

به نام خدای بخشنده و مهربان





دانشکده تولید گیاهی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته  
علوم باغبانی

**مطالعه تغییرات برخی از ترکیبات فنلی کالوس کنگر فرنگی  
(*Cynara scolymus* L.) در محیط‌های مختلف کشت**

پژوهش و نگارش:

مهسا ثانوی جوشقانی

استاد راهنما:

دکتر عظیم قاسم نژاد

استاد مشاور:

دکتر مهدی علیزاده

تابستان ۱۳۹۱



### تعهد نامه پژوهشی

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های 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، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به موارد ذیل متعهد می‌شوند:

۱) قبل از چاپ پایان نامه (رساله) خود، مراتب را قبلاً بطور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع داده و کسب اجازه نمایند.

۲) در انتشار نتایج پایان نامه (رساله) در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.

۳) انتشار نتایج پایان نامه (رساله) باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد. اینجانب مهسا ثانوی جوشقانی دانشجوی رشته باغبانی گرایش گیاهان دارویی، ادویه‌ای و نوشابه‌ای مقطع کارشناسی ارشد تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.



تقدیم بہ:

پدر فداکار، مادر مہربان

و ہمسر عزیزم...





گذراندن مراحل اجرائی و تدوین این پایان نامه پس از الطاف و عنایات الهی مدیون راهبانی و مساعدت و بهنگری بزرگوارانی است که بی تردید بدون بهرایی آنان طی این طریق با مشکلات فراوان همراه بود، لذا بر خود لازم می دانم بهنگامه پایانی پژوهش خویش از زحمات کسانی که در این مسیر مریاری نمودند قدردانی نمایم.

از پدر، مادر و برادرم که در هر قدم باهدلی و جوشش بخدمتشان بهرایی ام می نمایند،

و همسر م که همراه بهنگی و مونس م در تمام بحظات تلخ و شیرین زندگیم می باشد، از صمیم قلم شکر کنم.

مراتب قدردانی و سپاس بی حد و مرز خود را نسبت به استاد راهبانی کرامتقدر، جناب آقای دکتر عظیم قاسم نژاد که در تمام مراحل این پایان نامه از لطف ایشان بهره مند بودم، به جامی آورم، از استاد مشاور کرامی جناب آقای دکتر محمدی علیراده به پاس نظرات و راهنموده های شایسته ایشان شکر می کنم.

از اساتید داور خود سرکار خانم دکتر خراسانی نژاد و جناب آقای دکتر احمدی خواه که با مطالعه این پایان نامه و ارائه نظرات فرزانه خود سعی در پربارتر نمودن آن داشتند بسیار سپاسگزار می نمایم.

از نماینده محترم تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر قربانی به خاطر مساعدت بی دریغ ایشان شکر می نمایم.

با سپاس فراوان از بهکاری و دلگرمی تمامی بهنگاسی ها و دوستان عزیزم.



## چکیده

کنگرفرنگی گیاهی از خانواده کاسنی (Asteraceae) و بومی نواحی مدیترانه‌ای است، این گیاه دارای ترکیبات پلی‌فنلی و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است. به علت وجود این ترکیبات، در تحقیق حاضر تغییرات کالوس کنگرفرنگی از لحاظ برخی خصوصیات ظاهری و بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. بذره‌های کنگرفرنگی بعد از ضدعفونی، به منظور جوانه‌دار شدن به پتری دیش‌های محتوی کاغذ صافی در شرایط کاملاً استریل منتقل شدند. برای به دست آوردن گیاهچه‌های سالم با بنیه مناسب، جوانه‌های عاری از بیماری در محیط کشت نصف غلظت موراشیگ و اسکوگ (MS/۱/۲) کشت گردیدند. از گیاهچه‌های حاصله ریزنمونه‌های دمبرگ، برگ و ریشه تهیه شد و جهت کالزایی به محیط‌های کشت SH، MS و B5 حاوی ۰/۸ درصد آگار و هورمون تو-فور-دی در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی گرم در لیتر انتقال داده شدند. در دمای  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  و تاریکی نگهداری شدند. در محیط کشت بدون هورمون که به عنوان شاهد در نظر گرفته شد، کالوس‌زایی قابل توجه‌ای صورت نگرفت. تمام کالوس‌های حاصل ترکیب رنگی سفید-کرم تا قهوه‌ای روشن و تیره داشتند. بر اساس نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین داده‌ها، در محیط کشت MS (در مقایسه با دو محیط کشت دیگر)، هر دو غلظت هورمونی ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون تو-فور-دی و ریزنمونه برگ (نسبت به ریزنمونه‌های دمبرگ و ریشه) بیشترین کالزایی را نشان دادند. بالاترین میزان کلروفیل a، b و کل در محیط کشت MS، در سطح هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر وجود داشت، بالاترین میزان کارنوئید مربوط به محیط کشت MS و غلظت هورمونی ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر و ریزنمونه دمبرگ بود. در محیط‌های B5 و MS، ریزنمونه‌ی ریشه و غلظت هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر درصد مهار رادیکال-های آزاد بهتری داشتند. از نظر مقدار فنل محیط‌های SH و B5 میزان فنل بیشتری داشتند و در بررسی میزان فلاونوئید، محیط SH نسبت به دو محیط دیگر میزان بالاتری را دارا بود. بهترین غلظت هورمونی و ریزنمونه در تولید بیشتر فنل و فلاونوئید در کالوس‌ها مربوط به غلظت هورمونی ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر و ریزنمونه برگ بود. محیط کشت B5 و غلظت هورمونی ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر و ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ بهترین راندمان تولید اسید کافئیک را داشتند. اسید کلروژنیک در محیط کشت SH و غلظت هورمونی ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر و ریزنمونه برگ میزان بیشتری داشتند.

کلیدواژگان: کنگرفرنگی، کالوس، متابولیت‌های ثانویه، رنگیزه‌های گیاهی.



## فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: مقدمه .....	۱
۱-۱- گیاهان دارویی .....	۲
۲-۱- کنگر فرنگی .....	۲
۳-۱- بیوتکنولوژی .....	۳
۴-۱- فرضیات .....	۴
۵-۱- اهداف .....	۴
فصل دوم: بررسی منابع .....	۵
۱-۲- کالوس (پینه) .....	۶
۲-۲- القای کالوس .....	۷
۳-۲- محیط کشت .....	۸
۴-۲- تنظیم کننده های رشد .....	۸
۵-۲- تهیه ریز نمونه .....	۱۰
۶-۲- باززایی و ریخت زایی .....	۱۰
۷-۲- مواد مؤثره .....	۱۱
۸-۲- رنگیزه های گیاهی .....	۱۲
فصل سوم: مواد و روش ها .....	۱۵
۱-۳- زمان و مکان آزمایش .....	۱۶
۲-۳- مواد و دستگاه ها .....	۱۶
۳-۳- تعیین زیوایی (قوه نامیه) بذور کنگر فرنگی به منظور تهیه دانهال های سترون .....	۱۶
۴-۳- محیط کشت .....	۱۷
۵-۳- ضد عفونی بذر کنگر فرنگی .....	۱۹
۶-۳- تهیه گیاهچه استریل کنگر فرنگی .....	۱۹
۷-۳- تهیه ریز نمونه کنگر فرنگی .....	۲۰

## فهرست مطالب

عنوان	صفحه
۸-۳- واكشت.....	۲۰
۹-۳- تهیه محیط کشت جهت باززایی.....	۲۰
۱۰-۳- صفات مورد مطالعه.....	۲۰
۱۱-۳- اندازه گیری وزن تر و خشک کالوس.....	۲۰
۱۲-۳- اندازه گیری کلروفیل و کارتنوئید.....	۲۱
۱۳-۳- مطالعه بیوشیمیایی کالوس کنگر فرنگی.....	۲۲
۱۴-۳- اندازه گیری فنل کل.....	۲۲
۱۵-۳- اندازه گیری محتوای فلاونوئید.....	۲۳
۱۶-۳- اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH.....	۲۴
۱۷-۳- اندازه گیری اسیدکلروژنیک و اسیدکافئیک با استفاده از دستگاه HPLC.....	۲۴
۱۸-۳- تهیه شکل کالیبراسیون برای اسیدکلروژنیک و اسیدکافئیک.....	۲۵
۱۹-۳- تزریق نمونه گیاهی.....	۲۶
۲۰-۳- تجزیه و تحلیل داده‌ها.....	۲۶
فصل چهارم: نتایج و بحث.....	۲۷
۱-۴- نتایج مشاهده‌ای.....	۲۸
۲-۴- نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل های آماری.....	۳۱
نتیجه گیری کلی.....	۷۱
پیشنهادات.....	۷۲
منابع.....	۷۴

## فهرست جداول

صفحه

عنوان

جدول ۱-۳- فرمولاسیون محیط‌های کشت استفاده شده در کشت بافت گیاهی.....	۱۸
جدول ۱-۴- اثر ساده ریزنمونه، هورمون و محیط کشت بر میزان وزن تر کالوس.....	۳۱
جدول ۲-۴- اثر متقابل ریزنمونه، هورمون و محیط کشت بر میزان وزن تر کالوس.....	۳۵
جدول ۳-۴- اثر ساده ریزنمونه، هورمون و محیط کشت بر میزان وزن خشک (از یک گرم کالوس تر).....	۳۶
جدول ۴-۴- اثر متقابل ریزنمونه، هورمون و محیط کشت بر میزان وزن خشک کالوس (به ازای یک گرم وزن تر).....	۳۹
جدول ۵-۴- اثر ساده ریزنمونه، هورمون و محیط کشت بر میزان کلروفیل a (میلی گرم/گرم وزن تر).....	۴۰
جدول ۶-۴- اثر متقابل ریزنمونه، هورمون و محیط کشت بر میزان کلروفیل a، b، کل و کارتنوئید (میلی گرم/گرم وزن تر).....	۴۳
جدول ۷-۴- اثر ساده ریزنمونه، هورمون و محیط کشت بر میزان کلروفیل b (میلی گرم/گرم وزن تر).....	۴۴
جدول ۸-۴- اثر ساده ریزنمونه، هورمون و محیط کشت بر میزان کلروفیل کل (میلی گرم/گرم وزن تر).....	۴۷
جدول ۹-۴- اثر جداگانه ریزنمونه، هورمون و محیط کشت بر میزان کارتنوئید (میلی گرم/گرم وزن تر).....	۵۰
جدول ۱۰-۴- اثر ریزنمونه، هورمون و محیط کشت بر درصد مهار رادیکال‌های آزاد.....	۵۳
جدول ۱۱-۴- اثر متقابل فاکتورها بر درصد مهار رادیکال‌های آزاد، فنل و فلاونوئید.....	۵۷
جدول ۱۲-۴- اثر ساده ریزنمونه، هورمون و محیط کشت بر میزان فنل کل (میلی گرم/گرم وزن تر).....	۵۸
جدول ۱۳-۴- اثر ساده ریزنمونه، هورمون و محیط کشت بر میزان فلاونوئید (میلی گرم/گرم وزن تر).....	۶۱
جدول ۱۴-۴- اثر ساده ریزنمونه، هورمون و محیط بر میزان اسید کافئیک.....	۶۵
جدول ۱۵-۴- اثر متقابل ریزنمونه، هورمون و محیط کشت بر میزان اسید کافئیک و اسید کلروژنیک.....	۶۷
جدول ۱۶-۴- اثر ساده ریزنمونه، هورمون و محیط کشت بر میزان اسید کلروژنیک.....	۶۸

## فهرست اشکال

عنوان	صفحه
شکل ۳-۱- گیاهچه گیاه کنگرفرنگی عاری از بیماری در محیط کشت MS/۱.....	۱۹
شکل ۳-۲- شکل استاندارد گالیک اسید.....	۲۳
شکل ۳-۳- شکل استاندارد کوئرستین.....	۲۳
شکل ۳-۴- کروماتوگرام نمونه استاندارد، اسید کلروژنیک با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و اسید کافئیک با غلظت ۷ میلی‌گرم در لیتر.....	۲۵
شکل ۴-۱- تغییرات کالوس در ریزنمونه دمبرگ در ماه اول کشت (چپ به راست).....	۲۸
شکل ۴-۲- کالوس ریزنمونه‌های مختلف برگ (B)، دمبرگ (D) و ریشه (R).....	۲۹
شکل ۴-۳- ریشه‌زایی در ریزنمونه ریشه (۱) و اندامزایی در ریزنمونه دمبرگ (۲) و کالوس‌دهی جزئی در ریزنمونه دمبرگ (۳) در محیط کشت فاقد هورمون.....	۲۹
شکل ۴-۴- رشد کالوس‌های سبز رنگ از کالوس‌های قهوه‌ای.....	۳۰
شکل ۴-۵- اثر دوگانه محیط کشت و سطوح هورمونی بر میزان وزن تر کالوس.....	۳۲
شکل ۴-۶- اثر دوگانه محیط کشت و ریزنمونه بر میزان وزن تر کالوس.....	۳۳
شکل ۴-۷- اثر دوگانه سطوح هورمون و ریزنمونه بر میزان وزن تر کالوس.....	۳۴
شکل ۴-۸- اثر دوگانه محیط کشت و هورمون بر میزان وزن خشک کالوس.....	۳۷
شکل ۴-۹- اثر متقابل اثر متقابل محیط کشت و ریزنمونه بر میزان وزن خشک.....	۳۷
شکل ۴-۱۰- اثر متقابل اثر متقابل ریزنمونه و هورمون بر میزان وزن خشک.....	۳۸
شکل ۴-۱۱- اثر متقابل محیط کشت و هورمون بر میزان کلروفیل a.....	۴۱
شکل ۴-۱۲- اثر متقابل محیط کشت و ریزنمونه بر میزان کلروفیل a.....	۴۱
شکل ۴-۱۳- اثر متقابل ریزنمونه و هورمون بر میزان کلروفیل a.....	۴۲
شکل ۴-۱۴- اثر متقابل محیط کشت و هورمون بر میزان کلروفیل b.....	۴۴
شکل ۴-۱۵- اثر متقابل محیط کشت و ریزنمونه بر میزان کلروفیل b.....	۴۵
شکل ۴-۱۶- اثر متقابل هورمون و ریزنمونه بر میزان کلروفیل b.....	۴۶
شکل ۴-۱۷- اثر متقابل محیط کشت و هورمون بر میزان کلروفیل کل.....	۴۷
شکل ۴-۱۸- اثر متقابل محیط کشت و ریزنمونه بر میزان کلروفیل کل.....	۴۸
شکل ۴-۱۹- اثر متقابل ریزنمونه و هورمون بر میزان کلروفیل کل.....	۴۸



## فهرست اشکال

صفحه

عنوان

- شکل ۴-۲۰- اثر متقابل محیط کشت و هورمون بر میزان کارتنوئید ..... ۵۰
- شکل ۴-۲۱- اثر متقابل محیط کشت و ریزنمونه بر میزان کارتنوئید ..... ۵۱
- شکل ۴-۲۲- اثر متقابل ریزنمونه و هورمون بر میزان کارتنوئید ..... ۵۱
- شکل ۴-۲۳- اثر متقابل محیط کشت و هورمون بر درصد مهار رادیکال‌های آزاد ..... ۵۴
- شکل ۴-۲۴- اثر متقابل محیط کشت و ریزنمونه بر درصد مهار رادیکال‌های آزاد ..... ۵۵
- شکل ۴-۲۵- اثر متقابل هورمون و ریزنمونه بر درصد مهار رادیکال‌های آزاد ..... ۵۵
- شکل ۴-۲۶- اثر متقابل محیط کشت و هورمون بر میزان فنل کل ..... ۵۸
- شکل ۴-۲۷- اثر متقابل محیط کشت و ریزنمونه بر میزان فنل کل ..... ۵۹
- شکل ۴-۲۸- اثر متقابل ریزنمونه و هورمون بر میزان فنل کل ..... ۵۹
- شکل ۴-۲۹- اثر متقابل محیط کشت و هورمون بر میزان فلاونوئید ..... ۶۱
- شکل ۴-۳۰- اثر متقابل محیط کشت و ریزنمونه بر میزان فلاونوئید ..... ۶۲
- شکل ۴-۳۱- اثر متقابل ریزنمونه و هورمون بر میزان فلاونوئید ..... ۶۲
- شکل ۴-۳۲- کروماتوگرام ترکیبات پلی‌فنلی کالوس کنگرفرنگی ..... ۶۴
- شکل ۴-۳۳- اثر متقابل محیط کشت و هورمون بر میزان اسید کافئیک ..... ۶۵
- شکل ۴-۳۴- اثر متقابل محیط کشت و ریزنمونه بر میزان اسید کافئیک ..... ۶۶
- شکل ۴-۳۵- اثر متقابل ریزنمونه و هورمون بر میزان اسید کافئیک ..... ۶۶
- شکل ۴-۳۶- اثر متقابل محیط کشت و هورمون بر میزان اسید کلروژنیک ..... ۶۹
- شکل ۴-۳۷- اثر متقابل محیط کشت و ریزنمونه بر میزان اسید کلروژنیک ..... ۶۹
- شکل ۴-۳۸- اثر متقابل ریزنمونه و غلظت هورمون بر میزان اسید کلروژنیک ..... ۷۰



فصل اول

مقدمه

## ۱- مقدمه

## ۱-۱- گیاهان دارویی

در پیکر گیاهان دارویی مواد خاصی به نام «مواد مؤثره»<sup>۱</sup> (مواد فعال<sup>۲</sup>) ساخته و ذخیره می‌شود که این مواد تأثیر فیزیولوژیکی بر پیکر موجودات زنده بر جا می‌گذارند. این گیاهان برای مداوای برخی بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. مواد فعال مذکور در طی یک سلسله فرایندهای ویژه و پیچیده بیوشیمیایی، به مقدار بسیار کم معمولاً کمتر از وزن خشک گیاه ساخته می‌شوند و به «متابولیت‌های ثانویه»<sup>۳</sup> نیز معروفند (امید بیگی، ۱۳۸۴). تولید متابولیت‌های ثانویه بخشی از سیستم دفاعی گیاه را تشکیل می‌دهد. متابولیت‌های ثانویه جنبه‌های مهمی از کیفیت غذای انسان (رنگ، طعم و بو) را تعیین می‌کنند. برخی از آن‌ها نظیر رنگدانه‌های گیاهی برای تنوع گل‌ها و گیاهان زینتی مهم هستند. تعدادی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی برای تولید داروها، حشره‌کش‌ها، چاشنی‌های غذایی، رنگ‌ها و خوشبوکننده‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (حبیبی خانیانی، ۱۳۸۴).

## ۱-۲- کنگر فرنگی

کنگر فرنگی در اقتصاد کشاورزی مدیترانه با تولید سالانه ۷۵۰ میلیون تن (بیش از ۶۰ درصد از تولید کنگر فرنگی) در بیش از ۸۰ هکتار از زمین‌های زراعی نقش قابل توجهی دارد. ایتالیا تولید کننده برجسته جهان است (در حدود ۴۷۰ میلیون تن)، به دنبال آن اسپانیا (۱۸۸ میلیون تن)، فرانسه (۵۲/۵ میلیون تن) و یونان (۳۵ میلیون تن) قرار دارند (پروهنس و همکاران، ۲۰۰۸).

## ۱-۲-۱- مشخصات گیاهشناسی

کنگر فرنگی با نام علمی *Cynara scolymus* L. گیاهی است چند ساله یا پایا، سازگار با سرمای مناطق مدیترانه‌ای، با طول عمر متوسط ۴ سال که ارتفاع آن به ۲ متر می‌رسد. دارای برگ‌های بسیار بزرگ متمایل به سفید کرکینه پوش و حاوی رگبرگ‌های خیلی برجسته است (سید ضیایی، ۱۳۸۳). جوانه‌های گل از قسمت انتهایی ساقه اصلی و ساقه‌های جانبی گیاه بیرون می‌آیند و هر جوانه گل باز

- 
1. Active substances
  2. Active principle
  3. Secondary metabolit