بهبود تولید ماده موثره اسید کلروژنیک در گیاه دارویی سرخارگل تحت تاثیر عصاره مخمر

ژیلا مهرپویا[۱] ، محمد عبدلی*[۲]، محمد رضا طالبیان[۳]
[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد رشته تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر
[۲*]استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر
[۳] دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته تولیدات گیاهی، دانشگاه ملایر
نویسنده مسئول: Abdoli_m@malayeru.ac.ir

چکیده

استفاده از محرک‌ها می‌تواند روشی مناسب برای افزایش تولید متابولیت‌های ارزشمند ثانویه در گیاهان دارویی باشد. در این پژوهش، در راستای افزایش تولید اسید کلروژنیک، اثر غلظت‌های مختلف عصاره مخمر ($g\ l^{-1}$ ۱/۵، ۱، ۰/۷۵، ۰) هرکدام در چهار زمان برداشت (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) بر روی اندام هوایی سرخارگل بصورت آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار بررسی شد. نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد برای صفت میزان اسید کلروژنیک، بین غلظت‌های مختلف عصاره مخمر و چهار زمان برداشت و اثر متقابل آنها اختلاف بسیار معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد. عصاره مخمر سبب تحریک تولید اسید کلروژنیک شد. تولید اسید کلروژنیک به طور معنی‌داری تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره مخمر و مدت زمان تیمار می‌باشد. بیشترین میزان اسید کلروژنیک ($mg\ g^{-1}$ DW ۱/۶۸) در تیمار $g\ l^{-1}$ ۱/۵ عصاره مخمر به مدت ۹۶ ساعت تولید شد که ۳/۴۲ برابر بیشتر از شاهد می‌باشد.

کلمات کلیدی: سرخارگل، اسید کلروژنیک، عصاره مخمر، گیاهان دارویی

مقدمه

سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.)، گیاهی علفی و چند ساله می‌باشد که برای صدها سال به عنوان گیاهی دارویی استفاده شده است (Wang and To, 2004). این گیاه، یکی از پرفروش‌ترین گیاهان دارویی در بیشتر کشورهای توسعه یافته است (Kim *et al.*, 2010). این گیاه از نظر موارد مصرف در ایالات متحده آمریکا و اروپا، دومین رتبه را بین گیاهان دارویی دارد (Kayser and Quax, 2007)، به طوری که حدود ۱۰٪ تجارت مکمل‌های دارویی را به خود اختصاص داده است (Romero *et al.*, 2009). فروش سالانه‌ی فرآورده‌های گیاه سرخارگل در آمریکا، ۳۰۰ میلیون دلار و در کانادا ۲۵ میلیون دلار می‌باشد (Wang and To, 2004). طبق تحقیق پایگاه اطلاعات فرآورده‌های طبیعی، ۲۱۶ ماده موثره با خواص دارویی در سرخارگل وجود دارد (Murch *et al.*, 2006). سرخارگل، یکی از مهمترین گیاهان دارویی می‌باشد. در سال‌های اخیر، نیاز جهانی برای فرآورده‌های حاصل از گیاه دارویی سرخارگل به خاطر خطر بیماری‌های واگیردار ویروسی به شدت افزایش یافته است. این گیاه به عنوان یک داروی موثر در پیشگیری و درمان بسیاری از امراض همچون سرماخوردگی، آنفولانزا، عفونت‌ها و التهابات پوستی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Nilanthi *et al.*, 2009). گیاه داروئی سرخاگل، حاوی مشتقات اسید کافئیک یعنی کافئیک اسید، اسید کلروژنیک و اسید شیکوریک، کربوهیدرات‌ها، گلیکوزیدها، آلکالوئیدها، الکلآمیدها (آلکامیدها) و پلی اتیلنها می‌باشد. اسید کلروژنیک یک اسید هیدروکسی و ترکیبی ارگانیک از گروه فنیل پروپانوئید می‌باشد که در برخی از گیاهان وجود دارد و خاصیت آنتی اکسیدان و ضد التهابی دارد. در حال حاضر گیاه سرخارگل به طور گسترده‌ای در بسیاری از کشورها و همچنین منطقه شمال آمریکا که از آن سرچشمه گرفته، کشت می‌شود. در طبیعت، در برخی موارد متابولیت‌های ثانویه گیاهی به عنوان یک مکانیسم دفاعی در برابر حمله پاتوژن‌ها تولید می‌شوند و مشخص شده که گیاهان هنگامی که با ترکیباتی با منشاء پاتوژنی روبرو می‌شوند چنین واکنش مشابهی را از خود نشان می‌دهند. محرک‌ها سیگنال‌هایی تولید می‌کنند که باعث تحریک تشکیل متابولیت‌های ثانویه می‌شوند و از این روش می‌توان برای تولید بیشتر متابولیت‌ها استفاده نمود (Wickermesinhe and Arteca, 1993). محرک، به ترکیبات شیمیایی یا بیوفاکتورهایی از منابع مختلف اطلاق می‌شود که با

IrHC2019

افزودن مقادیر کم آن به یک سیستم سلولی زنده، می‌توانند سبب عکس‌العمل‌های فیزیولوژیکی، مرفولوژیکی، تجمع و افزایش فیتوالکسین‌ها شوند و بیوسنتز ترکیبات مخصوص آغاز یا افزایش یابد (Namdeo, 2007). از این رو محرک‌ها، در سطح وسیعی به عنوان ابزارهایی برای بهبود عملکرد متابولیت‌های ثانویه که کارکردی دفاعی در سلول‌های گیاهی دارند، مورد استفاده می‌گیرند. بنابراین بمنظور تولید اقتصادی متابولیت های ثانویه ضرورت دارد که از محرک ها به طور بهینه در گیاهان دارویی استفاده گردد. در این پژوهش، در راستای افزایش تولید اسید کلروژنیک، اثر غلظت‌های مختلف عصاره مخمر با چهار مدت زمان برداشت بر روی اندام هوایی سرخارگل بررسی شد.

مواد و روش ها

این تحقیق، از آذر ماه ۹۶ تا آبان ماه ۹۷ در گلخانه سازمان پارک‌ها و فضای سبز شهرداری ملایر واقع در غرب ایران و جنوب شرقی استان همدان با ارتفاع ۱۷۲۵ متر از سطح دریا در شهر ملایر انجام شد. بذور گیاه سرخارگل از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. برای کشت از گلدان‌هایی سفالی با قطر دهانه ۲۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر استفاده شد. برای خاک گلدان‌ها از خاک رس، خاک برگ و ماسه به نسبت مساوی استفاده شد و کود حیوانی پوسیده نیز به آن اضافه گردید. در هر گلدان ۱۵-۱۰ عدد بذر گیاه سرخارگل به صورت سطحی و در عمق ۱- ۰/۵ سانتی‌متری کاشته شد و لایه ای نازک کود دامی پوسیده روی آنها ریخته شد. دمای گلخانه به طور متوسط ۲۵ درجه سانتی گراد بود. بعد از ۴ ماه ارتفاع گیاهان حدودا ۵ سانتی متر شده بود و گیاهان تنک گردیدند طوری که در هر گلدان ۷ تا۱۰ گیاه باقی ماند. پس از گذشت ۱۱ ماه گیاهان به سمت گلدهی رفتند و ساقه گلدهنده تشکیل شد. روی برخی از گیاهان نیز غنچه‌های گل ظاهر شدند. در این مرحله با توجه به تحقیقات انجام شده بهترین زمان برای استفاده از محرک‌ها جهت افزایش متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. محلول پاشی روی اندام های هوایی گیاه انجام شد. برای محلول پاشی گیاهان شاهد نیز، آب معمولی مورد استفاده قرار گرفت. یک تا چهار روز پس از اعمال تیمارها، نمونه‌برداری صورت پذیرفت. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۶ تیمار و ۳ تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش عبارت بودند از: تیمار محلول پاشی در چهار غلظت عصاره مخمر ($g\ l^{-1}$ ۰، ۰/۷۵، ۱،۱/۵ روی اندام هوایی سرخارگل هر کدام در چهار زمان برداشت (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت). محلول‌های محرک آماده شده به گلخانه منتقل شدند. ابتدا برای هر سطح از هر محرک سه گلدان به عنوان سه تکرار انتخاب شدند. پاشش به تمام قسمت های هوایی گیاهان به طور کامل انجام شد. بعد از پاشش محلول‌ها بر روی گیاهان، بعد از ۲۴ ساعت اولین نمونه گیری، بعد از ۴۸ ساعت دومین نمونه‌گیری، بعد از ۷۲ ساعت سومین نمونه‌گیری و بعد از ۹۶ ساعت چهارمین نمونه‌گیری انجام شد. نمونه‌ها برای خشک شدن در مکانی سایه با دمای ۱۸ درجه پهن شده و بعد از یک هفته کاملاً خشک شدند. هر نمونه داخل کیسه پلاستیکی به طور جداگانه قرار گرفته و درب آنها بسته شد. صفت مورد مطالعه در این تحقیق شامل سنجش تولید اسید کلروژنیک توسط دستگاه HPLC بود.

نتایج و بحث

نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان می‌دهد که اثرات اصلی چهار غلظت ($g\ l^{-1}$ ۱/۵، ۱، ۰/۷۵، ۰) محرک عصاره مخمر و چهار زمان برداشت (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) و اثرات متقابل آنها بر تولید اسید کلروژنیک از برگ‌های سرخارگل در سطح احتمال ۱ درصد بسیار معنی‌دار می‌باشد. با توجه به معنی دار شدن اثر متقابل عصاره مخمر و زمان-های برداشت، می‌توان نتیجه گرفت که دو فاکتور بطور مستقل عمل نکرده‌اند. بدیهی است که در اینجا مقایسه میانگین اثرات اصلی محرک عصاره مخمر و زمان های مختلف برداشت اعتبار کافی ندارد. بنابر این فقط مقایسه میانگین اثرات متقابل مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج مقایسه میانگین تیمارها (شکل ۱) نشان می‌دهدکه بالاترین میزان اسید کلروژنیک در تیمار عصاره مخمر ۱/۵ گرم در لیتر در مدت زمان برداشت ۹۶ ساعت از زمان پاشش محرک‌ها به میزان ۱/۶۸ میلی‌گرم در گرم بوده و بعد از آن تیمار عصاره مخمر ۱/۵ گرم در لیتر در مدت زمان برداشت ۷۲ ساعت از زمان پاشش به میزان ۱/۳۷ میلی‌گرم در گرم بوده است. همچنین تیمار عصاره مخمر ۱ گرم در لیتر در مدت زمان برداشت ۹۶ ساعت از زمان پاشش به میزان ۱/۲۸ میلی‌گرم در گرم بوده است. این مقادیر با توجه به مقدار اسید کلروژنیک در شاهد که برای ۹۶

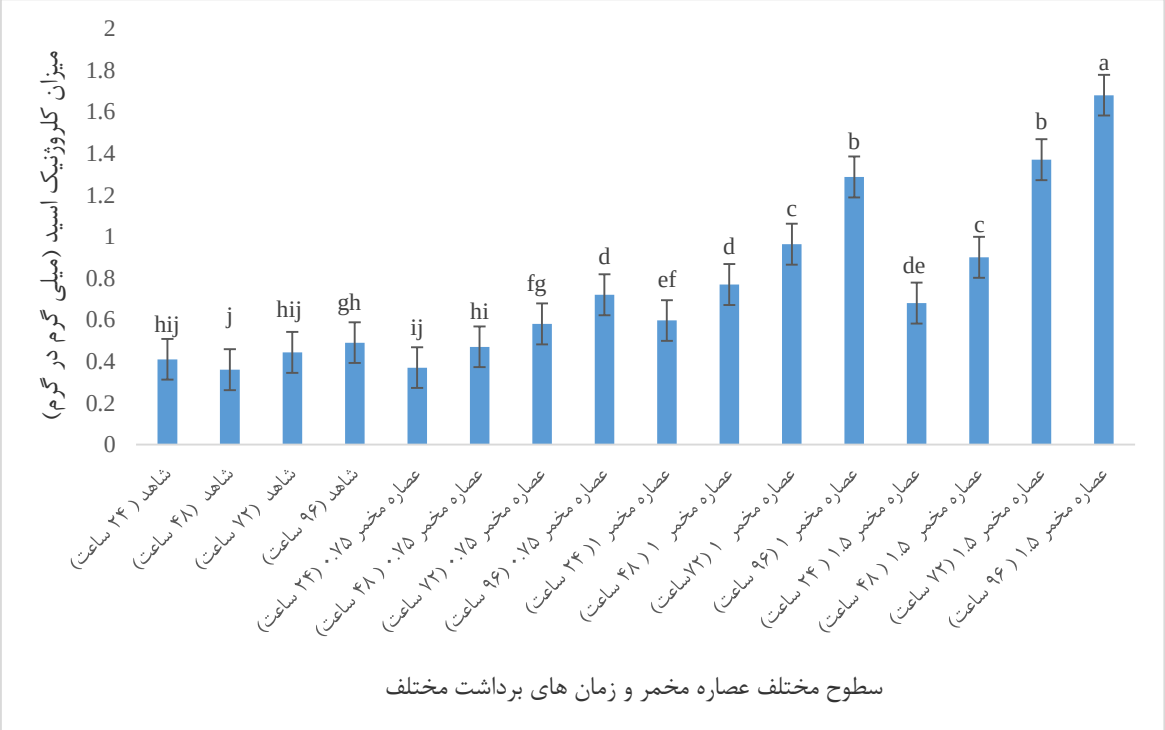
IrHC2019

ساعت ۰/۴۹ میلی‌گرم در گرم و برای ۷۲ ساعت ۰/۴۴ میلی‌گرم در گرم می‌باشد مقدار قابل توجهی است که برای اولی ۳/۴۲ برابر و برای دومی ۳/۱۱ برابر شده است. همچنین نتایج مقایسه میانگین تیمارها نشان می‌دهد که کمترین مقدار اسید کلروژنیک در سطوح مختلف عصاره مخمر مربوط به مقدار ۰/۷۵ گرم در لیتر در زمان برداشت ۲۴ ساعت به میزان ۰/۳۷ میلی‌گرم در گرم می‌باشد. به طور کلی نتایج نشان داد تمام سطوح مختلف عصاره مخمر بر تولید اسید کلروژنیک در گیاه دارویی سرخارگل تاثیر مثبت داشته و باعث افزایش آن می‌شود که این میزان تا ۳/۴۲ برابر شاهد بوده است. همچنین برای هر کدام از تیمار غلظت عصاره مخمر، افزایش زمان برداشت از ۲۴ ساعت تا ۹۶ ساعت باعث افزایش تولید اسید شیکوریک گردید. در رابطه با مکانیسم عمل محرک چندین فرضیه وجود دارد، از جمله: اتصال محرک به یک رسپتور در غشاء پلاسمایی، جریان کلسیم از منابع برون سلولی و منابع درون سلولی نظیر واکوئل‌ها به داخل سیتوپلاسم، تغییر سریع الگوی فسفریلاسیون پروتئین و فعالیت پروتئین کینازی و غیره (Vasconsuelo and Boland, 2007).

جدول (۱) تجزیه واریانس اثر عصاره مخمر و مدت زمان تیمار بر تولید اسید کلروژنیک در گیاه دارویی سرخارگل

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
محرک (a)	۳	۱/۳۶۴ **
زمان (b)	۳	۰/۶۶۲ **
اثر متقابل (a×b)	۹	۰/۰۹۶ **
اشتباه آزمایشی	۳۲	۰/۰۰۳ **
کل	۴۷	

** دارای تفاوت بسیار معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪



شکل (۱) مقایسه میانگین اثر متقابل عصاره مخمر و زمان‌های برداشت بر تولید اسید کلروژنیک در گیاه سرخارگل

منابع

1- Kayser, O., Quax, W. J. 2007. Medicinal plant biotechnology from basic research to industrial applications. Weinheim: Wiley-VCH Press, Germany.
2- Kim, J. S., Lee, S. Y., Eom, S. H. and Park, S. U. 2010. Improved shoot organogenesis and plant regeneration of *Echinacea angustifolia*. Journal of Medicinal Plants Research. 4(7): 587–591.

IrHC2019

3- Murch, S. J., Peiris, S. E., Shi, W. L., Zobayed, S. M. A. and Saxena, P. K. 2006. Genetic diversity in seed populations of *Echinacea purpurea* controls the capacity for regeneration, route of morphogenesis and phytochemical composition. Plant Cell Rep., 25: 522–532.
4- Namdeo, A. G. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites. Pharm Rev., 1: 69-79.
5- Nilanti, D., and yang, Y.Sh. 2014. Effects of Sucrose and Other Additives on *in vitro* growth and development of purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.) J Biomed Biotechnol.
6-Romero, F. R., Delate, K., Kraus, G. A., Solco, A. K., Murphy, P. A. and Hannapel, D. J. 2009. Alkamide production from hairy root cultures of *Echinacea*. In Vitro Cell. Dev Biol Plant, 45: 599-609.
7- Vasconsuelo, R. and Boland, R. 2007 Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. Plant Sci., 172 (5): 861-875.
8- Wang, H. M. and To, K. Y. 2004. *Agrobacterium*-mediated transformation in the high-value medicinal plant *Echinacea purpurea*. Plant Sci., 166: 1087–1096.
9- Wickremesinhe, E. R. M. and Arteca, R. N. 1993. *Taxus* callus cultures: initiation, growth optimization, characterization and *Taxol* production. Plant Cell Tiss Organ Cult., 35: 181-183.

Improvement of Chlorogenic Acid Production in Coneflower by Yeast Extract

Zhila Mehrpooya[1], Mohammad Abdoli [*2], Mohammad Reza Talebian[3]
[1] MSc in Plant Production, Faculty of Agriculture, Malayer University
[2*] Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Malayer University
[3] Graduate of Master of Plant Production, Malayer University
[*] *Corresponding author: Abdoli_m@malayeru.ac.ir*

Abstract

Using of elicitors can be a suitable way to increase the production of valuable secondary metabolites in medicinal plants. In this research, in order to increase the production of chlorogenic acid, the effect of different concentrations of yeast extract (0, 0.5, 0.75, 1 $g1^{-1}$) each at four harvesting times (24, 48, 72 and 96 Hour) on leaf of *Echinacea* in a factorial experiment with a completely randomized design with three replications was investigated. The results of analysis of the variance showed that for the chlorogenic acid content, there is very significant difference at 1% probability level between the concentrations of yeast extract and the four harvesting times and their interactions. The yeast extract stimulated the production of chlorogenic acid. Chlorogenic acid production is significantly affected by the different concentrations of yeast extract and the duration of the treatment. The highest amount of chlorogenic acid content (1.68 mg g^{-1} DW) was produced in the treatment 1.5 g l^{-1} of yeast extract for 96 hours, which is 3.42 times more than control.

***Keywords*:** *Echinacea purpurea*, Chlorhenic acid, Yeast extract, Medicinal plants

IrHC2019