

بررسی اثر نوع بستر و شرایط کشت بر تولید اسیدهای فنلی در چند جمعیت کاهوی موجدار (*Lactuca undulata* Ledeb)

مرتضی مفید بجنوردی^۱، مهناز اقدسی^{۲*}، سید محمد فاطمی^۳

چکیده

کاهوی موجدار (*Lactuca undulata* Ledeb) گیاهی یکساله از تیره کاسنی است. هدف از این پژوهش بررسی اثر نوع بستر و شرایط کشت بر مقدار شیکوریک اسید در جمعیت‌های مختلف گیاه کاهوی موجدار است. به این منظور بذرها جمع‌آوری شده از مناطق (چشمه‌علی، قم، میرزابابیلو، بیارجمند و فیروزکوه)، در گلدان و در دو نوع بستر خاک مزرعه و خاک جمع‌آوری شده از رویشگاه طبیعی کشت شد و در دو شرایط فضای باز و اتاقک رشد کشت شدند. نتایج حاصل نشان داد که بالاترین مقدار شیکوریک اسید (۱/۲۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در جمعیت فیروزکوه کشت شده در گلدان حاوی خاک منطقه مشاهده شد. بیشترین مقدار کلروژنیک اسید (۰/۹۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و کافئیک اسید (۰/۵۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) نیز در جمعیت چشمه‌علی کشت شده در گلدان حاوی خاک رویشگاه طبیعی مشاهده شد. نتایج حاضر نشان می‌دهد که در بین جمعیت‌های مورد بررسی تنوع فیتوشیمیایی بالایی وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: خاک، شیکوریک اسید، کاهوی موجدار (*Lactuca undulata* Ledeb)، کافئیک اسید، کلروژنیک اسید

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران.

۲- دانشیار فیزیولوژی مولکولی گیاهی دانشگاه گلستان، گرگان، ایران.

* (نویسنده مسئول: Aghdasi1346@gmail.com)

۳- استادیار سیستماتیک گیاهی، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران.

مقدمه

کاهوی موجدار با نام علمی *Lactuca undulata Ledeb.* گیاهی یک‌ساله از تیره کاسنی است که در اروپا، ترکیه، ایران، قفقاز، روسیه، افغانستان، پاکستان، عراق و اردن گسترش دارد. رویشگاه طبیعی این گیاه در ایران در مناطقی مانند پارک ملی گلستان، اطراف تهران، سمنان، اصفهان، هرمزگان، خراسان، آذربایجان، سیستان و بلوچستان، کرمان و فارس گزارش شده است (Asadi et al., 2013).

بررسی‌های فیتوشیمیایی نشان داده که گونه‌های مختلف کاهو حاوی متابولیت‌های ارزشمندی از جمله ترکیبات فنلی شامل آنتوسیانین‌ها، اسیدهای فنلی، فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها، اسید فولیک، آسکوربیک‌اسید و سزکوئی‌ترین‌های-لاکتونی هستند (Assefa et al., 2019). اولین بار Ramezannejad و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان دادند که کاهوی موجدار حاوی فلاونوئیدها، فنل‌ها و مشتقات کافئیک اسید مانند شیکوریک اسید است. این محققان همچنین نشان دادند که ساقه کاهوی موجدار در فاز زایشی دارای مقادیر قابل توجهی از شیکوریک اسید (۲.۳۱ میلی گرم بر گرم وزن خشک) است و به عنوان یک گیاه بومی ایران می‌تواند جایگزین سرخارگل (*Echinacea purpurea*) جهت تولید شیکوریک اسید باشد (Ramezannejad et al., 2019).

شیکوریک اسید ترکیبی با فرمول شیمیایی $C_{22}H_{18}O_{12}$ است که برای اولین بار از بخش‌های هوایی کاسنی جداسازی شد (Scarpati & Oriente, 1958). مقدار این ترکیب برحسب گونه، اندام و شرایط رشد متغیر است (Murch et al., 2006). منبع اصلی تولید شیکوریک اسید در دنیا از گیاه سرخارگل است (Thygesen et al., 2007) که بومی ایران نیست امروزه از شیکوریک اسید بعنوان یک ترکیب جدید در سلامت انسان به ویژه در تهیه مکمل‌های غذایی و به‌عنوان محرک سیستم ایمنی در مقابله با بیماری‌های ویروسی و عفونت‌ها استفاده می‌شود (Nuissier et al., 2010). تاکنون خواص ضدسرطانی (Tsai et al., 2012)، ضد التهاب، التیام زخم (Saeed et al., 2018)، خاصیت آنتی‌اکسیدانی (Tsai et al., 2017) و بهبود بیماری کبد چرب (Ding et al., 2019) برای شیکوریک اسید گزارش شده است.

کیفیت و کمیت متابولیت‌های ثانوی به ویژه ترکیبات فنلی در گیاهان در سطح جنس، گونه، واریته و جمعیت متفاوت است (Holeski et al., 2012). ژنتیک، شرایط محیطی و برهم‌کنش بین این دو فاکتور از عوامل مهم تاثیرگذار در نوع و مقدار متابولیت‌های ثانوی در گیاهان است (Nicolle et al., 2004). عوامل محیطی گوناگون از جمله دما، شدت و کیفیت نور، ویژگی‌های خاک، مقدار آب در دسترس گیاه با تاثیر بر مسیر سنتز و تجمع ترکیبات فنلی گیاهان باعث افزایش یا کاهش مقدار آنها می‌شوند (Rouphael et al., 2012). در رابطه با تفاوت میزان ترکیبات فنلی در سطح زیرگونه و جمعیت‌های گیاهان مطالعات زیادی وجود دارد. گزارش‌ها نشان داده که در واریته‌های مختلف کاهوی خوراکی در پاسخ به طول موج‌های مختلف نور ترکیبات فنلی گوناگونی تجمع می‌یابند (Ouzounis et al., 2015; Koukounaras et al., 2016). به‌علاوه چندین مطالعه درباره تنوع لاکتون‌ها در

جمعیت‌های گونه‌های مختلف کاهو در شرایط آزمایشگاهی وجود دارد (Beharav *et al.*, 2010; Beharav *et al.*, 2015; Beharav *et al.*, 2020). Treuren و همکاران با بررسی پروفایل شیمیایی ۱۵۰ توده از گونه‌های مختلف کاهو شامل *L. saligna*, *L. virosa* و *L. sativa* و *L. serriola* که در شرایط گلخانه کشت شده بودند، نشان دادند که تنوع فیتوشیمیایی در سطح فراگونه‌ای بین این گیاهان وجود دارد. همچنین این محققان اظهار داشتند که تنوع فیتوشیمیایی به دلیل تنوع ژنتیکی بالا در سطح فراگونه‌ای در این گیاهان است (Treuren *et al.*, 2018). از طرفی دیگر بررسی‌های اولیه بر روی ۵ جمعیت گیاهی کاهوی موجدار جمع آوری شده از مناطق قم، بیارجمند، دشت میرزابابیلو در خراسان شمالی، فیروزکوه و چشمه‌علی دامغان نشان داد که بیشترین مقدار شیکوریک اسید (۳/۵ میلی گرم بر گرم وزن خشک) در نمونه‌های فیروزکوه وجود دارد. در حالی که بیشترین مقدار کافنیک اسید (۱/۲۶ میلی گرم بر گرم وزن خشک) در نمونه‌های جمع‌آوری شده از قم مشاهده شد (Mofid Bojnoordi *et al.*, 2020).

مشاهدات میدانی ما از رویشگاه‌های کاهوی موجدار (که عموماً در قالب جمعیت‌های پراکنده و دور از هم است) احتمال انقراض آن را در طی چند سال آینده نشان می‌دهد. با نظر به اهمیت حفظ ذخایر ژنتیکی گونه‌های بومی سازگار و امکان بهره‌برداری از آنها در جهت تولید فرآورده‌های دارویی از جمله شیکوریک اسید، پژوهش حاضر به بررسی امکان کشت کاهوی موجدار در شرایط آب و هوای گرگان پرداخته است. نتایج حاصل از تحقیق حاضر می‌تواند به شناسایی عوامل دخیل در تجمع این ترکیبات و نیز اثر شرایط محیطی در تولید مواد موثره کمک نماید.

مواد و روش‌ها

بذرهای کاهوی موجدار در فاصله ۲۰ اردیبهشت تا ۱۰ خرداد از پنج منطقه شهرک پردیسان قم، فیروزکوه، چشمه‌علی دامغان، بیارجمند-روستای دزیان و دشت میرزابابیلو واقع در شرق پارک ملی گلستان جمع‌آوری شدند (جدول ۱).

جدول ۱: مختصات جغرافیایی و شرایط آب و هوایی مناطق نمونه‌برداری

ارتفاع از سطح دریا (متر)	نوع آب و هوا	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	منطقه نمونه برداری
۹۳۰	گرم و خشک	۳۴° ۵۰' ۱۳۴"	۵۰° ۷۰' ۳/۵۵"	پردیسان قم
۱۹۵۰	مرطوب و سردکوهستانی، نیمه	۳۵° ۴۷' ۱۲/۱"	۵۲° ۴۹' ۱۷/۲"	فیروزکوه
۱۵۱۶	خشک، نیمه خشک و سرد	۳۶° ۱۶' ۴۳/۴۰"	۵۴° ۵' ۱۱/۶۳"	چشمه‌علی دامغان
۱۲۲۶	گرم و خشک	۳۶° ۵۰' ۰/۰۷۳"	۵۵° ۵۹' ۳۴/۱۹۱"	بیارجمند
۱۳۵۰	خشک، نیمه خشک و سرد	۳۷° ۲۱' ۴۹/۹"	۵۶° ۱۵' ۲۱"	دشت میرزابابیلو

بستر و شرایط کشت

برای بررسی امکان کشت و پرورش کاهوی موجدار، بذره‌های جمع‌آوری شده در ۲۸ اسفندماه سال ۱۳۹۷ در زمینی واقع در روستای توشن گرگان به صورت طرح بلوک کاملاً تصادفی در کرت‌هایی به اندازه ۲×۱ متر که از قبل آماده شده بودند، کشت شد. بستر خاک مورد استفاده از نوع لوم رسی و بدون افزودن مواد شیمیایی بود. همچنین جهت بررسی اثر عوامل مختلف بر مقدار شیکوریک اسید و دیگر ترکیبات آن در کاهوی موجدار، بذرها در گلدان‌های پلاستیکی به عمق ۲۰ و قطر ۱۵ سانتی‌متر در دو بستر خاک مزرعه و خاک جمع‌آوری شده از رویشگاه طبیعی گیاه کشت شدند. برای هر بستر کشت ۳ گلدان انتخاب و در هر گلدان ۵ عدد بذر کشت شدند که پس از جوانه‌زنی تعداد دو عدد گیاه در هر گلدان تا مرحله زایشی نگهداری شدند. سپس هر گروه از گلدان‌ها در دو شرایط فضای باز و اتاقک رشد با شرایط کنترل شده (دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی) با شدت نور ۱۵۰ میکرومول فوتون بر ثانیه قرار داده شدند. تا زمان جوانه‌زنی بذرها، آبیاری هر دو روز یکبار و پس از جوانه‌زدن هر ۴ روز یکبار انجام شد. عملیات نمونه‌برداری با شروع فاز زایشی و در اواخر خرداد ماه انجام شد. پس از جمع‌آوری نمونه‌های هر منطقه به‌طور جداگانه، ساقه گیاه از دیگر قسمت‌ها تفکیک شده و پس از خشک شدن در سایه و با تهویه مناسب، جهت انجام سنجش‌های بعدی به آزمایشگاه انتقال یافت.

اندازه‌گیری وزن خشک

نمونه‌های ریشه و اندام هوایی به طور جداگانه در آون در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز خشک و سپس وزن خشک آنها اندازه‌گیری شد.

آنالیز خاک

همزمان با جمع‌آوری بذرها و نمونه‌های گیاهی از رویشگاه‌های طبیعی، خاک ریزوسفر گیاه و نیز خاک مزرعه جهت بررسی‌های بعدی جمع‌آوری و به آزمایشگاه خاک‌شناسی شرکت مهندسين مشاور خاک‌آزما نگین منتقل شد. سپس فاکتورهای مختلف مانند pH، هدایت الکتریکی (EC) (توسط کندانداکتومتر)، درصد آهک (به روش تیتراسیون) و نوع بافت خاک مورد بررسی و سنجش قرار گرفتند.

سنجش محتوی شیکوریک اسید، کلروژنیک اسید و کافئیک اسید

عصاره‌گیری نمونه‌ها به روش Luo و همکاران (۲۰۰۳) با اندکی تغییرات انجام شد. مقدار ۰/۱ گرم پودر اندام هوایی در استونیتریل ۲۰ درصد (V/V) خیسانده شده و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و بر روی شیکر قرار گرفت. عصاره‌ی حاصل بعد

۱۸۰ / مرتضی مفید بجنوردی و همکاران: بررسی اثر نوع بستر و شرایط کشت بر تولید اسیدهای فنلی در چند جمعیت

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.

آنالیزهای HPLC

جهت سنجش اسیدهای فنلی از دستگاه HPL (مدل Hitachi-Japan) مجهز به ستون C_{18} (۴.۶ mm×250 mm) با آشکارساز UV/VIS و ردیاب Diode Array استفاده شد. روش انجام آنالیز از نوع ایزاکراتیک و سرعت جریان حلال یک میلی لیتر در دقیقه بود. فاز متحرک شامل استونیتریل خالص (حلال A) و آب اسیدی شده با ۰/۱ درصد فسفریک اسید (حلال B) بود. طول موج های آشکارسازی ۳۳۰ نانومتر برای شیکوریک اسید و ۲۷۸ نانومتر برای کلروژنیک و کافئیک اسید بود. حجم ۲۰ میکرولیتر از عصاره پس از فیلترشدن (۰/۴۵ میکرون) به دستگاه تزریق شد.

به منظور رسم نمودار های استاندارد، محلول هایی با غلظت های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ (میلی گرم بر لیتر) از هر یک از استانداردهای مورد سنجش (Merk- Germany) تهیه شدند. سپس ۲۰ میکرولیتر از این محلول ها به دستگاه تزریق شدند. نمودار رگرسیون بر اساس مقادیر مختلف این استانداردها و مقادیر مختلف سطح زیر پیک رسم گردید. بعد از ظهور پیک های مورد نظر از عصاره های تزریق شده، سطح زیر منحنی پیک ها محاسبه و سپس در فرمول حاصل از خط رگرسیون مربوط به منحنی استاندارد ترکیبات شیکوریک، کلروژنیک و کافئیک اسید قرار داده شد تا غلظت هر یک از ترکیبات مورد نظر به دست آید.

تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق تمامی سنجش ها با سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS (version 22) انجام شد. از آنالیز یکطرفه دانکن برای مشخص کردن اختلاف معنی دار بین نتایج استفاده شد. سطح اطمینان برای وجود اختلاف معنی دار آماری، ۹۵ درصد در نظر گرفته شد. رسم نمودارها و جدول ها توسط نرم افزار Excel انجام گردید.

نتایج

آنالیز خاک: آنالیز نمونه های خاک جمع آوری شده از رویشگاه های مختلف کاهوی موجدار نشان داد که بافت خاک مناطق چشمه علی و بیارجمند لوم ماسه ای بوده، منطقه میرزابابیلو لوم، منطقه فیروزکوه لوم رسی و منطقه قم ماسه لومی بوده است. بیشترین مقدار EC در خاک مناطق فیروزکوه، میرزابابیلو و چشمه علی و کمترین مقدار در قم و بیارجمند ارزیابی شد. نوع خاک هر پنج رویشگاه آهکی با pH قلیایی ضعیف می باشد. منطقه بیارجمند و چشمه علی بیشترین و منطقه فیروزکوه و قم کمترین درصد ماده آلی را دارند. نتایج حاصل از آنالیز خاک مزرعه نیز نشان داد که بافت خاک از نوع لوم رسی بوده و در مقایسه

با خاک مناطق نمونه‌برداری دارای مقادیر بیشتر درصد ماده آلی و مقادیر کمتر آهک است. در این آزمایش pH خاک زراعی از نوع قلیایی ضعیف بوده است (جدول ۲).

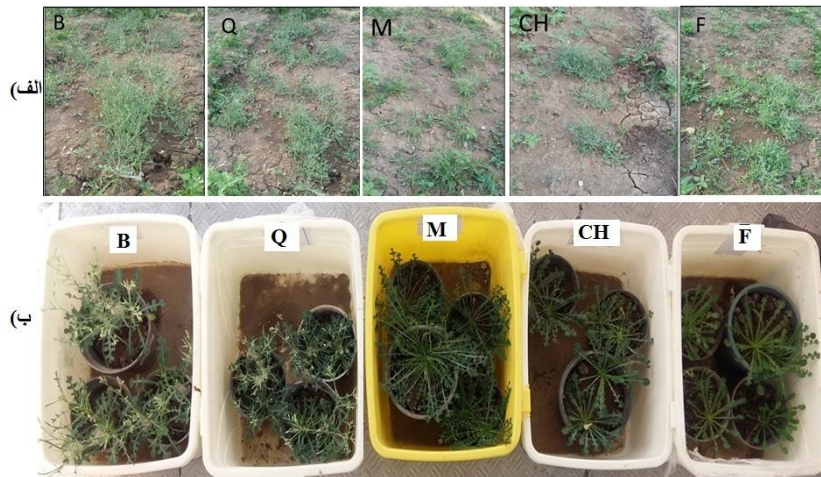
جوانه‌زنی بذرها و رشد گیاهان: بذره‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف که در شرایط مزرعه و یا گلخانه‌ها در فضای باز و یا اتاق رشد کشت شده بودند، پس از حدود بیست روز جوانه‌زنی را آغاز کردند. پس از دو ماه گیاهان وارد فاز زایشی (تشکیل ساقه گل‌آذین) شده و پس از حدود ده تا پانزده روز اولین گل‌ها ظاهر شدند. بذره‌های جمع‌آوری شده از دو منطقه قم و بیارجمند نیز پس از دو ماه (همزمان با گیاهان کشت شده در مزرعه) با تشکیل ساقه گل‌آذین وارد فاز زایشی شده و چرخه زندگی خود را تکمیل کردند. در حالی که نمونه‌های میرزابایلو، چشمه‌علی و فیروزکوه با تاخیر و پس از طی سه ماه وارد فاز زایشی شدند. در بین ۵ جمعیت مورد بررسی نمونه‌های جمع‌آوری شده از میرزابایلو که در اتاقک کشت رشد یافته بودند، از رشد بیشتری در مقایسه با سایر نمونه‌ها برخوردار بودند (شکل ۱).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های به‌دست آمده نشان داد که طول و وزن تر و خشک ساقه و ریشه در پنج جمعیت کاهوی موج کشت‌شده در شرایط مختلف تفاوت معنی‌داری را در سطح کمتر از یک درصد نشان می‌دهند. بیشترین مقدار طول ساقه ($52/4 \pm 66/23$ cm) در نمونه‌های میرزابایلو که در اتاقک رشد کشت شدند مشاهده شد. همچنین نتایج حاضر نشان داد که هر پنج جمعیت گیاهان کشت‌شده در مزرعه طول ساقه و ریشه بالاتری در مقایسه با گیاهان کشت‌شده در گلخانه داشتند. در بین گیاهان کشت‌شده در شرایط مزرعه و اتاق رشد، نمونه‌های میرزابایلو و بیارجمند دارای بیشترین مقدار طول ساقه بودند که با سایر نمونه‌ها تفاوت معنی‌داری نشان دادند (شکل ۲ و ۳).

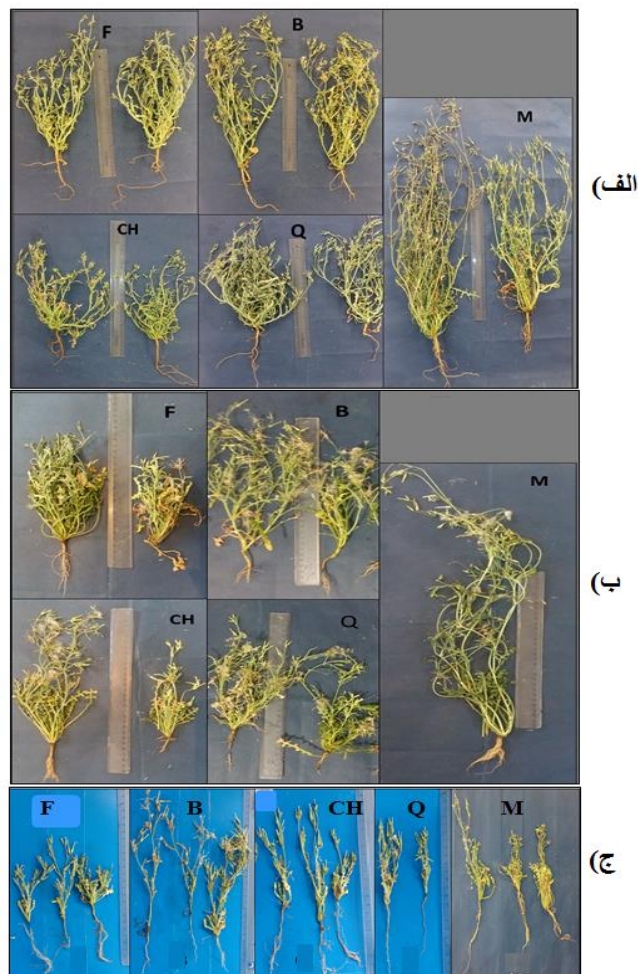
بیشترین مقدار وزن تر و خشک ساقه و ریشه در هر پنج جمعیت در نمونه‌های کشت شده در شرایط مزرعه مشاهده شد. در بین نمونه‌های کشت شده در شرایط مزرعه، نمونه میرزابایلو و قم به ترتیب با $11/53 \pm 33/78$ و $4/78 \pm 26/11$ گرم بیشترین مقدار وزن تر را نشان دادند. همچنین بیشترین وزن خشک ساقه به ترتیب در نمونه میرزابایلو و قم به مقدار $0/52 \pm 6/85$ و $5/35 \pm 0/85$ گرم مشاهده شد (شکل ۴).

جدول ۲: تجزیه شیمیایی نمونه خاک مناطق رویش گیاه و خاک زراعی گرگان

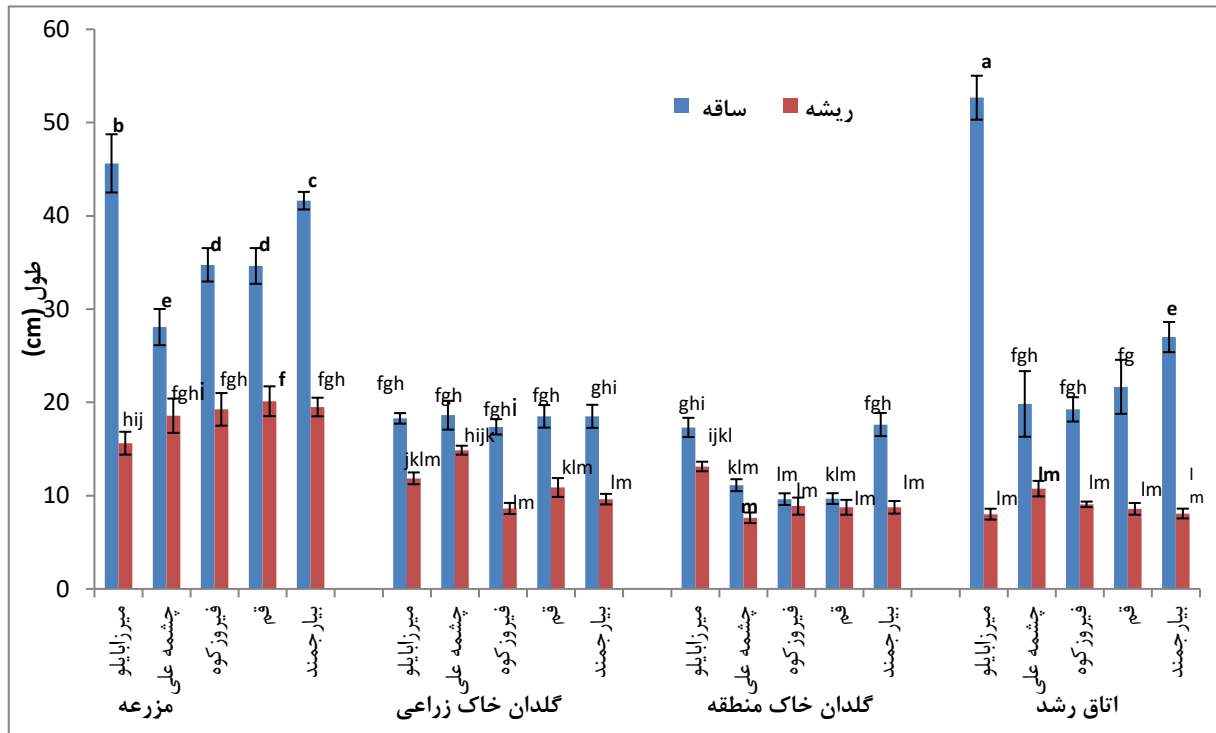
منطقه	بافت خاک	شن (%)	لای (%)	رس (%)	آهک (%)	ماده آلی (%)	pH	EC (Ds/m)
بیارجمند	لوم شنی	۶۶	۲۴	۱۰	۲۵/۶۲	۱/۱۹	۷/۶۹	۰/۷۷
قم	شن لومی	۸۰	۱۲	۸	۱۷/۶۲	۰/۰۳۴	۷/۶۸	۰/۹۱
چشمه علی دامغان	لوم شنی	۴۶	۴۴	۱۰	۵۶/۸۷	۱/۱۹	۷/۸۱	۱/۷۲
میرزابایلو	لوم	۴۶	۲۴	۲۰	۳۳/۶۲	۰/۷۴	۸/۱۰	۱/۷۲
فیروزکوه	لوم رسی	۲۶	۴۲	۳۲	۳۴/۱۲	۰/۰۳۴	۷/۶۹	۳۴/۱۲
گرگان	لوم رسی	۱۲	۵۲	۳۶	۱۲/۶۲	۲/۷۷	۷/۶۰	۲/۷۷



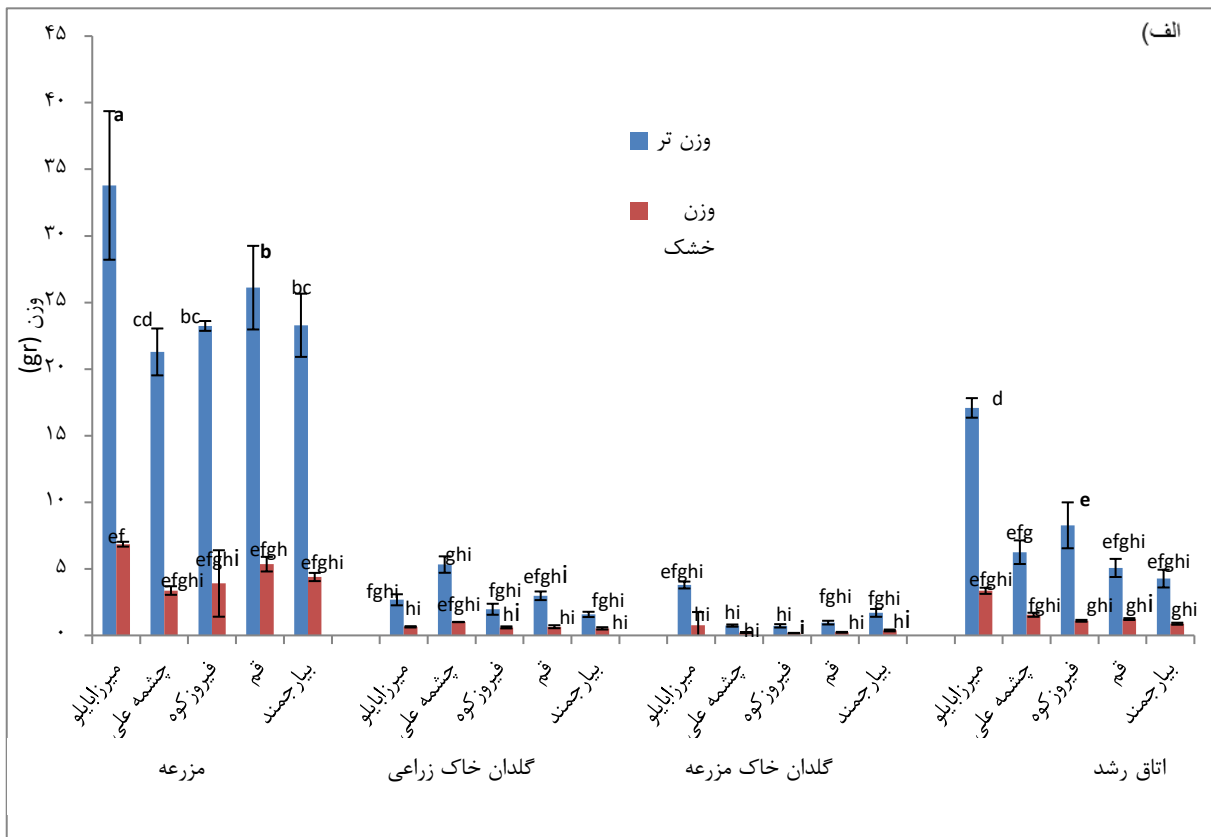
شکل ۱: گیاهان حاصل از کشت بذر پنج جمعیت کاهوی موجدار در الف) مزرعه و ب) اتاقک رشد. F: فیروزکوه، CH: چشمه‌علی، M: میرزابایلو، Q: قم و B: بیارجمند پس از ۲ ماه.

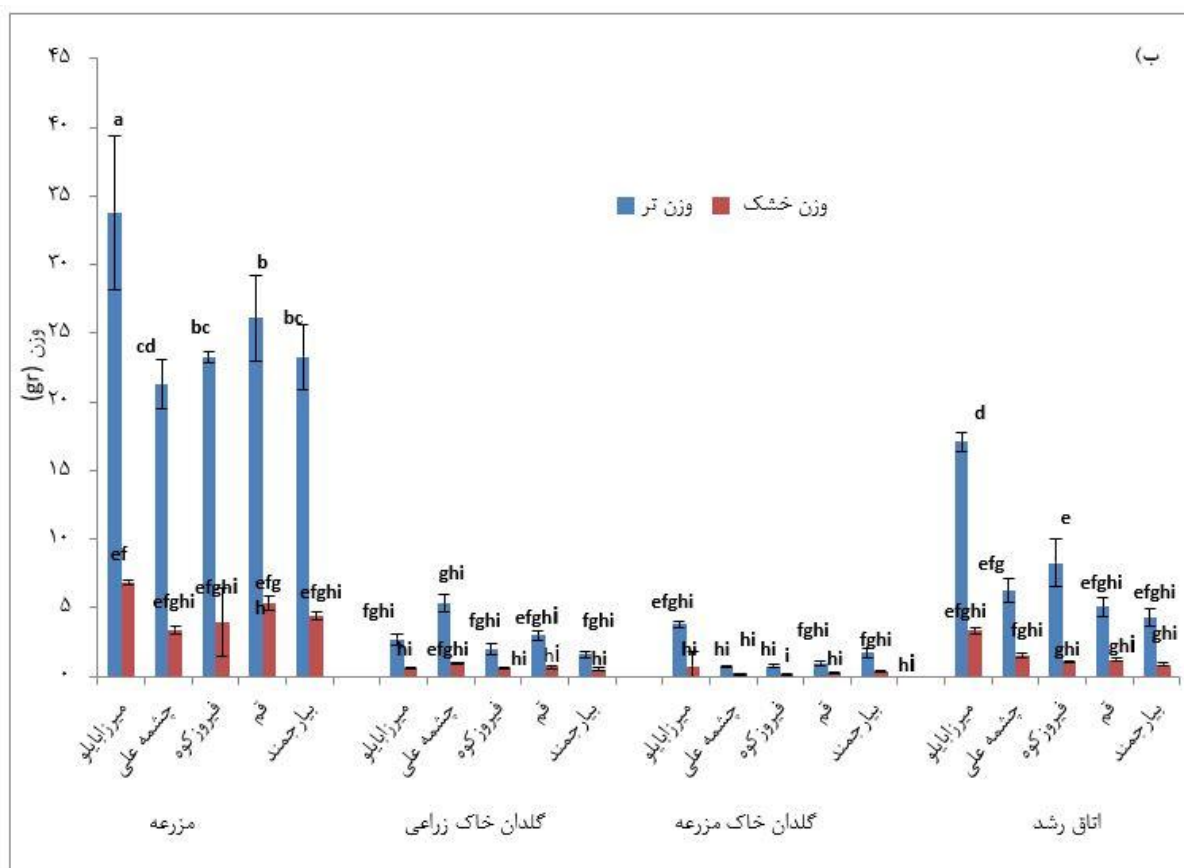


شکل ۲: کاهوی موجدار برداشت‌شده در فاز زایشی حاصل از کشت در الف) مزرعه، ب) اتاقک رشد و ج) گلدان با خاک منطقه در شرایط آب و هوای گرگان. F: فیروزکوه، CH: چشمه‌علی، M: میرزابایلو، Q: قم و B: بیارجمند.



شکل ۳: میانگین طول ساقه و ریشه در ۵ جمعیت کاهوی موجدار کشت‌شده در بسترهای مختلف خاک مزرعه و خاک منطقه (رویشگاه طبیعی گیاه) در دو شرایط فضای باز و اتاقک کشت پس از ۴ ماه. هر ستون نشان دهنده میانگین داده‌ها ± انحراف معیار است.





شکل ۴: میانگین وزن تر و خشک (الف) ساقه و (ب) ریشه در ۵ جمعیت کاهوی موجدار کشت شده در بسترهای مختلف خاک مزرعه و خاک منطقه (رویشگاه طبیعی گیاه) در دو شرایط فضای باز و اتاقک کشت پس از ۴ ماه. هر ستون نشان دهنده میانگین داده‌ها \pm انحراف معیار است.

بررسی مقدار کافئیک اسید و مشتقات آن به روش HPLC

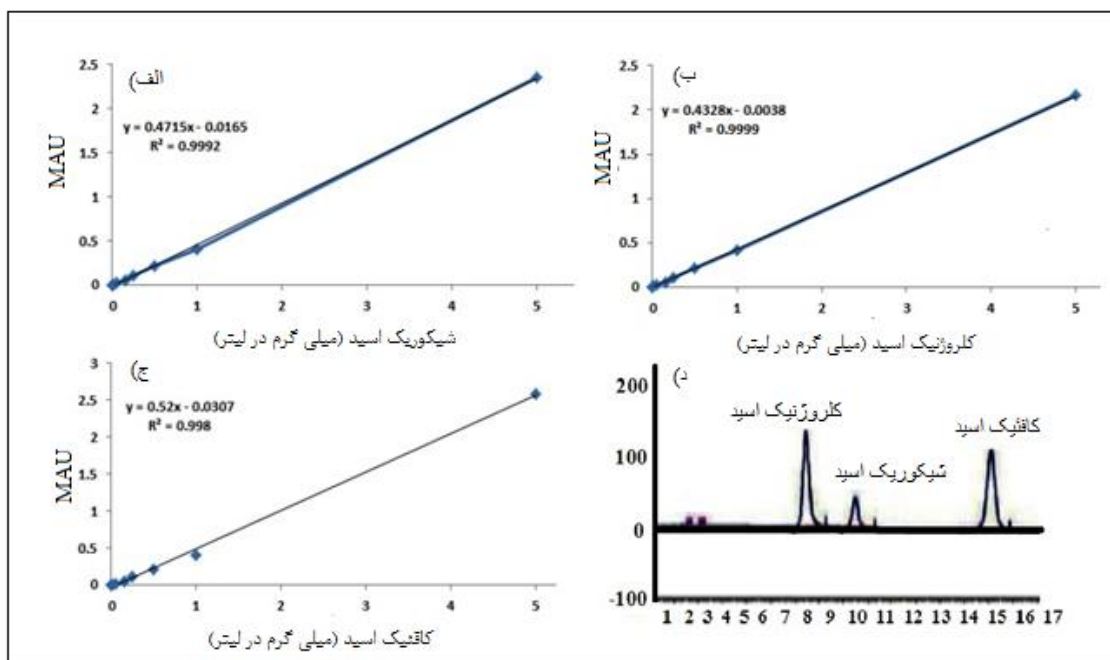
در ابتدا غلظت‌های مختلف ترکیبات استاندارد به دستگاه HPLC تزریق و زمان بازداری هر یک از ترکیبات مورد نظر به دست آمد. بنا به نتایج حاضر زمان بازداری کلروژنیک اسید، شیکوریک اسید و کافئیک اسید به ترتیب در دقایق ۸/۵، ۱۰ و ۱۴/۵ است (شکل ۵).

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از سنجش میزان کافئیک اسید، شیکوریک اسید و کلروژنیک اسید نشان داد که میانگین مقدار این ترکیبات در ساقه گیاهان جمع‌آوری شده از پنج منطقه مختلف که در شرایط مختلف کشت شده‌اند، در سطح یک درصد تفاوت معنی‌دار دارند. نتایج حاصل نشان داد که در تمام جمعیت‌های مورد بررسی، میزان شیکوریک اسید در گیاهانی که در گلدان و در فضای باز رشد یافته بودند بیشتر از نمونه‌هایی بود که در مزرعه و یا اتاقک کشت رشد یافته بودند. در این تحقیق بالاترین میزان شیکوریک اسید در نمونه‌هایی که از منطقه فیروزکوه جمع‌آوری شده و در گلدان حاوی خاک منطقه (۱/۲۴ میلی گرم بر گرم وزن خشک) و خاک زراعی (۱/۲۲ میلی گرم بر گرم وزن خشک) رشد یافته بودند مشاهده شد. همچنین

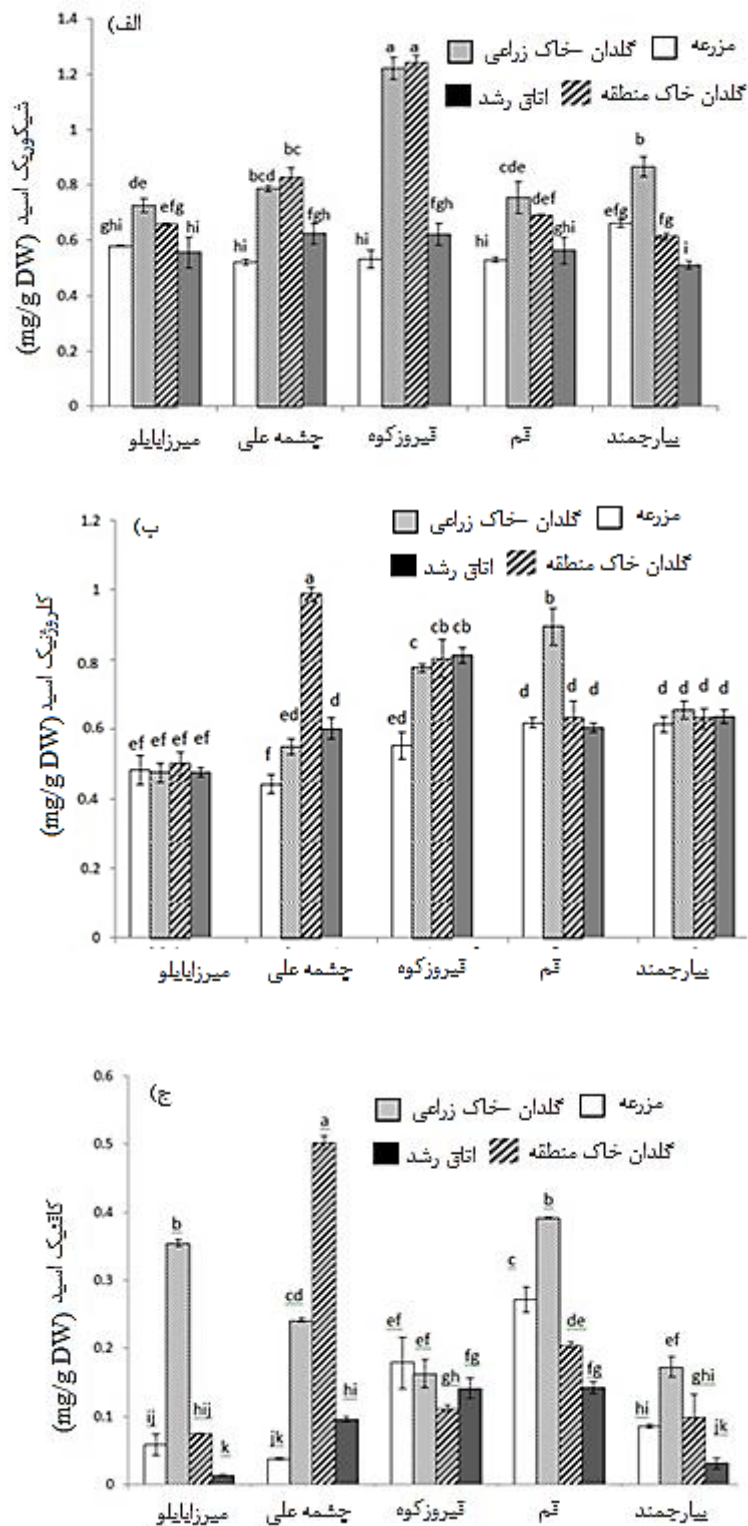
کمترین مقدار شیکوریک اسید در نمونه‌هایی که از منطقه بیارجمند جمع‌آوری شده و در اتافک رشد کشت شده بودند، مشاهده شد (شکل ۶-الف).

میانگین مقدار کلروژنیک اسید در دو نمونه میرزابیلو و بیارجمند که در شرایط مختلف کشت شده بودند، تفاوت معنی‌دار نشان نداد. در حالی که بیشترین مقدار کلروژنیک اسید (۰/۹۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در نمونه‌های جمع‌آوری شده از منطقه چشمه‌علی که در گلدان حاوی خاک منطقه رویش یافته بودند مشاهده شد. همچنین نمونه‌های جمع‌آوری شده از منطقه قم که در گلدان حاوی خاک زراعی رشد یافته بودند حاوی مقادیر بالایی از کلروژنیک اسید (۰/۸۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در خود بودند که با سایر گیاهان تفاوت معنی‌داری را نشان دادند (شکل ۶-ب).

بیشترین مقدار کافئیک اسید (۰/۵۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در نمونه‌های چشمه‌علی که در گلدان حاوی خاک منطقه رویش یافته بودند، مشاهده شد. در حالی که بیشترین مقدار کافئیک اسید در نمونه‌های میرزا بیلو و قم که در گلدان حاوی خاک زراعی رویش یافته بودند، مشاهده شد. این گیاهان در مقایسه با سایر نمونه‌ها تفاوت معنی‌داری را در مقدار کافئیک اسید نشان دادند (شکل ۶-ج).



شکل ۵: نمودار کالیبراسیون (الف) شیکوریک اسید، (ب) کلروژنیک اسید، (ج) و کافئیک اسید و (د) کروماتوگرام نمونه استاندارد. شدت جذب در واحد MAU (Measurement of Absorbance Unit) بیان شده است.



شکل ۶: الف) شیکوریک اسید، ب) کلروژنیک اسید و ج) کافئیک اسید در ۵ جمعیت کاهوی موجدار کشت شده در بسترهای مختلف خاک مزرعه و خاک منطقه (رویشگاه طبیعی گیاه) در دو شرایط فضای باز و اتاقک کشت. هر ستون نشان دهنده میانگین داده‌ها ± انحراف معیار است (n= ۶). ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، در سطح ۰/۰۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

بحث

مقدار شیکوریک اسید در گیاهان کشت شده در شرایط آب و هوای گرگان در هر پنج جمعیت نسبت به گیاهان برداشت‌شده از طبیعت کاهش معنی‌داری نشان داد. این نتیجه مطابق با مطالعه Binns و همکاران است که گزارش کردند گونه‌های مختلف اکیناسه که بصورت خودرو در طبیعت رشد می‌کنند، مقدار شیکوریک اسید بیشتری نسبت به گیاهان کشت شده دارند (Binns *et al.*, 2002). عوامل محیطی مثل دما، رطوبت، بارش و نور اثر مستقیم بر روی مقدار متابولیت‌های گیاهی دارند (Lee & Scagel, 2013).

نتایج حاضر نشان داد که مقدار رشد و همچنین میانگین مقدار شیکوریک، کلروژنیک و کافئیک اسید در جمعیت‌های کاهوی موجدار تفاوت معنی‌دار دارند. بیشترین مقدار رشد در گیاهان جمعیت میرزابابیلو مشاهده شد که همراه با تجمع کمترین میزان شیکوریک اسید در مقایسه با سایر جمعیت‌ها بود. این نتیجه نشان‌دهنده تخصیص بیشتر کربن فتوسنتزی در این جمعیت در جهت رشد گیاه و استفاده کمتر آن برای تولید متابولیت‌های ثانوی است. بررسی میزان شیکوریک اسید در بین جمعیت‌های مختلف کاهوی موجدار که از رویشگاه طبیعی خود نمونه‌برداری شده بودند نشان داد که بالاترین مقدار این ترکیب در جمعیت فیروزکوه (۳/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) وجود دارد (Mofid Bojnoordi *et al.*, 2020). نتایج حاضر نیز نشان داد که بیشترین مقدار شیکوریک اسید (در بین جمعیت‌های مختلف که در شرایط آب و هوای گرگان کشت شده بودند) در جمعیت فیروزکوه که در گلدان و در فضای باز رشد یافته بودند (۱/۲۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) به دست آمد. با توجه به کشت گیاهان در شرایط یکسان، این نتایج نشان‌دهنده تاثیر ژنتیک بر مسیر سنتز و تجمع این ترکیبات در جمعیت‌های مختلف گیاه است. این نتایج قابل مقایسه با مطالعه Assefa و همکاران است که با کشت ۲۲ واریته کاهوی خوراکی در شرایط یکسان گزارش کردند که مقدار اسیدهای فنلی، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و لاکتون‌های سزکوئی‌ترین در این واریته‌ها متفاوت بوده و این تنوع، پایه و اساس ژنتیکی دارد (Assefa *et al.*, 2019).

مقدار شیکوریک اسید در گیاهان کشت‌شده در گلدان در مقایسه با گیاهانی که در مزرعه کشت شده بودند، افزایش معنی‌دار نشان داد. اما مقدار رشد گیاهان کشت شده در گلدان، کمتر از گیاهان کشت شده در مزرعه بود. این نتیجه احتمالاً ناشی از تنش بیشتر در گلدان (در مقایسه با زمین) است که با تغییر مسیر کربن به سمت ساخت متابولیت‌ها باعث کاهش رشد و افزایش ترکیبات دفاعی در مقابل تنش‌ها شده است. با توجه به اینکه گلدان‌ها نسبت به سطح زمین ارتفاع دارند احتمالاً مقدار میزان نوسان دمای شب و روز در آنها بیشتر بوده و این عامل نقش موثری در افزایش شیکوریک اسید در گیاهان کشت شده در گلدان دارد. چنان که گیاهان کشت شده در گلدان و در اتاقک رشد که متحمل نوسان دمایی کمتری بودند مقدار شیکوریک اسید کمتری نیز داشتند. در رابطه با اثر دما بر متابولیسم ترکیبات فنلی می‌توان به نتایج Tudela و همکاران در سال ۲۰۱۷

اشاره کرد که گزارش کردند دمای پایین در فصل رشد باعث کاهش قهوه‌ای شدن کاهو در ارتباط با متابولیسم ترکیبات فنلی می‌گردد (Tudela et al., 2017).

نتایج حاضر نشان داد که مقدار کافئیک اسید، شیکوریک اسید و کلروژنیک اسید در هر پنج جمعیت، در گیاهان رشد یافته در فضای باز در مقایسه با گیاهان رشد یافته در اتاقک رشد، بیشتر است. با توجه به اینکه گیاهان رشد یافته در اتاقک رشد در خاک استریل رویش داشته و همچنین این فضا عاری از پاتوژن‌ها است، احتمال دارد افزایش میزان ترکیبات فوق در گیاهان رشد یافته در فضای باز، بدلیل تنش زیستی و یا برهم‌کنش گیاه با قارچ‌ها و میکروب‌های خاک رخ داده باشد. از عوامل تاثیرگذار دیگر بر مقدار ترکیبات مورد بررسی می‌توان به تفاوت نوسان دما، طول موج و شدت نور در فضای باز و اتاق رشد اشاره کرد. گیاهان رشد یافته در فضای باز تحت نوسان دمایی و شدت نور بیشتر نسبت به گیاهان اتاق رشد هستند. از طرفی امکان تابش نور فرابنفش در گیاهان تحت تابش نور خورشید وجود دارد. در این رابطه می‌توان به مطالعه Romani و همکاران اشاره کرد که گزارش کردند کاهوی رشد کرده در شرایط مزرعه نسبت به گیاهان رشد کرده در گلخانه با پوشش پلی‌کربنات میزان شیکوریک اسید بیشتری نشان دادند (Romani et al., 2002). همچنین Yildirim و Turker گزارش کردند مقدار ترکیبات فنلی در گیاهان *Fragaria vesca* L. رشد کرده در فضای باز در مقایسه با گیاهان رشد یافته در شرایط آزمایشگاهی و بر روی محیط کشت MS (موراشیگ و اسکوگ) حداقل ۵ برابر بیشتر بوده است (Yildirim & Turker, 2014).

در گیاهان کاشته شده در گلدان حاوی خاک منطقه و خاک زراعی، در بیشتر جمعیت‌ها تفاوت معنی‌داری در مقدار کافئیک اسید، شیکوریک اسید و کلروژنیک اسید مشاهده نشد. خاک زراعی در مقایسه با خاک جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های طبیعی گیاه دارای درصد ماده آلی بیشتر و آهک کمتر است. در این مطالعه مقدار نیتروژن خاک اندازه‌گیری نشده است، اما مطالعات زیادی در رابطه با اثر منفی نیتروژن خاک بر مقدار ترکیبات فنلی گیاهان وجود دارد. از جمله Qadir و همکاران گزارش کردند که در کاهوی خوراکی با افزایش مقدار نیتروژن خاک، میزان اسیدهای فنلی و فلاونوئیدها کاهش یافت (Qadir et al., 2017). همچنین Mampholo و همکاران نشان دادند که با افزایش نیتروژن، مقدار اسیدهای فنلی (شیکوریک، کفتاریک، کلروژنیک و کافئیک اسید) و فلاونوئیدها (ایزورامنتین، کوئرستین، میریستین و اپی‌کاتشین) در واریته‌های مختلف کاهوی خوراکی که در شرایط هیدروپونیک رشد یافته بودند، کاهش یافت (Mampholo et al., 2018).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که سطوح بالایی از تنوع بین جمعیت‌های کاهوی موجدار از نظر ویژگی‌های فیتوشیمیایی وجود دارد. با توجه به کشت جمعیت‌ها در شرایط یکسان، این امر نشان‌دهنده پتانسیل ژنتیکی بالا در بین

جمعیت‌های مورد بررسی است. همچنین مطالعه حاضر نشان داد که در بین جمعیت‌های مورد بررسی، بالاترین مقدار شیکوریک اسید (۱/۲۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در جمعیت فیروزکوه که در گلدان و در فضای باز رشد یافته بودند مشاهده می‌شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور و حوزه تحصیلات تکمیلی دانشگاه گلستان

انجام شده است.

منابع

- Asadi, M., Safavi, S.R., Naseh, Y., Jafari, E. and Heydarnia, N. (2013). Flora of Iran, Asteraceae Tribe Cichorieae (No. 77). Research Institute of Forests & Rangelands Press, 548.
- Assefa, A.D., Choi, S., Lee, J.E. Sung, J.S. and Hur, O.S., Ro, N.Y., Lee, H.S., Jang, S.W. and Rhee, J.H. (2019). Identification and quantification of selected metabolites in differently pigmented leaves of lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars harvested at mature and bolting stages. BMC Chemistry, 13:56-68.
- Beharav, A., Ben-David, R., Doležalová, I. and Lebeda, A. (2010). Eco-Geographical Distribution of *Lactuca aculeata* Natural Populations in Northeastern Israel. Genetic Resources and Crop Evolution, 57: 679–86.
- Beharav, A., Stojakowska, A., Ben-David, R., Malarz, J., Michalska, K. and Kisiel, W. (2015). Variation of sesquiterpene lactone contents in *Lactuca georgica* natural populations from Armenia. Genetical Resource Crop Evolution, 62: 431–441.
- Beharav, A., Malarz, J., Michalska, K., Ben-David, R. and Stojakowska, A. (2020). Variation of sesquiterpene lactone contents in *Lactuca altaica* natural populations from Armenia. Biochemical Systematics and Ecology, 90: 104030.
- Binns S.E, Livesey J.F, Arnason J.T and Baum B.R. (2002). Phytochemical variation in Echinacea from roots and flower heads of wild and cultivated populations. Journal Agriculture and Food Chemistry, 50:3673–3687.
- Ding, H., Ci, X., Cheng, H, Yu, Q. and Li, D. (2019). Chicoric acid alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice through anti-inflammatory and anti-oxidant activities. International Immunopharmacology, 66: 169–176.
- Holeski, L.M., Hillstrom, M.L., Whitham, T.G. and Lindroth, R.L. (2012). Relative importance of genetic, ontogenetic, induction and seasonal variation in producing amultivariate defense phenotype in a foundation treespecies. Oecologia, 170: 695–707.

- Koukounaras, A., Siomos, A.S., Gerasopoulos, D. and Karamanoli, K. (2016). Genotype, ultraviolet irradiation, and harvesting time interaction effects on secondary metabolites of whole lettuce and browning of fresh-cut product. *Journal Horticultural Science Biotechnology*, 91:491–496.
- Lee, J. and Scagel, C.f. (2013). Chicoric acid: chemistry, distribution and production. *Frontiers of Chemistry*, 1:40-45.
- 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 Chromatography*, 986: 73-81.
- Mampholo, B.M., Maboko, M.M., Soundy, P. and Sivakumar, D. (2018). Variety-specific responses of lettuce grown in a gravel-film technique closed hydroponic system to N supply on yield, morphology, phytochemicals, mineral content and safety. *Journal of Integrative Agriculture*, 17: 2447–2457.
- Mofid Bojnoordi, M., Aghdasi, M. and Fatemi, M. (2020). An investigation on phytochemical components and antioxidant activity of *Lactuca undulate* in 5 natural habitats of Iran. *Journal of medicinal plants*, 75:65-75.
- 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 Reports*, 25: 522–532.
- 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.
- Nuissier, G., Rezzonico, B. and Grignon-Dubois, M. (2010). Chicoric acid from *Syringodium filiforme*. *Food Chemistry*, 120: 783–788.
- Ouzounis, T., Parjikolaei, B.R., Frette, X., Rosenqvist, E. and Ottosen, C.O. (2015). Pre-dawn and high intensity application of supplemental blue light decreases the quantum yield of PSII and enhances the amount of phenolic acids, flavonoids, and pigments in *Lactuca sativa* *Front. Plant Science*, 6:19-25.
- Qadir, O., Siervo, M., Seal, C.J. and Brandt, K. (2017). Manipulation of contents of nitrate, phenolic acids, chlorophylls, and carotenoids in lettuce (*Lactuca sativa* L.) via contrasting responses to nitrogen fertilizer when grown in a controlled environment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65: 10003–10010.
- Ramezannejad, R., Aghdasi, M. and Fatemi, M. (2019). An investigation on chicoric acid content and antioxidant activity in some Iranian native species compared to *Echinacea purpurea* L. in different developmental stages. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 34: 909-923.

- Rouphael, Y., Cardarelli, M., Bassal, A., Leonardi, C., Giuffrida, F. and Colla, G. (2012). Vegetable quality as affected by genetic, agronomic and environmental factors. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 10: 680-688.
- Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Sani, G., Cimato, A. and Heimler, D. (2002). Polyphenols in greenhouse and open-air-grown lettuce. *Food Chemistry*, 79: 337-342.
- Saeed, M., Babazadeh, D., Arain, M.A., Naveed, M., Shah, Q.A., Kamboh, A.A., Moshaveri, A., Modarresi-Ghazani, F., Hejazi, V. and Chao, S. (2018). The use of chicoric acid from *Echinacea purpurea* as a feed additive in poultry nutrition, *World's Poultry Science Journal*, 74: 69-78.
- Scarpati, M.L. and Oriente, G. (1958). Chicoric acid (dicaffeoyltartaric acid): its isolation from chicory (*Chicorium intybus*) and synthesis. *Tetrahedron*, 4:43-48.
- Thygesen, L., Thulin, J., Mortensen, A., Skibsted, L. H., Molgaard, P. (2007). Antioxidant activity of chicoric acid and alkamides from *Echinacea purpurea*, alone and in combination. *Food Chemistry*, 101: 74-81.
- Treuren, R.V., van Eekelen, H.D.L.M., Wehrens, R. and de Vos, R.C.H. (2018). Metabolite variation in the lettuce gene pool: towards healthier crop varieties and food. *Metabolomics*, 14:146-153.
- Tsai, Y.L., Chiu, C.C., Chen, J.Y.F., Chan, K.C. and Lin, S.D. (2012). Cytotoxic effects of *Echinacea purpurea* flower extracts and chicoric acid on human colon cancer cells through induction of apoptosis. *Journal of ethnopharmacology*, 143: 914-919.
- Tsai, K.L., Kao, C.L., Hung, C.H., Cheng, Y.H., Lin, H.C. and Chu, P.M. (2017). Chicoric acid is a potent anti-atherosclerotic ingredient by anti-oxidant action and anti-inflammation capacity. *Oncotarget*, 8: 29600-29612.
- Tudela, J.A., Hernandez, N., Perez-Vicente, A. and Gil, M.I. (2017). Growing season climates affect quality of fresh-cut lettuce. *Postharvest Biology Technology*, 123: 60-68.
- Yildirim, A.B. and Turker, A.U. (2014). Effects of regeneration enhancers on micropropagation of *Fragaria vesca* L. and 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.

Impact of planting bed and culture conditions on phenolic acid production in some *Lactuca undulata* Ledeb populations

M. Mofid Bojnoordi¹, M. Aghdasi^{2*}, M. Fatemi³

Received:2021.1.12

Accepted:2021.4.11

Abstract

Lactuca undulata Ledeb. belongs to the family of Asteraceae. The present study aimed to investigate the impact of planting bed and conditions culture on cichoric acid production in different populations. For this purpose, collected seeds from regions (Cheshmeh Ali Damghan, Qom, Mirzabailo, Biarjamand, and Firoozkooh) were planted in pots with two different kinds of soil (field soil and soil collected from natural habitat) and kept in either outdoor or growth chamber. The current data revealed that the highest amount of chicoric acid (1.24 mg/kg DW) was observed in the Firoozkooh population which was grown in pots containing soil of the region. The highest amount of chlorogenic acid (0.98 mg/g DW) and caffeic acid (0.50 mg/g DW) were also observed in the Cheshmeh Ali population which grown in pots containing natural habit soil. The present results showed that there is high phytochemical diversity among the studied populations.

Keywords: *Caffeic acid, Chlorogenic acid, Cichoric acid, Lactuca undulata Ledeb, Soil*

1- PhD student in Plant Physiology, Golestan University, Gorgan, Iran

2- Associate Professor of Plant Molecular Physiology, Golestan University, Gorgan, Iran

*(Corresponding author: Aghdasi1346@gmail.com)

3- Assistant Professor of Plant Systematics, Golestan University, Gorgan, Iran