکرار در هر تیمار اجرا گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS Portable ver. 9.1.3 مورد بررسی قرار گرفت. برای مقایسه میانگین پارامترهای وزن‌تر و خشک، CVS و صفت آنتوسیانین از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و آزمون توکی استفاده به عمل آمد و نمودارها نیز با نرم افزار Excel و SAS ترسیم شدند.

نتایج و بحث:

تأثیر تیمارهای ترکیبی لیزرهای آبی و قرمز بر تولید آنتوسیانین: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین صفت آنتوسانین کل و آنتوسیانین مونومریک کل سلول‌های سوسپانسیونی سیب گوشت قرمز و تیمارهای

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.1.3]

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای ترکیبی لیزرهای آبی و قرمز بر میزان تولید آنتوسیانین در سلول‌های سوسپانسیونی سیب گوشت قرمز

منابع تغیرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		آنتوسیانین کل TA	آنتوسیانین منومریک کل TAM
اثرات ترکیبی لیزرهای آبی و قرمز	۱۷	٤٦٣/١٠١**	٠/٠٠٠١٦**
خطا	٣٦	٥/٩٣١	٠/٠٠٠٠٠٥٩

** معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

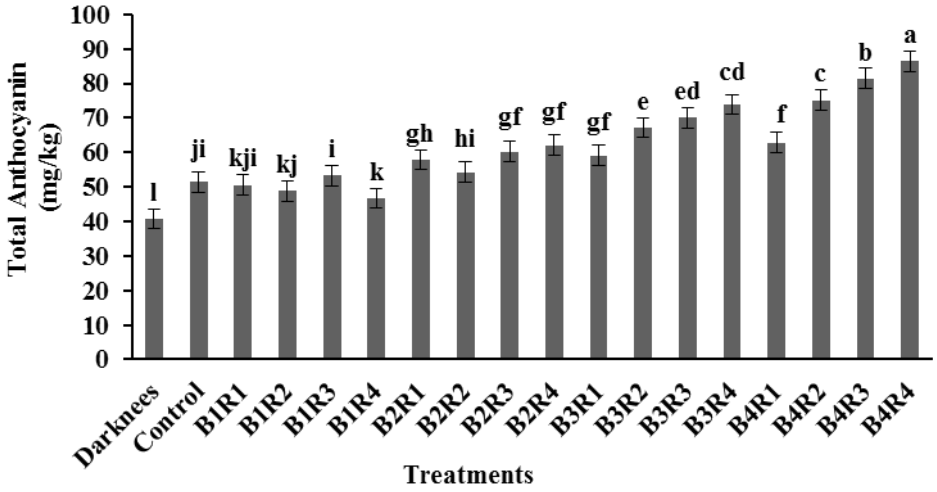
ترکیبی لیزرهای آبی با قرمز در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی داری وجود دارد ($P \leq 0.01$). مقایسه دو به دوی میانگین تیمارها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مشخص کرد که تفاوت چشمگیری بین تیمارهای ترکیبی لیزری از نظر تولید آنتوسیانین وجود دارد (**جدول ۱**).

تیمارهای ترکیبی B_4R_4، B_4R_3 و B_4R_2 از نظر تولید TA و TMA نسبت به سایر تیمارها میانگین بالاتری داشتند (٨٦/٤٣، ٨١/٣٧، ٧٥/٠٨٧ به ترتیب بر حسب میلیگرم در کیلوگرم برای TAو ٠/٠٣، ٠/٠٢٤٣ و ٠/٠٢٢٠ برحسب میلیگرم در لیتر برای TMA). در این میان کمترین میزان تولید آنتوسیانین TA در تیمار تاریکی و کمترین میزان آنتوسیانین TMA در تیمار شاهد تاریکی، شاهد نوری و سطح اول تابش لیزر آبی (١٣/٧٣ میلی‌وات بر سانتی مترمربع) در ترکیب با ٤ شدت تابش لیزر قرمز مشاهده شد (**شکل ۱ و ۲**). بنابراین، با افزایش تابش لیزر آبی از سطح اول تابش تا سطح چهارم و همچنین به دنبال آن افزایش تابش لیزر قرمز در هر سطح از تابش لیزر آبی، میزان تولید آنتوسیانین در سلول‌های سوسپانسیونی افزایش یافت، به طوری که بیشترین میزان TA و TMA در سطح چهارم لیزر آبی (٦٧/٠٩ $mWcm^{-2}$) در ترکیب با شدت بالای تابش لیزر قرمز (٦/٤٦$mWcm^{-2}$) بدست آمد.

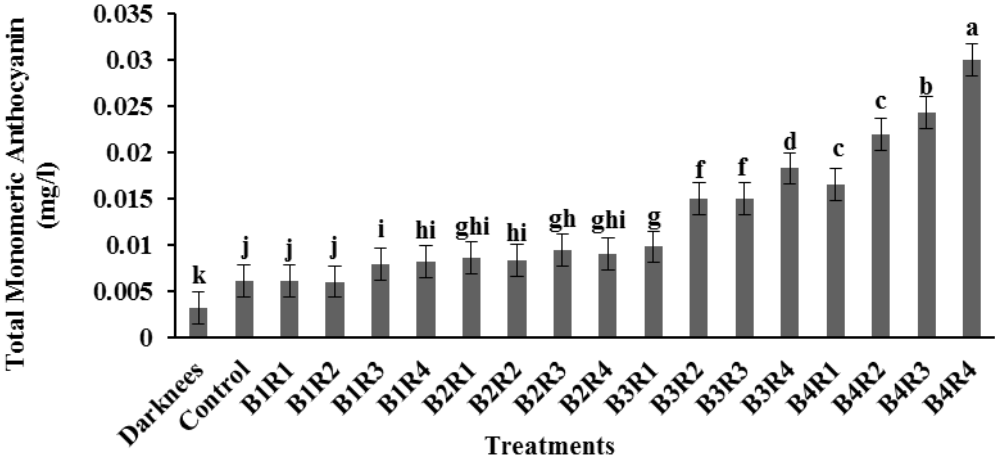
مدارک زیادی وجود دارد که نشان می‌دهند تابش لیزر باعث تحریک فرآیندهای زیستی در بافت و اندام‌های گیاهان و حیوانات می‌شود (Ansimov *et al*., 1997). عمل لیزر در نتیجه افزایش یک پتانسیل انرژی زیستی در گیاه بوده که منجر به فعالیت زیاد سیستم‌های فیتوکرومی، فتوهورمونی و تخمیری همراه با تحریک فرآیندهای فیزیولوژیکی و فتوشیمیایی در آنها می‌گردد (Vasilevski *et al*., 2001). اساس تحریک فرآیندهای زیستی در مرحله فیزیولوژیکی هر گیاه، یک حالت سینرژیسم بین تابش تکفام لیزر و فتورسپتورها به عنوان عامل فعال شدن فرآیندهای بیولوژیکی زیادی در گیاه می‌باشد (Perveen *et al*., 2010). در پژوهشی به منظور بررسی عکس العمل دفاعی سیستم آنتی اکسیدانتی در پاسخ به تابش لیزری در مریستم‌های انتهایی و تولید ترکیب مالوندی الدهید (malondialdahyde) و آنتوسیانین در گیاچه‌های *Isatis indigotica*، گیاهچه‌ها به مدت ۸ ساعت در روز در معرض تابش UV-B و سپس با لیزر هلیوم- نئون (633 nm; 5.23 $mWmm^{-2}$) به مدت ۵ دقیقه در روز تیمار شدند، نتایج نشان داد که UV-B به تنهایی منجر به افزایش معنی داری در میزان ترکیب مالوندی الدهید شده در صورتیکه لیزر هلیوم- نئون باعث کاهش این ترکیب شده و در مقابل با کاهش پراکسیداسیون غشاء و افزایش در میزان آنتوسیانین به عنوان سیستم آنتی اکسیدانتی غیره آنزیمی منجر به بالا بردن سیستم دفاعی آنتی اکسیدانتی می‌گردد اما تیمار ترکیبی اثر کمتری ازUV-B و بیشتری نسبت به تابش لیزری داشت. (Chen, 2009). بنابراین این احتمال وجود دارد که شدت‌های بالای تیمارهای ترکیبی لیزری، باعث صدمه و افزایش پراکسیداسیون غشاء سلول‌های سوسپانسیونی سیب گوشت قرمز گردیده و در این شرایط تولید آنتوسیانین به دلیل تابش بالای لیزرهای ترکیبی با سرعت بیشتری صورت گرفته تا از طریق ارتقاء سیستم آنتی اکسیدانتی باعث حفاظت سلول از استرس اعمال شده ناشی از تابش بالای لیزرها شود. **اثر تیمارهای ترکیبی لیزری بر میزان رشد سلول‌های سوسپانسیونی سیب:** برای پژوهش در آزمایشگاه‌های کشت

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.1.3]



شکل ۱- تأثیر تیمارهای ترکیبی لیزر آبی با قرمز بر میزان تولید آنتوسیانین کل سلول‌های سوسپانسیونی سیب گوشت قرمز. Darkness: تیمار شاهد تاریکی؛ Control: شاهد نوری؛ B_1، B_2، B_3، B4 (چهار سطح شدت تابش لیزر آبی) و R_1، R_2، R_3، R_4 (چهار سطح شدت تابش لیزر قرمز). میانگین‌های که دارای حروف یکسان هستند در سطح احتمال ۵ درصد آزمون توکی تفاوت معنی داری باهم ندارند.



شکل ۲- تأثیر تیمارهای ترکیبی لیزر آبی و قرمز بر میزان تولید آنتوسیانین مونومریک کل سلول‌های سوسپانسیونی سیب. Darkness: تیمار شاهد تاریکی؛ Control: شاهد نوری؛ B_1، B_2، B_3، B4 (چهار سطح شدت تابش لیزر آبی) و R_1، R_2، R_3، R_4 (چهار سطح شدت تابش لیزر قرمز). میانگین‌های که دارای حروف یکسان هستند در سطح احتمال ۵ درصد آزمون توکی تفاوت معنی داری باهم ندارند.

بافت گیاهی و یا در صنعت برای اطمینان از تکرارپذیری تولید، تعیین پارامتر رشد سلول‌های سوسپانسیونی بسیار مهم می‌باشد. از آنجا که یک عنوان مشخص یا تعریف واضح و یکنواخت از پارامتر رشد سلول‌های سوسپانسیونی در شرایط کشت سلولی وجود ندارد. بنابراین رشد سلول می‌تواند در ارتباط با تعداد سلول، توده سلولی، وزن‌تر و خشک سلول و غیره باشد. بر این اساس رشد سلول اغلب با استفاده از روشهای از قبیل وزن‌تر و خشک سلول، تعداد سلول، حجم سلول رسوب شده (Packed cell volume)، حجم سلول بعد از رسوب یا ته نشین شدن CVS (Cell after Volume Sedimentation)، حالت اسمولالیتی و هدایت الکتریکی محیط کشت، تعیین غلظت نیترات یا متابولیت ثانویه، محتوای پروتئین، محتوای DNA و زنده‌مانی سلول اندازه‌گیری می‌شوند (Mustafa *et al.*, 2011). در این پژوهش، پارامترهای وزن‌تر و خشک سلول و CVS به

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.1.3]

عنوان معیاری از رشد سلول‌های سوسپانسیونی مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز وزن‌تر و وزن خشک سلول‌های سوسپانسیونی: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی نشان داد که تفاوت معنی‌داری از نظر وزن‌تر و وزن خشک سلول‌های سوسپانسیونی سیب گوشت قرمز بین تیمارهای ترکیبی لیزر آبی و لیزر قرمز در سطح احتمال ۵ درصد وجود دارد ($P \leq 0.05$). (**جدول ۲ و ۳**). بیشترین وزن‌تر سلول‌ها در تیمار ترکیبی R_4B_2 و کمترین وزن‌تر در تیمارهای R_3B_3 و R_3B_1 مشاهده گردید. همچنین، بیشترین وزن خشک سلول‌ها در تیمار ترکیبی R_1B_1 و کمترین میزان وزن خشک در تیمار شاهد تاریکی دیده شد. در حالت کلی تأثیر تیمارهای ترکیبی لیزری بر وزن‌تر نسبت به وزن خشک بیشتر بود (**جدول ۳**). به عبارتی کاهش وزن‌تر در سطح تابش سوم و چهارم لیزر آبی به همراه افزایش شدت تابش لیزر قرمز از سطح اول تا سطح چهارم، دلیل بر اثبات این موضوع دارد. در صورتی که سطح تابش اول و دوم برخلاف سطح تابش سوم و چهارلیزر آبی، اثر بهبود کنندگی یا خنثی بر رشد سلول‌های سوسپانسیونی از لحاظ وزن ترسلول اعمال کرده است.

آنالیز حجم سلول بعد از رسوب (CVS): نتایج حاصله از تجزیه واریانس مشخص نمود که از نظر صفت CVS سلول‌های سوسپانسیونی بین تیمارهای ترکیبی لیزرهای آبی و قرمز اثر معنی داری وجود دارد ($P \leq 0.05$) (**جدول ۳**). با توجه به نمودار میانگین‌های صفت CVS براساس مقایسه میانگین توکی، تفاوت بدست آمده بین تیمارهای ترکیبی لیزر آبی و قرمز از جهت تأثیر گذاری بر کاهش و افزایش CVS چندان قابل ملاحظه نبود و فقط تیمار B_2R_3 با تیمارهای B_4R_3 و شاهد تاریکی تفاوت معنی دار نشان داد و بیشترین میزان CVS را به خود اختصاص داد. با توجه به (**جدول ۳**)، می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش تابش لیزری آبی از سطح اول تا چهارم در ترکیب با لیزر قرمز، میزان CVS سلول نیز کاهش یافت ولی از نظر تجزیه آماری تفاوت معنی دار با سایر تیمارهای ترکیبی نداشت و تنها تفاوت قابل ملاحضه‌ای بین تیمار شاهد تاریکی و تیمار B_2R_3 مشاهده گردید.

مکانیسم تأثیر امواج الکترومغناطیسی بر سلول‌های زنده هنوز بطور دقیق مشخص نشده است، ولی باید گفت که اثرات مهاری یا تحریکی میدان مغناطیسی بر رشد بافت‌ها، به عواملی نظیر گونه و اندام گیاهی، فرکانس و نوع میدان، مدت زمان تیمار و سایر عوامل تنش‌زا بستگی دارد (Kato *et al.*, 1989). برخی تحقیقات نشان داده است که امواج الکترومغناطیسی می‌تواند منجر به تولید و یا افزایش طول عمر رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) شود. تجمع این رادیکال‌ها می‌تواند منجر به تنش اکسیداتیو شود. تنش اکسیداتیو باعث تغییر در فعالیت آنزیم‌ها، بیان ژن و آزادسازی کلسیم از ذخایر سلولی می‌گردد. همچنین این تنش می‌تواند بر ساختار غشا، رشد سلول و مرگ سلول‌ها تأثیر بگذارد (Belyavskaya, 2004; Sahebjamei *et al.*, 2007).

Salyaev و همکاران (۲۰۰۷) عنوان کردند که عکس العمل القایی یا تحریک کننده تابش لیزری به عنوان امواج الکترومغناطیسی با شدت تابش بالا در سلول‌ها را می‌توان به دو دسته گروه بندی نمود: دسته اول مربوط به اعمال استرس به سلول و در نتیجه آن، افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و دسته دیگر را به تحریک بیوسنتز متابولیت های ثانویه از طریق تأثیر بر مسیر متابولیکی همراه با تغییر در فرآیندهای زیستی نسبت دادند. بنابراین در حالت کلی می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش شدت تابش در تیمارهای ترکیبی لیزری، میزان وزن‌تر و وزن خشک و CVS سلول‌های سوسپانسیونی سیب گوشت قرمز کاهش یافت که احتمالاً می‌توان آنرا به استرس وارد شده ناشی از شدت بالای لیزر مورد استفاده بر سلول‌ها و تأثیر آنها بر ساختار غشایی سلول‌ها نسبت داد. از سوی دیگر تولید میزان بالای آنتوسیانین در سلول‌های تیمار شده با شدت‌های بالای لیزر را نیز می‌توان به تنش ناشی از لیزر نسبت داد؛ چرا که آنتوسیانین‌ها به عنوان یک ترکیب متابولیت ثانویه اغلب تحت شرایط استرس از قبیل نور بالا، دمای پایین، کمبود مواد غذایی و حمله پاتوژن ها تولید می‌شوند تا به واسطه‌ی خاصیت آنتی‌اکسیدانتی بالا، گونه‌های رادیکال‌های فعال اکسیژن تولید شده در طول فتوسنتز مخصوصاً تحت شرایط

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.1.3]

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای ترکیبی لیزرهای آبی و قرمز بر میزان رشد سلول‌های سوسپانسیونی سیب گوشت قرمز

منابع تغیرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		حجم سلول بعد از رسوب (CVS)	وزن خشک (DCW)	وزن‌تر (FCW)
اثرات ترکیبی لیزرهای آبی و قرمز	*۰/۷۹٤	*۳٤/٤۷	*۲٦٦/۸۸	۱۷
خطا	۰/۰۱۱	٤٥/۹۱	۳۹/۸٤	۳٦

* معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات تیمارهای ترکیبی لیزرهای آبی و قرمز بر میزان رشد سلول‌های سوسپانسیونی سیب گوشت قرمز

تیمارهای ترکیبی لیزرهای آبی و قرمز	پارامترهای رشد سلولی		
	وزن‌تر (FCW)	وزن خشک (DCW)	حجم سلول بعد از رسوب (CVS)
	mg/ml	mg/ml	cm
Darkness	۳۷/۷۷ cd	٤/۳۹ a	۰/۲٥ b
Control	٤۸ abcd	٤/۸٦ ab	۰/۲۷ ab
B1R1	٥۳/۷۷ abc	٥/۳٤ a	۰/۳۹ ab
B1R2	٥٥/۱۱ ab	٤/۷۷ ab	۳٦ ab
B1R3	۳۳/۱۲ cd	٤/٤٤ ab	۳۲ ab
B1R4	٤٥/۷۷ bcd	٥ ab	۰/٤۱ ab
B2R1	٤٥/۲۲ bcd	٤/۸۸ ab	٤۲ ab
B2R2	٥٥/٥٥ ab	٤/۷۷ ab	۳۹ ab
B2R3	٥۳/۷٥ abcd	٤ ab	۰/٤۳ a
B2R4	٦۲/٦٦ a	٥ ab	۰/۳۷ ab
B3R1	٥۳/۸۸ ab	٤/٦٦ ab	۰/۳٦ ab
B3R2	٤٥/۲۲ bcd	٤/۷۷ ab	۰/۳٥ ab
B3R3	۳۳/٤٤ cd	٤/٦٦ ab	۰/۳۲ ab
B3R4	٤٥/۲۲ bcd	٤/٦٤ ab	۰/۲۸ ab
B4R1	٤۰ bcd	٥/۲۲ a	۰/۲۸ ab
B4R2	۳۸ cd	٤/۲۳ ab	۰/۲٦ ab
B4R3	٥۰/٤٤ abcd	٤/۷٦ ab	۰/۲٥ b
B4R4	۳۷/۷۷ bcd	٥ ab	۰/۲۷ ab

میانگین‌های که دارای حروف یکسان هستند در سطح احتمال ۵ درصد آزمون توکی تفاوت معنی داری باهم ندارند. Darkness؛ تیمار شاهد تاریکی؛ Control، شاهد نوری؛B1، B2، B3، B4 (چهار سطح شدت تابش لیزر آبی) و R1، R2، R3، R4 (چهار سطح شدت تابش لیزر قرمز).

بازدارندگی نوری (نور شدید و دمای پایین) را جذب کنند (Albert *et al*., 2009). در بین فتورسپتورها، فیتوکروم‌ها بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و مشخص شده است که فیتوکروم ها در بیوسنتز آنتوسیانین دخالت دارند. فیتوکروم ها با عکس العمل

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.1.3]

به نور قرمز و قرمزدور و تبدیل شدن از حالت Pr به Pfr مستقیم باعث بیان ژن‌ها در گیاه می‌شوند (Zhou and Singh, 2004). Frohnmeyer و همکاران (۱۹۹۲) در بررسی نوع رسپتور موجود درگیاهچه های گوجه فرنگی، درخت خردل وسیب، متوجه شدند که فیتوکروم ها رسپتورهای اصلی در کنترل تجمع و تولید آنتوسیانین می‌باشند. نتایج نشان می‌دهد که در سطوح سوم و چهارم لیزر آبی (شکل ۱ و ۲)، با افزایش شدت تابش لیزر قرمز، میزان آنتوسیانین نیز افزایش فوق العاده‌ای پیدا کرد. احتمالاً لیزر قرمز از طریق کمک به لیزر آبی بصورت سینرژیست باعث بهبود تولید آنتوسیانین در سیب گوشت قرمز شده است که احتمالاً این اثر با مشارکت فتورسپتورها همراه است. این نتایج با مطالعات انجام شده توسط (Kurata *et al.*, 2000b) روی تولید آنتوسیانین در سلول‌های سوسپانسیونی توت فرنگی مطابقت داشت؛ آن‌ها نیز عنوان کرده‌اند که نور قرمز در ترکیب با نور آبی، اثر هم‌افزایی بر تولید آنتوسیانین دارد، در حالی که به تنهایی اثر ضعیفی بر تولید آنتوسیانین اعمال کرده است که احتمالاً این اثر در ارتباط با همکاری و مشارکت فتورسپتورهای مسئول جذب این دو نور در مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین می‌باشد.

منابع:

کاکاوند، ف. (۱۳۹۰). تأثیر منبع نیتروژن، ساکارز و شدت نور بر تولید درون شیشه‌ای آنتوسیانین در سیب ماکامیک. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم باغبانی .دانشگاه تبریز. تبریز. ایران.

Albert, N. W., Lewis, D. H. Zhang, H. Irving, L. J. Jameson, P. E. and Davies, K. M. (2009) Light-induced vegetative anthocyanin pigmentation in *Petunia*. Journal of Experimental Botany 1-12.

Anisimov, A., Vorobev, V. and Zuikov, A. (1997) The influence of laser radiation on the velocity of rotational motion of protoplasm in elodea cells. Laser Physics 7:1132-1137.

Belyavskaya, N. A. (2004) Biological effects due to weak magnetic field on plants. Advances in space Research 1566–1574.

Chalker-Scott, L. (1999) Environmental significance of anthocyanins in plant stress response. Photochemistry and Photobiology 70:1-9.

Chen, Y.P. (2009) Response of antioxidant defense system to laser radiation apical meristem of *Isatis indigotica* seedlings exposed to UV-B. Plant Signaling and Behavior 4:7, 571-573.

Codron, H., Latci, a. Pech, J. C. Nebie, B. and Fallot, J. (1979) Control of quiescence and viability in auxin-deprived pear cells in batch and continuous culture. Plant Science Letters 17: 29-35.

Frohnmeyer., H. Ehmann, B. Kretsch, M. Rocholl, M. Harter, K. Nagatani, A. Furuya, M. Batschauer, A. Halbrock, K. and Schafer, E. (1992) Differential usage of photoreceptors for chlacone synthase gene expression during plant development. Plant Journal 2:899–906.

Dobránszki, J. and Teixeira da Silva, J. A. (2010) Micropropagation of apple-A review. Biotechnology Advances 28: 462–488.

Dzhangaliev, A. D., Salova, T. N. and Turekhanova, P. M. (2003) The wild fruits and nut plants of Kazakhstan. Horticultural Reviews 29: 305-371.

Giusti, M. M. and Wrolstad, R. E. (2005) Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components (Eds. Wrolstad, R. E., Acree, T. E., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Smith, D. and Sporns, P.)Pp. 344-402. Handbook of food analytical chemistry: Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons.

Kato, R., Kamada, H., Asashma, M. (1989) Effect of high and very low magnetic field on the growth of hairy roots of Daucus carotta and Atropa belladonna. Cell Physiology 30: 605–608.

Kazemzadeh, B. H., Mahna, N. Safari, E. Zaare-Nahandi, F. and Motallebi-Azar, A. (2015) Effects of Diode and He-Ne Laser on In Vitro Production ofAnthocyanin in Apple Cell Suspension Culture. International Journal of Horticultural Science and Technology 2: 634-642.

Khatami, F. Ghanati, F. 2011. Effects of UV irradiation on cell viability, anthocyanin, and flavonoid contents of Callus cultured Malva neglecta cells. International Conference on Life Science and Technology.

Kurata, H., Matsumura, S. and Furusaki, S. (1997a) Light irradiation causes physiological and metabolic changes for Purine alkaloid production by a Coffe Arabica cell suspension culture. Plant Science 123:197-203.

Kurata, H., Mochizuki, A. Okuda, N. Seki, M. Furusaki, S. (2000b) Intermittent light irradiation with second- or hour-scale periods controls anthocyanin production by strawberry cells. Enzyme and Microbial Technology, 621–629.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.1.3]

Mahna, N., and Motallebi, Azar A. (2007) In *vitro* micropropagation of apple (*Malus* × *domestica* borkh.) cv. Golden Delicious. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences. Ghent University. 72: 235-238.

Mustafa, N. R., Winter, de W. Iren, van F. and Verpoorte, R. (2011) Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. Nature protocols 6:715-739.

Pech, J. C., and Latch, A. Austruy M. and Fallot, J. Bull. (1975) Bulletin de la Société Botanique de France. 122 -183.

Perveen R., Ali, Q. Ashraf, M. Al-Qurainy, F. Jamil, Y. and Ahmad M. R. (2010) Effects of different doses of low power continuous wave He-Ne laser radiation on some seed thermodynamic and germination parameters, and potential enzymes involved in seed germination of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Photochem. Photobiol 86: 1050-1055.

Ramakrishna, A. and Ravishankar, A. G. (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plant. Plant Signaling and Behavior 6: 1720-1731.

Salyaev, R. K., Dudareva, L.V. Lankevich, S. V. Makarenko, S. P. Sumtsova, V. M and Rudikovaskaya, E. G. (2007) Effect of low-inensity laser radiation on the chemical composition and structure of lipids in wheat tissue culture. Journal of Biological Sciences 412: 87-88.

Sahebjamei, H., Abdolmaleki, P., and Ghanati, F. (2007) Effects of magnetic field on the antioxidant enzyme activities of suspension-cultured tobacco cells. Bioelectromagnetics 28: 42– 47.

Shin, W. H., Park, S. J. and Kim, E. J. (2006) Protective effect of anthocyanin in middle cerebral artery occusion and reperfusion model of *cerebral ischemia* in rats. Life Science 79: 130-137.

Vasantha Rupasinghe., H. P. Huber, G. M. Embree, C. G. and Forsline, P. L. (2010) Red-fleshed apple as a sourse for functional beverages. Canadian Journal of Plant Sciences 90: 95-100.

Vasilevski., G. Bosev, D. Bozev, Z. and Vasilevski, N. (2001) Byophisical methods as a factor in decreasing of the soil contamination. Int. Workshop Assesment of the Quality of Contaminated Soils and Sites in Central and Eastern European Countries (CEEC) and New Independent States (NIS), Sofia, Bulgaria.

Wrolstad, R. E. (1976a) Color and pigment analyses in fruit products. Oregon Agricultural Experiment Station Bulletin. 624.

Wrolstad, R. E., Skrede, G. Lea P. and Enersen, G. (1990b) Influence of sugar on anthocyanin pigment stability in frozen strawberries. Journal of Food Science. 55:1064-1065.

Zhang, W. and Furusaki, S. (1999) Production of anthocyanin by plant tissue culture. Biotechnology & Bioprocess Engineering 4: 231-252.

Zhou.,Y. and Singh, B. R. (2004) Effect of Light on Anthocyanin Levels in Submerged, Harvested Cranberry Fruit. Journal of Biomedicine and Biotechnology 259–263.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.1.3]