

به نام نزدان





دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گیلان

دانشکده تولید گیاهی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته  
علوم باغبانی، گرایش گیاهان داروئی، ادویه‌ای و نوشابه‌ای

## مطالعه کاربرد متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک بر تولید متابولیت‌های ثانویه کشت کالوس کنگر فرنگی (*Cynara scolymus* L.)

پژوهش و نگارش:

آتنا تنوری

استاد راهنما:

دکتر عظیم قاسم‌نژاد

استاد مشاور:

دکتر مهدی علیزاده

زمستان ۱۳۹۱



## تعهدنامه پژوهشی

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه‌های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مبین بخشی از فعالیت‌های علمی- پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می‌شود؛ بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

۱- قبل از چاپ پایان‌نامه خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع داده و کسب اجازه نمایند.

۲- قبل از چاپ پایان‌نامه در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد، ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.

۳- انتشار نتایج پایان‌نامه باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب آتنا تنوری دانشجوی رشته علوم باغبانی، گرایش گیاهان دارویی، ادویه‌ای و نوشابه‌ای مقطع کارشناسی ارشد تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی و امضاء



تقدیم بہ مہربان فرشتگانی کہ:

محظات ناب باور کردن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن، عظمت  
رسیدن و تمام تجربہ ہائی یکتا و زیبای زندگیم دیون حضور سبز آن ہست.

تقدیم بہ خانوادہ عزیزم





پاس بی پایان پروردگاری هم‌ترا که فرصت علم و دانش را ارزانیم داشت و در تمام مراحل زندگی یاریم نمود. برستی که می‌بودن این راه دشوار زندگی جزء با  
اگرچه قدرت لایزال او ممکن نیست و تنها یاری و اتقانت اوست که انسان می‌تواند بر مشکلات فائق آید. حال که بخارش این رساله به اتمام رسیده  
است، بر خود لازم می‌دانم از خانواده عزیزم که باهدلی و بهرامی ایشان مرا تا این وادی یاری نموده اند تشکر نمایم.

مراتب قدردانی و سپاس بی‌حد و مرز خود را نسبت به استاد راهنمای گرانقدر، جناب آقای دکتر عظیم قاسم نژاد که در تمام مراحل این پایان نامه از لطف  
ایشان بهره‌مند بودم، به جامی آورم، از استاد مشاور گرامی جناب آقای دکتر مهدی علینژاده به پاس نظرات و راهنمایی‌های شایسته ایشان تشکر می‌کنم.

از اساتید داور خود سرکار خانم دکتر خراسانی نژاد و سرکار خانم دکتر وارسته اکبرپور با مطالعه این پایان نامه و ارائه نظرات فرزانة خود سعی در بهرتر نمودن  
آن داشته‌ام بسیار سپاسگزار می‌نمایم.

از نماینده محترم تحصیلات تکلیفی جناب آقای دکتر قربانی به خاطر مساعدت بی‌دریغ ایشان تشکر می‌نمایم.

با سپاس فراوان از بهکاری و دلگرمی تامی، بهکلاسی با دوستان عزیزم.



## چکیده

روند رو به افزایش مصرف گیاهان دارویی به عنوان مواد اولیه بسیاری از داروها در اکثر کشورها باعث افزایش تقاضا برای این ترکیبات شده است و از آنجا که این فراورده‌های با ارزش به طور طبیعی به مقدار اندکی در گیاهان تولید می‌شود؛ از این رو علم بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک به ویژه کشت بافت، با استفاده از تکنیک‌ها و ابزارهای آزمایشگاهی خاص می‌تواند در توسعه صنعت داروسازی و تکثیر گیاهان دارویی نقش مهمی ایفا کند. کنگرفرنگی یکی از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی است که امروزه به دلیل ترکیبات غنی آنتی‌اکسیدانی خود نیاز بیشتری به آن احساس می‌شود. از آنجا که ترکیبات القاءکننده استرس از قبیل متیل‌جاسمونات (MJ) و اسیدسالیسیلیک (SA) باعث تغییر مسیرهای متابولیکی ترکیبات ثانویه گیاهان می‌شود؛ لذا به منظور بررسی اثر این دو محرک بر متابولیت‌های ثانویه گیاه کنگرفرنگی، کالوس‌های این گیاه در محیط کشت جامد MS با اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات در غلظت‌های (۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو مولار) در دو آزمایش جداگانه به صورت طرح کاملاً تصادفی تیمار شدند و پس از ۴ هفته صفات فیزیولوژیکی کالوس به همراه برخی از ترکیبات بیوشیمیایی آن مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که اعمال تیمار SA در غلظت‌های پایین باعث افزایش، و غلظت‌های بالای آن باعث کاهش رنگدانه‌های درونی می‌شود و اعمال تیمار MJ کاهش کلروفیل و افزایش مقدار کارتنوئید را در پی دارد. همچنین با ارزیابی میزان وزن تر و خشک کالوس‌ها مشاهده گردید که SA باعث کاهش وزن تر و افزایش وزن خشک کالوس می‌شود. و در تیمار MJ بیشترین وزن خشک مربوط به تیمارهای ۲۵ و ۵۰ میکرومول بود. بررسی تغییرات ترکیبات فنلی (اسید کلروژنیک و اسید کافئیک) و فلاونوئیدی نشان داد که افزودن SA و MJ به محیط کشت می‌تواند با ارسال پیام و القاء استرس در سلول‌های کالوس، باعث تجمع بیشتر ترکیبات فنلی کلروژنیک اسید و کافئیک اسید، فلاونوئید کل و در نهایت مهار رادیکال‌های آزاد و کاهش خسارات اکسیداتیو شود. البته مقدار این ترکیبات بسته به غلظت این دو محرک متفاوت بود.

**کلمات کلیدی:** کنگرفرنگی، کالوس، اسید سالیسیلیک، متیل‌جاسمونات، متابولیت‌های ثانویه.



## فهرست مطالب

صفحه

عنوان

### فصل اول

- ۱- مقدمه ..... ۲
- ۱-۱- فرضیات تحقیق ..... ۴
- ۲-۱- اهداف تحقیق ..... ۴

### فصل دوم

- ۲- بررسی منابع ..... ۶
- ۱-۲- تعریف گیاهان دارویی ..... ۶
- ۲-۲- ترکیب‌های ثانویه و مواد موثره ..... ۶
- ۳-۲- کنگر فرنگی ..... ۷
- ۱-۳-۲- گیاه‌شناسی ..... ۷
- ۲-۳-۲- نیازهای اکولوژیکی ..... ۸
- ۳-۳-۲- تکنیر کنگر فرنگی ..... ۸
- ۴-۳-۲- برداشت کنگر فرنگی ..... ۹
- ۵-۳-۲- ارقام کنگر فرنگی ..... ۹
- ۶-۳-۲- ترکیبات شیمیایی ..... ۱۰
- ۷-۳-۲- اثرات فارماکولوژیکی ..... ۱۲
- ۴-۲- کشت بافت ..... ۱۴
- ۱-۴-۲- تولید و استخراج متابولیت‌های ثانویه ..... ۱۴
- ۲-۴-۲- محرک‌ها راهکاری بر افزایش تولید ترکیبات دارویی در کشت سلولی و کالوس ..... ۱۶
- ۵-۲- اسید سالیسیلیک ..... ۱۶
- ۱-۵-۲- مکانیسم عمل اسید سالیسیلیک و تولید متابولیت‌های ثانویه ..... ۱۷
- ۶-۲- متیل جاسمونات (MJ) ..... ۱۸
- ۱-۶-۲- مکانیسم عمل متیل جاسمونات و تولید متابولیت‌های ثانویه ..... ۱۸

## فهرست مطالب

صفحه

عنوان

### فصل سوم

۲۴	۳- مواد و روش ها .....
۲۴	۳-۱- مواد و دستگاه ها .....
۲۴	۳-۱-۱- منبع گیاهی مورد استفاده .....
۲۴	۳-۱-۲- مواد شیمیایی مورد استفاده .....
۲۴	۳-۱-۳- دستگاه ها و لوازم مصرفی .....
۲۵	۳-۲- محیط کشت .....
۲۶	۳-۳- تهیه محلول پایه .....
۲۸	۳-۳-۱- تهیه محلول های پایه برای تنظیم کننده های رشد/ هورمون ها .....
۲۸	۳-۴- تهیه محیط کشت .....
۲۹	۳-۵- ضد عفونی وسایل مورد نیاز .....
۲۹	۳-۶- آماده سازی هود (لامینار ایرفلو) .....
۲۹	۳-۷- مراحل مربوط به تولید گیاهچه از بذر .....
۲۹	۳-۷-۱- مراحل مقدماتی فراهم سازی منبع گیاهی نونهال و استریل .....
۳۰	۳-۷-۲- آماده سازی ظروف کشت .....
۳۰	۳-۷-۳- تهیه جوانه استریل .....
۳۰	۳-۷-۴- عملیات مربوط به انتقال گیاهچه ها به محیط کشت ۱/۲MS .....
۳۱	۳-۸- عملیات مربوط به القاء کالوس .....
۳۱	۳-۸-۱- آماده سازی محیط کشت فاز القاء .....
۳۲	۳-۸-۲- تهیه ریزنمونه های دمبرگ از گیاهچه های استریل .....
۳۳	۳-۹- مرحله اعمال تیمار محرک های شیمیایی جهت القاء تولید متابولیت ثانویه .....
۳۳	۳-۹-۱- آماده سازی محیط کشت در فاز القاء متابولیت ثانویه .....
۳۴	۳-۹-۲- نحوه اعمال تیمار .....
۳۴	۳-۹-۳- واکشت ریزنمونه های کالوس در محیط کشت حاوی تیمارهای القاء کننده .....
۳۴	۳-۱۰- اندازه گیری عملکرد کالوس .....

## فهرست مطالب

عنوان	صفحه
۱-۱۰-۳- وزن تر کالوس .....	۳۴
۲-۱۰-۳- وزن خشک کالوس .....	۳۵
۱۱-۳- اندازه گیری صفات مورفولوژیکی .....	۳۵
۱-۱۱-۳- رنگ کالوس .....	۳۵
۲-۱۱-۳- سفتی کالوس .....	۳۶
۳-۱۱-۳- درصد قهوه‌ای شدن .....	۳۶
۴-۱۱-۳- میزان رشد .....	۳۶
۱۲-۳- اندازه گیری رنگدانه‌های درونی .....	۳۶
۱۳-۳- اندازه گیری صفات بیوشیمیایی کالوس کنگر فرنگی .....	۳۷
۱-۱۳-۳- اندازه گیری درصد مهار رادیکال‌های آزاد به روش DPPH .....	۳۷
۲-۱۳-۳- اندازه گیری فنل کل .....	۳۸
۳-۱۳-۳- اندازه گیری محتوای فلاونوئید .....	۳۸
۴-۱۳-۳- اندازه گیری اسید کلروجنیک و اسید کافئیک با استفاده از دستگاه HPLC .....	۳۹
۱-۴-۱۳-۳- آماده سازی نمونه .....	۴۰
۲-۴-۱۳-۳- تهیه نمودار کالیبراسیون برای اسید کلروجنیک و اسید کافئیک .....	۴۰
۳-۴-۱۳-۳- تزریق نمونه گیاهی .....	۴۰
۱۴-۳- تجزیه و تحلیل داده‌ها .....	۴۲

### فصل چهارم

۴- نتایج و بحث .....	۴۴
۱-۴- مطالعه اثر تنظیم کننده‌های رشد بر خصوصیات کمی و کیفی کالوس .....	۴۴
۲-۴- تأثیر غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات بر صفات مورفولوژیکی کالوس کنگر فرنگی .....	۴۷
۱-۲-۴- تأثیر سطوح مختلف اسید سالیسیلیک بر صفات مورفولوژیکی کالوس کنگر فرنگی .....	۴۷
۲-۲-۴- تأثیر سطوح مختلف متیل جاسمونات بر صفات مورفولوژیکی کالوس کنگر فرنگی .....	۴۹

## فهرست مطالب

عنوان	صفحه
۳-۴- تأثیر اسید سالیسیلیک بر صفات کیفی و کمی کنگر فرنگی .....	۵۰
۱-۳-۴- تأثیر غلظت‌های متفاوت SA بر میزان وزن و رنگدانه‌های درونی کالوس .....	۵۰
۱-۱-۳-۴- تأثیر غلظت‌های متفاوت SA بر وزن تر و خشک کالوس .....	۵۱
۲-۱-۳-۴- تأثیر سطوح مختلف اسید سالیسیلیک بر میزان کلروفیل و کارتنوئید .....	۵۲
۳-۱-۳-۴- بررسی همبستگی فاکتورهای فیزیولوژیکی بر هم تحت تأثیر اسید سالیسیلیک .....	۵۴
۲-۳-۴- تأثیر غلظت‌های متفاوت اسید سالیسیلیک بر صفات بیوشیمیایی کالوس کنگر فرنگی .....	۵۵
۱-۲-۳-۴- اثر سطوح مختلف اسید سالیسیلیک بر میزان فنل کل کالوس .....	۵۶
۲-۲-۳-۴- تأثیر سطوح مختلف اسید سالیسیلیک بر میزان ترکیبات فلاونوئیدی .....	۵۷
۳-۲-۳-۴- تأثیر سطوح مختلف SA بر درصد مهار رادیکال آزاد .....	۵۸
۴-۲-۳-۴- اثر سطوح مختلف SA بر میزان اسید کلروژنیک و اسید کافئیک .....	۵۹
۵-۲-۳-۴- بررسی همبستگی فاکتورهای موثر بر فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی کالوس کنگر فرنگی تحت تیمار SA ..	۶۱
۴-۴- تأثیر کاربرد متیل جاسمونات بر صفات کیفی و کمی کالوس کنگر فرنگی .....	۶۲
۱-۴-۴- تأثیر غلظت‌های متفاوت متیل جاسمونات بر وزن کالوس و تراکم رنگدانه‌های درونی کالوس ..	۶۲
۱-۱-۴-۴- تأثیر غلظت‌های متفاوت متیل جاسمونات بر وزن تر و خشک کالوس .....	۶۲
۲-۱-۴-۴- تأثیر سطوح مختلف متیل جاسمونات بر میزان کلروفیل و کارتنوئید .....	۶۴
۳-۱-۴-۴- بررسی همبستگی فاکتورهای فیزیولوژیکی تحت تأثیر متیل جاسمونات .....	۶۵
۲-۴-۴- تأثیر غلظت‌های متفاوت متیل جاسمونات بر صفات بیوشیمیایی کالوس کنگر فرنگی .....	۶۶
۱-۲-۴-۴- تأثیر سطوح مختلف متیل جاسمونات بر فنل کل کالوس .....	۶۷
۲-۲-۴-۴- تأثیر سطوح مختلف متیل جاسمونات بر فلاونوئید کل کالوس .....	۶۸
۳-۲-۴-۴- تأثیر سطوح مختلف متیل جاسمونات بر توانمندی مهار رادیکال آزاد (DPPH) عصاره کالوس ..	۶۹
۴-۲-۴-۴- تأثیر سطوح مختلف متیل جاسمونات بر اسید کلروژنیک و اسید کافئیک .....	۷۰
۵-۲-۴-۴- بررسی همبستگی فاکتورهای موثر بر فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی کالوس کنگر فرنگی تحت تیمار	
متیل جاسمونات .....	۷۱
نتیجه‌گیری کلی .....	۷۲
پیشنهادات .....	۷۴
منابع .....	۷۵



## فهرست جدول‌ها

صفحه

عنوان

- جدول ۱-۳- دستگاه‌های مورد استفاده در آزمایش..... ۲۵
- جدول ۲-۳- دسته بندی ترکیبات محیط کشت MS جهت تهیه محلول‌های پایه..... ۲۷
- جدول ۳-۳- ترکیبات هورمونی مورد استفاده جهت القاء کالوس کنگرفرنگی..... ۳۳
- جدول ۱-۴- واکنش تیمارهای متفاوت اکسین با سایتوکینین بر زمان القاء و درصد کالوس دهی..... ۴۶
- جدول ۲-۴- تأثیر تیمارهای هورمونی بر خصوصیات ظاهری کالوس کنگرفرنگی..... ۴۶
- جدول ۳-۴- مقایسه صفات مورفولوژیکی کالوس کنگرفرنگی تحت تیمار اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات..... ۴۸
- جدول ۴-۴- تجزیه واریانس وزن کالوس و رنگدانه‌های درونی کالوس کنگرفرنگی تحت تأثیر اسید سالیسیلیک..... ۵۱
- جدول ۵-۴- مقایسه میانگین رنگدانه‌های درونی کالوس کنگرفرنگی تحت تیمار اسید سالیسیلیک..... ۵۳
- جدول ۶-۴- همبستگی میان صفات فیزیولوژیکی اندازه‌گیری شده در کالوس کنگرفرنگی تحت تیمار (SA).... ۵۴
- جدول ۷-۴- تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی کالوس تازه تحت تأثیر اسید سالیسیلیک..... ۵۵
- جدول ۸-۴- همبستگی میان صفات بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده در کالوس کنگرفرنگی تحت تیمار (SA) ... ۶۱
- جدول ۹-۴- تجزیه واریانس وزن کالوس و غلظت رنگدانه‌های درونی کالوس تحت تأثیر متیل جاسمونات..... ۶۲
- جدول ۱۰-۴- مقایسه میانگین رنگدانه‌های درونی کالوس کنگرفرنگی تحت تیمار متیل جاسمونات..... ۶۵
- جدول ۱۱-۴- همبستگی میان صفات فیزیولوژیکی اندازه‌گیری شده کالوس کنگرفرنگی تحت تیمار (MJ).... ۶۶
- جدول ۱۲-۴- تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی کالوس کنگرفرنگی تحت تأثیر تیمار متیل جاسمونات..... ۶۷
- جدول ۱۳-۴- همبستگی میان صفات بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده در کالوس کنگرفرنگی تحت تیمار (MJ)..... ۷۲

## فهرست شکل‌ها

صفحه

عنوان

- شکل ۱-۲-۱- مسیره‌های انتقال پیام به وسیله اسید سالیسیلیک..... ۱۸
- شکل ۲-۲-۲- مسیر سیگنالینگ و تاثیر محرک بر سلول (حسنلو و همکاران، ۲۰۰۹)..... ۱۹
- شکل ۱-۳-۱- گیاهچه سترون کنگرفرنگی دو هفته پس از رشد در محیط کشت MS ۱/۲..... ۳۱
- شکل ۲-۳-۲- نمایش محل تهیه ریزنمونه از گیاهچه استریل (A) و کالوس تولید شده از ریزنمونه مربوط در محیط ms (B)..... ۳۲
- شکل ۳-۳-۳- نمودار کالیبراسیون کلروژنیک اسید..... ۴۱
- شکل ۴-۳-۴- نمودار کالیبراسیون کافئیک اسید..... ۴۱
- شکل ۵-۳-۵- کروماتوگرام نمونه استاندارد، اسید کلروژنیک با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و اسید کافئیک با غلظت ۷ میلی‌گرم در لیتر..... ۴۲
- شکل ۱-۴-۱- کالوس‌های تشکیل شده در محیط MS حاوی NAA (۵mg/l) و BA (۲mg/l) ۲۸ روز پس از کشت..... ۴۵
- شکل ۲-۴-۲- تاثیر تیمارهای هورمونی بر رنگ و بافت کالوس..... ۴۷
- شکل ۳-۴-۳- تاثیر اسید سالیسیلیک ( $0-200 \mu M$ ) بر صفات مورفولوژیکی کالوس..... ۴۹
- شکل ۴-۴-۴- تاثیر متیل‌جاسمونات ( $0-200 \mu M$ ) بر صفات مورفولوژیکی کالوس کنگرفرنگی..... ۵۰
- شکل ۵-۴-۵- اثر اسید سالیسیلیک بر وزن تر کالوس کنگرفرنگی..... ۵۲
- شکل ۶-۴-۶- اثر اسید سالیسیلیک بر وزن خشک کالوس کنگرفرنگی..... ۵۲
- شکل ۷-۴-۷- اثر اسید سالیسیلیک بر میزان فنل کل (mg/g F.W)..... ۵۶
- شکل ۸-۴-۸- اثر اسید سالیسیلیک بر میزان فلاونوئید کل (mg/g F.W)..... ۵۷
- شکل ۹-۴-۹- اثر اسید سالیسیلیک بر میزان درصد مهار رادیکال (DPPH)..... ۵۹
- شکل ۱۰-۴-۱۰- اثر سطوح مختلف اسید سالیسیلیک بر میزان سنتز اسید کلروژنیک ( $\mu g/g F.W$ )..... ۶۰
- شکل ۱۱-۴-۱۱- اثر سطوح مختلف اسید سالیسیلیک بر میزان سنتز اسید کافئیک ( $\mu g/g F.W$ )..... ۶۰
- شکل ۱۲-۴-۱۲- اثر سطوح مختلف متیل‌جاسمونات بر وزن تر کالوس..... ۶۴
- شکل ۱۳-۴-۱۳- اثر سطوح مختلف متیل‌جاسمونات بر وزن خشک کالوس..... ۶۴
- شکل ۱۴-۴-۱۴- اثر سطوح مختلف متیل‌جاسمونات بر فنل کل (mg/g F.W)..... ۶۸
- شکل ۱۵-۴-۱۵- اثر سطوح مختلف متیل‌جاسمونات بر میزان فلاونوئید کل (mg/g F.W)..... ۶۸

## فهرست شکل‌ها

صفحه	عنوان
۷۰.....	شکل ۴-۱۶- اثر سطوح مختلف متیل جاسمونات بر درصد مهار رادیکال آزاد.....
۷۱.....	شکل ۴-۱۷- تغییرات میزان اسید کلروجنیک کالوس کتگرفرنگی تحت تأثیر تیمار متیل جاسمونات.....
۷۱.....	شکل ۴-۱۸- اثر سطوح مختلف متیل جاسمونات بر میزان اسید کافنیک کالوس کتگرفرنگی.....

