Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Plant Production Research

Print ISSN: 2322-2050
Online ISSN: 2322-2778

Identification of anthocyanin compounds in 10 Grape Cultivars (*Vitis Vinifera* L.) By HPLC-DAD Method

Fatemeh Sadeghian[1], Esmaeil Seifi[*2], Seyyedeh Sanaz Ramezanpour[3], Seyyed Alireza Salami[4]

1. Ph.D. Student, Dept. of Horticultural Sciences, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: fatemesadeghian66@gmail.com
2. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Horticultural Sciences, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: esmaeilseifi@gau.ac.ir
3. Associate Prof., Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: ramezanpours@gau.ac.ir
4. Associate Prof., Dept. of Horticultural Sciences, Faculty of Agricultural Sciences and Engineering, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: asalami@ut.ac.ir

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 07.24.2022
Revised: 08.17.2022
Accepted: 09.11.2022

Keywords:
Antioxidant,
Diversity,
Malvidin,
PCA,
Total phenol

ABSTRACT

Introduction and Objectives: Grapes are a significant source of phenolic compounds, Genetic factors primarily determine anthocyanins, and in grapes, skin color is a critical and influential factor in the large germplasm of grapes. Since about 250 cultivars of 800-1000 grape cultivars are grown in Iran, studying anthocyanin compounds in the available germplasm resources is crucial. Therefore, this study was carried out to investigate the profile and diversity of different polyphenolic and anthocyanin compounds in some colored grapevine cultivars (*V. vinifera* L).

Materials and Methods: In this study the cultivars Flame, Crimson, Red Globe, Sahebi ghoochan, Ghare Shire, Sahebi Urmia, Syah Ghare Bagh, Rish baba, Flame seedless and Lale Bidane were investigated. The amount of phenol in the pulp was measured by the Folin-Ciocalteu method, and total flavonoids were measured by aluminum chloride calorimetry method. Total anthocyanin was measured with a spectrophotometer at 760 nm. The evaluation of the individual anthocyanin compounds was done by HPLC-DAD. Analysis of variance for all morphological traits was performed with the software IBM SPSS 26 using the one-way method ANOVA. The correlation among varieties, PCA analysis, and the scatter plot of the distribution according to PC1/PC2 were made with the statistical software SPSS. The distance values were calculated using the Euclidean method, and the dendrogram was generated using the UPGMA method of the NCSS statistical software (NCSS.12).

Results: The percentage of total phenols, flavonoids, and anthocyanins in the berries of the studied cultivars were 48, 43, and 9, respectively. The results showed that the highest concentrations of total phenols were found in the cultivars “Crimson” (16.94 mg GAE/100 g), “Red Globe” (13.74 mg GAE/100 g), and “Flame” (13.58 mg GAE/100 g). The highest content of total flavonoids was found in “Flame” (36.47 mg100 g^{-1}) and “Red Globe” (10.05 mg 100g^{-1}), also the highest content of anthocyanins was found in “Ghare Shire”, “Syah Ghare Bagh”, “Lale Bidane” and “Sahebi Urmia” with 6.09, 6.59, 3.58 and 2.01 mg kg^{-1}, respectively. Among the varieties studied, the lowest content of total anthocyanins, flavonoids, and phenol respectively was observed in “Flame” with 0.23 mg kg^{-1} and

"Syah Ghare Bagh" with 5.8 mg/kg, and in "Sahebi ghoochan" with 2.88 mg kg^{-1}. The composition of pelargonidin and its derivatives was not identified. The concentration of malvidin in "Flame" and "Red Globe" was trace and was not observed in "Sahebi Urmia" and "Lale Bidane". The correlation results show that the highest positive and significant correlations were between delphinidin 6-acetyl glucoside and cyanidin 6-acetyl glucoside (r=0.99). Malvidin showed the highest correlation with delphinidin and petunidin. According to the dendrogram of cluster analysis of ten red cultivars for anthocyanins, they were divided into two main groups. The first group consisted of the two cultivars "Syah Ghare Bagh" and "Ghare Shire", further away from the other eight cultivars of the second group.

Conclusion: The studied cultivars showed significant differences in the individual anthocyanin compounds and the amount of phenol, flavonoids, and total anthocyanins. According to the results, peonidin and malvidin had the highest concentrations in the studied cultivars; In "Syah Ghare Bagh", the highest concentration of peonidin was found at 54.08 mg kg DW^{-1}, and in "Ghare Shire" malvidin with 42.78 mg kg DW^{-1}. In addition "Syah Ghare Bagh" and "Ghare Shire"" had the highest total anthocyanin concentration. Consequently, these genotypes were located in a separate group by distance from most cultivars based on cluster analyses.

Cite this article: Sadeghian, Fatemeh, Seifi, Esmaeil, Ramezanpour, Seyyedeh Sanaz, Salami, Seyyed Alireza. 2023. Identification of anthocyanin compounds in 10 Grape Cultivars (*Vitis Vinifera* L.) By HPLC-DAD Method. *Journal of Plant Production Research*, 30 (1), 225-242.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/JOPP.2022.20456.2956
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

شاپا چاپی: ۲۳۲۲-۲۰۵۰
شاپا آنلاین: ۲۳۲۲-۲۷۷۸

شناسایی ترکیبات آنتوسیانینی در ۱۰ رقم انگور (*Vitis vinifera* L.) با روش HPLC-DAD

فاطمه صادقیان[۱]، اسماعیل سیفی*[۲]، سیده ساناز رمضانپور[۳]، سید علیرضا سلامی[۴]

۱. دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: fatemesadeghian66@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: esmaeilseifi@gau.ac.ir

۳. دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: ramezanpours@gau.ac.ir

۴. دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: asalami@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۰۲
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۰۵/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۰

واژه‌های کلیدی:
آنتی‌اکسیدان،
تنوع،
فنول کل،
مالویدین،
PCA

چکیده

سابقه و هدف: انگور یا تاک (*Vitis vinifera* L.) منبع مهمی از ترکیبات فنولی و آنتوسیانینی بوده و این ترکیبات خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی قوی دارند. آنتوسیانین‌ها در درجه اول توسط عوامل ژنتیکی تعیین می‌شوند. رنگ پوست میوه در انگور، یک عامل مهم و مؤثر در شناسایی ژرم‌پلاسم غنی این گیاه و تحت‌تأثیر مقدار آنتوسیانین است. از آن‌جایی‌که حدود ۲۵۰ رقم از مجموع ۸۰۰-۱۰۰۰ ژنوتیپ انگور در ایران رشد می‌کنند، مطالعه ترکیبات آنتوسیانینی در منابع ژرم‌پلاسمی ضروری است. این مطالعه جهت بررسی تنوع ترکیبات پلی‌فنولی و آنتوسیانینی در ۱۰ رقم رنگی انگور انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، ارقام فلیم، کریمسون، رد گلاب، صاحبی قوچان، قره‌شیره، صاحبی ارومیه، سیاه قره‌باغ، ریش‌بابا، فلیم سیدلس و لعل بیدانه مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های انگور رنگی (قرمز و سیاه) زمانی برداشت شدند که مقدار قند آن‌ها در محدوده ۱۹-۲۲ بود و رنگ‌گیری کامل داشتند. میزان فنول کل در گوشت میوه با روش فولین سیوکالتو انجام شد و از اسید گالیک به عنوان استاندارد استفاده گردید. اندازه‌گیری فلاونوئید کل با روش کالری‌متری آلومینیوم کلراید و تعیین مقدار آنتوسیانین پوست حبه به روش وانگر (۱۹۷۹) با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر انجام شد. اندازه‌گیری ترکیبات آنتوسیانینی در پوست حبه با روش HPLC-DAD انجام شد. تجزیه واریانس همه صفات ریخت‌شناسی توسط نرم‌افزار IBM SPSS 26 و با استفاده از ANOVA یک‌طرفه انجام شد.

همبستگی ژنوتیپ‌ها و تجزیه PCA و نقشه پراکندگی بر طبق PC1/PC2، با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS رسم شد. مقادیر فاصله بر اساس روش اقلیدسی محاسبه و دندروگرام با استفاده از روش UPGMA توسط نرم‌افزار آماری NCSS12 تهیه شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بیش‌ترین غلظت فنول کل به ترتیب مربوط به ژنوتیپ کریمسون (۱۶/۹۴ میلی‌گرم اسید گالیک بر ۱۰۰ گرم)، رد گلوب (۱۳/۷۴ میلی‌گرم اسید گالیک بر ۱۰۰ گرم) و فلیم (۱۳/۵۸ میلی‌گرم اسید گالیک بر ۱۰۰ گرم) بود. در صورتی که، بیش‌ترین مقدار فلاونوئید کل مربوط به رقم فلیم (۳۶/۴۷ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم) و رد گلوب (۱۰/۰۵ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم) و بیش‌ترین مقدار آنتوسیانین کل در رقم سیاه قره‌باغ (۶/۵۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و قره‌شیره (۶/۰۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم) مشاهده شد. در بین ارقام مورد بررسی، کم‌ترین میزان فنول کل در ژنوتیپ صاحبی قوچان با ۲/۸۸ میلی‌گرم اسید گالیک بر ۱۰۰ گرم، کم‌ترین میزان فلاونوئید کل در ژنوتیپ قره‌شیره با ۴/۵۶ و همین‌طور کم‌ترین میزان آنتوسیانین کل در رقم فیلم با ۰/۲۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم دیده شد. مشتقات مالویدین (کفوییل گلوکوزاید) و نیز پئونیدین و سیانیدین در ۱۰۰٪ نمونه‌ها وجود داشتند. غلظت مالویدین در ژنوتیپ فلیم و رد گلوب در حد جزیی بود و در صاحبی ارومیه و لعل بیدانه مشاهده نشد؛ هم‌چنین، ترکیب پلارگونیدین و مشتقات آن شناسایی نشدند. بیش‌ترین غلظت آنتوسیانین منفرد مربوط به پئونیدین و مالویدین بود. نتایج هم‌چنین نشان داد که بیش‌ترین همبستگی مثبت و معنی‌دار بین دلفینیدین- ۶- استیل گلوکوزاید و سیانیدین-۶- استیل گلوکوزاید (r=۰/۹۹) بود. مالویدین بیش‌ترین همبستگی را با دلفیدین و پتونیدین نشان داد. بر اساس دندروگرام تجزیه خوشه‌ای، ۱۰ ژنوتیپ مورد مطالعه از نظر صفات آنتوسیانینی به دو گروه اصلی تقسیم شدند. گروه اول شامل دو رقم سیاه قره‌باغ و قره‌شیره بود که از گروه دوم فاصله داشتند.

نتیجه‌گیری: ارقام مورد مطالعه از نظر ترکیبات منفرد آنتوسیانینی و نیز میزان فنول، فلاونوئید و آنتوسیانین کل تفاوت‌های معنی‌داری نشان دادند. ترکیب پئونیدین و مالویدین بیش‌ترین غلظت را در این ژنوتیپ‌ها داشتند. ژنوتیپ سیاه قره‌باغ و قره‌شیره بیش‌ترین آنتوسیانین کل را نشان دادند.در رقم سیاه قره‌باغ، بیش‌ترین غلظت پئونیدین (۵۴/۰۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و در رقم قره‌شیره بیش‌ترین غلظت مالویدین (۴۲/۷۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک) شناسایی شدند. این دو رقم با فاصله از سایر ژنوتیپ‌ها در گروه مجزایی قرار گرفتند.

استناد: صادقیان، فاطمه، سیفی، اسماعیل، رمضانپور، سیده ساناز، سلامی، سید علیرضا (۱۴۰۲). شناسایی ترکیبات آنتوسیانینی در ۱۰ رقم انگور (*Vitis vinifera* L.) با روش HPLC-DAD. *نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی*، ۳۰ (۱)، ۲۴۲-۲۲۵.
DOI: 10.22069/JOPP.2022.20456.2956

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

پلی‌فنول‌ها دارای طیف وسیعی از ساختارهای پیچیده هستند که سبب تشکیل رنگ، بو و طعم میوه‌ها و سبزیجات می‌شوند (۱). این ترکیبات در کاهش استرس اکسیداتیو سلول (۲ و ۳)، جلوگیری از آسیب DNA و ترمیم آن، کند کردن رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی (۲ و ۴) و در بهبود بیماری‌های عروقی (۵)، میکروبی (۶ و ۷)، گوارشی (۸) و عملکرد سیستم ایمنی مؤثرند (۳ و ۴). محبوب‌ترین انواع پلی‌فنول‌های ضدسرطانی کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها، ایزوفلاون‌ها، فنول‌ها، ایزوتیوسیانات‌ها و آنتوسیانین‌ها هستند (۲ و ۴). فراوان‌ترین ترکیبات مؤثر در رنگ اکثر میوه‌ها و سبزیجات آنتوسیانین‌ها می‌باشند (۲). شش نوع مختلف آنتوسیانین‌ها بسته به ساختار مولکولی عبارتند از: سیانیدین، دلفینیدین، پلارگونیدین، پئونیدین، پتونیدین و مالویدین (۹ و ۱۰). مشتقات مالویدین و پتونیدین بنفش، مشتقات پئونیدین و سیانیدین قرمز و مشتقات دلفینیدین آبی هستند و شدت رنگ آن‌ها بستگی به مقدار آنتوسیانین موجود در پوست انگور دارد (۱۱). انباشت آنتوسیانین‌ها در انگور از مرحله رنگ‌گیری حبه یا دگرفامی[1] شروع می‌شود (۱۲). تنها مشتقات ۳ مونوگلوکوزید آنتوسیانین‌ها در انگور وجود دارند (۱۱). در حالی‌که مشتقات مختلف ۳،۵- دی-گلیکوزید و نیز سایر ترکیبات فنولی در انگورهای مختلف ثبت شده است (۹)، ولی به‌نظر می‌رسد که این توزیع متأثر از عواملی مانند گونه، رقم، درجه رسیدگی و شرایط محیطی طی فصل رشد است (۱۲ و ۱۳).

بوته انگور، که به آن تاک نیز می‌گویند، منبع مهمی از آنتی‌اکسیدان‌ها مانند ترکیبات فنولی است که غلظت آن‌ها در هنگام رسیدن تغییر می‌کند (۱۲). هر گروه از خانواده پلی‌فنول مستقیماً مسئول ویژگی‌های مهم ارقام خاص انگور و محصولات آن است (۱۴). کیفیت خوشه انگور و بازارپسندی آن تا حد زیادی به رنگ پوست وابسته است و هم‌چنین کیفیت آب‌میوه و محصولات فرآوری شده عمدتاً به دلیل رنگ پوست (۱۵) و ترکیب و محتوای آنتوسیانین‌ها تغییر می‌کند (۱۲، ۱۶ و ۱۷). ترکیب آنتوسیانین‌ها در درجه اول توسط عوامل ژنتیکی تعیین می‌شود. محتوای هر یک از آنتوسیانین‌ها در پوست انگور در هر رقم برای مدت معینی پایدار است و درصد آن از سالی به سال دیگر تفاوتی ندارد (۱۱ و ۱۸). در بلوبری (*Vaccinium* spp.) مقدار آنتوسیانین در یک ژنوتیپ رشد کرده در مناطق مختلف تفاوت زیادی نشان می‌دهد (۱۹). بنابراین، رنگ پوست یک عامل مهم در منابع ژرم‌پلاسم انگور است. مطالعه این ترکیبات سابقه طولانی دارد. ابتدا برای شناسایی آنتوسیانین‌ها، کروماتوگرافی کاغذی (PC) و کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) استفاده می‌شد (۲۰). سپس کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) به محبوب‌ترین و پرکاربردترین تکنیک برای تجزیه و تحلیل آنتوسیانین‌ها تبدیل شد (۲۱ و ۲۲). از مزایای HPLC، جداسازی قوی و قابلیت تشخیص فوری و حساسیت زیاد است و در چند دهه اخیر همراه طیف‌سنجی جرمی (۱۱، ۱۸ و ۲۳) و UHPLC-QqQ-MS (۲۴)، به یک ابزار مهم برای شناسایی آنتوسیانین تبدیل شده است.

در انگور، شاخص رسیدن بر اساس محتوای مواد محلول جامد، اسیدیته قابل تیتراسیون و پی‌اچ تعیین می‌گردد (۲۲) و از طرفی بدین‌منظور از رسیدن فنولی استفاده می‌شود که آنتوسیانین‌ها، تانن‌ها و کل فنول را در نظر می‌گیرند (۱۲). چندین نوع آنتوسیانین از چند رقم گزارش شده‌اند (۱۱، ۲۵ و ۲۶) و به علت کاربردهای گسترده و رو به رشد این ترکیبات در صنایع نساجی، دارویی، بهداشتی، آرایشی و غذایی، مطالعات بیش‌تری در مورد ویژگی‌های آنتوسیانینی و

1- Veraison

در کل ترکیبات فلاونوئیدی در ژنوتیپ‌های مختلف انگور در مناطق مختلف ضروری است (۴۰). هم‌چنین ایران یازدهمین تولیدکننده انگور در جهان است و سطح زیر کشت آن در سال ۲۰۱۸ حدود ۱۶۵۰۹۷ هکتار بوده است (۲۹) و تخمین زده می‌شود که حدود ۲۵۰ رقم از مجموع ۸۰۰–۱۰۰۰ ژنوتیپ انگور در ایران رشد می‌کنند (۲۷ و ۲۸)؛ بنابراین مطالعه ترکیبات آنتوسیانینی و محتوای آن‌ها در ژرم‌پلاسم ایرانی جنس *ویتیس* بسیار مهم است. این مطالعه با هدف بررسی تنوع ترکیبات منفرد آنتوسیانینی در برخی از ارقام رنگی انگور با استفاده از روش HPLC-DAD انجام شد. فنول، فلاونوئید و آنتوسیانین کل در ارقام بررسی شدند و تجزیه و تحلیل خوشه‌ای ارقام با توجه به ترکیبات آنتوسیانینی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه‌ها: نمونه‌های مورد مطالعه از انگورهای رنگی (قرمز و سیاه) بودند بنابراین در زمان رنگ‌گیری کامل از سه منطقه ایران برداشت شدند (جدول ۱). نمونه‌ها پس از برداشت بلافاصله به آزمایشگاه علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند. برای اندازه‌گیری آنتوسیانین، پوست حبه‌ها از گوشت جدا و به‌مدت ۴۸ ساعت در دستگاه خشک‌کن انجمادی (Freeze-dryer Operon Co Ltd,) قرار گرفت و تا زمان اندازه‌گیری در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین‌ها در آزمایشگاه شیمی در دپارتمان DISAFA دانشگاه تورین ایتالیا انجام شد. برای حمل نمونه‌ها از یخ خشک استفاده شد.

جدول ۱- مختصات جغرافیایی مکان‌های مورد مطالعه، سن و فاصله کاشت ارقام مورد مطالعه.

Table 1. Geographical characteristics of vineyards, age and distance of planting of studied cultivars.

ارقام Cultivars	ارتفاع از سطح دریا Altitude	طول جغرافیایی Longitude	عرض جغرافیایی Latitude	سن Age	فاصله کاشت Distance of planting	موقعیت در ایران Location in Iran
صاحبی قوچان Sahebi Ghoochan	1458	58°18'07.9"E	37°04'22.5"N	25	2×3	شرق East
فلیم Flame، کریمسون Crimson و رد گلوب Red globe	1320	50°56'49.3"E	35°46'20.3"N	15	2.5×3	مرکز Center
قره‌شیره Ghare shire، صاحبی ارومیه Sahebi urmia، سیاه قره‌باغ Syah Gharebagh، ریش‌بابا Rish baba، فلیم سیدلس Flame seedless و لعل بیدانه Lale bidane	1570	45° 28' 4.11" E	37° 9' 30.3" N	20-25	1.5×3	غرب West

اندازه‌گیری فنول، فلاونوئید و آنتوسیانین کل: میزان فنول کل در گوشت میوه با روش فولین سیوکالتو و با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-160) در طول موج ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و از اسید گالیک به عنوان استاندارد استفاده گردید (۱۷ و ۳۰). برای اندازه‌گیری فلاونوئید کل، از روش کالری‌متری آلومینیوم کلراید (۹) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۵ نانومتر استفاده شد. تعیین مقدار آنتوسیانین کل به روش وانگر (۳۱) صورت گرفت و بر حسب میلی‌گرم در کیلوگرم وزن تر میوه بیان گردید.

اندازه‌گیری ترکیبات آنتوسیانینی با HPLC-DAD: نمونه‌ها طبق روش کدرینا-اوکوتان (۳۲) آماده و تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. از استاندارد مالویدین ۳- اُ - گلوکوزید، دلفینیدین ۳- اُ- گلوکوزید و سیانیدین ۳- اُ- گلوکوزید، از Extrasynthèse (جنای، فرانسه)، استفاده شد و در مجموع ۱۵ ترکیب آنتوسیانینی با روش HPLC-DAD در طول موج ۵۲۰ نانومتر شناسایی شد (جدول ۲). عصاره‌های پوست حبه با اسید فسفریک رقیق شده و با فیلتر (۰/۲۰ میکرومتر) در داخل وایال‌های ۱ میلی‌لیتری تزریق شدند. سپس نمونه‌ها در اتوسمپلر HPLC قرار گرفته و آماده تزریق شدند. تجزیه و تحلیل کمی آنتوسیانین‌ها توسط یک سری سیستم Agilent 1200 (Agilent، Waldbronn، آلمان)، مجهز به ردیاب (DAD G1316A)، با تزریق ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌ها انجام شد. آنتوسیانین‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر تشخیص داده شدند و نتایج به صورت میلی‌گرم معادل هر کیلوگرم حبه در وزن خشک گزارش شد.

تجزیه آماری: تجزیه واریانس همه صفات توسط نرم‌افزار IBM SPSS Ver. 26 و با استفاده از ANOVA یک‌طرفه انجام شد. بررسی همبستگی ژنوتیپ‌ها (Correlation coefficient Pearson)، تجزیه به مؤلفه‌ها (PCA) بر طبق PC1/PC2 و نقشه پراکندگی با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS صورت گرفت. میانگین پارامترها قبل از تجزیه و تحلیل خوشه‌ای نرمال شد تا از تأثیرات ایجاد مقیاس‌های مختلف جلوگیری شود. مقادیر فاصله بر اساس روش اقلیدسی محاسبه شد و دندروگرام با استفاده از روش UPGMA توسط نرم‌افزار آماری NCSS 12 رسم گردید.

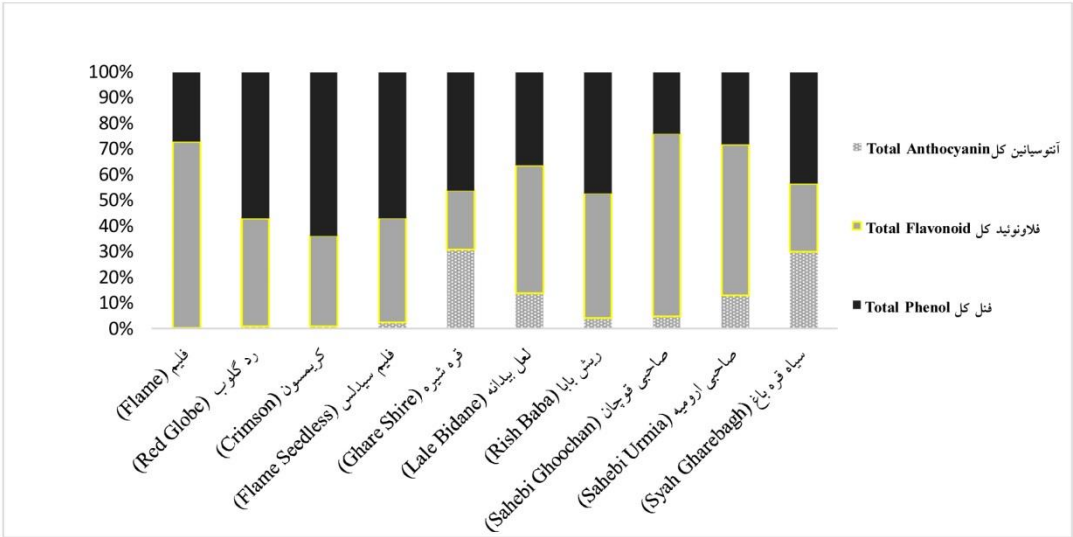
نتایج و بحث

ترکیبات پلی‌فنولی به عنوان متابولیت‌های ثانویه غالب در گونه‌های انگور می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای مفید در کموتاکسونومی *V. vinifera* استفاده شوند، زیرا ترکیبات آن‌ها در انگور تحت‌تأثیر عوامل ژنتیکی است (۱۴ و ۲۷). با توجه به ویژگی‌های بیولوژیک ارگانولپتیک (رنگ، گسی و تلخی)، فلاونول‌ها، استیلبن‌ها و آنتوسیانین‌ها در انگور نقشی کلیدی در کیفیت آب‌میوه و عصاره آن بازی می‌کنند (۲۵ و ۳۲). رقم و سال رشد در مشخصات آنتوسیانین‌ها و نیز در خصوصیات بیوشیمیایی (۳۳ و ۳۴) ارقام نقش دارند، اما بیش‌تر تحت‌تأثیر مشخصات ژنتیکی رقم و تا حدودی عملیات باغبانی قرار می‌گیرد (۳۴، ۳۵ و ۳۶).

غلظت فنول، فلاونوئید و آنتوسیانین کل: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین ارقام مورد بررسی از نظر غلظت فنول، فلاونوئید و آنتوسیانین کل در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشت. ارقام در مقدار آنتوسیانین کل تفاوت بیش‌تری نشان دادند (P-value در جدول ۲ گزارش شده است). بیش‌ترین مقدار فنول کل مربوط به ارقام کریمسون، رد گلوب و فلیم به ترتیب با ۱۶/۹۴، ۱۳/۷۴ و ۱۳/۵۸ میلی‌گرم اسید گالیک بر ۱۰۰ گرم بود (جدول ۲). در

صورتی که بیش‌ترین مقدار فلاونوئید کل مربوط به رقم فلیم (۳۶/۴۷ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم) و بیش‌ترین مقدار آنتوسیانین کل در رقم سیاه قره‌باغ، قره‌شیره و لعل بیدانه به ترتیب با ۶/۵۹ ۶/۰۹ و ۳/۵۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد (جدول ۲). در بین ارقام مورد بررسی، کم‌ترین میزان فنول کل در ژنوتیپ صاحبی قوچان با ۲/۸۸ میلی‌گرم اسید گالیک بر ۱۰۰ گرم، کم‌ترین غلظت فلاونوئید کل در ژنوتیپ قره‌شیره با ۴/۵۶ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم و همین‌طور کم‌ترین میزان آنتوسیانین کل در رقم فیلم با ۰/۲۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد (جدول ۲). همان‌طور که در بالا ذکر شد، بین میزان رنگ و آنتوسیانین ارتباط وجود دارد. در یک مطالعه دیگر، در ژنوتیپ کابرنت ساوینیون و کابرنت گرنیشت با رنگ پوست بنفش تیره مقدار آنتوسیانین بالاتری نسبت به رقم رد گلوب با رنگ پوست قرمز گزارش شده است (۳۷).

حبه انگور با توجه به مقدار و ترکیب آنتوسیانین طیف گسترده ای از رنگ‌ها را از سبز/زرد تا آبی تیره نشان می‌دهد. آنتوسیانین‌های مشتق شده از سیانیدین منجر به تولید رنگ قرمز و دلفینیدین منجر به ایجاد رنگ آبی در حبه‌ها می‌شوند (۳۶ و ۳۸). در دهه‌های اخیر، مطالعات بسیاری در مورد کنترل ژنتیکی رنگ حبه انگور در ارقام اروپایی، آمریکایی و آسیایی انجام شده است. ژن‌های متصل به DNA، برای چندین فاکتور رونویسی، از جمله ترکیبات هاپلوتیپ MYBA1 و MYBA2 در لوکوس مربوط به رنگ، تعیین‌کننده کلیدی تنوع آنتوسیانین و توسعه رنگ در پوست حبه انگور هستند. هم‌چنین رتروترانسپوزون در ناحیه پروموتر MYBA1 و جهش در توالی کدکننده MYBA2 منجر به رنگ سفید پوست شد؛ هاپلوتیپ‌های MYB بر نسبت آنتوسیانین‌های تری/دی هیدروکسیله و آنتوسیانین‌های متیله/غیرمتیله از طریق تنظیم چندین ژن ساختاری دخیل در بیوسنتز آنتوسیانین تأثیر می‌گذارند که منجر به رنگ‌های متنوع می‌شود (۳۸).



شکل ۱- پروفیل فنول، فلاونوئید و آنتوسیانین کل در ارقام مورد بررسی.

Fig. 1. Profile of total phenol, flavonoid and anthocyanin in the studied cultivars.

جدول ۲- محتوای فنول، فلاونوئید و آنتوسیانین کل در ارقام مورد بررسی.

Table 2. Content of total phenol, flavonoid and anthocyanin in the studied cultivars.

ژنوتیپ Genotype	رنگ حبه Color	فنول کل Total Phenol mg GAE 100 g^{-1}	فلاونوئید کل Total Flavonoid mg 100g^{-1}	آنتوسیانین کل Total anthocyanin mg kg^{-1}
P-value		P<0.001	*P*<0.001	*P*<0.001
فلیم (Flame)	Red قرمز	13.58±0.06 [b]	36.47±0 [a]	0.23±0 [f]
رد گلوب (Red globe)	Rouge ارغوانی	13.74±0.1 [b]	10.05±0.22 [c]	0.27±0 [f]
کریمسون (Crimson)	Red قرمز	16.94±0 [a]	9.3±0.0 [d]	0.3±0 [f]
فلیم سیدلس (Flame seedless)	Red قرمز	13.34±0 [b]	9.49±0 [cd]	0.61±0 [e]
قره‌شیره (Ghare shire)	Black سیاه	9.14±0 [c]	4.56±0 [h]	6.09±0.09 [b]
لعل بیدانه (Lale bidane)	Black سیاه	9.34±0.2 [c]	12.85±0 [b]	3.58±0.01 [c]
ریش‌بابا (Rish baba)	Rouge ارغوانی	8.04±0.05 [d]	8.25±0.01 [f]	0.73±0.01 [e]
صاحبی قوچان (Sahebi Ghoochan)	Red قرمز	2.88±0.13 [f]	8.56±0.3 [ef]	0.58±0.05 [e]
صاحبی ارومیه (Sahebi urmia)	Black سیاه	4.38±0.07 [e]	9.14±0.24 [de]	2.01±0.01 [d]
سیاه قره‌باغ (Syah Gharebagh)	Black سیاه	9.52±0.13 [c]	5.8±0.03 [g]	6.59±0.03 [a]

در هر ستون، مقادیر با حروف یکسان تفاوت معنی‌دار ندارند

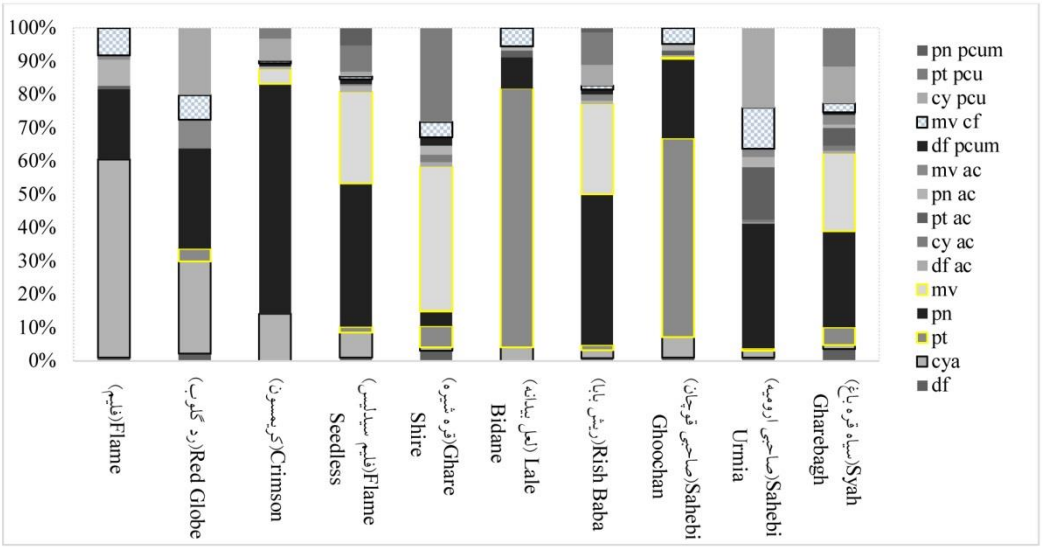
In each column, the values with the same letter don't have any significant differences

بررسی کمیت و کیفیت ترکیبات آنتوسیانینی: ترکیبات فنولی انگور، به ویژه آنتوسیانین‌ها، به طور گسترده برای اهداف طبقه‌بندی استفاده می‌شوند (۲۳ و ۳۹). ترتیب شستشوی آنتوسیانین‌ها در فاز معکوس به درجه قطبیت آن‌ها مرتبط است، به طوری که ترکیبات قطبی‌تر زودتر آشکار می‌شوند. قطبیت آنتوسیانین‌ها به درجه هیدروکسیل شدن و متیلاسیون از حلقه بنزن وابسته بوده و با افزایش گروه‌های هیدروکسیلی قطبیت آن‌ها بیش‌تر می‌شود. اولین آنتوسیانین شناسایی‌شده دلفینیدین بوده و به دنبال آن سیانیدین، پتونیدین، پئونیدین و مالویدین آشکار می‌شوند (۴۰). فهرست ۱۵ ترکیب آنتوسیانینی شناسایی شده (پنج مونوگلوکوزید آنتوسیانین و مشتقات آن‌ها)، به ترتیب زمان بازداری در جدول ۳ آمده است. آنتوسیانین‌ها در ارقام رنگی انگور در مرحله رنگ‌گیری حبه ظاهر می‌شوند و سپس به‌تدریج در طول رشد تا مرحله بلوغ و رسیدن انباشته شده و در صورت مناسب بودن شرایط محیطی به حداکثر مقدار خود می‌رسند (۱۲ و ۲۶). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که ارقام مورد بررسی در اغلب فاکتورها در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌دار داشتند، ولی در مالویدین، پئونیدین، پئونیدین کوماریل گلوکوزاید، سیانیدین کوماریل گلوکوزاید، مالویدین کفوییل گلوکوزاید، پتونیدین کوماریل گلوکوزاید و دلفینیدین ۳-کوماریل گلوکوزاید تفاوت معنی‌داری نشان ندادند (P-value در جدول ۳ گزارش شده است). در شکل ۲، پروفیل ترکیبات آنتوسیانینی شناسایی شده آمده است.

در مطالعه حاضر، فراوانی ترکیبات آنتوسیانینی در ارقام مورد مطالعه عبارت بودند از: مونوگلوکوزیدهای دلفینیدین (۴۰ درصد)، سیانیدین (۳۰ درصد)، ترکیبات مزدوج مربوط به آن‌ها، از جمله استیل، کوماروئیل و کفوئویل‌ها، دلفینیدین ۳- کوماریل گلوکوزاید (۴۰ درصد)، پتونیدین ۳- کوماریل گلوگوزاید (۴۰ درصد) و پئونیدین ۶- کوماریل گلوگوزاید (۲۰ درصد) که در ارقام کم‌تری مشاهده

شدند. ترکیب پلارگونیدین و مشتقات آن شناسایی نشدند، اگرچه وجود آن‌ها در محصولات فرآوری شده انگور توسط نویسندگان دیگر گزارش شده است (۱۷) و نیز در انگور تازه‌خوری بی.ار.آس- ویتوریا، از ارقام جدید هیبریدی (*Vitis* sp.) به مقدار جزئی (۳۳) و هم‌چنین در *V. rotundifolia* و *V. labrusca* (۱۷)، گزارش شده‌اند. مشتقات مالویدین (کفوییل گلوکوزاید) و نیز پئونیدین و سیانیدین در ۱۰۰ درصد نمونه‌ها وجود داشت. غلظت مالویدین در ژنوتیپ فیلم و رد گلوب در حد جزیی بود و در صاحبی ارومیه شناسایی نشد (جدول ۳). پئونیدین و مالویدین بالاترین غلظت را در بین ترکیبات آنتوسیانینی شناسایی شده به ترتیب با ۵۴/۰۸ و ۴۴/۲۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک در رقم سیاه قره‌باغ نشان دادند (جدول ۳ و شکل ۲). دو ترکیب پتونیدین (کافئویل و استیل) در انواع عصاره و آب‌میوه‌ها شناسایی شده‌اند، اما در انگورهای تازه‌خوری کم‌تر گزارش شده‌اند. ترکیب پتونیدین بیش‌ترین میزان را با ۲۶/۳۶ و ۲۴/۶۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک، به ترتیب در رقم صاحبی قوچان و لعل بیدانه نشان داد و هم‌چنین ترکیب غالب آنتوسیانینی در ارقام ذکر شده بود. در شکل ۳، کروماتوگرام خروجی HPLC-DAD برای دو رقم قره‌شیره و کریمسون نمایش داده شده است.

محتوای کل آنتوسیانین در گونه‌های وحشی بیش‌تر از هیبریدهای بین‌گونه‌ای گزارش شده است. در انگورهای مختص فرآوری (کابرنت ساوینیون و مرلو) نسبت به انگورهای تازه‌خوری در همان گونه‌ها، مقدار پلی‌فنول‌ها بالاتر و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیش‌تری وجود داشت (۳۷). مشتقات مالویدین در انگور غالب هستند (۱۴) و مشتقات پئونیدین نیز از فراوان‌ترین آنتوسیانین‌ها در اکثر انگورهای تازه‌خوری و فرآوری گزارش شده‌اند (۱۷). با توجه به تحلیل‌های انجام شده در این پژوهش، مالویدین و پئونیدین از نظر میزان غلظت غالب هستند. بیش‌ترین مقدار آنتوسیانین در رقم فلیم، سیانیدین با ۲۶/۹، در لعل بیدانه، پتونیدین با ۲۶/۳۶ و در کریمسون، پئونیدین با ۵/۰۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک دیده شد.



شکل ۲- پروفیل ترکیبات متفاوت آنتوسیانینی در ژنوتیپ‌های مورد بررسی.

Fig. 2. Profile of different anthocyanin individual compounds in the studied cultivars.

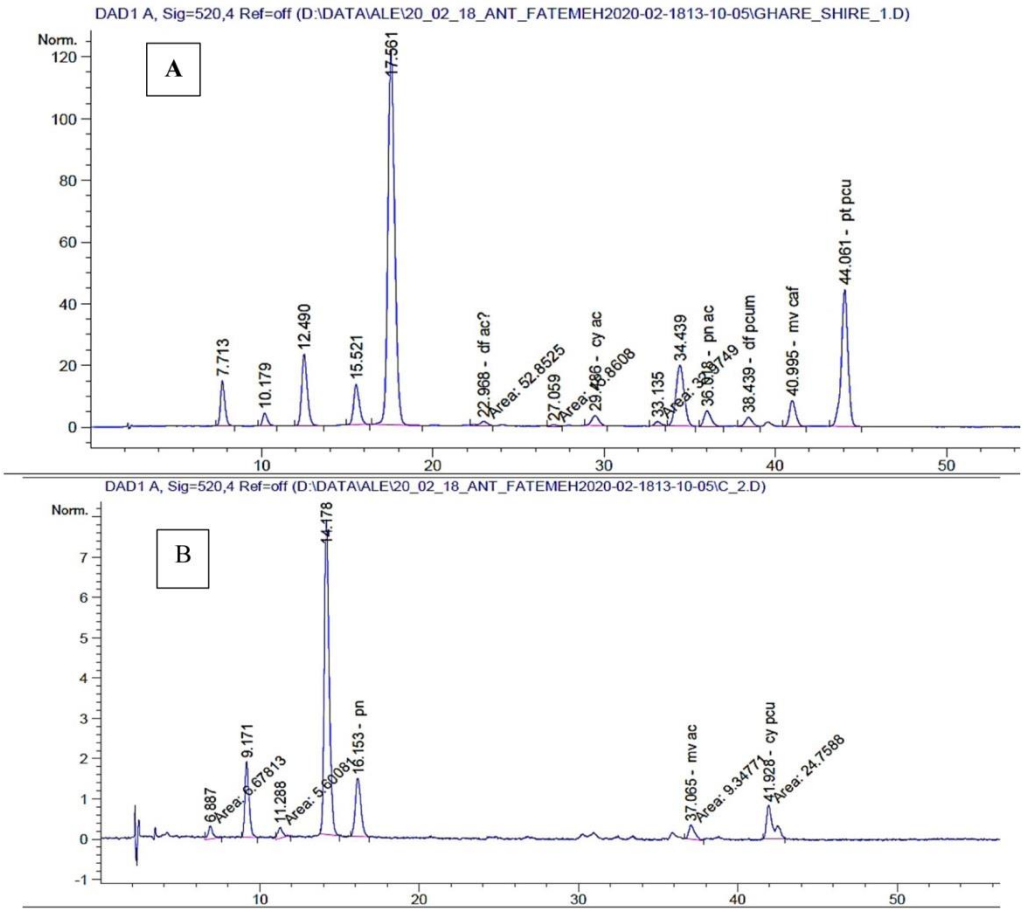
جدول ۳- ترکیبات آنتوسیانینی شناسایی شده با HPLC-DAD در پوست حبه ارقام متفاوت انگور.

Table 3. Average contents of anthocyanin compounds identified by HPLC-DAD in the skins of different grape Cultivars.

سیاه قره‌باغ Syah Gharebagh	صاحبی ارومیه Sahebi Urum	صاحبی قوچان Sahebi Ghoochan	ریش بابا Rish Baba	لعل بی‌دانه Lale Bidane	قره‌شیره Ghare Shire	فلیم سیدلس Flame Seedless	کریمسون Crimson	رد گلوب Red Globe	فلیم Flame	P-value	نام اختصاری Abbreviation code	زمان بازداری Retention time	ترکیبات آنتوسیانینی Anthocyanin compounds
7.02±3.64 a	1.05±0.2 ab	0.42±0.22 b	0.47±0.13 b	0±0 b	3.17±1.29 ab	0.65±0.06 b	0±0 b	0.04±0.04 b	0.16±0.16 b	P=0.01	df	7.5	Delphinidin
2.02±1.01 b	2.46±0.37 b	2.58±0.09 b	1.45±0.29 b	1.42±0.33 b	0.93±0.4 b	4.78±1.02 ab	1.03±0.63 b	0.54±0.12 b	9.26±3.38 a	P<0.001	cya	10.22	Cyanidin
10.11±5.63 ab	0.67±0.67 b	24.66±11.87 a	0.86±0.21 b	26.36±4.09 a	6.27±2.85 ab	1.1±0.16 b	0±0 b	0.08±0.04 b	0±0 b	P<0.001	pt	12.29	Petunidin
54.08±48.59 a	40.13±4.79 a	9.86±2.88 a	26.26±4.97 a	3.14±0.62a	4.44±1.18 a	27.32±12.27 a	5.01±3.15 a	0.58±0.18 a	3.29±1.19 a	P=0.28	pn	15.28	Peonidin
44.26±44.26 a	0±0 a	0.25±0.25 a	15.68±2.75 a	0±0 a	42.78±18.39 a	17.31±8.24 a	0.32±0.32 a	tr	tr	P=0.27	mv	17.4	Malvidin
1.54±0.77 a	0.44±0.07 abc	0.21±0.21 bc	0±0 c	0±0 c	1.38±0.12ab	0±0 c	0±0 c	0±0 c	0±0 c	P<0.001	df ac	18.74	Delphinidin 6-Acetyl-Glucoside
2.79±1.4 a	0.74±0.11 ab	0±0 b	0±0 b	0±0 b	2.17±0.08 ab	0±0 b	0±0 b	0±0 b	0±0 b	P<0.001	cy ac	23.15	Cyanidin 6-Acetyl-Glucoside
10.06±10.06 ab	16.94±1.6 a	0.56±0.38 b	0±0 b	0.73±0.01 b	0±0 b	0±0 b	0±0 b	0±0 b	0.16±0.16 b	P=0.01	pt ac	28.9	Petundin 6-Acetyl-Glucoside
1.66±0.94 abc	3.38±0.17 a	0.78±0.09 bc	0.58±0.09 c	0.31±0.05 c	2.67±0.38 ab	1.15±0.29 bc	0.06±0.06 c	0±0 c	1.2±0.64 pn	P<0.001	pn ac	32.79	Peonidin 6-Acetyl-Glucoside
5.39±2.88 a	2.53±0.15 ab	0±0 b	1.02±0.3 ab	0.08±0.08 b	0±0 b	0.34±0.34 b	0±0 b	0.17±0.03 b	0.21±0.21b	P=0.01	mv ac	35.70	Malvidin 6-Acetyl-Glucoside
1.5±1.5 a	0±0 a	0±0 a	0.86±0.21 a	0±0 a	2.38±0.44 a	1±0.32 a	0.06±0.06 a	0±0 a	0±0 a	P=0.3	df pcum	38.45	Delphinidin-3-Comaryl Glucoside
5.16±3.45 a	13.33±12.05 a	2±0.78 a	0.68±0.16 a	1.88±0.28 a	4.74±0.93 a	0.49±0.25 a	0.06±0.06 a	0.14±0.14 a	1.27±0.4 a	P=0.45	mv cf	39.43	Malvidin Caffeoyl Glucoside
20.75±20.75 a	25.65±12.93 a	0±0 a	3.69±1.84 a	0±0 a	0.1±0.1 a	0.89±0.45 a	0.48±0.48 a	0.39±0.19 a	0±0 a	P=0.2	cy pcu	41	Cyanidin -3-Comaryl Glucoside
21.68±21.68 a	0±0 a	0±0 a	5.53±1.42 a	0±0 a	27.52±4.52 a	4.96±2.91 a	0.23±0.23 a	0±0 a	0±0 a	P=0.09	pt pcu	43.83	Petunidin -3-Comaryl Glucoside
0±0 a	0±0 a	0±0 a	0.81±0.81 a	0±0 a	0±0 a	3.31±3.31 a	0±0 a	0±0 a	0±0 a	P=0.51	pn pcum	44.38	Peonidin 6-Comaryl Glucoside
188.03	107.32	41.31	57.89	33.93	98.55	63.30	7.256	1.93	15.5				مجموع آنتوسیانین‌ها Sum anthocyanins

مقادیر به صورت میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک حبه انگور (پوست) بیان شده‌اند. انحراف معیار در پرانتز گزارش شده است (n=۳). "tr" به معنی غلظت جزئی است. در هر ردیف، مقادیر با حروف یکسان تفاوت معنی‌داری ندارند

Values expressed as mg kg^{-1} DW of grape berry (skin). Standard deviation is reported in parentheses (n =3). "tr" means the value is trace. In each row, the values with the same letter don't have any significant differences



شکل ۳- کروماتوگرام (λ=۵۲۰) ترکیبات آنتوسیانینی پوست حبه در دو ژنوتیپ قره شیره (A) و کریمسون (B) با استفاده از HPLC-DAD.

Fig. 3. Chromatogram (λ=520) of "Ghare Shire" (A) and "Crimson" (B) grape skin using HPLC-DAD.

مشخص شده است که الگوی آنتوسیانین نه تنها بر رنگ انگور، بلکه بر پتانسیل آنتی‌اکسیدانی آن نیز تأثیر می‌گذارد. برای نمونه، وجود مالویدین و پئونیدین به عنوان عامل مثبت در نظر گرفته می‌شود، زیرا ساختار شیمیایی آن‌ها شامل گروه‌های هیدروکسیل (مانند سایر آنتوسیانیدین‌ها) بوده و در برابر اکسیداسیون مقاومت بالاتری داشته و در نتیجه در پایداری زیاد آن‌ها نقش دارند (۳۱). آسیلاسیون در موقعیت C۶ مولکول گلوکز، با استری کردن توسط اسیدهای استیک، p-کوماریک و کافئیک رخ می‌دهد (۹) و هم‌چنین به‌نظر می‌رسد که گلیکوزیلاسیون و استیلاسیون آنتوسیانیدین‌ها می‌توانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهند (۲۰). با توجه به این‌که اشکال گلیکوزیله و استیله مالویدین و پئونیدین در برخی از انگورهای تازه‌خوری نسبتاً فراوان هستند، احتمال این‌که این ژنوتیپ‌ها بتوانند منبع خوبی از نظر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی باشند زیاد است. گزارش شده است که حضور آنتوسیانین و غلظت آن در حبه‌ها ارتباط زیادی با اثرات مثبت آن‌ها در سلامت انسان، از جمله عوامل خطرناک قلبی- عروقی، دارد (۵ و ۴۱).

همبستگی ترکیبات آنتوسیانینی: طبق نتایج، بیش‌ترین همبستگی مثبت و معنی‌دار را دلفینیدین-۶-استیل‌گلوکوزاید با سیانیدین-۶- استیل‌گلوکوزاید (r=۰/۹۹)، پتونیدین-۶-استیل‌گلوکوزاید با سیانیدین-

۳- کوماریل‌گلوگوزاید (r=۰/۹۷) و هم‌چنین مالویدین با پتونیدین ۳- کوماریل‌گلوگوزاید (r=۰/۹۷) نشان دادند (جدول ۴). هم‌چنین، مالویدین همبستگی بالایی با دلفنیدین و پتونیدین-۶-استیل‌گلوکوزاید نشان داد. بررسی همبستگی بین ترکیبات پلی‌فنولی مختلف و آنتوسیانینی در سیب‌زمینی، مرکبات و آرابیدوپسیس در برخی منابع به طور مفصل بررسی شده است (۱۰، ۴۲ و ۴۳). گزارش شده است که در ارقام سیب‌زمینی یک همبستگی مثبت و قوی بین دو آنتوسیانین دلفنیدین ۳-p-کوماروئیل روتینوزید-۵-گلوکوزید و پئونیدین ۳-p-کوماروئیل روتینوزید-۵-گلوکوزید وجود دارد (۱۰).

جدول ۴- ضرایب همبستگی (پیرسون) صفات آنتوسیانینی اندازه‌گیری‌شده در ارقام مورد مطالعه.

Table 4. Correlation coefficients (Pearson) between measured traits in studied cultivars.

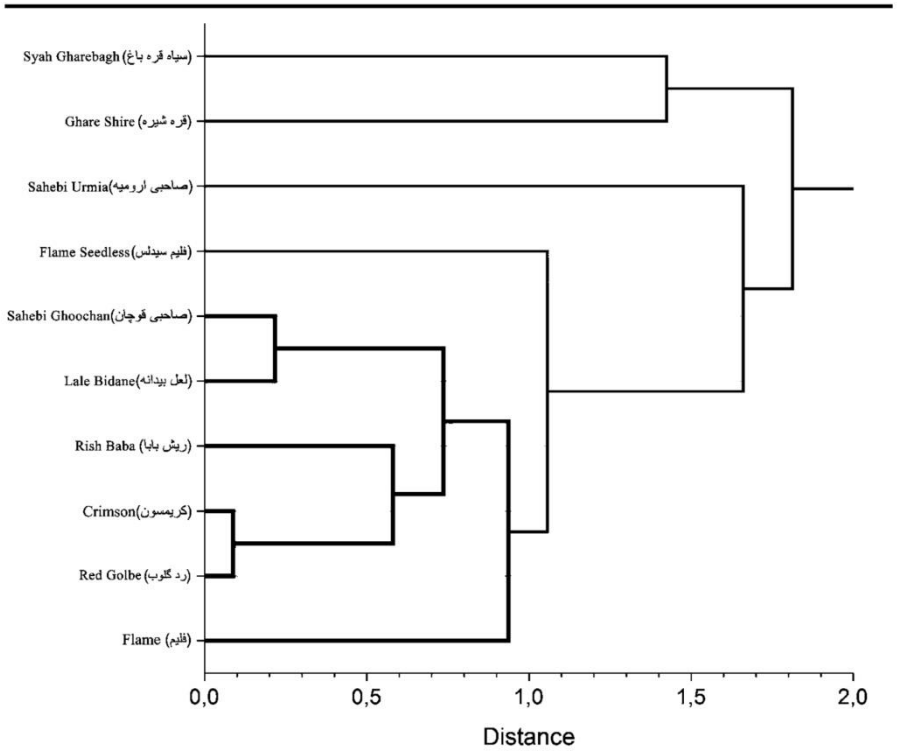
	df	cya	pt	pn	mv	df ac	cy ac	pt ac	pn ac	mv ac	df pcum	mv cf	cy pcu	pt pcu
df	1													
cya	-0.158	1												
pt	0.058	-0.206	1											
pn	0.659*	-0.033	-0.140	1										
mv	0.862**	-0.198	-0.055	0.459	1									
df ac	0.925**	-0.243	0.084	0.469	0.872**	1								
cy ac	0.951**	-0.228	0.024	0.522	0.879**	0.991**	1							
pt ac	0.442	-0.068	-0.098	0.754*	0.109	0.409	0.444	1						
pn ac	0.444	0.111	-0.171	0.491	0.416	0.611	0.592	0.702*	1					
mv ac	0.822**	-0.083	-0.054	0.897**	0.511	0.632*	.696*	0.759*	0.416	1				
df pcum	0.694*	-0.204	-0.113	0.293	0.959**	0.780**	0.770**	-0.032	0.435	0.279	1			
mv cf	0.349	-0.084	-0.047	0.558	0.141	0.463	0.462	0.916**	0.879**	0.533	0.093	1		
cy pcu	0.560	-0.097	-0.148	0.853**	0.239	0.478	0.526	0.978**	0.655*	.865**	0.074	0.848**	1	
pt pcu	0.827**	-0.240	-0.019	0.315	0.973**	0.914**	0.905**	0.089	0.469	0.415	0.957**	0.190	0.190	1
pn pcum	-0.134	0.246	-0.252	0.228	0.120	-0.260	-0.238	-0.212	-0.055	-0.126	0.205	-0.263	-0.170	-0.040

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

* and ** Correlation is significant at the 0.05 and 0.01 levels, respectively

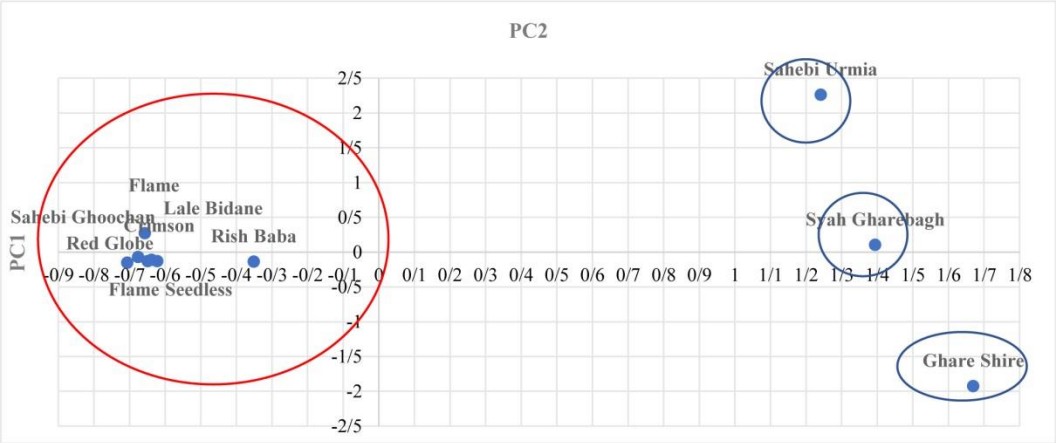
تجزیه خوشه‌ای و تجزیه و تحلیل مؤلفه (PCA): با توجه به دندروگرام UPGMA حاصل از تجزیه خوشه‌ای (شکل ۴)، ۱۰ ژنوتیپ رنگی مورد مطالعه در صفات آنتوسیانینی به دو گروه اصلی تقسیم شدند. گروه اول شامل دو رقم سیاه قره‌باغ و قره‌شیره بود که با فاصله دورتری از هشت رقم دیگر قرار گرفتند. نزدیک‌ترین ژنوتیپ‌ها کریمسون با رد گلوب و صاحبی قوچان با لعل بیدانه بودند. این تحلیل برای درک بهتر رابطه بین تنوع و غلظت آنتوسیانین در ارقام انگور انجام شد (شکل ۵ و جدول ۵)، سه جزء اصلی اول (PC 1-3)، ۸۸/۸۴ درصد از کل واریانس را تبیین کردند. این تجزیه نشان داد که می‌توان انواع انگور را بر اساس غلظت‌های آنتوسیانین منفرد شناسایی کرد. در PC1، اکثر متغیرهای آنتوسیانینی

به‌جز سیانیدین، پتونیدین و پئونیدین کوماریل گلوگوزاید در ۱۰ ژنوتیپ مورد مطالعه رابطه مثبت و بالاتر از حد ۰/۵۵۵ نشان دادند (جدول ۵). در شکل و جدول ۵، ژنوتیپ‌ها در چهار گروه قرار گرفته و در محور PC2 ژنوتیپ قره‌شیره رابطه منفی و بالایی (۰/۶۸۶-) در میزان دلفینیدین- ۳-کوماریل گلوکوزاید (۲/۸۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک) نشان داد. در نتیجه، آنتوسیانین‌ها می‌توانند نشانگرهای مفیدی برای تشخیص انواع انگور در نظر گرفته شوند. از طرفی استفاده از این ابزار طبقه‌بندی بهتر است با احتیاط صورت گیرد، زیرا غلظت آنتوسیانین نه تنها تحت‌تأثیر عوامل ژنتیکی است، بلکه عواملی مانند عملیات زراعی، بلوغ، مرحله رسیدن، آب و هوا و سطح تنش نیز در مقدار و حضور آن‌ها مؤثر هستند (۳۶). ده ژنوتیپ مورد بررسی از سه مکان جغرافیایی متفاوت نمونه‌برداری شده بودند، اما بر اساس تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌ها در گروه‌های متفاوتی تفکیک نشدند، اما در مورد دو رقم صاحبی قوچان و ارومیه فاصله و تفاوت وجود داشت. با توجه به این‌که این دو رقم تفاوت‌های مورفولوژیکی در ویژگی رنگ حبه و برگ داشتند (نتایج ارائه نشده است)، بدون انجام تجزیه مولکولی نمی‌توان از یکسان بودن آن‌ها اطمینان حاصل کرد. بر روی پایگاه داده Vitis International Variety Catalog اطلاعات دو رقم متفاوت با نام صاحبی با رنگ پوست حبه متفاوت و نیز تمایز در طول آلل‌ها ناشی از تجزیه SSR ثبت شده است. نتایج مطالعه حاضر در مورد ترکیبات آنتوسیانینی ارقام مرغوب در نقاط مختلف ایران در زمان برداشت با درجه بریکس بین ۱۹ تا ۲۲ اطلاعات مفیدی حاصل کرده است.



شکل ۴- دندروگرام UPGMA ترکیبات متفاوت آنتوسیانینی در ژنوتیپ‌های مورد بررسی.

Fig. 4. Dendrogram of different anthocyanin compounds in the studied cultivars.



شکل ۵- توزیع ۱۰ ژنوتیپ بررسی‌شده برای دو جزء اصلی (PC1 و PC2) حاصل PCA، بر مبنای داده‌های HPLC-DAD.

Fig. 5. Distributions of the 10 grape cultivars in the two-dimensional space of principle component PC1 and PC2 of PCA based on HPLC-DAD.

جدول ۵- تجزیه PCA صفات آنتوسیانینی ۱۰ ژنوتیپ انگور.

Table 5. PCA analysis on anthocyanin traits of 10 grapevine cultivars.

	PC 1	PC 2	PC3
df	0.889**	-0.278	0.042
cya	0.060	0.598**	-0.041
pt	-0.034	-0.226	-0.760**
pn	0.663**	0.628**	0.213
mv	0.752**	-0.642**	0.126
df ac	0.915**	-0.384	-0.058
cy ac	0.931**	-0.345	-0.034
pt ac	0.598**	0.789**	-0.059
pn ac	0.863**	0.194	-0.066
mv ac	0.665**	0.552**	0.109
df pcum	0.691**	-0.686**	0.123
mv cf	0.717**	0.555**	-0.155
cy pcu	0.637**	0.760**	0.029
pt pcu	0.743**	-0.658**	0.041
pn pcum	-0.269	-0.060	0.798**
Eigenvalues	7.071	4.318	1.344
Total variance (Cumulative %)	47.141	75.924	84.887

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه، در مجموع پانزده مونوگلوکوزید آنتوسیانین و ترکیبات مشتق شده آن‌ها در ۱۰ رقم بررسی شد. ارقام مورد مطالعه از نظر ترکیبات منفرد آنتوسیانینی و نیز میزان فنول، فلاونوئید و آنتوسیانین کل تفاوت‌های معنی‌داری نشان دادند. ترکیب پئونیدین و مالویدین و ترکیبات استری و استیلی آن‌ها در ژنوتیپ‌ها بیش‌ترین غلظت را نشان دادند. بر اساس تجزیه خوشه‌ای و PCA، ژنوتیپ‌ها در گروه‌های متفاوتی تفکیک شدند. ارقام سیاه قره‌باغ و قره‌شیره بیش‌ترین آنتوسیانین کل و پئونیدین را نشان داده و در تجزیه‌های مربوط به طبقه‌بندی (تجزیه خوشه‌ای و PCA) با فاصله از سایر ارقام و در گروه‌های مجزایی قرار گرفتند. به علت کاربردهای گسترده و رو به رشد این ترکیبات در صنایع نساجی، دارویی، بهداشتی، آرایشی و غذایی، مطالعات بیش‌تری در مورد ویژگی‌های آنتوسیانینی و در کل ترکیبات فلاونوئیدی در ژنوتیپ‌های مختلف انگور در مناطق مختلف ضروری است (۴۱).

منابع

1. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. and Jiménez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. Am. J. Clin. Nutr. 79: 727-747.
2. Ali, K., Maltese, F., Choi, Y.H. and Verpoorte, R. 2010. Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. Phytochem. Rev. 9: 357-378.
3. Archivio, D., Filesi, M., Di Benedetto, C., Gargiulo, R., Giovannini, R. and Masella, C.R. 2007. Polyphenols, Dietary Sources and Bioavailability. Ann. Ist. Super. Sanita, 43: 348.
4. Abbas, M., Saeed, F., Anjum, F.M., Afzaal, M., Tufail, T., Bashir, M.S., Ishtiaq, A., Hussain, S. and Suleria, H.A.R. 2017. Natural polyphenols: An overview. Int. J. Food Prop. 20: 8. 1689-1699.
5. Hooper, L., Kroon, P.A., Rimm, E.B. Cohn, J.S., Harvey, I., Le Cornu, K.A., Ryder, J.J., Hall, W.L. and Cassidy, A. 2008. Flavonoids, Flavonoid-Rich Foods, and Cardiovascular Risk: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. Am. J. Clin. Nutr. 88: 38-50.
6. Radovanović, B.C., Anđelković, S.M., Radovanović, A.B. and Anđelković, M.Z. 2013. Antioxidant and antimicrobial activity of polyphenol extracts from wild berry fruits grown in southeast Serbia. Trop. J. Pharm. Res. 12: 5. 813-819.
7. Turkmen, F.U., Takci, H.A.M. and Sekeroglu, N. 2017. Total phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of traditional unripe grape products. Indian J. Pharm. Educ. Res. 51: 489-493.
8. Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D. and Conte, A. 2010. *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. Food Chem. 120: 2. 599-606.
9. Goufo, P., Singh, R.K. and Cortez, I. 2020. A Reference List of Phenolic Compounds (Including Stilbenes) in Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Roots, Woods, Canes, Stems, and Leaves. Antioxidants, 9: 5. 398.
10. Oertel, A., Matros, A., Hartmann, A., Arapitsas, P., Dehmer, K.J., Martens, S. and Mock, H.P. 2017. Metabolite profiling of red and blue potatoes revealed cultivar and tissue specific patterns for anthocyanins and other polyphenols. Planta, 246: 2. 281-297.
11. Zhu, L., Zhang, Y. and Lu, J. 2012. Phenolic contents and compositions in skins of red wine grape cultivars among various genetic backgrounds and originations. Int. J. Mol. Sci. 13: 3. 3492-3510.
12. Shahab, M., Roberto, S. R., Ahmed, S., Colombo, R.C., Silvestre, J.P., Koyama, R. and De Souza, R.T. 2020.

Relationship between anthocyanins and skin color of table grapes treated with abscisic acid at different stages of berry ripening. Sci. Hort. 259: 108859.
13. Downey, M.O., Dokoozlian, N.K. and Krstic, M.P. 2006. Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. Am. J. Enol. Vitic. 57: 3. 257-268.
14. Gervasi, T., Oliveri, F., Gottuso, V., Squadrito, M., Bartolomeo, G., Cicero, N. and Dugo, G. 2016. Nero d'Avola and Perricone cultivars: determination of polyphenols, flavonoids and anthocyanins in grapes and wines. Nat. Prod. Res. 30: 20. 2329-2337.
15. Carreno, J. and Martinez, A. 1995. Proposal of an index for objective evaluation of the color of red table grapes. Food Res. Int. 28: 373-377.
16. Cooper-Driver, G.A. 2001. Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. Phytochem. 56: 229-236.
17. Zhang, Q., Zhang, J., Shen, J., Silva, A., Dennis, D.A. and Barrow, C.J. 2006. A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. J. Appl. Phycol. 18: 3. 445-450.
18. Pomar, F., Novo, M. and Masa, A. 2005. Varietal differences among the anthocyanin profiles of 50 red table grape cultivars studied by high performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A. 1094: 34-41.
19. Stevenson, D. and Scalzo, J. 2012. Anthocyanin composition and content of blueberries from 730 around the world. J. Berry Res. 2: 179-189.
20. Fong, R.A., Webb, A.D. and Kepner, R.E. 1974. Acylatedanthocyanins in a hybrid *Vitis* variety. Phytochem. 13: 6. 1001-1004.
21. Morais, H., Ramos, C., Forgacs, E., Cserhati, T. and Oliiera, J. 2002. Influence of storage conditions on the stability of monomeric anthocyanins studied by reversed phase high performance liquid chromatography. J. Chromatog. B. 770: 297-301.
22. Rusjan, D., Korosec-Koruza, Z. and Veberic, R. 2008. Primary and secondary metabolites related to the quality potential of table grape varieties (*Vitis vinifera* L.). Eur. J. Hort. Sci. 73: 3. 124.
23. Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E. and Hermosín-Gutiérrez, I. 2010. Flavonol profiles of *Vitis vinifera* white grape cultivars. J. Food Compos. Anal. 23: 7. 699-705.
24. Pinasseau, L., Verbaere, A., Roques, M., Meudec, E., Vallverdú-Queralt, A., Terrier, N., Boulet, J.C., Cheynier, V. and Sommerer, N. 2016. A fast and robust UHPLC-MRM-MS method to characterize and quantify grape skin tannins after chemical depolymerization. Molecules. 21: 10. 1409.
25. Cantos, E., Espin, J.C. and Tomás-Barberán, F.A. 2002. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC− DAD− MS− MS. J. Agric. Food Chem. 50: 20. 5691-5696.
26. Flamini, R., Mattivi, F., Rosso, M.D., Arapitsas, P. and Bavaresco, L. 2013. Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols. Int. J. Mol. Sci. 14: 10. 19651-19669.
27. Doulaty Baneh, H., Grassi, F., Mohammadi, A., Nazemieh, A., De Mattia, F., Imazio, S. and Labra, M., 2007. The use of AFLP and morphological markers to study Iranian grapevine germplasm to avoid genetic erosion. J. Hort. Sci. Biotechnol. 82: 5. 745-752.
28. Najafi, J., Alipanah, L., Ghareyazie, B., Mohammadi, S.A., Hagh Nazari, A. and This, P. 2006. Genetic diversity of Iranian and some of European grapes revealed by microsatellite markers. Iran. J. Biotech. 4: 36-44.
29. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2018. FAOSTAT statistical database. FAO, Rome, Italy.
30. Slinkard, K. and Singleton, V.L. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. Am. J. Enol. Vitic. 28: 1. 49-55.

31.Wagner, G.J. 1979. Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. Plant physiol. 64: 1. 88-93.
32.Kedrina-Okutan, O., Novello, V., Hoffmann, T., Hadersdorfer, J., Occhipinti, A., Schwab, W. and Ferrandino, A. 2018. Constitutive polyphenols in blades and veins of grapevine (*Vitis vinifera* L.) healthy leaves. J. Agric. Food Chem. 66: 42. 10977-10990.
33.Colombo, R.C., Roberto, S.R., da Cruz, M.A., de Carvalho, D.U., Yamamoto, L.Y., Nixdorf, S.L. and Hermosin-Gutierrez, I. 2021. Characterization of the phenolic ripening development of 'BRS Vitoria'seedless table grapes using HPLC–DAD–ESI-MS/MS. J. Food Compos. Anal. 95: 103693.
34.Mazza, G. and Brouillard, R. 1987. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. Food Chem. 25: 3. 207-225.
35.Spinardi, A., Cola, G., Gardana, C.S. and Mignani, I. 2019. Variation of anthocyanin content and profile throughout fruit development and ripening of highbush blueberry cultivars grown at two different altitudes. Front. Plant Sci. 1045.
36.Pejman Mehr, M., Ebadi, A., Mousavi, A., Walker, A.R. and Rahimi, A. 2015. A quantitative and qualitative study of anthocyanins and flavonols in the skin of several grape cultivars using high performance liquid chromatography (HPLC). Quar. J. Med. Plants. 4: 56. 123-137. (In Persian)
37.Du, B., He, B.J., Shi, P.B., Li, F.Y., Li, J. and Zhu, M. 2012. Phenolic content and antioxidant activity of wine grapes and table grapes. J. Med. Plant Res. 6: 17. 3381-3387.
38.Fang, J., Jogaiah, S., Guan, L., Sun, X. and Abdelrahman, M. 2018. Coloring biology in grape skin: a prospective strategy for molecular farming. Physiologia plantarum, 164: 4. 429-441.
39.Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M. and Velasco, R. 2006. Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. J. Agric. Food Chem. 54: 20. 7692-7702.
40.Cacho, J., Fernandez, P., Ferreira, V. and Castells, J.E. 1992. Evolution of five anthocyanidin-3-glucosides in the skin of the Tempranillo, Moristel, and Garnacha grape varieties and influence of climatological variables. Am. J. Enol. Vitic. 43: 244-248.
41.Albuquerque, B.R., Heleno, S.A., Oliveira, M.B.P., Barros, L. and Ferreira, I.C. 2021. Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. Food Func. 12: 1. 14-29.
42.Proteggente, A.R., Saija, A., De Pasquale, A. and Rice-Evans, C.A. 2003. The compositional characterisation and antioxidant activity of fresh juices from sicilian sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) varieties. Free Radic. Res. 37: 6. 681-687.
43.Schulz, E., Tohge, T., Zuther, E., Fernie, A.R. and Hincha, D.K. 2015. Natural variation in flavonol and anthocyanin metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* accessions. Plant, Cell Environ. 38: 8. 1658-1672.