Journal of Medicinal Plants Biotechnology
JMPB

Original Article

Impact of Heat Shock Treatment on Chicoric Acid Production in Tissue Culture of *Echinacea Purpurea*

Fatemeh Shahri [1], ***Sahebeh Hajipoor*** [2], ***Mahnaz Aghdasi*** *[3], ***Seyed Mohammad Fatemi*** [4]

1.MSc student in Plant Physiology, Faculty of Science, Golestan University, Golestan, Iran
2.PhD student in Plant Physiology, Faculty of Science, Golestan University, Golestan, Iran
3.Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Golestan University, Golestan, Iran
4.Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Golestan University, Golestan, Iran

ARTICLE INFO

Article history

Submitted: 2025-1-14
Revised: 2025-2-9
Accepted: 2025-4-4

KEYWORDS

Heat shock, *Echinacea purpurea,* chicoric acid, phenol, secondary metabolites.

ABSTRACT

Plants synthesize a wide variety of secondary metabolites with complex chemical compositions that not only have medicinal value but also play important roles in coping with biotic and abiotic stress conditions.The aim of the current study was to investigate the impact of heat shock treatment on the production of secondary metabolites in callus obtained from *Echinacea purpurea* plant. To this aim, seeds were grown on MS medium. Then root explants were prepared from 45-day-old seedlings and transferred to MS medium containing different concentrations of 0/5 and 1 mg/L 2,4-D and Kin. Heat shock treatment at 35 °C for different durations (10, 20, 30, 40, 50 and 60 minutes) was applied daily to 2-month-old callus. After a week, the samples were collected and different biochemical analysis were performed. The highest amount of total phenol, total flavonoid, soluble sugar, MDA, chicoric acid, chlorogenic acid and caffeic acid was observed in samples that were treated for 60 min at 35 °C. On the other hand, the present data revealed that heat shock treatment significantly increased catalase and peroxidase activities, but there was no significant difference among the different treatments. In conclusion, the results indicated that heat shock treatment can be used as a new method to enhance the production of secondary metabolites in *Echinacea* under tissue culture conditions.

* Corresponding author: ***Mahnaz Aghdasi***
✉ E-mail: *Aghdasi1346@gmail.com*

مجله زیست فناوری گیاهان دارویی
JMPB

مقاله پژوهشی

اثر تیمار شوک حرارتی بر تولید شیکوریک اسید در کشت بافت سرخارگل ارغوانی (Echinacea purpurea)

فاطمه شهری [۱]، صاحبه حاجی‌پور [۲]، مهناز اقدسی [۳]، سید محمد فاطمی [۴]

۱.دانش‌آموخته کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گلستان، ایران
۲. دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان ، گلستان، ایران
۳. استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گلستان، ایران
۴. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گلستان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۲۵-۱۰-۱۴۰۳
بازنگری: ۲۱-۱۱-۱۴۰۳
پذیرش: ۱۵-۱-۱۴۰۴

چکیده: گیاهان تنوع عظیمی از متابولیت‌های ثانویه را با ترکیب شیمیایی پیچیده‌ای سنتز می‌کنند که نه تنها ارزش دارویی دارند بلکه در مبارزه گیاهان با تنش‌های زیستی و غیر زیستی نیز مهم هستند. هدف از این مطالعه اثر تیمار شوک حرارتی بر تولید متابولیت‌های ثانویه در پینه گیاه سرخارگل می‌باشد. به منظور انجام این تحقیق بذرهای گیاه سرخارگل در محیط کشت MS رشد داده شدند و سپس قطعات جداکشت ریشه از گیاهچه‌های ۴۵ روزه تهیه و در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر D-۲,۴ و Kin کشت شدند. تیمار شوک حرارتی در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و به طور روزانه در مدت زمان-های مختلف (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ ، ۵۰ و ۶۰ دقیقه) بر روی پینه‌های دوماهه اعمال شد. پس از یک هفته نمونه‌ها جمع‌آوری و سنجش‌های مختلف بیوشیمیایی بر روی آن انجام شد. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار فنل کل، فلاونوئید کل، قند محلول، مالون دی‌آلدهید، شیکوریک‌اسید، کلروژنیک‌اسید و کافئیک‌اسید در نمونه‌هایی که به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد تیمار شده بودند، مشاهده شد. ازطرفی دیگر داده‌های حاضر نشان داد که تیمار شوک حرارتی سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در مقایسه با شاهد شده، اما بین انواع تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. نتایج حاضر نشان می‌دهد که با اعمال تیمار شوک حرارتی می‌توان تولید متابولیت‌های ثانویه را در شرایط کشت بافت در گیاه سرخارگل افزایش داد.

واژگان کلیدی:

سرخارگل، شوک حرارتی، شیکوریک اسید، فنل، متابولیت‌های ثانویه.

*نویسنده مسئول: **مهناز اقدسی**

✉ E-mail: *Aghdasi1346@gmail.com*
Journal homepage: ***jmpb.znu.ac.ir***

مقدمه

گیاه سرخارگل ارغوانی با نام علمی *Echinacea purpurea* گیاهی چند-ساله و متعلق به خانواده آفتابگردان است (McGregor, 1968). تاکنون چندین گروه مهم از ترکیبات فعال زیستی با خاصیت دارویی از این گیاه جداسازی شده است. مهم‌ترین اجزای سرخارگل شامل آلکیل آمیدها، پلی ساکاریدها، گلیکوپروتئین‌ها، فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی مانند مشتقات اسید کافئیک، شیکوریک اسید، کافتاریک اسید و کلروژنیک اسید است که مقدار آن در بخش‌های مختلف گیاه متفاوت می‌باشد (Erkoyuncu and Yorgancilar, 2021). اسید شیکوریک فراوان‌ترین جزء ترکیبات فنلی موجود در ریشه سرخارگل است. این ترکیب خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی داشته و می‌تواند به بهبود عملکرد سیستم ایمنی بدن کمک کنند (Lee and Scagel, 2013). با این حال، غلظت این ترکیب با توجه به گونه، نوع اندام، شرایط رشد و عوامل محیطی متفاوت است (Erkoyuncu and Yorgancilar, 2021).

مسیر بیوسنتزی شیکوریک اسید هنوز به خوبی شناخته نشده است. تحقیقات نشان می‌دهند که بیوسنتز شیکوریک اسید از مسیر فنیل پروپانوئید انجام می‌شود. پیش‌ماده اصلی این مسیر اسیدآمینه فنیل‌آلانین است که توسط آنزیم فنیل‌آلانین-آمونیالیاز (PAL) به اسید سینامیک تبدیل شده و سپس توسط سینامات ۴ هیدروکسیلاز (C4H) به اسید کوماریک تبدیل می‌شود. کوماریک اسید توسط p-coumarate-3-hydroxylase (C3H) به اسید کافئیک تبدیل می‌شود. در ادامه آنزیم لیگاز ۴-(هیدروکسیل) سیناموئیل CoA (4CL)، تبدیل کوماریک اسید و کافئیک اسید را به کوماروئیل CoA و کافئویل CoA کاتالیز می‌کند. به تازگی سه آنزیم مهم در این مسیر شناسایی شده که مراحل نهایی بیوسنتز شیکوریک اسید را کاتالیز می‌کنند: تارتاریک اسید هیدروکسی سیناموئیل ترانسفراز (HTT)، هیدروکسی سیناموئیل-CoA و کوئینات هیدروکسی سیناموئیل ترانسفراز (HQT). HTT بیوسنتز کافتاریک اسید را از کافئویل CoA را

کاتالیز می کند، در حالی که HQT بیوسنتز کلروژنیک اسید را کاتالیز می‌کند. سپس کافتاریک اسید و کلروژنیک اسید از سیتوزول به داخل واکوئل انتقال یافته و شیکوریک اسید به کمک CAS (شیکوریک اسید سنتاز)، سنتز می‌شود (Ravazzolo et al., 2022).

تنوع ژنتیکی عظیم در میان خانواده‌ها و حتی درون گونه‌های مختلف گیاهان دارویی، ضرورت تولید آن‌ها را در شرایط کنترل شده ایجاد می‌کند. کشت بافت گیاهی به رشد و تکثیر سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌ها در محیط‌های جامد یا مایع در شرایط کنترل‌شده اشاره دارد. در حال حاضر تکنیک کشت بافت به طور فزاینده‌ای در تولید ترکیبات زیست‌فعال در شرایط آزمایشگاهی استفاده می‌شود (Marthe, 2018). با توجه به ارزش اقتصادی بالای شیکوریک اسید در صنعت دارویی و تهیه مکمل‌های غذایی، تلاش‌های زیادی در جهت افزایش تولید این ماده در جریان است. تاکنون گزارش‌های مختلفی در زمینه کشت بافت سرخارگل منتشر شده است. نتایج تحقیقات انجام شده نشان داده که تیمارهای هورمونی مناسب می‌تواند به تحریک تولید این ماده در شرایط کشت بافت منجر شود. رمضان‌نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان دادند که پینه حاصل از قطعات جداکشت ریشه در محیط کشت MS حاوی 2,4-D و Kin سبب افزایش ۶۰ درصدی در تولید این ترکیب در مقایسه با شاهد شده است (Ramezannezhad et al., 2019). این محققان نشان دادند در حالی که مقدار شیکوریک‌اسید در قطعه جداکشت ریشه ۳/۴۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بوده، مقدار این ترکیب در پینه به دست آمده به ۵/۶۳ میلی گرم بر گرم وزن خشک رسیده است. نتایج تحقیقات دیگر در زمینه استفاده از برخی الیسیتورها نیز نشان داده که تیمار سوسپانسیون سلولی حاصل از قطعه جداکشت ریشه با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر نانوذره نیترات نقره به مدت ۴۸ ساعت سبب افزایش این ماده تا ۹/۴۵ میلی گرم بر گرم وزن خشک شده است. نتایج مفید بجنوردی و همکاران در سال ۲۰۲۳ نیز بر روی تولید شیکوریک اسید در گیاه کاهوی موجدار نشان داده که تیمار پینه حاصل از قطعه جداکشت برگ با نور UV به مدت ۲۰ دقیقه (در طی ۱۰

روز)، سبب افزایش این ماده به مقدار ۶/۱۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک می‌شود. همچنین تیمار تعلیق سلولی حاصل از پینه حاصل از قطعه جداکشت برگ گیاه کاهوی موجدار به مدت ۴۸ ساعت با ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان سبب افزایش ۲/۸ برابری در مقدار شیکوریک اسید (۱۱/۶۳ میلی گرم بر گرم وزن خشک) در مقایسه با شاهد شده است (Mofid Bojnoordi et al., 2022).

تاکنون اثر عوامل مختلف بر تولید شیکوریک اسید در کشت بافت مورد بررسی قرار گرفته است، اما گزارشی در خصوص اثر شوک حرارتی بر تولید شیکوریک اسید منتشر نشده است. نتایج تحقیقات مفید بجنوردی و همکاران در سال ۱۴۰۰ در مطالعه اثر شرایط محیطی بر تولید شیکوریک اسید در گیاه کاهوی موجدار نشان داده که گیاهان کشت‌شده در شرایط اتاقک رشد که متحمل نوسان دمایی کمتری بودند مقدار شیکوریک اسید کمتری در مقایسه با گیاهان کشت شده در شرایط مزرعه داشتند (مفید بجنوردی و همکاران ۱۴۰۰). Tudela و همکاران نیز در سال ۲۰۱۷ نشان داده‌اند که دمای پایین سبب کاهش تولید ترکیبات فنلی در گیاه کاهو می‌شود.

دمای بالا بر رشد و نمو گیاه تأثیر منفی می گذارد. تحمل گرما در گیاهان به تعامل پیچیده‌ای از عوامل مختلف، از جمله فعال‌شدن مسیر پاسخ به تنش گرمایی، مسیرهای سیگنال‌دهی پایین-دست و زیست‌ساخت هورمون‌های گیاهی وابسته است. این شبکه پیچیده از مکانیسم‌ها منجر به تولید چندین متابولیت ثانویه می‌شود که نقش مهمی در افزایش توانایی گیاه برای مقابله با تنش دمای بالا ایفا می‌کند (Rehman et al., 2024).

Karakas و همکاران در سال ۲۰۲۰ اثر شوک حرارتی را بر تولید متابولیت‌های ثانویه در پینه‌های گیاه شیرین بیان مورد بررسی قرار دادند. تیمارها شامل چهار درجه حرارت (۴، ۲۲، ۳۵ . ۴۵ درجه سانتی‌گراد) در مدت زمان‌های ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه بود. نتایج نشان داد بالاترین درصد تولید ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مانند سوپروکسید دیسموتاز و کاتالاز در تیمار ۴ درجه و ۲۲ درجه و به مدت

۱۵ دقیقه بوده است (Karakas et al., 2020).

Xin و همکاران در سال ۲۰۲۲ تاثیر شوک حرارتی را در تشکیل پینه در سیب‌زمینی شیرین مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه، پینه سیب‌زمینی شیرین با شوک حرارتی در دمای ۵۰، ۶۵ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه تحت تیمار قرار گرفت. نتایج این محققان نشان داد که تیمار در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد متابولیسم گونه‌های اکسیژن فعال را در سیب‌زمینی شیرین تحریک می‌کند. سطح بالاتر گونه‌های اکسیژن فعال، فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیالاز، لیگاز ۴-کومارات-CoA و سینامات-۴-هیدروکسیلاز در مسیر متابولیک فنیل پروپانوئید را تحریک کرده و سنتز سریع کلروژنیک اسید ، p-کوماریک اسید، روتین اسید و کافئیک اسید را افزایش می‌دهد. محتوای کاتالاز، PAL و کلروژنیک اسید با تغییر در متابولیت‌ها و فعالیت‌های آنزیمی همبستگی مثبت نشان داد (Xin et al., 2022).

در حال حاضر سرخارگل ارغوانی به‌عنوان یکی از پرفروش‌ترین گیاهان دارویی و مکمل‌های غذایی در اروپا و ایالات متحده آمریکا شناخته شده است. با توجه به ارزش اقتصادی و حجم مبادلات تجاری شیکوریک اسید در جهان (بالغ بر ۵۸ میلیون دلار در سال (Lee and Scagel, 2013)، یافتن راهکارهای مناسب که بتواند تولید این ماده با ارزش را افزایش دهد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. به همین دلیل هدف از تحقیق حاضر بررسی الگوی تغییرات شیکوریک اسید و مشتقات آن در پینه حاصل از سرخارگل ارغوانی در اثر تیمار شوک حرارتی خواهد بود.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاهچه استریل و تولید پینه: در این تحقیق بذرها از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. به منظور تولید گیاهچه سترون، بذرها به مدت ۱۵ دقیقه در آب شهر خیسانده شدند. سپس به مدت یک دقیقه در الکل ۷۰٪ ضدعفونی شده و بدنبال آن با آب مقطر استریل شستشو شدند. پس از ضدعفونی‌شدن به مدت ۱۰ دقیقه در آب ژاول ۷٪، سه بار با آب مقطر استریل شستشو شده و در زیر هود لامینار بر روی محیط کشت قرار

گرفتند. سپس ظروف حاوی بذرها به اتاقک کشت با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال داده شدند. پس از ۴۵ روز، قطعات جداکشت ریشه از گیاهچه‌های استریل جدا شده و به محیط کشت MS حاوی ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin انتقال یافتند. شرایط اتاقک رشد برای تولید پینه از نظر فتوپریود، شدت نور و دما مطابق با شرایط تولید گیاهچه استریل بود. عملیات واکشت هر ۳ هفته انجام شد. بعد از ۶۰ روز پینه‌ها برداشت شدند.

شرایط تیماردهی: پینه‌های به دست آمده به مدت یک هفته به طور روزانه در مدت زمان‌های مختلف (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ ، ۵۰ و ۶۰ دقیقه) در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد تیمار شدند. پس از بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی پینه‌ها، سنجش‌های بیوشیمیایی انجام شد. بخشی از نمونه‌ها جهت انجام سنجش‌های فیزیولوژیکی در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و بخش دیگری از نمونه‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت در آون خشک شدند.

سنجش فنل کل و فلاونوئید کل: جهت عصاره‌گیری ۰/۱ گرم از نمونه پینه خشک پودر شده در ۵ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق خیسانیده شد. عصاره به دست آمده از کاغذ صافی عبور داده شد. روش استخراج سه بار تکرار شد و عصاره به دست آمده از هر مرحله با هم مخلوط شدند. سپس با استفاده از دستگاه روتاری حلال از عصاره جدا شده و جهت سنجش مقدار فنل و فلاوونوئید کل استفاده شد (Pourmorad et al., 2006).

سنجش فنل کل با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو (Folin-Ciocalteu Reagent) انجام شد. ابتدا ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره به دست آمده با ۱/۲۵ میلی لیتر از معرف فولین‌کالتیو سیو ۰/۲ مولار مخلوط و پس از ۵ دقیقه قرار گرفتن در دمای محیط، یک میلی‌لیتر از محلول Na2CO3 به آن اضافه و مجدداً به مدت ۲ ساعت در دمای محیط قرار گرفت. سپس جذب محلول در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد غلظت‌های مختلفی از گالیک اسید (۲ ، ۱/۵ ، ۱ ، ۰/۵ ، ۰)

میلی‌گرم در لیتر تهیه و طول موج آن با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. مقادیر فنل کل به صورت اکی والان میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک گیاه محاسبه شد (Meda et al., 2005).

سنجش محتوی فلاوونوئید کل به روش آلومینیوم کلراید (AlCl3) انجام شد (Chang et al., 2002). در این روش ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره پس از فیلترشدن با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر با ۷۵۰ میکرولیتر متانول، ۵۰ میکرولیتر محلول الکلی ۱۰ درصد AlCl3، ۵۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۱/۴ میلی لیتر آب مقطر دوبار تقطیر مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه شدند. سپس جذب مخلوط واکنش در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف کوئرسیتین (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ میکروگرم) استفاده شد. محتوی فلاوونوئید کل عصاره بر مبنای میلی‌گرم کوئرستین بر گرم عصاره استخراج شده تعیین شد.

سنجش قند: برای سنجش محتوای قند محلول، از روش فنل‌اسیدسولفوریک استفاده‌شد (McCready et al., 1950). ابتدا برای استخراج عصاره ۰/۱ گرم پینه در هاون چینی حاوی ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ٪۷۰ سائیده شده و سپس به مدت یک هفته در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از یک هفته نمونه‌ها صاف شده و عصاره مورد نظر بدست آمد. برای سنجش ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره با آب مقطر به حجم ۲ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس یک میلی‌لیتر فنل ٪۵ به آن اضافه و ورتکس شد. آنگاه ۵ میلی لیتر اسیدسولفوریک غلیظ به آن افزوده و حدود نیم ساعت پس ازخنک‌شدن کامل محلول، جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۸۵ نانومتر خوانده‌شد. محلول بلانک حاوی ترکیبات مذکور بوده ولی به جای عصاره از اتانول ٪۷۰ استفاده شد. به منظور اندازه‌گیری محتوای قند محلول از منحنی استاندارد گلوکز استفاده‌شد. غلظت قند محلول برحسب میکروگرم در لیتر تعیین و نتایج حاصل برحسب میلی‌گرم برگرم وزن خشک نمونه بیان شد.

به منظور سنجش قند کل ۰/۲ گرم از نمونه تر سابیده شده و به یک

لوله فالکون انتقال یافت. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ (v/v) به آن اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه با ورتکس تکانده شد. در مرحله بعد نمونه‌ها در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول رویی به لوله فالکون انتقال یافته و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار گرفتند تا الکل نمونه‌ها به طور کامل تبخیر شود. مقدار ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۴۷ میلی‌لیتر هیدروکسیدباریم ۰/۳ نرمال و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر سولفات‌روی ۵ ٪به هر کدام از نمونه‌های خشک شده اضافه و نمونه‌ها در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و فاز رویی جدا و درون لوله فالکون ریخته شده و جهت اندازه‌گیری قند کل استفاده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول تهیه شده به یک فالکون منتقل شده و یک میلی‌لیتر محلول فنل ۵٪ به محلول مرحله قبل اضافه و سپس ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸ ٪ (v/v) به محلول بالا اضافه شده و در نهایت پس از ۴۵ دقیقه، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۸۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (Schlegel, 1956).

سنجش پراکسیداسیون لیپیدها (MDA): در این روش ابتدا ۰/۱ گرم بافت تازه در هاون چینی پودر شده و سپس به آن ۱ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید ۵٪ اضافه شده و با دستگاه ورتکس به خوبی مخلوط شد. سپس نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. هم حجم سوپرناتانت بالا، تیوباربیوتوریک اسید ۰/۵٪ در Tca ۲۰ ٪ به نمونه اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه در بن‌ماری قرار داده شده و بلافاصله به حمام یخ منتقل شدند. پس از سردشدن، نمونه‌ها در ۷۵۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. جذب محلول در طول موج های ۶۰۰ و ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقدار MDA هر نمونه توسط فرمول زیر محاسبه شد (Hodges et al., 1999).

MDA (µmol/g.f.w) = ((A 532nm/155)/ 0.1)-((A600nm/155)/ 0.1)

A532: میزان جذب در ۵۳۲ نانومتر و A600: جذب در ۶۰۰ نانومتر

اندازه‌گیری شیکوریک، کلروژنیک و کافئیک اسید: مقدار شیکوریک،

کلروژنیک و کافئیک اسید به روش Luo و همکاران در سال ۲۰۰۳ سنجش شد. به این منظور، مقدار ۰/۱ گرم پودر پینه خشک‌شده در استونیتریل ۲۰٪ (v/v) خیسانده شده و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و بر روی شیکر قرار گرفت. عصاره‌ی حاصل بعد از فیلترشدن توسط کاغذ صافی به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۵۰۰ دور سانتریفیوژ شد. در نهایت، عصاره شفاف رویی به منظور سنجش شیکوریک، کلروژنیک و کافئیک اسید مورد استفاده قرار گرفت.

برای سنجش این ترکیبات از دستگاه HPLC دارای ستون (4.6 mm×250 mm) C18 با آشکارساز UV/VIS، ردیاب Diod Array، پمپ L- Merck Hitachi 7100 و نرم افزار EZchrome مدل Hitachi-Japan استفاده شد. روش انجام آنالیز از نوع ایزاکراتیک و سرعت جریان حلال یک میلی‌لیتر در دقیقه بود. فاز متحرک شامل استونیتریل خالص و آب اسیدی شده با ۰/۱ درصد فسفریک اسید بود. فاز تهیه‌شده به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه فراصوت در دمای ۲۰ درجه‌سانتی‌گراد قرار گرفت تا حباب‌های هوا از آن خارج شود. طول موج‌های انتخابی دستگاه شامل ۳۳۰ نانومتر برای سنجش شیکوریک اسید و ۲۷۸ نانومتر برای سنجش کلروژنیک اسید و کافئیک اسید بود. مقدار ۲۰ میکرولیتر از عصاره (پس از فیلترشدن) به دستگاه تزریق شد. برای رسم نمودارهای استاندارد، غلظت‌های مختلف سه ترکیب استاندارد به ستون تزریق و پس از محاسبه سطح زیرپیک، نمودارهای استاندارد رسم شد. با قرار دادن مقادیر زیرسطح پیک‌های شیکوریک، کلروژنیک و کافئیک اسید در فرمول به دست آمده از نمودار رگرسیون مربوط، غلظت این ترکیبات بر اساس میلی‌گرم در گرم وزن خشک محاسبه شد.

عصاره‌گیری جهت سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز: عصاره‌گیری به روش Kar and Mishra (1976) صورت گرفت. به این منظور مقدار ۰/۱ گرم از بافت تر پینه با ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با اسیدیته ۶/۸ در یک هاون چینی سرد و بر روی حمام یخ هموژن شد. هموژن حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۶۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. فاز

رویی به عنوان عصاره آنزیمی برای بررسی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز مورد استفاده قرار گرفت.

جهت سنجش آنزیم پراکسیداز، محلول واکنش با حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر، حاوی ۲۷۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار با PH=6.8، ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول ۰/۶ مولار، ۱۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱/۲ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی است. غلظت نهایی پراکسید هیدروژن و گایاکول در ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش به ترتیب ۲۰ و ۴۰ میلی مولار است. محلول شاهد، حاوی ۲۸۰۰ میکرولیتر بافر فسفات، ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول ۰/۶ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی است. واکنش با افزودن عصاره آنزیمی آغاز شد. تغییرات جذب نور محلول واکنش نسبت به شاهد در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه در فواصل زمانی ۱۰ ثانیه ثبت گردید. در نهایت فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس میکرومول تترا گایاکول تشکیل شده (ضریب خاموشی m μ-1 cm-126.6) در دقیقه به ازای یک میلی‌گرم بافت تر بیان شد (Chance and Maehly, 1995).

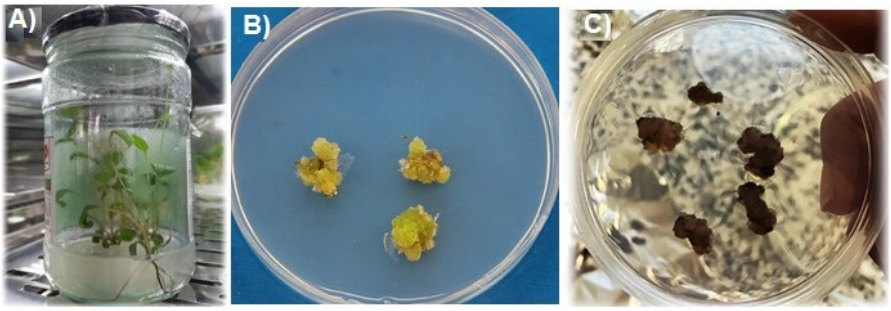
به منظور سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز، محلول واکنش در حجم نهایی۳ میلی‌لیتر شامل ۲۸۰۰ میکرولیتر بافر فسفات‌سدیم ۵۰ میلی مولار با pH=6.8، ۱۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۰/۴۵ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی است. غلظت نهایی پراکسید هیدروژن در ۳ میلی‌لیتر محلول واکنش، ۱۵ میلی‌مولار می‌باشد. محلول شاهد حاوی ۲۹۰۰ میکرولیتر بافر و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی است. با افزودن عصاره به محیط واکنش، تجزیه پراکسید هیدروژن توسط آنزیم شروع می‌شود. تغییرات جذب نور محلول واکنش نسبت به شاهد در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۱۲ دقیقه در فواصل زمانی ۱۰ ثانیه ثبت شد. در نهایت فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس میکرومول پراکسید هیدروژن مصرف شده (ضریب خاموشی $m\ \mu^{-1}\ cm^{-1}$ ۴۰) در دقیقه به ازای ۱ میلی‌گرم بافت تر بیان گردید (Chance and Maehly, 1995).

آنالیز آماری: در این پژوهش طرح کاملاً تصادفی مورد استفاده قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل نتایج از آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده شد. در مواردی که تفاوت معنی‌داری بین

میانگین پاسخ کالوس‌ها وجود داشت، مقایسه زوجی بین میانگین‌ها با استفاده از آزمون TukeyHSD انجام شد و نتایج به صورت نمودارهای جعبه‌ای ارایه شد.

نتایج

خصوصیات ظاهری گیاهچه‌های استریل و پینه حاصل از قطعات جداکشت ریشه: بذرهای گیاه سرخارگل سه روز پس از آب‌نوشی و قرارگرفتن بر روی محیط کشت MS جوانه زدند و پس از ۴۵ روز گیاهچه استریل به دست آمد (شکل A-۱). سپس قطعات جداکشت ریشه در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون‌های 2,4-D و Kin قرار گرفتند. پس از ۱۰ تا ۲۰ روز، پینه‌ها در لبه بریدگی قطعات جدا کشت ظاهر شدند. رنگ پینه‌های به دست آمده سبز روشن بود (شکل B-۱). سپس از پینه‌های ۶۰ روزه جهت اعمال تیمار استفاده شد. با اعمال تیمار شوک حرارتی رنگ پینه‌ها به قهوه‌ای تیره تغییر یافت (شکل C-۱).



شکل ۱: A) گیاهچه استریل ۴۵ روزه. B) پینه حاصل از قطعات جداکشت ریشه در محیط کشت MS حاوی غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون‌های 2,4-D و Kin پس از ۶۰ روز نگهداری در شرایط اتاق کشت C) پینه حاصل از قطعات جداکشت ریشه یک هفته پس از تیمار شوک حرارتی به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد.

اثر تیمار شوک حرارتی بر فاکتورهای بیوشیمیایی: نتایج حاصل از آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که اثر مدت زمان تیمار بر مقدار فنل و فلاونوئید کل، قند کل و محلول، مالون در آلدهید، شیکوریک اسید، کلروژنیک اسید، کافئیک اسید و

نیز کلروفیل در سطح ۹۵٪ بوده است. اما اثر مدت زمان بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز معنی‌دار نبوده است(جدول ۱).

محتوی فنل و فلاونوئیدکل:

داده‌های حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که تیمار شوک حرارتی به مدت ۱۰ و ۲۰ دقیقه تفاوت معنی‌داری در مقدار فنل کل با نمونه شاهد نشان نمی‌دهد. از طرفی دیگر بین تیمارهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه ای نیز تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. این در حالی است که با افزایش مدت زمان تیمار شوک حرارتی به ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه مقدار فنل کل به طور معنی‌داری نسبت به شاهد و نیز سایر تیمار ها افزایش نشان داد. در این آزمایش کمترین مقدار فنل کل در نمونه شاهد (۱۱۲/۰۱±۰/۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و بیشترین مقدار آن در تیمار ۶۰ دقیقه‌ای (۴/۶۱۰±۰/۴۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) دیده شده که نسبت به شاهد افزایش ۴۱ برابری را نشان داده است (شکل A-۲).

نتایج حاصل نشان داد که در نمونه شاهد مقدار فلاونوئید کل ۱۸۸/۰۴۱±۰/۰میلی‌گرم بر گرم وزن تر می‌باشد. با اعمال شوک حرارتی مقدار فلاونوئید کل به تدریج با افزایش مدت زمان تیمار افزایش نشان یافت، به طوری‌که بیشترین مقدار فلاونوئید کل در تیمار ۶۰ دقیقه‌ای شوک حرارتی (۵۷۲/۱۲±۲/۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مشاهده شد. نتایج حاصل از آنالیز آماری نیز نشان داد که بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ وجود دارد (شکل B-۲).

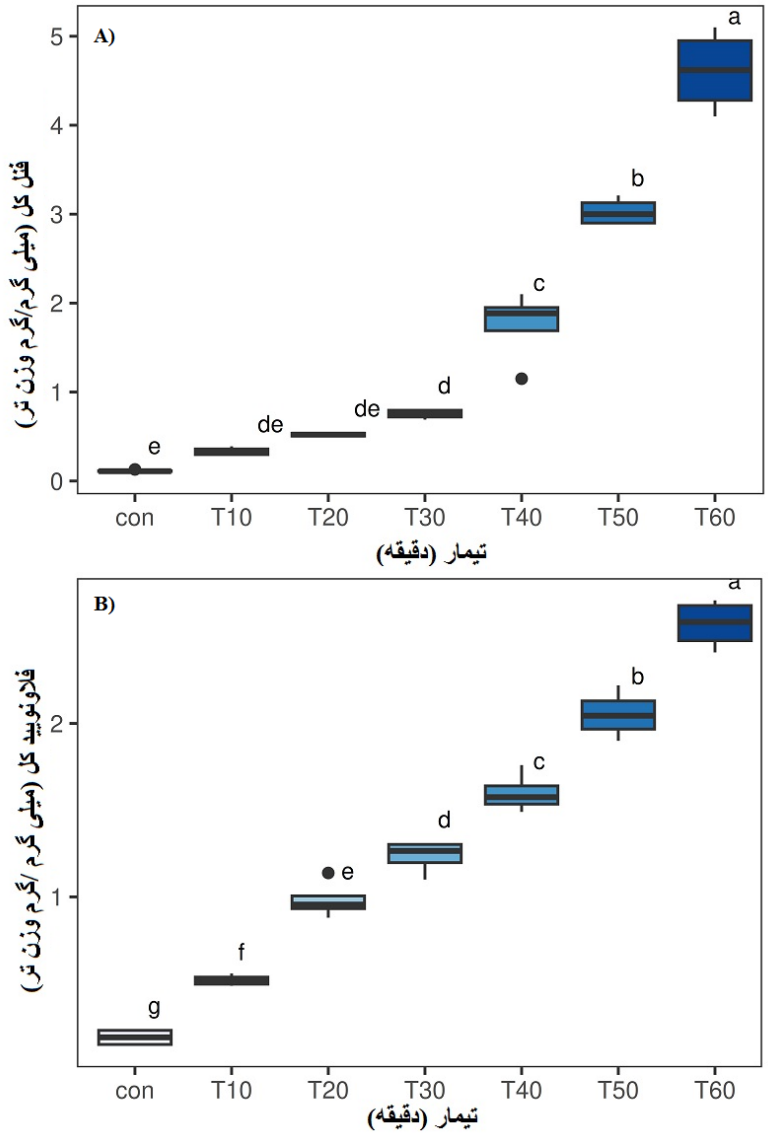
جدول ۱- آنالیز واریانس اثر مدت زمان تیمار شوک حرارتی بر برخی فاکتورهای بیوشیمیایی در پینه حاصل از قطعه جداکشت ریشه گیاه سرخارگل *(Echinacea purpurea)* در محیط کشت MS.

		میانگین مربعات									
منابع تغییرات	درجه آزادی	فنل کل	فلاونوئید کل	قند کل	قند محلول	مالون دی آلدهید	پراکسیداز	کاتالاز	شیکوریک اسید	کلروژنیک اسید	کافئیک اسید	کلروفیل
تیمار	۶	۲/۸۱۷**	۱۱/۹*	۲۰/۱۷*	۱/۱۹*	۱۳/۵۸*	۱۳/۰۲ns	۲/۲۳ns	۴۹/۰۲*	۶/۳۱*	۴/۱۶*	۳/۶۲*
خطای آزمایش	۱۱	۰/۱۱	۰/۰۶	۰/۱۹۴	۳*۰/۰۳۱	۰/۳۵	۱۷/۳۴	۸/۸۹	۰/۰۰۷	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۳۱

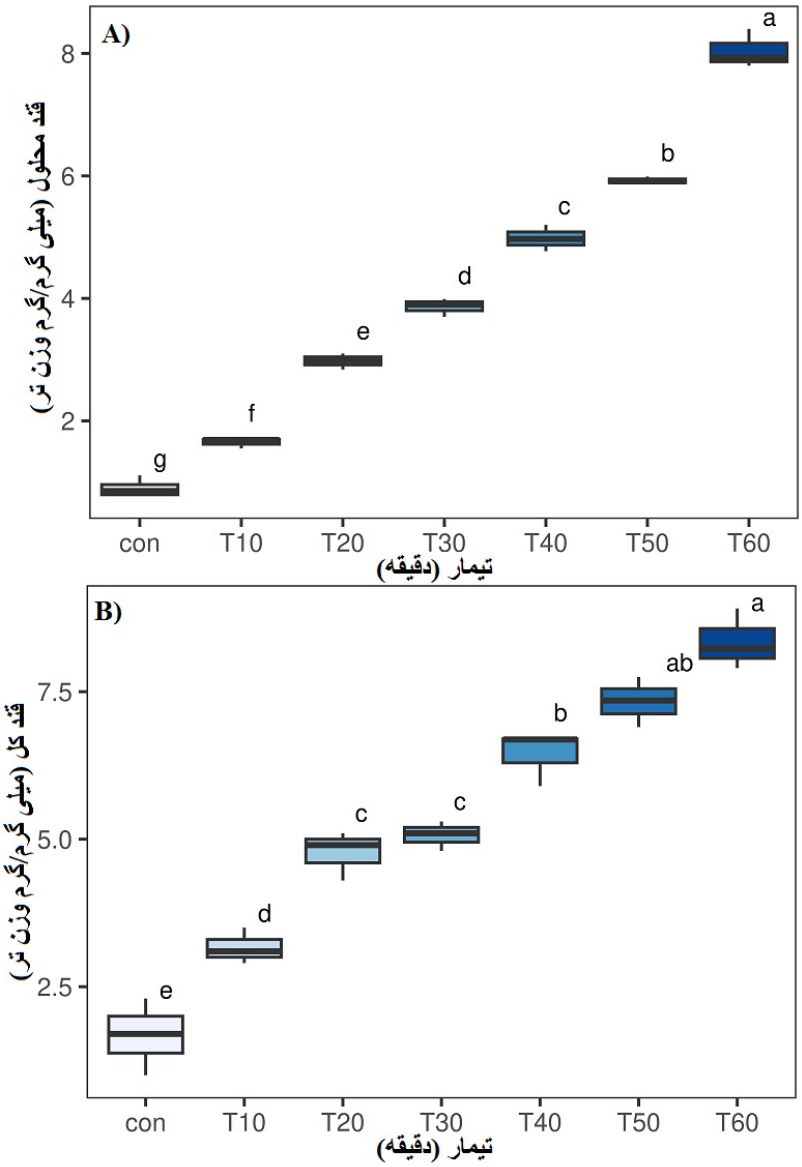
* در سطح احتمال $P \leq 0.05$ معنی‌دار بوده و ns معنی‌دار نمی‌باشد.

قندهای محلول و کل: نتایج حاصل نشان داد که تیمار شوک حرارتی سبب افزایش مقدار قندهای محلول در نمونه‌های مورد بررسی شده است. به طوریکه با افزایش مدت زمان تیمار، مقدار قندهای محلول در نمونه‌ها افزایش نشان داد. آنالیز آماری انجام شده نیز نشان داد که بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری در سطح ٪۹۵ وجود دارد. کمترین مقدار قندهای محلول در نمونه شاهد (۰/۱۳±۰/۱۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و بیشترین مقدار آن در تیمار ۶۰ دقیقه‌ای (۸/۰±۰۴۰/۲۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) دیده شده که نسبت به شاهد افزایش قابل توجهی را نشان داده است (شکل ۳-A).

اندازه‌گیری‌های انجام شده نشان داد که تیمار شوک حرارتی به مدت ۱۰ دقیقه سبب افزایش معنی‌دار در مقدار قند کل نسبت به نمونه شاهد شده است. این نتایج نشان داد که مقدار قند کل در نمونه شاهد ۶۰/۴۸±۱/۰میلی‌گرم بر گرم وزن تر بوده در حالی که در پینه‌هایی که به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه تیمار شده‌اند این عدد به ۳/۱۶۶±۰/۲۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر رسیده است. همچنین داده‌های حاضر نشان داد که بین تیمارهای ۲۰ و ۳۰ دقیقه ای و نیز بین تیمارهای ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه‌ای شوک حرارتی تفاوت معنی‌داری در مقدار قند کل دیده نشده است (شکل ۳-B).



شکل ۲: اثر تیمار شوک حرارتی بر A) فنل کل و B) فلاونوئید کل در پینه حاصل از قطعه جداکشت ریشه گیاه سرخارگل *(Echinacea purpurea)* در محیط کشت MS. در محور افقی مدت زمان تیمار شوک حرارتی به دقیقه نشان داده شده است. نتایج حاضر حاصل میانگین ۳ تکرار است. جعبه‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، در سطح ۰/۰۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.



شکل ۳: اثر تیمار شوک حرارتی بر A) قند محلول و B) قند کل در پینه حاصل از قطعه جداکشت ریشه گیاه سرخارگل *(Echinacea purpurea)* در محیط کشت MS. در محور افقی مدت زمان تیمار شوک حرارتی به دقیقه نشان داده شده است. نتایج حاضر حاصل میانگین ۳ تکرار است. جعبه‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، در سطح ۰/۰۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

شاخص پراکسیداسیون لیپیدها: نشان داد که تیمار شوک حرارتی سبب افزایش معنی‌دار شاخص داده‌های به‌دست آمده از تحقیق حاضر

پراکسیداسیون لیپیدها (مالون‌دی‌آلدهید) در مقایسه با نمونه شاهد شده است. در حالی‌که مقدار مالون‌دی آلدهید در نمونه شاهد ۷۰/۵۶±۴/۰ میکرومول بر گرم وزن تر بوده، تیمار ۱۰ دقیقه‌ای شوک حرارتی سبب افزایش آن تا ۱۵/۱۷۷±۰/۳۶ میکرومول بر گرم وزن تر شده است. همچنین نتایج حاضر نشان داد که بین تیمارهای ۱۰ و ۲۰ دقیقه‌ای و نیز بین تیمارهای ۴۰ و ۵۰ دقیقه‌ای تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (شکل A-۴).

فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانت: داده‌های به دست آمده در این تحقیق نشان داد که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در نمونه شاهد پایین (۰/۱۶±۰/۱۹۳ میکرومول در دقیقه.گرم بر وزن تر) بوده است. اعمال تیمار ۱۰ دقیقه‌ای بر روی پینه‌ها سبب افزایش ۲/۵ برابری در فعالیت این آنزیم (۰/۱۲ ± ۰/۴۹ میکرومول در دقیقه.گرم بر وزن تر) شده است، که تفاوت معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان می‌دهد. نتایج حاصل نشان داد که تیمار شوک حرارتی در مدت زمان‌های مختلف سبب افزایش معنی‌دار در میزان فعالیت این آنزیم در مقایسه با نمونه شاهد شده است. اما بین مدت زمان‌های مختلف تفاوت معنی‌داری دیده نشده است (شکل B-۴).

داده‌های به دست آمده نشان داد که تیمار شوک حرارتی سبب افزایش معنی‌دار در میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در مقایسه با نمونه شاهد شده است. از طرفی دیگر آنالیزهای آماری نشان داد که بین مدت زمان‌های مختلف تیمار شوک حرارتی تفاوت معنی‌داری دیده نشده است (شکل C-۴).

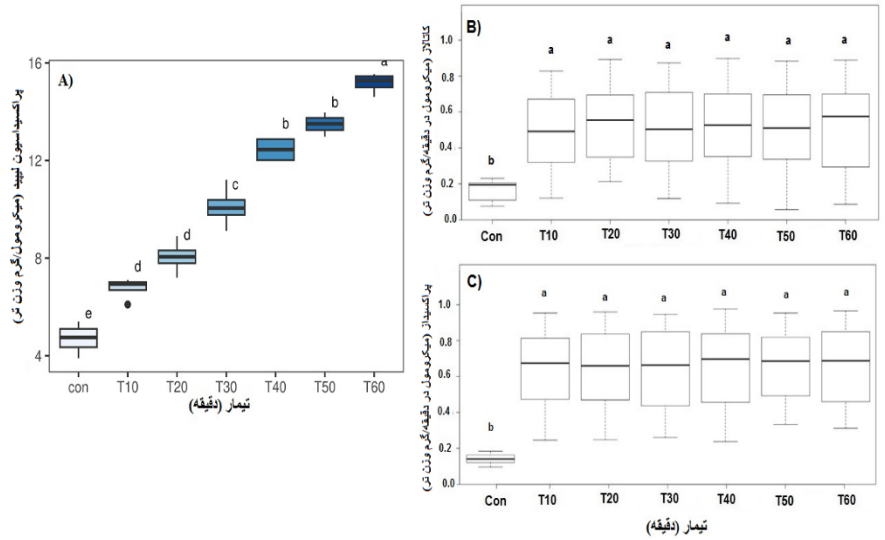
مشتقات کافئیک اسید: در ابتدا با تزریق غلظت‌های مختلف ترکیبات استاندارد به دستگاه، زمان بازداری کلروژنیک اسید (۴ دقیقه), شیکوریک اسید (۸/۵ دقیقه) و کافئیک اسید (۱۳/۵ دقیقه) بدست آمد (شکل A-۵). سپس با تزریق عصاره استونیتریلی عصاره گیاهی و مقایسه زمان بازداری آن با نمونه استاندارد، زمان خروج این سه ماده از ستون و پیک مربوط به آن‌ها تعیین شد.

آنالیز عصاره حاصل از نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از دستگاه HPLC نشان داد که مقدار شیکوریک

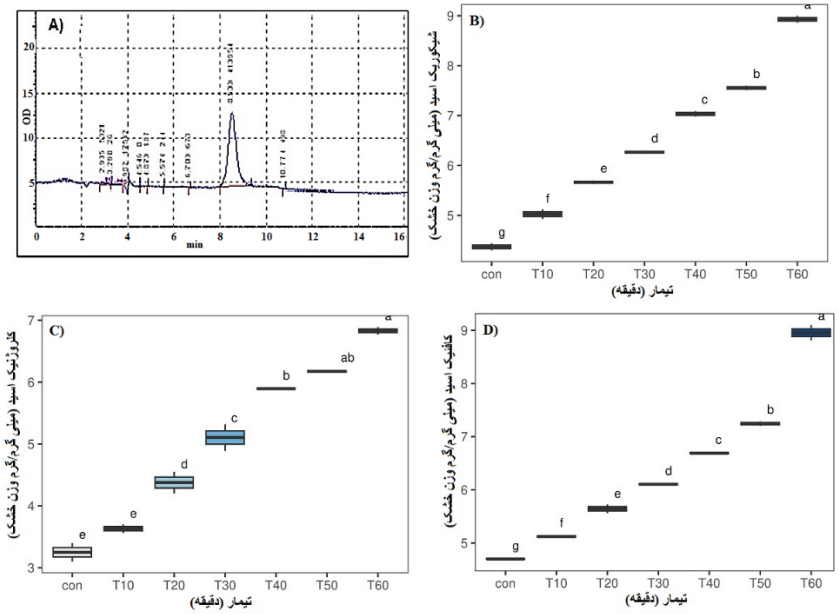
اسید در پینه حاصل از ریشه گیاه سرخار گل در محیط کشت MS برابر ۰/۰۷ ۳۷/۴± میلی‌گرم بر گرم وزن خشک است. این در حالی است که در نمونه‌های تیمار یافته با شوک حرارتی، با افزایش مدت زمان تیمار مقدار شیکوریک اسید نیز به تدریج افزایش یافته است. بیشترین مقدار شیکوریک اسید در این تحقیق در نمونه‌هایی که به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد تیمار شده بودند (۰/۰۶ ۹۲/۸± میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) مشاهده شده که افزایش تقریبا دو برابری را نسبت به نمونه شاهد نشان داد. آنالیزآماری داده‌های به دست آمده نشان داد که اثر مدت زمان بر تولید شیکوریک اسید معنی‌دار بوده است (شکل B-۵).

اندازه‌گیری مقدار کلروژنیک اسید در نمونه شاهد نشان داد که مقدار این ترکیب ۰/۱۵±۳/۲۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک است. بررسی نتایج حاصل از اثر شوک حرارتی در مدت زمان‌های مختلف نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین نمونه شاهد و نمونه‌هایی که به مدت ۱۰ دقیقه تیمار شده‌لند، وجود ندارد. اما تیمارهای ۲۰ و ۳۰ دقیقه‌ای سبب افزایش معنی‌دار در مقدار کلروژنیک اسید در مقایسه با نمونه شاهد شده است. همچنین تیمار ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه ای سبب افزایش معنی‌دار در مقدار این ترکیب در مقایسه با شاهد شده است، ولیکن تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه دیده نشده است. بالاترین مقدار کلروژنیک اسید در تیمار ۶۰ دقیقه‌ای (۰/۰۶±۶/۸۳ میلی‌گرم بر گرم وزن) مشاهده شد (شکل C-۵).

همچنین نتایج حاضر نشان داد که با افزایش مدت زمان تیمار شوک حرارتی به تدریج مقدار کافئیک اسید در نمونه‌های مورد بررسی افزایش یافته است. کمترین و بیشترین مقدار این ماده به ترتیب در نمونه شاهد (۷۰/۰۱±۴/۰ میلی‌گرم بر گرم وزن) و پینه‌هایی که به مدت ۶۰ دقیقه تحت تیمار شوک حرارتی قرار گرفته‌اند (۹۵/۱۴±۸/۰ میلی‌گرم بر گرم وزن) مشاهده شد. مقایسه نتایج حاصل از آنالیز آماری نیز نشان داد که بین تیمارهای مختلف اثر معنی‌داری وجود دارد (شکل D-۵).



شکل ۴: اثر تیمار شوک حرارتی بر A) شاخص پراکسیداسیون لیپیدها، B) فعالیت آنزیم کاتالاز و C) فعالیت پراکسیداز در پینه حاصل از قطعه جداکشت ریشه گیاه سرخارگل *(Echinacea purpurea)* در محیط کشت MS. در محور افقی مدت زمان تیمار شوک حرارتی به دقیقه نشان داده شده است. نتایج حاضر حاصل میانگین ۳ تکرار است. جعبه‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، در سطح ۰/۰۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.



شکل ۵: A) کروماتوگرام نمونه استاندارد شیکوریک اسید و اثر تیمار شوک حرارتی بر مقدار B) شیکوریک اسید، C) کلروژنیک اسید و D) کافئیک اسید در پینه حاصل از قطعه جداکشت ریشه گیاه سرخارگل *(Echinacea purpurea)* در

محیط کشت MS. در محور افقی مدت زمان تیمار شوک حرارتی به دقیقه نشان داده شده است. نتایج حاضر حاصل میانگین ۳ تکرار است. جعبه‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، در سطح ۰/۰۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

بحث

در حال حاضر مهمترین منبع تولید شیکوریک اسید گیاه سرخارگل ارغوانی است که به طور وسیع در بیشتر نقاط دنیا به واسطه اهمیت تجاری آن کشت می‌شود (Jeong et al., 2009). مقدار شیکوریک اسید در این گیاه به عوامل مختلفی نظیر نوع اندام، سن، زمان برداشت و شرایط فیزیولوژیکی گیاه وابسته بوده و بین ۲ تا ۳۰ میلی‌گرم در گرم وزن خشک گزارش شده است (Thomsen et al., 2012). نتایج تحقیقات رمضان نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان داده که مقدار این ماده ارزشمند در گیاه سرخارگل کشت شده در گرگان ۳/۵۸ میلی‌گرم در هر گرم وزن خشک است.

ژنتیک، شرایط محیطی و برهم کنش بین این دو فاکتور از عوامل مهم در تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان از جمله شیکوریک اسید هستند (Nicolle et al., 2004). عواملی چون درجه حرارت، شدت و کیفیت نور، ارتفاع از سطح دریا، ویژگی های خاک، میزان آب در دسترس گیاه ازجمله مهم ترین عوامل محیطی تأثیرگذار بر مسیر سنتز و تجمع ترکیبات فنلی در گیاهان هستند که باعث افزایش یا کاهش مقدار آن‌ها می شوند (Lee and Scagel, 2010). به عنوان مثال Yildirim و Turker نشان دادند که مقدار ترکیبات فنلی در گیاهان *Fragaria vesca* L. رشدکرده در فضای باز در مقایسه با گیاهان رشدیافته در شرایط آزمایشگاهی و بر روی محیط کشت MS حداقل ۵ برابر بیشتر بود (Yildirim and Turker, 2014). نتایج حاضر نشان داد که با افزایش مدت زمان تیمار شوک حرارتی مقدار شیکوریک اسید افزایش می‌یابد. به‌طوریکه در نمونه‌هایی که به مدت ۶۰ دقیقه تحت تیمار شوک حرارتی قرار گرفته بودند، افزایش تقریبا دوبرابری در مقدار شیکوریک اسید نسبت به شاهد مشاهده شده است. مطالعات نشان می‌دهد که شیکوریک اسید به عنوان یک بازدارنده در برابر حمله میکروبی و گیاهخواری عمل می‌کند. این ترکیب دارای فعالیت آنتی اکسیدانتی بوده و به طرز قدرتمندی رادیکال‌های آزاد را مهار می‌کند

(Wang et al., 2017). نتیجه تحقیقات Kobayashi و همکاران در سال ۲۰۲۴ بر روی اثر تیمار شوک حرارتی (اثر دماهای مختلف و در مدت زمان‌های مختلف) بر روی گیاه سرخارگل نشان داده که تیمار شوک حرارتی در دماهای ۳۰ و ۶۰ درجه سبب بیشترین تجمع شیکوریک اسید در برگ و ریشه می‌شود. نتایج این محققان اگرچه در شرایط مزرعه می‌باشد اما با نتایج حاضر مطابقت دارد.

همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش مدت زمان تیمار شوک حرارتی محتوی کلروژنیک اسید در نمونه‌های تحت تیمار افزایش می‌یابد. کلروژنیک اسید یکی دیگر از ترکیبات فنلی مهم و از مشتقات شیکوریک اسید است که نقش مهمی در مقابله با تنش‌های غیر زیستی و زیستی در گیاهان دارد. کلروژنیک اسید و مشتقات آن به عنوان بیومارکرهای مقاومت به تنش‌های زیستی معروف شده‌اند که باعث افزایش مقاومت گیاه در برابر علفخواران و پاتوژن‌ها می‌شوند (Hammerschmidt, 2014).

همچنین Mei و همکاران در سال ۲۰۲۰ گزارش کردند که کلروژنیک اسید می‌تواند آنتی‌اکسیدان مؤثری برای محافظت از گیاهان در برابر تنش اکسیداتیو باشد. Xin و همکاران در سال ۲۰۲۲ اثر شوک حرارتی را بر تولید پینه‌های سیب زمینی شیرین بررسی کردند. آنان نشان دادند که تیمار در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد، فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL)، لیگاز ۴-کومارات-CoA و سینامات-۴-هیدروکسیلاز را در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها تحریک کرده و در نتیجه باعث افزایش سنتز کلروژنیک اسید می‌شود.

ازطرفی دیگر داده‌های حاضر نشان داد که با افزایش مدت زمان تیمار شوک حرارتی محتوی کافئیک اسید در نمونه‌ها افزایش می‌یابد. بیشترین تغییر در مقدار این ترکیب در تیمار ۶۰ و ۵۰ دقیقه نسبت به شاهد بود. کافئیک اسید ترکیب فنلی است که نقش‌های متنوع آن در پاسخ گیاهان به انواع تنش‌های غیرزیستی مانند شوری، سرما و به ویژه تنش شوک حرارتی به اثبات رسیده است. در حال حاضر تحقیقات زیادی در خصوص

نحوه اثر کافئیک اسید در فرایندهای مهم سلولی مانند مهار رادیکال‌های آزاد و حفظ یکپارچگی سلول‌ها در جریان است (Mughal et al., 2024). Xin و همکاران در سال ۲۰۲۲ تجمع کافئیک اسید را در تیمار شوک حرارتی در پینه‌های سیب زمینی مشاهده کردند. کافئیک‌اسید و مشتقات آن در حفظ فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه در طی تنش حرارتی نقش دارند. کافئیک اسید واسطه جذب پرتوهای پرانرژی در سلول‌های مزوفیل در تیمار حرارتی است. این مکانیسم شامل تولید اسید فرولیک از طریق متیلاسیون کافئیک اسید کاتالیز شده توسط O-متیل ترانسفراز است. این تغییرات مقاومت به گرما را با کاهش رشد و نمو و تنظیم متابولیت‌ها ارتقا می‌بخشند (Koshiro et al., 2007).

داده‌های حاضر نشان داد که با افزایش مدت زمان شوک حرارتی، محتوی فنل در نمونه‌های تحت تیمار افزایش می‌یابد. در این تحقیق بیشترین مقدار فنل کل در تیمار شوک حرارتی به مدت ۶۰ دقیقه بوده است. گیاهان ترکیبات فنلی را در بافت‌های خود به عنوان پاسخی سازگار به شرایط نامطلوب محیطی انباشته می‌کنند و نقش کلیدی در پاسخ به تنش‌های محیطی مختلف مانند نور زیاد، دمای پایین، دمای بالا، عوامل بیماری‌زا، گیاه‌خواران و کمبود مواد مغذی دارند (Pérez- Pérez-Pazos et al., 2021). Xin و همکاران در سال ۲۰۲۲ اثر شوک حرارتی را در تولید پینه‌های سیب زمینی شیرین مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنان نشان داد که تیمار در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد سبب تولید بالاترین مقدار فنل کل شده است (Xin et al., 2022). در تحقیق حاضر تیمار شوک حرارتی در دمای ۳۵ درجه و مدت زمان ۶۰ دقیقه بیشترین مقدار تولید فنل را در نمونه‌ها سبب شد که با نتایج پژوهش دیگر محققان همخوانی دارد.

نتایج حاضر نشان داد که با افزایش مدت زمان تیمار شوک حرارتی، محتوی فلاونوئید در نمونه‌های تحت تیمار افزایش یافت. بیشترین تغییر نسبت به شاهد در محتوی فلاونوئید در تیمار به مدت ۶۰ دقیقه بود. فلاونوئیدها متابولیت‌های ثانویه با وزن مولکولی کم با ساختار پلی‌فنلی هستند که در عملکردهای فیزیولوژیکی گیاه

نقش دارند و اغلب اثرات محافظتی در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی از جمله گرما دارند (Jiang et al., 2019). Rivero و همکاران در سال ۲۰۰۱ اثر شوک حرارتی را بر تولید ترکیبات فنلی در گیاه گوجه فرنگی مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد سبب کاهش وزن لندام هوایی و تجمع فنل‌ها و فلاونوئیدها در گوجه‌فرنگی می‌شود. در تحقیق حاضر نیز با افزایش مدت زمان تیمار شوک حرارتی، افزایش تولید فلاونوئیدها را مشاهده شد که با نتایج سایر محققان مطابقت دارد.

داده‌های به دست آمده از این تحقیق نشان داد که با افزایش مدت زمان تیمار شوک حرارتی محتوی قندهای محلول در نمونه‌های تحت تیمار نسبت به شاهد افزایش یافت. بیشترین مقدار افزایش قندهای محلول در تیمار ۶۰ و ۵۰ دقیقه بود. قندهای محلول به تنش‌های محیطی بسیار حساس هستند و بر روی انتقال کربوهیدرات از اندام‌های منبع به لندام‌های مخزن تأثیر می‌گذارند. قندها به عنوان مولکول سیگنالی عمل می‌کنند و نقش مهمی در تعدیل بیان ژن‌های درگیر در مسیر تنش دارند (Bian et al., 2020). بررسی‌های حاضر نشان داد که با افزایش مدت زمان تیمار شوک حرارتی محتوی قند کل در نمونه‌های تحت تیمار نسبت به شاهد افزایش یافته است. بیشترین مقدار قند کل در تیمار ۶۰ و ۵۰ دقیقه مشاهده شده که نسبت به شاهد افزایش چشمگیری را نشان داده است. محققان نشان دادند که کربوهیدرات-های ذخیره‌ای در طول تنش‌های غیر زیستی و زیستی در گیاهان تجمع می‌یابند. با افزایش دما متابولیسم کربوهیدرات‌ها از فرم ذخیره‌ای به فرم قابل استفاده در آمده تا گیاه بتواند در برابر تنش‌ها مقابله کند. در سال ۲۰۱۶ محققانی مانند EL-BELTAGI و همکاران، اثر شوک حرارتی را بر صفات فیزیولوژیکی پینه گندم بررسی کردند. نتایج این محققان نشان داد که تیمار شوک حرارتی (۳۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۷۲ ساعت سبب افزایش قابل توجه در مقدار قندهای محلول و کل در پینه این گیاه می‌شود.

نتایج حاضر نشان داد که شاخص پراکسیداسیون لیپیدها (مالون دی‌آلدهید) با افزایش مدت زمان تیمار

شـــوک حرارتی افزایش می‌یـابـد.در تحقیق حاضر بیشترین تغییر در تیمار ۴۰ و ۵۰ و ۶۰ دقیقه مشـــاهده شـــده اســـت. یافته‌ها نشـــان می‌دهد که پاسخ‌های فیزیولوژیکی زیادی در تنش شـوک حرارتی ایجاد می‌شـود. دماهای بـالا بـاعـث ایجـاد تنش در بخش‌هـای مختلف ســـلول گیاه از جمله غشـــای سلولی می‌شود. شاخص پراکسیداسیون لیپدهای غشـــا یا مالون دی‌آلدهید (MDA) یکی از مهم‌ترین پارامترهای پاسخ به شوک حرارتی است که نشت الکترولیت‌ها و میزان پایداری غشـــا در شـــرایط تنش را نشـــان می‌دهد و برای تعیین آســـیب غشـــای ســـلولی مورد ارزیـابی قرار می‌گیرد (Shen et al., 2017). Taratima و همکاران در سال ۲۰۲۲ تاثیر شوک حرارتی را بر صفات رشدی و فیزیولوژیکی پینه برنج بررسی کردند. نتایج نشـــان داد نمونه‌هایی که در دمای بالا (۳۵ و ۴۲ درجه ســانتی-گراد) نگهداری شـــدند، مقدار نشـــت مالون دی‌آلدئید و الکترولیت‌ها در آنها به طور معنی‌داری نســـبت به شـــاهد افزایش یافته اســت. در تحقیق حاضـــر نیز با افزایش مدت زمان تیمار شـــوک حرارتی درصـد نشـت مالون دی‌آلدهید افزایش معنی‌داری نسـبت به نمونه‌های شـــاهد نشـــان داد که با نتایج ســـایر محققان مطابقت دارد.

بررسی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نتایج نشان داد که تیمار شوک حرارتی ســـبب افزایش معنی‌دار در فعالیت این آنزیم می‌شـــود. کـاتـالازهـا آنزیم‌هـای ســم‌زدایی پراکســید هیدروژن در همه گیـاهـان هســـتنـد و نقش مهمی در مقاومت گیاهان به تنش‌های زیسـتی و غیر زیسـتی دارند. هنگامی که سـلول‌ها برای اولین بار تحت شـــرایط تنش قرار می‌گیرند، یک انفجار در تولید گونه‌های رادیکـال‌هـای آزاد رخ مـی‌دهـد کـه آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی مانند کاتالاز به عنوان اولین آنزیم‌ها فعالیت خود را برای پـاکســـازی این ترکیبـات آغـاز مـی‌کـنـنـد (Yuan et al., 2011). Kolupaev و همکاران نیز در ســـال ۲۰۰۸ نشـان دادند که شـوک حرارتی ســـبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکســـیدانتی به خصـــوص کاتالاز در گیاهچه‌های گندم می‌شود.

همچنین بررسـی اثر تیمار شـوک حرارتی بر فعـالیـت آنزیم پراکســـیـداز نشـــان داد که تیمار در مدت زمان‌های مختلف ســـبب افزایش میزان فعالیت

این آنزیم می‌شود. Gulen and Eris در سال ۲۰۰۴ اثر دمای بالا بر فعالیت ایزوآنزیم پراکسیداز (PRX) را در توت فرنگی (*Fragaria x ananassa cv. Camarosa*) مورد بررسی قرار دادند. نتیجه این تحقیق نشان داد که اثرات تنش حرارتی بر افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز معنی‌دار بوده است.

نتیجه گیری کلی

گیاهان مکانیسم‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی متعددی را در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی ایجاد می‌کنند. این مکانیسم‌ها شامل تغییراتی در سطوح رونوشت، پروتئوم و متابولوم است که پاسخ‌هایی مانند تنظیم هورمون گیاهی، سیگنال‌دهی ROS، وضعیت هیدرولیک گیاه، تنظیم اسمزی و تولید متابولیت‌های ثانویه برای حفظ رشد و بهره‌وری گیاه را ایجاد می‌کند. در تحقیق حاضر اثر تیمار شوک حرارتی بر تولید برخی از متابولیت‌های ثانویه در پینه‌های گیاه سرخارگل ارغوانی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش مدت زمان تیمار شوک حرارتی تولید متابولیت‌های ثانویه مانند شیکوریک، کلروژنیک و کافئیک اسید افزایش می‌یابد. از طرفی سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی دخیل در فرایندهای مقابله با تنش از جمله کاتالاز و پراکسیداز نشان داده که برای مقابله با شوک وارد شده فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه گلستان جهت حمایت مالی این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- مفید بجنوردی, م.، اقدسی، م. و فاطمی، م. (۱۴۰۰). بررسی اثر نوع بستر و شرایط کشت بر تولید اسیدهای فنلی در چند جمعیت کاهوی موجدار (*Lactuca undulata Ledeb*). مجله زیست شناسی کاربردی، ۳۴، ۱۹۲-۱۷۶.
- Bian, X.H., Li, W., Niu, C.F., Wei, W., Hu, Y., Han, J.Q. and Zhang, J. S. (2020). A class B heat shock factor selected for during soybean domestication contributes to salt tolerance by promoting flavonoid biosynthesis. New Phytologist, 225, 268-283.
- Chance, B. and Maehly, A.C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. Methods of Biochemical Analysis, Volume 1.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. and Chern, J.C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of food and drug analysis, 10, 178-182.
- EL-Beltagi, H.S., Ahmed, O.K. and Hegazy, A.E. (2016). Protective effect of nitric oxide on high temperature induced oxidative stress in wheat (Triticum aestivum) callus culture. Notulae Scientia Biologicae, 8, 192-198.
- Erkoyuncu, M.T. and Yorgancilar, M. (2021). Optimization of callus cultures at Echinacea purpurea L. for the amount of caffeic acid derivatives. Electronic Journal of Biotechnology, 51, 17-27.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F. and Prange, R.K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta, 207, 604-611.
- Hammerschmidt, R. (2014). Chlorogenic acid: A versatile defense compound. Physiological and Molecular Plant Pathology, 88, 3-4.
- Jeong, J.A., Wu, C.H., Murthy, H.N., Hahn, E.J.

different abiotic stress treatments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 142, 401-414.
- Kolupaev, Y.Y., Karpets, Y.V. and Kosakivska, I.V. (2008). The importance of reactive oxygen species in the induction of plant resistance to heat stress. Genetic Applied Plant Physiology, 34, 251-66.
- Kobayashi, W., Tomizawa, A., Kurawaka, M., Abe, M., Watanabe, A. and Ayabe, S. (2024). Metabolomic profiling of the nutritional components of chicory leaves following heat processing. Journal of Food Science, 89, 2054-2066.
- Koshiro, Y., Jackson, M. C., Katahira, R., Wang, M. L., Nagai, C. and Ashihara, H. (2007). Biosynthesis of chlorogenic acids in growing and ripening fruits of Coffea arabica and Coffea canephora plants. Zeitschrift für Naturforschung C, 62,731-742.
- Lee, J. and Scagel, C.F. (2013). Chicoric acid: chemistry, distribution, and production. Frontiers in and Paek, K.Y. (2009). Application of an airlift bioreactor system for the production of adventitious root biomass and caffeic acid derivatives of Echinacea purpurea. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 14, 91-98.
- Jiang, H., Wang, B., Ma, L., Zheng, X., Gong, D., Xue, H. and Prusky, D. (2019). Benzo-(1, 2, 3)-thiadiazole-7-carbothioic acid s-methyl ester (BTH) promotes tuber wound healing of potato by elevation of phenylpropanoid metabolism. Postharvest Biology and Technology, 153, 125-132.
- Kar, M. and Mishra, D. (1976). Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant physiology, 57, 315-319.
- Karakas, F.P. and Bozat, B.G. (2020). Fluctuation in secondary metabolite production and antioxidant defense enzymes in in vitro callus cultures of goat's rue (Galega officinalis) under

Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food Chem, 9, 571-7.
- Mei, Y., Sun, H., Du, G., Wang, X. and Lyu, D. (2020). Exogenous chlorogenic acid alleviates oxidative stress in apple leaves by enhancing antioxidant capacity. Scientia Horticulturae, 274, 109676-109678.
- Mofid Bojnoordi, M., Aghdasi, M. and Fatemi, M. (2022). The effect of different concentrations of chitosan on the production of phenolic acids in cell culture of Lactuca undulate Ledeb. Agricultural Biotechnology Journal, 14, 1-20.
- Mofid Bojnoordi, M., Ramezannezhad, R., Aghdasi, M. and Fatemi, M. (2023). Production of phenolic acids improved in callus cultures of Lactuca undulata by Ultraviolet-B irradiation. International Journal of Horticultural Science and Technology, 10, chemistry, 1, 40-52.
- Luo, X.B., Chen, B., Yao, S.Z. and Zeng, J.G. (2003). Simultaneous analysis of caffeic acid derivatives & alkamides in roots and extracts of Echinacea purpurea by HPLC-photodiode array detection-electrospray mass spectrometry. Journal of Chromatophy, 986, 73-81.
- Marthe, F. (2018). Tissue culture approaches in relation to medicinal plant improvement. Biotechnologies of Crop Improvement, Volume 1: Cellular Approaches, 487-497.
- McCready, R., Guggolz, J., Silviera, V. and Owens, H. (1950) Determination of starch and amylose in vegetables, application to peas. Analytical *Chemistry,* 22,1156-1158.
- McGregor, R.L., (1968) The taxonomy of the genus Echinacea (compositae). The University of Kansas Science Bulletin, 48, 113-142.
- Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J. and Nacoulma, O.G. (2005).

Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African journal of biotechnology, 5, 1142-1145.

- Ramezannezhad, R., Aghdasi, M. and Fatemi, M. (2019). Enhanced production of cichoric acid in cell suspension culture of Echinacea purpurea by silver nanoparticle elicitation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 139, 261-273.
- Ravazzolo, L., Ruperti, B., Frigo, M., Bertaiola, O., Pressi, G., Malagoli, M. and Quaggiotti, S. (2022). C3H expression is crucial for methyl jasmonate induction of chicoric acid production by Echinacea purpurea (L.) moench cell suspension cultures. International Journal of Molecular Sciences, 23, 11179-1184.
- Rehman, A., Khan, I. and Farooq, M. (2024). Secondary metabolites mediated reproductive tolerance under heat stress in plants. Journal of Plant 9-16.
- Mughal, A., Jabeen, N., Ashraf, K., Sultan, K., Farhan, M., Hussain, M. I. and uz Zaman, Q. (2024). Exploring the Role of Caffeic Acid in Mitigating Abiotic Stresses in Plants: A Review. Plant Stress,10, 100487.
- Nicolle, C., Carnat, A., Fraisse, D., Lamaison, J.L., Rock, E., Michel, H., Amouroux, P. and Remesy, C. (2004). Characterisation and variation of antioxidant micronutrients in lettuce (Lactuca sativa folium). Journal of the Science of Food and Agriculture, 84, 2061-2069.
- Pérez-Pazos, J.V., Rosero, A., Martínez, R., Pérez, J., Morelo, J., Araujo, H. and Burbano-Erazo, E. (2021). Influence of morpho-physiological traits on root yield in sweet potato (Ipomoea batatas Lam.) genotypes and its adaptation in a sub-humid environment. Scientia Horticulturae, 275, 109703-109706.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J. and

Echinacea purpurea and Echinacea pallida. Journal of agricultural and food chemistry, 60, 12131-12141.
- Tudela, J. A., Hernández, N., Pérez-Vicente, A. and Gil, M. I. (2017). Growing season climates affect quality of fresh-cut lettuce. Postharvest biology and technology, 123: 60-68.
- Wang, Y., Diao, Z., Li, J., Ren, B., Zhu, D., Liu, Q. and Liu, X. (2017). Chicoric acid supplementation ameliorates cognitive impairment induced by oxidative stress via promotion of antioxidant defense system. RSC advances, 7, 36149-36162.
- Xin, Q., Liu, B., Sun, J., Fan, X., Li, X., Jiang, L. and Zhou, X. (2022). Heat shock treatment promoted callus formation on postharvest sweet potato by adjusting active oxygen and phenylpropanoid metabolism. Agriculture, 12 : 1351.
- Yildirim, A.B. and Turker, A.U. (2014). Effects of regeneration enhancers on micropropagation of Fragaria vesca L. and Growth Regulation, 43, 2993-3011.
- Schlegel, H. G. (1956). Die verwertung organischer säuren durch Chlorella im licht. Planta, 47, 510-526.
- Shen, H.F., Zhao, B., Xu, J.J., Liang, W., Huang, W.M. and Li, H.H. (2017). Effects of heat stress on changes in physiology and anatomy in two cultivars of Rhododendron. South African Journal of Botany, 112, 338-345.
- Taratima, W., Chuanchumkan, C., Maneerattanarungroj, P., Trunjaruen, A., Theerakulpisut, P. and Dongsansuk, A. (2022). Effect of heat stress on some physiological and anatomical characteristics of rice (Oryza sativa L.) cv. KDML105 callus and seedling. Biology, 11, 1587.
- Thomsen, M.O., Fretté, X.C., Christensen, K.B., Christensen, L.P. and Grevsen, K. (2012). Seasonal variations in the concentrations of lipophilic compounds and phenolic acids in the roots of

phenolic content comparison of field-grown and in vitro-grown plant materials by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (LC–ESI-MS/MS). Scientia Horticulturae, 169, 169-178.

- Yuan, Y., Liu, Y., Luo, Y., Huang, L., Chen, S., Yang, Z. and Qin, S. (2011). High temperature effects on flavones accumulation and antioxidant system in Scutellaria baicalensis Georgi cells. African Journal of Biotechnology, 10, 5182-5192.