Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 50, No 1, Spring 2019 (61-76)
DOI: 10.22059/ijhs.2018.246503.1353

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۰، شمارهٔ ۱، بهار ۱۳۹۸ (ص۷۶-۶۱)

بررسی ویژگی‌های فیتوشیمیایی گل سرخارگل [*Echinacea purpurea* (L.) Moench] در کشت مخلوط با لوبیا سبز و تاریخ‌های مختلف کشت تابستانه

سمانه اسدی صنم[1]، محسن زواره[2*]، همت‌اله پیردشتی[3]، فاطمه سفیدکن[4] و قربانعلی نعمت‌زاده[5]
۱ و ٤. استادیار و استاد، بخش تحقیقات گیاهان دارویی، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
۲. دانشیار، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۳ و ۵. دانشیار و استاد، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۹/۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۱۲/۱٤)

چکیده

در بررسی عملکرد ماده خشک و ویژگی‌های فیتوشیمیایی گل سرخارگل‌های دوساله در کشت مخلوط سرخارگل با لوبیا سبز و تاریخ‌های مختلف کشت تابستانه، آزمایشی به‌صورت کرت‌های خردشده در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در سال زراعی ۹۲-۱۳۹۱، طراحی و اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل آرایش کشت [کشت خالص سرخارگل، کشت خالص لوبیا سبز، کشت مخلوط جایگزینی با الگوهای کشت ۱:۱ (یک در میان) و ۲:۲ (دو در میان) سرخارگل و لوبیا سبز]، تاریخ‌های کشت [(۱۰ تیر، ۹ مرداد و ۸ شهریور) در تابستان ۱۳۹۱] و کشت لوبیا سبز هم‌زمان با سبزشدن سرخارگل در بهار ۱۳۹۲ بود. نتایج آزمایش نشان داد که کشت زودهنگام سرخارگل‌ها در تابستان (۱۰ تیر) موجب افزایش ماده خشک، مشتقات اسید کافئیک و محتوای فنل و فلاونوئید کل گل شد. در میان الگوهای کشت مخلوط نیز، کشت دو در میان سرخارگل و لوبیا سبز، موجب افزایش ماده خشک گل شد. در حالی‌که بیشترین مقدار اسید شیکوریک، اسید کلروژنیک و اکیناکوزید به‌ترتیب با ۲۹/۳، ۲/٤ و ۲/۳ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک در کشت خالص سرخارگل‌ها به‌دست آمد. بیشترین مقدار فنل و فلاونوئید کل گل هم، در تاریخ کاشت ۱۰ تیر و آرایش تک‌کشتی سرخارگل‌ها به‌دست آمد. در کل، می‌توان گفت که اگر هدف از کشت این گیاه افزایش تولید مشتقات اسید کافئیک باشد، تک‌کشتی و اگر هدف، بهبود تولید ماده خشک باشد، کشت مخلوط مزیت محسوب می‌شود. به علاوه، کشت زودتر این گیاه نیز از نظر تولید ماده خشک و مشتقات اسید کافئیک نسبت به کشت تأخیری، برتری دارد.

واژه‌های کلیدی: فلاونوئید کل، فنل کل، ماده خشک گل، مشتقات اسید کافئیک.

Evaluation of phytochemical properties of purple coneflower [*Echinacea purpurea* (L.) Moench] flowers in intercropping with green beans and different summer time planting dates

Samaneh Asadi-Sanam[1], Mohsen Zavareh[2*], Hemmatollah Pirdashti[3], Fatemeh Sefidkon[4] and Ghorban-Ali Nematzadeh[5]
1, 4. Assistant Professor and Professor, Department of Medicinal Plants, Research Institute of Forests and Rangelands, AREEO, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
3, 5. Associate Professor and Professor, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
(Received: Nov. 24, 2017 - Accepted: Mar. 5, 2018)

ABSTRACT

To evaluate dry matter yield and phytochemical properties of two years old purple coneflower [*Echinacea purpurea* (L.) Moench] flower in intercropping with green beans and different summer time planting dates, a randomized complete block design in split plot arrangement with three replications was conducted in Research Farm of Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan in 2012-2013. Treatments included planting arrangements [coneflower and green bean monoculture, replacement intercropping planting with patterns of 1:1 and 2:2 ratio of coneflower: green beans], planting dates (June 30, July 30 and August 29), and cultivation of green beans in the spring of 2012 coincided with the emergence of coneflower. Results of the experiment showed that planting date of June 30 increased dry matter, caffeic acid derivates, total phenol and flavonoid contents of flower. Among the intercropping planting arrangements, patterns of 2:2 ratio of coneflower: green beans, increased flower dry matter. While the highest amount of cichoric acid, chlorogenic acid and echinacoside (29.3, 2.4 and 2.3 mg/g dry matter, respectively) were obtained in coneflower plants cultivated as sole crop. The maximum amount of total phenol and flavonoid contents of flower were detected in coneflower plants cultivated in June 30 and sole cropping pattern. Overall, it can be concluded that if the aim of cultivation of this plant is increasing production of caffeic acid derivatives, sole cropping is better than mixed cropping. However, for dry matter improvement, mixed cropping has more advantages. In addition, early cultivation of the crop is more suitable for caffeic acid derivatives and dry matter production than delayed planting.

Keywords: Caffeic acid derivates, Flower dry matter, Total flavonoid, Total phenol.

* Corresponding author E-mail: mzavareh@guilan.ac.ir

مقدمه

سرخارگل با نام جنس *Echinacea* گیاهی علفی، چندساله و بومی قاره آمریکای شمالی است که در خانواده آستراسه (Asteraceae) رده‌بندی شده است (Hitchcock & Cronquist, 1973). گونه (*E. purpurea*) به‌عنوان مشهورترین گونه دارویی جنس *Echinacea* در ایالات متحده و استرالیا و از پرفروش‌ترین گیاهان دارویی در اروپا به‌شمار می‌رود (Stanisavljevic *et al*., 2009).

داروهای گیاهی زیادی در مقیاس تجاری از اندام‌های هوایی سرخارگل تولید می‌شوند که برای بیماری‌های لثه و دهان، درمان سرماخوردگی، سرفه، برونشیت، عفونت‌های ریوی و تقویت سیستم ایمنی بدن استفاده می‌شوند (Tsai *et al*., 2012). افزایش محبوبیت سرخارگل در ۲۰ سال اخیر و نیاز به مواد اولیه این گیاه برای تولید دارو در کشور، ضرورت توسعه کشت و کار این گیاه با بررسی شرایط رشد، نیازهای بوم‌شناسی، استفاده از شیوه‌های مناسب به‌زراعی و مدیریت درست را ایجاب می‌کند.

تعیین تاریخ کاشت مناسب، به‌عنوان یکی از شیوه‌های به‌زراعی، راهکاری برای جلوگیری از نوسانات عملکرد به‌شمار می‌رود (Paz *et al*., 2012) که هدف از آن، گزینش بهترین زمان کاشت برای رقم یا گروهی از ارقام مشابه است تا مجموعه عوامل محیطی برای هر یک از مراحل نموی گیاه از جمله سبزشدن، استقرار بوته‌ها و گلدهی در شرایط بهینه قرار گیرد (Lopez–Bellido *et al*., 2008). در این راستا، Chen *et al*. (2008) با تأکید بر سازگاری موفقیت‌آمیز سرخارگل در تایوان، ویژگی‌های فیتوشیمیایی این گیاه را تحت‌تأثیر تاریخ کشت دانستند.

بهره‌گیری از اصول بوم‌شناسی از جمله کشت مخلوط، یکی از علمی‌ترین و اقتصادی‌ترین شیوه مدیریت تولید گیاهان دارویی، با توجه به احتمال بروز اثرات منفی ناشی از مصرف انواع مواد شیمیایی، روی کمیت و کیفیت ترکیبات مؤثره این گیاهان عنوان شده است (Klindt Andersen *et al*., 2007). در طراحی سامانه کشت مخلوط، انتخاب نوع گونه‌ها به‌نحوی‌که اثرات تکمیل‌کنندگی بر یکدیگر داشته باشند، شرط اصلی موفقیت و برتری زیستی زراعت مخلوط می‌باشد که لازمه این کار، شناخت کامل گیاه در ارتباط با نیازهای بوم‌شناسی آن و نحوه واکنش آن به محیط است (Nachigera *et al*., 2008; Mohsen-Abadi & Jahansooz, 2013). در این آزمایش، تفاوت‌های فیزیولوژیک، تا اندازه‌ای تفاوت‌های ریخت‌شناسی و نیازهای متفاوت بوم‌شناسی سرخارگل و لوبیا سبز، توانایی تثبیت نیتروژن توسط لوبیا سبز و استفاده بیشتری از منابع در دسترس را می‌توان از دلایل انتخاب لوبیا سبز به‌عنوان گیاه همراه در کشت مخلوط با سرخارگل برشمرد. در بررسی جذب و رقابت نور در کشت مخلوط جایگزینی گیاهان *Panicum virgatum* و *Ratibida pinnata* با سرخارگل (*E. purpurea*) در شرایط گلخانه و مزرعه، عملکرد ماده خشک و شدت نور در سایه‌انداز گیاه سرخارگل تحت تأثیر نوع کشت (تک‌کشتی و مخلوط) قرار گرفت (Knee & Thomas, 2002).

اجزای فعال اندام‌های هوایی سرخارگل، شامل مشتقات اسید کافئیک (Caffeic acid)، پلی‌ساکاریدها، آلکامیدها، گلیکوپروتئین‌ها و اسانس می‌باشد (Percival, 2000). مشتقات اسید کافئیک جزو گروه اصلی ترکیبات فنلی در جنس *Echinacea* هستند که تصور می‌شود مسئول ویژگی‌های محرک سیستم ایمنی (Immunostimulating) باشند (Barnes *et al*., 2005). استفاده از گستره وسیعی از این ترکیبات در تولید محصولات اقتصادی و تجاری صنعت دارویی در پژوهش‌های مختلفی (Bergeron *et al*., 2002; Luo *et al*., 2003) مشاهده شده است. در سرخارگل، مشتقات اصلی اسید کافئیک از واکنش با اسید تارتاریک (Tartaric acid) (اسید کافتاریک و اسید شیکوریک)، اسید کوئینیک (Quinic acid) (اسید کلروژنیک و سینارین) یا گلیکوزید (اکیناکوزید) تولید می‌شوند. اسید شیکوریک که به‌عنوان یک نشان‌گر در تعیین کیفیت دارویی پیکره سرخارگل استفاده می‌شود (Thygesen *et al*., 2007)، در گل‌ها، ریشه‌ها و ریزوم‌ها، برگ‌ها و به‌مقدار کمتر در ساقه‌های *E. purpurea* وجود دارد (Stanisavljevic *et al*., 2009) که غلظت آن وابسته به منشأ گونه و نیز، فصل برداشت است (Bauer, 2000). تغییرات

مقدار اسید شیکوریک از ۱/۵۲ تا ۲۰/۲ میلی‌گرم بر گرم برای گل‌های سرخارگل در سراسر جهان گزارش شده است (Thomsen *et al*., 2012). غلظت دیگر مشتقات اسید کافئیک هم، به مانند اسید شیکوریک در بیشتر مطالعات انجام‌شده در سراسر جهان بسیار متفاوت بوده است. غلظت اسید کلروژنیک در مطالعات انجام‌شده در دانمارک (Thomsen *et al*., 2012) و نیوزیلند (Perry *et al*., 2001): زیر ۰/۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک، در ایالات متحده آمریکا (Gray *et al*., 2002; Schieffer & Kohn, 2002): ۰/۱۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک و در چین (Liu *et al*., 2007): ۳/۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گزارش شد. اسید کافتاریک هم، زیر ۰/۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در دانمارک (Thomsen *et al*., 2012)، بین ۰/۱ تا یک میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در سرخارگل‌های رشدیافته در ایالات متحده آمریکا و نیوزیلند (Gray *et al*., 2002; Perry *et al*., 2001) و ۳/۵ و ۷/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در آزمایش‌های انجام‌شده در ایالات متحده آمریکا و چین (Liu *et al*., 2007; Schieffer & Kohn, 2002) ثبت شد. با این‌حال، تجزیه‌های کمی عصاره‌های اتانولی و آبی سرخارگل نشان داده است که غلظت‌های بالای اسیدهای کافئیک در گیاه، هنگامی به‌دست می‌آید که به گیاه برای تولید و ذخیره این ترکیبات بیش از یک سال فرصت داده شود (Cech *et al*., 2006).

با توجه به آغاز تولید تجاری این گیاه و کمبود اطلاعات درباره ویژگی‌های فیتوشیمیایی آن در کشور و همچنین اهمیت کاهش استفاده از نهاده‌های شیمیایی در تولید گیاهان دارویی، پژوهش حاضر با هدف بررسی ویژگی‌های فیتوشیمیایی گل سرخارگل‌های دوساله در کشت مخلوط با لوبیا سبز و تاریخ‌های مختلف کشت تابستانه در منطقه ساری، طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در مزرعه پژوهشی پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، با عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۳۹ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۳ درجه و چهار دقیقه شرقی و ارتفاع ۱۱ متر پایین‌تر از سطح دریا به‌صورت کرت‌های خردشده در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در تابستان سال زراعی ۹۲-۱۳۹۱، طراحی و اجرا شد. پیش از شروع آزمایش، نمونه‌برداری مرکب از خاک مزرعه انجام و تعیین برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی (Ali Ehyaei & Behbehani Zade, 1993) در آزمایشگاه خاک دانشگاه صورت گرفت (جدول ۱). اطلاعات هواشناسی در سال‌های اجرای آزمایش (۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ هجری خورشیدی) از اداره تحقیقات هواشناسی کشاورزی قراخیل- قائمشهر (جدول ۲) تهیه شد.

در این آزمایش، تیمارها شامل آرایش کشت [کشت خالص سرخارگل، کشت خالص لوبیا سبز، کشت مخلوط جایگزینی با نسبت ۵۰:۵۰ و کشت ۱:۱ (یک در میان) و ۲:۲ (دو در میان) سرخارگل و لوبیا سبز] و تاریخ‌های مختلف کشت [(۱۰ تیر، ۹ مرداد و هشت شهریور) در تابستان سال زراعی ۱۳۹۱] و کشت لوبیا سبز هم‌زمان با سبزشدن سرخارگل در بهار سال زراعی ۱۳۹۲ بود که تاریخ کشت‌ها در کرت اصلی و الگوهای کشت در کرت‌های فرعی قرار گرفتند.

نشاهای گیاه دارویی سرخارگل در هر تاریخ کشت مورد نظر، از گلخانه پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج به زمین اصلی منتقل و در فاصله ۲۵ سانتی‌متر روی ردیف با تراکم ۱۰ بوته در متر مربع در کرت‌هایی با ابعاد ۵×۳ متر نشاکاری شدند. هر کرت شامل شش ردیف کاشت به‌فاصله ۴۰ سانتی‌متر بود. بذرهای لوبیا سبز (*Phaseolus vulgaris*) رقم سان‌ری (Sunray) هم، به‌فاصله ۱۰ سانتی‌متر روی ردیف (تراکم ۲۵ بوته در متر مربع) و با عمق پنج سانتی‌متر در همان کرت‌ها در تاریخ کاشت مورد نظر کاشته شدند. فاصله بین کرت‌های هر آرایش کشت، یک ردیف نکاشت و فاصله بین تاریخ‌های کشت، دو ردیف نکاشت درنظر گرفته شد. هم‌زمان با گذار از خواب زمستانی سرخارگل‌ها و جوانه‌زدن و باز رویش آن‌ها در بهار سال ۱۳۹۲، کشت لوبیا سبز در ردیف‌های مربوطه برای حفظ آرایش مخلوط در سال دوم سرخارگل‌ها انجام شد.

جدول ۱. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه آزمایش
Table 1. Some physical and chemical properties of experimental farm soil

Measured characteristics										
Sampling depth (centimeter)	The electrical conductivity ($ds\ m^{-1}$)	Saturated soil reaction	Organic carbon (%)	Total nitrogen (%)	Absorbable phosphorus (ppm)	Absorbable potassium (ppm)	Absorbable iron (mg/kg)	Absorbable manganese (mg/kg)	Absorbable zinc (mg/kg)	Soil texture
0-30	0.92	7	2.6	0.22	28.4	451	206	98	15.3	Clay Silty

جدول ۲. اطلاعات هواشناسی مربوط به ۶ ماه از فصل رشد سرخارگل در سال‌های اجرای آزمایش (سال زراعی ۹۲-۱۳۹۱) در ساری
Table 2. Meteorological data (for 6 months) from the purple coneflower growing season in the years of the experiment (2012-2013 crop year) in Sari

Months	Minimum temperature (celsius)		Maximum temperature (celsius)		Rainy day (day)		Total monthly rainfall (mm)	
	Years of experiment							
	91	92	91	92	91	92	91	92
March- April	9.4	10.2	20.5	19.8	5	10	9	31.5
April-May	16.1	13.6	26.3	24.7	3	7	5	32.6
May- June	19.8	19.2	29.7	28.7	3	5	22.8	8.9
June-July	22.2	21.4	29.7	30.9	9	4	17.9	10.4
Julay-August	23.2	21.7	33.8	29.1	1	16	4.3	49.5
August-September	21.2	21.8	28.8	30.1	11	7	93.5	36.3
Total	111.9	107.9	168.8	163.3	32	49	152.5	169.2
Average	18.65	17.9	28.1	27.2	5.3	8.2	25.4	28.2

عملیات آماده‌سازی بستر شامل شخم پاییزه، تسطیح و دو دیسک عمود برهم پیش از کاشت بود. سپس ردیف‌های کاشت به حالت پشته طراحی شد. از آن‌جایی که در بستر کاشت نشاها در خزانه، ماسه غالب بود، در هنگام انتقال نشاها به زمین اصلی نیز، مقداری ماسه نرم دریا با خاک پشته مخلوط شد. آبیاری گیاهان، بلافاصله پس از کاشت و پس از آن با توجه به شرایط آب و هوایی منطقه، به‌طور یکسان و به‌صورت قطره‌ای انجام شد. درضمن، به‌منظور بررسی آزمایش در شرایط کم‌نهاده و به‌سبب احتمال اثرات منفی نهاده‌های شیمیایی بر کیفیت مواد مؤثره سرخارگل، کنترل علف‌های هرز از راه وجین دستی در سه مرحله استقرار بوته‌ها، ابتدای گل‌دهی و ۵۰ درصد گل‌دهی در سال اول و دوم انجام شد و از هیچ‌گونه علف‌کش شیمیایی استفاده نشد؛ علاوه بر این، به‌جز کود سرک نیتروژن خالص از منبع اوره به‌مقدار ۲۰ کیلوگرم در هکتار در سال اول و دوم، از هیچ‌گونه کود شیمیایی دیگر در تیمارها استفاده نشد.

برداشت گل‌های سرخارگل در سال دوم در مرحله گل‌دهی کامل با رعایت اثرات حاشیه روی چهار بوته انجام شد. گل‌ها پس از جداسازی، در محیط خشک و سایه و در دمای ۲۵± درجه سلسیوس به‌مدت شش روز هواخشک شدند و سپس وزن آنها با ترازوی دقیق اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری ویژگی‌های فیتوشیمیایی گل‌ها، پنج ترکیب اصلی از مشتقات اسید کافئیک شامل اسید شیکوریک، اسید کافتاریک، اسید کلروژنیک، اکیناکوزید و سینارین به‌همراه محتوای فنل و فلاونوئید کل مورد ارزیابی قرار گرفت. در اندازه‌گیری ویژگی‌های فیتوشیمیایی، متانول، استونیتریل و اسید فسفریک دارای درجه HPLC و استانداردهای مخصوص دارای درجه HPLC هر یک از ترکیبات اسید شیکوریک، اسید کافتاریک، اسید کلروژنیک، اکیناکوزید و سینارین از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich) خریداری شد.

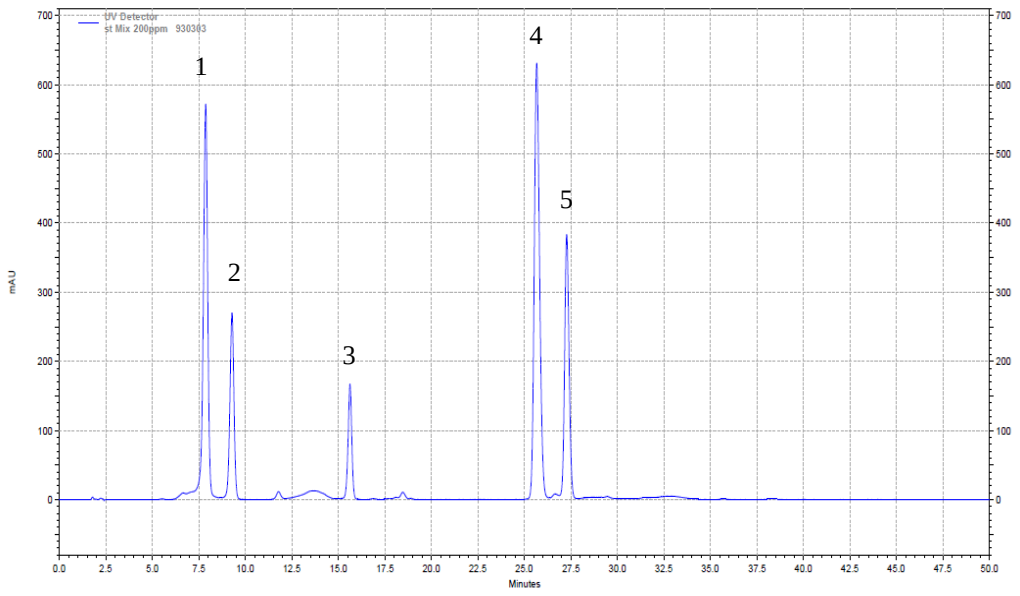
استخراج عصاره فنلی

برای استخراج عصاره فنلی از گل‌ها از روش Thygesen *et al.* (2007) با کمی تغییر استفاده شد. ابتدا نمونه‌های خشک گل‌ها با دستگاه قهوه خردکن (مدل E G 90 W-120205) پودر و از الک ۴۰ مش عبور داده شدند. سپس به ۰/۴گرم از پودر الک‌شده، ۱۰ میلی‌لیتر متانول:آب (۳۰:۷۰) اضافه شد. نمونه‌ها

پس از ورتکس کوتاهی به‌مدت ۲۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک (Ultrasonic Cleaner) با بسامد ۴۰ کیلوهرتز نگهداری شده و سپس به‌مدت دو ساعت شیک شدند. عصاره‌های متانولی به‌دست آمده در دور ۱۰۰۰۰ rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (مدل Sigma 3-30K) و فاز رویی آنها جدا شد. کار سانتریفیوژ دو بار انجام شد. نمونه‌های به‌دست‌آمده تا زمان تجزیه شیمیایی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

ارزیابی مشتقات اسید کافئیک

مقدار مشتقات اسید کافئیک در عصاره‌های فنلی استخراجی از گل‌ها بر اساس روش Hu & Kitts (2000) و با استفاده از دستگاه HPLC (Kanuer, Germany) در آزمایشگاه مرجع کروماتوگرافی در پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان تعیین شد. بدین منظور، در ابتدا با توجه به بالابودن غلظت ترکیبات فنلی در عصاره استخراجی، نمونه‌ها چهار بار با متانول ۷۰ درصد رقیق شدند. سپس یک میلی‌لیتر از عصاره استخراج‌شده گل، پیش از تزریق به دستگاه با استفاده از فیلترهای سرنگی PVDF (۴۵ میکرومتر × ۱۳ میلی‌متر) صاف و درون ظرف مخصوص HPLC ریخته شد. دستگاه HPLC مجهز به پمپ Smart line 1000، شناساگر فرابنفش، اتوسمپلر (Auto sampeler)، ستون RP-C18 (5× 250 mm×4.6 mm µm) بود. فاز متحرک شامل دو حلال (A و B) بود. حلال A شامل استونیتریل/آب حاوی ۰/۱ درصد اسید فسفریک با نسبت ۱۰:۹۰ و حلال B شامل استونیتریل/آب حاوی ۰/۱ درصد اسید فسفریک با نسبت ۲۵:۷۵ بود. طول موج شناساگر فرابنفش در ۳۳۰ نانومتر، تنظیم شد. حجم نمونه تزریق‌شده، ۲۰ میکرولیتر بود که پیش از تزریق نمونه‌ها، ابتدا از استانداردهای HPLC مخصوص هر یک از ترکیبات اسید شیکوریک، اسید کافتاریک، اسید کلروژنیک، اکیناکوزید و سینارین، پنج غلظت مختلف تهیه و به دستگاه HPLC تزریق شد تا زمان اندازه‌گیری، نسبت و شیب جریان حلال‌ها در ستون HPLC، به‌منظور جداسازی بهتر این ترکیب‌ها کالیبره شود. سپس با استفاده از کروماتوگرام‌های به‌دست آمده (شکل ۱)، منحنی استاندارد مربوط به هر ترکیب رسم شد تا با استفاده از منحنی استاندارد مربوطه، غلظت هر ترکیب بر حسب میلی‌گرم بر گرم ماده خشک محاسبه و بیان شود.



شکل ۱. کروماتوگرام HPLC برای ترکیبی از استانداردهای مشتقات اسید کافئیک. پیک ۱: اسید کافتاریک، پیک ۲: اسید کلروژنیک، پیک ۳: اکیناکوزید، پیک ۴: اسید شیکوریک و پیک ۵: سینارین.

Figure 1. HPLC chromatogram for caffeic acid derivatives standards. Peak 1: Caftaric acid, Peak 2: Chlorogenic acid, Peak 3: Echinocosid, Peak 4: Chicoric acid and Peak 5: Cinarin.

ارزیابی فنل کل

ارزیابی فنل کل با روش فولین سیوکالتیو انجام شد (Singleton *et al*., 1999). به‌علت بالابودن غلظت ترکیبات فنلی، ابتدا نمونه‌ها ۱۰ بار رقیق شدند. ۱۲۵ میکرولیتر از عصاره متانولی استخراج شده با ۳۷۵ میکرولیتر آب و ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۱۰ درصد مخلوط شدند. به مخلوط حاصل پس از شش دقیقه، دو میلی‌لیتر کربنات‌سدیم ۷/۵ درصد اضافه شد. میزان جذب مخلوط واکنش، پس از ۹۰ دقیقه نگهداری در شرایط بدون نور در طول موج ۷۶۵ نانومتر به‌وسیله دستگاه طیف‌سنج (Unico, USA) اندازه‌گیری شد. در نهایت مقدار فنل کل از روی منحنی استاندارد برحسب میلی‌گرم اکی‌والان اسید گالیک در یک گرم ماده خشک بیان شد.

ارزیابی فلاونوئید کل

مقدار فلاونوئید کل با روش کالریمتری آلومینیوم‌کلراید اندازه‌گیری شد (Du *et al*., 2009). ابتدا به ۱۵۰ میکرولیتر عصاره استخراج‌شده به‌ترتیب ۱۷۰۰ میکرولیتر اتانول ۳۰ درصد، ۱۵۰ میکرولیتر نیتریت‌سدیم ۰/۵ میلی‌مولار و ۱۵۰ میکرولیتر کلریدآلومینیوم ۰/۳ میلی‌مولار اضافه و بلافاصله به‌هم زده شد. پس از گذشت پنج دقیقه، ۱۰۰ میکرولیتر محلول هیدروکسیدسدیم یک میلی‌مولار اضافه شد. پس از ۱۵-۱۰ دقیقه، مقدار جذب با دستگاه طیف‌سنج در طول موج ۵۰۶ نانومتر ثبت شد. در نهایت محتوای فلاونوئید کل با استفاده از رسم منحنی استاندارد کوئرستین برحسب میلی‌گرم کوئرستین در گرم ماده خشک محاسبه و بیان شد.

برای تجزیه آماری داده‌ها، از نرم‌افزار SAS نسخه ۹ (SAS Institute, 2002) استفاده شد. مقایسه میانگین تیمارها، با آزمون حداقل اختلاف معنادار (LSD) انجام و در سطح احتمال پنج درصد مقایسه شدند. نمودارها، با نرم‌افزار سیگماپلات (SigmaPlot) نسخه ۱۲ رسم شدند.

نتایج

ماده خشک گل

نتایج تجزیه واریانس داده‌های ماده خشک گل نشان داد که برهم‌کنش تاریخ کاشت و الگوهای کشت مخلوط ردیفی بر این ویژگی تأثیر معنی‌داری داشت (جدول ۳). در این آزمایش، کشت مخلوط جایگزینی دو در میان سرخارگل و لوبیا سبز (۲:۲) در همه تاریخ‌های کشت تابستانه موجب افزایش ماده خشک گل سرخارگل شده است در حالی‌که این ویژگی در همه تاریخ‌های کشت با تک‌کشتی سرخارگل‌ها، کاهش نشان داد (شکل ۲). با این وجود، با کشت زودهنگام سرخارگل‌ها در ۱۰ تیر و الگوی ردیفی دو در میان سرخارگل و لوبیا سبز، بیش‌ترین مقدار ماده خشک گل با میانگین ۱۱/۵ گرم بر متر مربع به‌دست آمد (شکل ۲).

جدول ۳. تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای تاریخ کاشت و الگوهای کشت مخلوط ردیفی بر ماده خشک و ویژگی‌های فیتوشیمیایی گل در پایان گل‌دهی سرخارگل

Table 3. ANOVA of effect of planting dates and row intercropping pattern treatments on flower dry matter and phytochemical properties of coneflower flower at full bloom stage

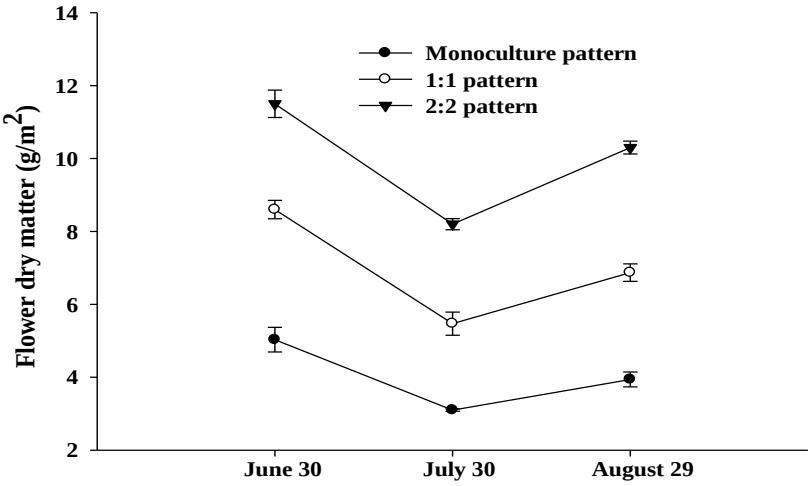
Source of variation	df	Mean squares							
		Dry matter	Cichoric acid	Caftaric acid	Chlorogenic acid	Echinacoside	Cinarin	Total phenol	Total flavonoid
Replication	2	0.734*	5.28^{ns}	0.0008^{ns}	0.018*	0.002^{ns}	nd	28.4*	0.266^{ns}
Planting dates	2	26.4**	286.7**	8.90**	4.38**	1.92**	nd	100.9**	8.47^{ns}
Error a	4	0.189	0.759	0.004	0.015	0.0006	nd	11.4	0.419
Row intercropping patterns	2	104.1**	45.1**	0.109*	1.68**	1.08**	nd	1664.7**	21.5**
Row intercropping patterns × Planting dates	4	0.571**	23.2**	1.93**	0.903**	0.382**	nd	182.1**	1.21^{ns}
Error	12	0.102	1.65	0.026	0.003	0.0007	nd	6.33	0.814
CV (%)	-	5.5	6.6	4.3	4.3	2.7	nd	4.5	8.4

**، * و ns: اختلاف معنی‌دار در سطح یک و پنج درصد و نبود اختلاف معنی‌دار. nd: عدم شناسایی

**,*, ns: Significant at 1% and 5% of probability levels, and non-significant, , respectively nd :Not detected.

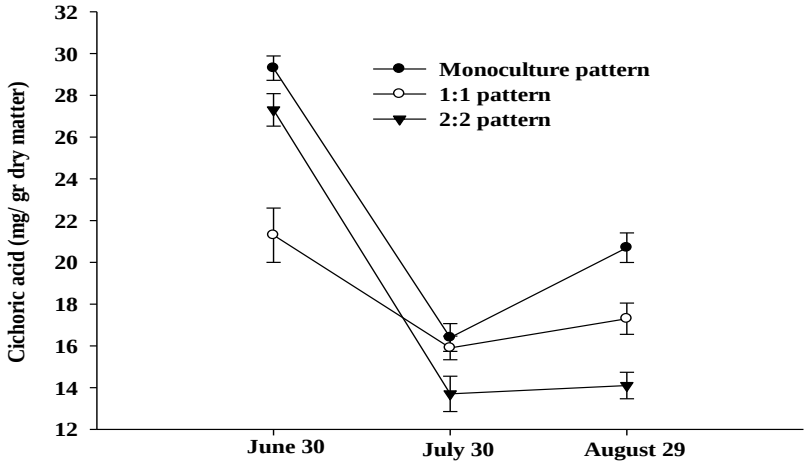
اسید شیکوریک گل

براساس یافته‌های این آزمایش، مقدار اسید شیکوریک گل سرخارگل در سطوح مختلف تیمارها روند معنی‌داری در پایان گل‌دهی نشان داد (جدول ۳، P<۰/۰۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که کشت تأخیری سرخارگل‌ها تا ۹ مرداد ماه در همه الگوهای کشت مخلوط ردیفی سرخارگل و لوبیا سبز، سبب کاهش مقدار اسید شیکوریک گل‌ها می‌شود (شکل۳). با این‌حال، بیشترین مقدار اسید شیکوریک گل‌ها (۲۹/۳ میلی‌گرم در گرم ماده خشک) در کشت زودتر در تیر ماه و در کشت خالص سرخارگل‌ها به‌دست آمد (شکل ۳). تأخیر در کشت تا ۹ مرداد و کشت مخلوط دو در میان (۲:۲) سرخارگل و لوبیا سبز موجب کاهش ۵۳ درصدی مقدار اسید شیکوریک گل‌ها به ۱۳/۷ میلی‌گرم در گرم ماده خشک شد (شکل ۳).



شکل ۲. برهم‌کنش تاریخ کاشت و الگوهای کشت مخلوط بر ماده خشک گل سرخارگل. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE (خطای معیار) است. مقدار LSD (P<۰/۰۵) برای برهم‌کنش تاریخ کاشت × الگوهای کشت مخلوط: ۰/۶۰۹

Figure 2. Interaction of planting date and mixed cropping patterns on coneflower dried matter. Values are mean of three replicates ± SE. LSD value (P<0.05) for interaction of planting date × mixed cropping patterns: 0.609



شکل ۳. برهم‌کنش تاریخ کاشت و الگوهای کشت مخلوط بر اسید شیکوریک گل سرخارگل. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE (خطای معیار) است. مقدار LSD (P<۰/۰۵) برای برهم‌کنش تاریخ کاشت × الگوهای کشت مخلوط: ۲/۰۷.

Figure 3. Interaction of planting date and mixed cropping patterns on coneflower cichoric acid. Values are mean of three replicates ± SE. LSD value (P<0.05) for interaction of planting date × mixed cropping patterns: 2.07

اسید کافتاریک گل

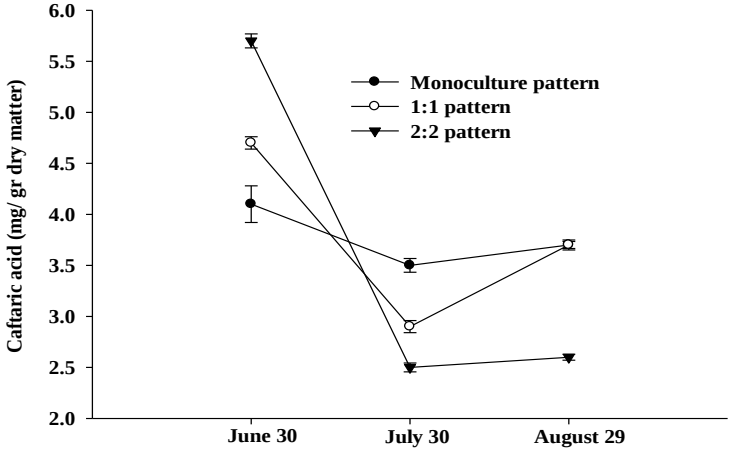
بر پایه نتایج به‌دست‌آمده از جدول تجزیه واریانس، برهم‌کنش تاریخ کاشت و الگوهای کشت مخلوط ردیفی بر مقدار اسید کافتاریک گل در پایان گل‌دهی سرخارگل معنی‌دار بود (جدول ۳؛ P<۰/۰۱). نتایج آزمایش نشان داد که کشت مخلوط جایگزینی با نسبت ۵۰:۵۰ با الگوی کشت ردیفی ۲:۲ سرخارگل و لوبیا سبز تنها در کشت زودهنگام سرخارگل‌ها در تیر ماه توانست موجب افزایش مقدار اسید کافتاریک گل‌ها شود در حالی‌که، مقدار این ترکیب در دیگر تاریخ‌های کشت به کمترین مقدار کاهش یافت (شکل ۴). به این ترتیب، در اولین تاریخ کشت تابستانه سرخارگل (۱۰ تیر) و در الگوی دو در میان سرخارگل و لوبیا سبز، بیشترین مقدار اسید کافتاریک گل‌ها با میانگین ۵/۷ میلی‌گرم در گرم ماده خشک به‌دست آمد که ۵۶ درصد نسبت به گیاهان کشت‌شده در دومین تاریخ کاشت تابستانه (۹ مرداد) و در الگوی کشت مشابه کاهش نشان داد (شکل ۴).

اسید کلروژنیک گل

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که برهم‌کنش تاریخ کاشت و الگوهای کشت مخلوط ردیفی بر مقدار اسید کلروژنیک گل سرخارگل تأثیر معنی‌دار داشته است (جدول ۳). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تأخیر در کشت سرخارگل‌ها تا ۹ مرداد ماه توانست در همه الگوهای کشت مخلوط ردیفی و تک‌کشتی سرخارگل سبب کاهش مقدار اسید کلروژنیک به‌مانند اسید شیکوریک و اسید کافتاریک گل‌ها شود (شکل ۵). مقدار اسید کلروژنیک گل‌ها در الگوی تک‌کشتی سرخارگل و کشت دو ردیفه سرخارگل و لوبیا سبز (۲:۲) تقریباً مشابه و در بیشترین مقدار (۲/۴۵ میلی‌گرم در گرم ماده خشک) بوده است (شکل ۵). با این‌حال، الگوی کشت دو ردیفه سرخارگل و لوبیا سبز (۲:۲) توانست در میانه‌های تابستان (۹ مرداد)، موجب کمترین مقدار اسید کلروژنیک در گل‌ها به ۰/۱۷ میلی‌گرم در گرم ماده خشک شود (شکل ۵).

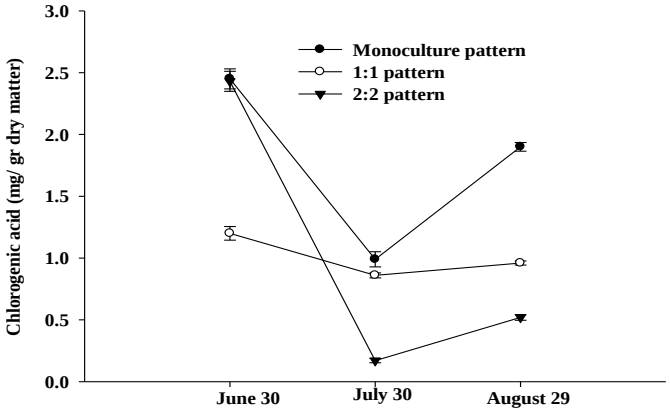
اکیناکوزید گل

تأثیر برهم‌کنش تاریخ و الگوهای کشت مخلوط ردیفی بر مقدار اکیناکوزید گل سرخارگل بسیار معنی‌دار بود (جدول ۳). در این آزمایش در بررسی برهم‌کنش الگوهای کشت مخلوط ردیفی با تاریخ‌های کشت تابستانه، کشت مخلوط گیاهان با الگوی ردیفی ۲:۲ (دو در میان سرخارگل و لوبیا سبز)، موجب کاهش مقدار اکیناکوزید گل در همه تاریخ‌های کشت شد (شکل ۶). بیشترین مقدار اکیناکوزید گل با میانگین ۲/۳ میلی‌گرم در گرم ماده خشک در تک‌کشتی سرخارگل‌ها و در کشت زودهنگام آن‌ها در تابستان (۱۰ تیر) به‌دست آمد (شکل ۶).



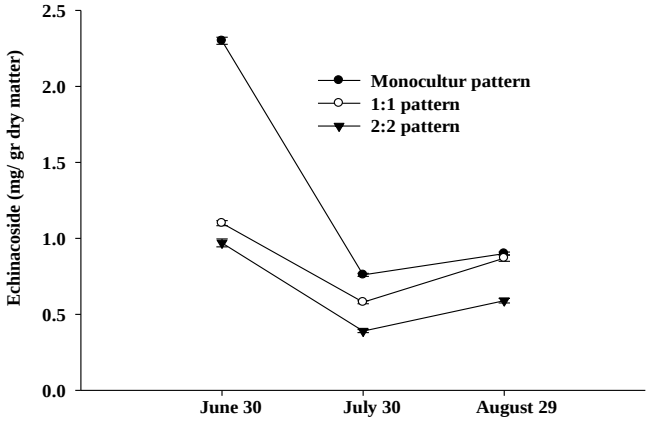
شکل ۴. برهم‌کنش تاریخ کاشت و الگوهای کشت مخلوط بر اسید کافتاریک گل سرخارگل. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE (خطای معیار) است. مقدار LSD (P<۰/۰۵) برای برهم‌کنش تاریخ کاشت × الگوهای کشت مخلوط: ۰/۲۴۷.

Figure 4. Interaction of planting date and mixed cropping patterns on coneflower caftaric acid. Values are mean of three replicates ± SE. LSD value (P<0.05) for interaction of planting date × mixed cropping patterns: 0.247



شکل ۵. برهم‌کنش تاریخ کاشت و الگوهای کشت مخلوط بر اسید کلروژنیک گل سرخارگل. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE (خطای معیار) است. مقدار LSD (*P*<۰/۰۵) برای برهم‌کنش تاریخ کاشت × الگوهای کشت مخلوط: ۰/۱۳۶.

Figure 5. Interaction of planting date and mixed cropping patterns on coneflower chlorogenic acid. Values are mean of three replicates ± SE. LSD value (*P*<0.05) for interaction of planting date × mixed cropping patterns: 0.136



شکل ۶. برهم‌کنش تاریخ کاشت و الگوهای کشت مخلوط بر اکیناکوزید گل سرخارگل. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE (خطای معیار) است. مقدار LSD (*P*<۰/۰۵) برای برهم‌کنش تاریخ کاشت × الگوهای کشت مخلوط: ۰/۰۴۴.

Figure 6. Interaction of planting date and mixed cropping patterns on echinacoside of coneflower flower. Values are mean of three replicates ± SE. LSD value (*P*<0.05) for interaction of planting date × mixed cropping patterns: 0.044

سینارین گل

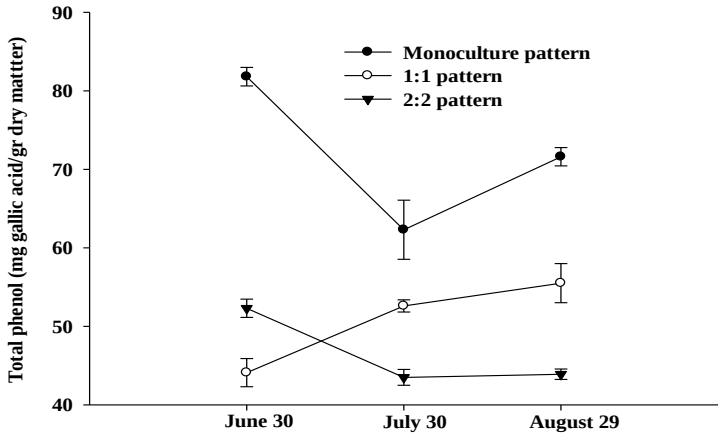
سینارین در گل سرخارگل‌ها در واکنش به تاریخ کشت و الگوهای کشت مخلوط ردیفی شناسایی نشد (جدول ۳).

فنل کل گل

تجزیه واریانس داده‌های فنل کل گل (جدول ۳) نشان داد که این ویژگی تحت تأثیر معنی‌دار برهم‌کنش تاریخ کاشت و الگوهای کشت مخلوط ردیفی قرار گرفته است. مقایسه میانگین‌های فنل کل گل‌ها نشان داد که تک‌کشتی سرخارگل‌ها سبب افزایش محتوای فنل کل گل‌ها در همه تاریخ‌های کشت می‌شود (شکل ۷). با این‌حال، بیشترین محتوای فنل کل گل‌ها (۸۱/۸ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم ماده خشک) در سرخارگل‌های کشت‌شده در تیر ماه با الگوی کشت خالص به‌دست آمد که نشان می‌دهد احتمالاً این الگوی کشت از لحاظ تجمع محتوای فنلی و اسیدهای فنلی، الگویی مناسب نسبت به چندکشتی سرخارگل است (شکل ۷). کشت مخلوط گیاهان با الگوی ردیفی ۲:۲ (دو در میان) در کشت دیرهنگام تا ۹ مرداد و هشت شهریور توانست موجب کاهش محتوای فنل کل گل‌ها به‌ترتیب به ۴۳/۵ و ۴۳/۹ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم ماده خشک شود (شکل ۷).

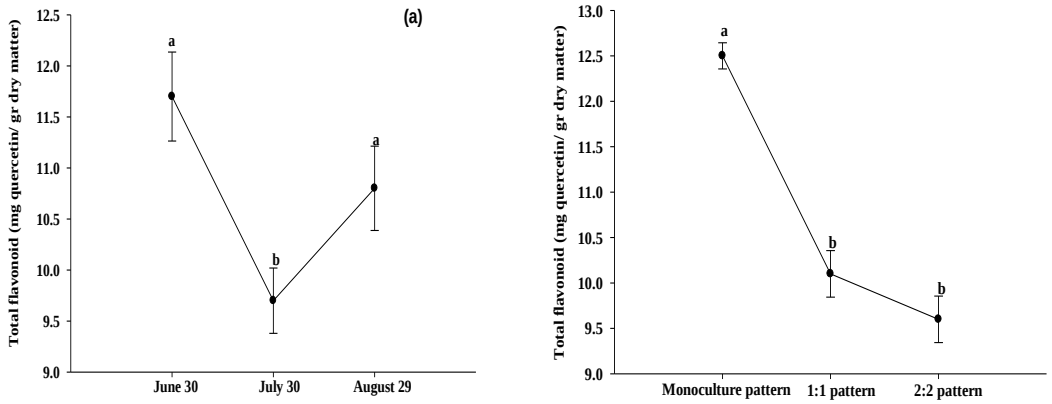
فلاونوئید کل گل

بر پایه نتایج به‌دست‌آمده از جدول تجزیه واریانس، فلاونوئید کل گل سرخارگل تحت تأثیر تاریخ کاشت و الگوهای کشت مخلوط ردیفی قرار گرفت؛ ولی برهم‌کنش آن‌ها معنی‌دار نبود (جدول ۳). بیشترین مقدار فلاونوئید کل گل (۱۱/۷ میلی‌گرم کوئرستین در گرم ماده خشک) مربوط به گیاهان تاریخ کاشت ۱۰ تیر بود (شکل ۸). همچنین، کشت خالص سرخارگل‌ها موجب افزایش محتوای فلاونوئید کل گل‌ها به ۱۲/۵ میلی‌گرم کوئرستین در گرم ماده خشک با ۲۳/۲ درصد افزایش نسبت به الگوی کشت دو ردیفه سرخارگل و لوبیا سبز (۲:۲) و ۱۹/۲ درصد افزایش نسبت به الگوی کشت یک ردیفه گیاهان (۱:۱) شد که این دو الگوی کشت اختلاف معنی‌داری از نظر آماری نشان ندادند (شکل ۸).



شکل ۷. برهم‌کنش تاریخ کاشت و الگوهای کشت مخلوط بر فنل کل گل سرخارگل. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE (خطای معیار) است. مقدار LSD (P<۰/۰۵) برای برهم‌کنش تاریخ کاشت × الگوهای کشت مخلوط: ۴/۷۷.

Figure 7. Interaction of planting date and mixed cropping patterns on total phenol of coneflower flower. Values are mean of three replicates ± SE. LSD value (P<0.05) for interaction of planting date × mixed cropping patterns: 4.77



شکل ۸. اثر ساده تاریخ کاشت (a) و الگوهای کشت مخلوط ردیفی (b) بر فلاونوئید کل گل سرخارگل. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE (خطای معیار) است. حروف متفاوت بیان‌گر اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD است.

Figure 8. Simple effect of planting date (a) and row intercropping patterns (b) on total flavonoid of coneflower flower. Values are mean of three replicates ± SE. The different letters are significantly different based on LSD test.

بحث

یکی از اهداف مهم مدیریت زراعی گیاهان دارویی، افزایش تولید ماده خشک در واحد سطح به‌همراه میزان ماده مؤثره بیشتر است. با توجه به نتایج آزمایش، افزایش ماده خشک گل در سرخارگل‌های دوساله در تیر ماه (شکل ۲) می‌تواند احتمالاً به‌علت

افزایش طول دوره رشد رویشی گیاه و ایجاد فرصت بیشتر برای استفاده از منابع رشد و نیز، کاهش حدود ۲۸ درصدی دما در تیر ماه نسبت به مرداد ماه در سال اول رشد (سال زراعی ۹۱-۱۳۹۰، جدول ۲) باشد که احتمالاً توانسته به استقرار بیشتر و مطمئن‌تر نشاها به‌علت خنک‌تر شدن بستر رشد گیاه کمک کند. در شرایط این آزمایش، به‌نظر می‌رسد افزایش ماده خشک گل‌ها در تک‌بوته سرخارگل‌های دوساله در الگوی دو ردیف لوبیا + دو ردیف سرخارگل (۲:۲) (شکل ۲) به‌علت رقابت بین‌گونه‌ای کمتر گیاهان در مقایسه با رقابت درون‌گونه‌ای باشد که سبب شده تا گیاهان همراه در این الگوی کشت برای آشیان‌های بوم‌شناختی یکسانی رقابت نکرده و منجر به افزایش ماده خشک تک‌بوته سرخارگل شده است. در مورد کشت مخلوط گیاه دارویی سرخارگل با دیگر گیاهان زراعی و دارویی، گزارش مدونی جز مطالعه Knee & Thomas (2002) در دسترس نیست. در این مطالعه، Knee & Thomas (2002) به بررسی جذب و رقابت نور در کشت مخلوط جایگزینی گیاهان *Panicum virgatum* و *Ratibida pinnata* با سرخارگل در دو محیط گلخانه و مزرعه پرداختند. آنها در شرایط مزرعه، کاهش عملکرد نسبی سرخارگل را در حضور این دو گونه گزارش کردند و به افزایش عملکرد نسبی این گیاهان در حضور سرخارگل تأکید کردند. در نتایج مطالعه آنها، سرخارگل رقابت‌کننده ضعیف‌تری نسبت به دو گونه علفی معرفی شد و علت آن، تفاوت‌های مربوط به جذب نور و در نتیجه فتوسنتز در گونه‌ها بیان شد. در دیگر گیاهان دارویی هم، Koocheki *et al.* (2012) به افزایش عملکرد اقتصادی گاوزبان اروپایی (*Borago officinalis* L.) در الگوی دو در میان (۲:۲) لوبیا و گاوزبان اشاره کردند. افزایش تجمع ماده خشک در کشت مخلوط نسبت به تک‌کشتی در کشت مخلوط کنجد و نخود (Pouramir *et al.*, 2010)، زنیان و شنبلیله (Mirhashemi *et al.*, 2009) و مخلوط سویا، ریحان رویشی و گاوزبان اروپایی (Bagheri *et al.*, 2012) نیز، گزارش شده است.

مشتقات اسید کافئیک جزو گروه اصلی ترکیبات فنلی در جنس *Echinacea* هستند که تصور می‌شود مسئول ویژگی‌های محرک سیستم ایمنی باشند (Barnes *et al.*, 2005). در پژوهش حاضر، بیشینه مقدار همه فنل‌های کافئول اندازه‌گیری‌شده در گل سرخارگل‌های دوساله (اسید شیکوریک، اسید کافتاریک، اسید کلروژنیک و اکیناکوزید)، مربوط به گیاهان اولین تاریخ کشت تابستانه (۱۰ تیر) در سال اول آزمایش بود؛ در حالی‌که مقدار هر چهار ترکیب در تاریخ کشت تأخیری ۹ مرداد، به کمترین مقدار رسید (شکل‌های ۳ تا ۶). افزایش این ترکیبات در تیر ماه می‌تواند احتمالاً به‌علت افزایش طول دوره رشد رویشی گیاه و امکان استفاده بیشتر از منابع رشد و نیز برخورداری نشاهای استقرار یافته از دما و نور بالا (شرایط تنش) در روزهای بلند تابستان نسبت به گیاهان کشت‌شده در مرداد ماه باشد. اسید شیکوریک به‌عنوان مهمترین ترکیب فنلی سرخارگل یک اسید هیدروسینامیک از رده فنیل پروپانوئید است (Sabet *et al.*, 2017). معمولاً، بیوسنتز ترکیبات فنلی در اندام‌های مختلف گیاهان دارویی متأثر از تغییر در فعالیت برخی از آنزیم‌های مؤثر در سنتز این ترکیبات مانند آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) و یا نقش پیش‌ماده آن باشد (Kishore *et al.*, 2010). فعالیت آنزیم‌های مؤثر در بیوسنتز ترکیبات فنلی همانند PAL تحت تأثیر دما قرار می‌گیرند (Sabet *et al.*, 2017). گزارش شده است که فعالیت آنزیم PAL در گیاه شیکوره (*Cichorium intybus* L.) تحت دمای ۲۰/۱۵ درجه سلسیوس (روز به شب) نسبت به دمای ۳۰/۲۵ درجه سلسیوس (روز به شب) بیشتر بود که منجر به تولید بیشتر ترکیبات فنلی در این گیاه شد (Boo *et al.*, 2006). در مطالعه Wu *et al.* (2007) در بررسی تجمع ترکیبات فنلی در دماهای ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سلسیوس در گیاه سرخارگل، افزایش تجمع زیست‌توده و همچنین فنل و فلاونوئید کل تحت دمای ۲۰ درجه سلسیوس گزارش شد. پژوهشگران استدلال دارند که تحت دمای پایین، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (سیتوکینین و جیبرلین) می‌توانند نقش مهمی در بیوسنتز ترکیبات فنلی و فعالیت این آنزیم داشته باشند (Min *et al.*, 2009; Boo *et al.*, 2006). اغلب ترکیبات فنلی به‌ویژه

اسید شیکوریک به‌عنوان ترکیب غالب فنل‌های کافئول، در تک‌کشتی سرخارگل‌ها بیشتر شدند و کمترین مقدار را در الگوی کشت دو ردیفه نشان دادند (شکل‌های ۳، ۵ و ۶). کاهش این ترکیبات در الگوی ۲:۲ سرخارگل و لوبیا سبز احتمالاً می‌تواند به علت شرایط رقابتی بیش‌تر گیاهان برای دسترسی به منابع رشد و محدودیت منابع نسبت به تک‌کشتی سرخارگل‌ها باشد. سرخارگل گیاهی روزخنثی است ولی رژیم‌های مختلف نوری بر غلظت مواد مؤثره‌ی آن تأثیرگذار است (Wu *et al*., 2007). PAL، آنزیمی مهم در مسیر بیوسنتز ترکیبات فنلی است و فعالیت آن تحت تأثیر شرایط محیطی از جمله شدت نور قرار می‌گیرد (Duke & Naylor, 1974). Duke & Naylor (1974) گزارش کردند که فعالیت آنزیم PAL در برگ گیاه ذرت با افزایش نور، بیشتر شده است. در پژوهش حاضر نیز به‌نظر می‌رسد افزایش ترکیبات فنلی در تک‌کشتی سرخارگل ناشی از دریافت نور در مقایسه با کشت مخلوط باشد.

در میان فنل‌های کافئول، اسید شیکوریک به‌عنوان ترکیب غالب و نشان‌گر از مشتقات اسید کافئیک است که به‌طور معمول غلظت بیشتری نسبت به دیگر فنل‌های کافئول در سرخارگل دارد (Thygesen *et al*., 2007). در پژوهش‌ها، مقدار اسید شیکوریک در گل‌های سرخارگل عمدتاً متفاوت بود: مقدار اندازه‌گیری‌شده این اسید فنلی در گل سرخارگل‌های رشدیافته در اسلونی (Kreft, 2005): ۱۱ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک، در آلمان (Becker & Hsieh, 1985): ۱۳ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک و در استرالیا (Wills & Stuart, 1999): ۳۰ تا ۳۸ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک اندازه‌گیری شد. در تایوان، مقدار اسید کلروژنیک با ۵/۹۲ میلی‌گرم در گرم ماده خشک، سینارین با ۰/۳۰ میلی‌گرم در گرم ماده خشک و اکیناکوزید با ۱/۱۰ میلی‌گرم در گرم ماده خشک با نسبت کمتر در مقایسه با اسید شیکوریک (۹۴/۹ میلی‌گرم در گرم ماده خشک) و اسید کافتاریک (۲۳/۹ میلی‌گرم در گرم ماده خشک) در گل سرخارگل در مطالعه Chen *et al*. (2008) به‌دست آمد. مطالعه Chen *et al*. (2008) برخلاف مطالعه Thomsen *et al*. (2012) با اسید شیکوریک بسیار پایین، از معدود مطالعاتی بود که غلظت اسید شیکوریک در آن بسیار بالا بود. Lin *et al*. (2011) هم در تایوان در نتایجی مشابه، به مقدار کمتر اسید کلروژنیک و اکیناکوزید نسبت به اسید شیکوریک و کافتاریک در گل سرخارگل‌ها اشاره کردند. در مطالعه حاضر نیز، مقدار اسید کافتاریک، اسید کلروژنیک و اکیناکوزید به‌ترتیب با ۵/۷، ۲/۴ و ۲/۳ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک در نسبت کمتری از اسید شیکوریک با میانگین ۲۹/۳ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک به‌دست آمد (شکل‌های ۳ تا ۶). مسیر بیوسنتزی اسید شیکوریک هنوز به‌خوبی شناخته شده نیست، اگرچه به‌طور کلی این طور استنباط می‌شود که این ترکیب از مسیر اسید شیکیمیک/ فنیل پروپانوئید بیوسنتز می‌شود. در این مسیر، ابتدا اسید کافئیک از پیش‌ساز فنیل‌آلانین توسط آنزیم PAL بیوسنتز می‌شود و در ادامه مسیر، سه ترکیب اسید شیکوریک، اسید کافتاریک و اسید کلروژنیک از اسید کافئیک مشتق می‌شوند (Miller, 2004; Mobin *et al*., 2015). احتمالاً فعالیت آنزیم بیوسنتزکننده اسید شیکوریک در این مسیر نسبت به دیگر آنزیم‌های بیوسنتزکننده سایر مشتقات بیشتر است که موجب تجمع بیشتر این ترکیب شده است. بیشترین مقدار اسید کافتاریک گل، در سرخارگل‌های رشدیافته در کانادا در مطالعه Binns *et al*. (2002) گزارش شد. اسید کلروژنیک هم که از مشتقات اسید کوئینیک است در گل‌های همه گونه‌های جنس *Echinacea* در مطالعه Binns *et al*. (2002) وجود داشت ولی اکیناکوزید در هیچ‌یک از گونه‌ها و مراحل رشد شناسایی نشد. اکیناکوزید از جمله ترکیبات فنلی است که به‌همراه آلکامیدها در ریشه بیشتر از سایر اندام‌های سرخارگل یافت می‌شود (Miller, 2004). در برخی مطالعات (Binns *et al*., 2002; Bauer, 2000; Thomsen *et al*., 2012) اکیناکوزید در گونه *E. purpurea* شناسایی نشده است.

سینارین هم که به‌همراه اسید کلروژنیک جزو اسید کوئینیک‌ها به‌شمار می‌رود به لحاظ اهمیت و فراوانی به‌ترتیب پس از اسید شیکوریک، اسید

کافتاریک، اسید کلروژنیک و اکیناکوزید قراردارد (Thomsen *et al*., 2012). نتیجه آزمایش حاضر به‌مانند نتیجه Lin *et al*. (2011) در تایوان و Thomsen *et al*. (2012) در شمال اروپا بود؛ به‌طوری که سینارین در گل‌های *E. purpurea* شناسایی نشد (جدول ۳). از آنجایی‌که گیاهان این گونه از جنس *Echinacea*، از لحاظ ژنتیکی مشابه هستند و منشأ یکسانی دارند به‌نظر می‌رسد که عدم وجود سینارین در این گونه، احتمالاً ناشی از عدم وجود آنزیم بیوسنتزکننده این ترکیب در مسیر سنتز ترکیبات فنلی باشد. در چند پژوهش دیگر (Binns *et al*., 2002; Perry *et al*., 2001; Pietta *et al*., 1998; Sabra *et al*., 2012) هم، وجود پنج ترکیب از مشتقات اسید کافئیک سرخارگل در آلمان، نیوزیلند، دانمارک و کانادا بررسی شد. نتایج این پژوهش‌ها با تأکید بر تفاوت این ترکیبات در مناطق مختلف، گونه *E. purpurea* را با مقدار بیشتر اسید شیکوریک و نبود اکیناکوزید و سینارین معرفی کردند و تأکید داشتند که دو ترکیب اکیناکوزید و سینارین می‌تواند در جمعیت‌های رشدی، اقلیم و شرایط محیطی متفاوت یافت شود. با این‌حال، تنها در چند پژوهش به وجود اندک سینارین در اندام‌های هوایی سرخارگل اشاره شده است. در مطالعه Binns *et al*. (2002) در کانادا، سینارین به‌همراه اسید شیکوریک و در مطالعه Chen *et al*. (2008) در تایوان، سینارین و اکیناکوزید در گل‌های سرخارگل بسیار پایین گزارش شد.

محتوای فنلی استخراج‌شده از اندام‌های هوایی سرخارگل از آنتی‌اکسیدان‌های کارآمد، برای درمان بیماری‌های مختلف گزارش شده است (Thygesen *et al*., 2007). در این آزمایش، افزایش مقدار فنل کل گل‌ها در کشت خالص سرخارگل‌ها و تاریخ کشت زودهنگام تابستانه (۱۰ تیرماه) قابل انتظار بود (شکل ۷)؛ چون بیشترین مقدار اغلب فنل‌های کافئول اندازه‌گیری‌شده به‌ویژه اسید شیکوریک نیز (شکل‌های ۳، ۵ و ۶)، در این تیمارها به‌دست آمد. در این آزمایش، اسید شیکوریک گل‌ها با مقادیر بسیار بیش‌تر از دیگر فنل‌های کافئول (۲۹/۳ میلی‌گرم در گرم ماده خشک) (شکل ۷)، ۳۵/۸ درصد از مقدار فنل کل گل‌ها را شامل می‌شود. احتمالاً ترکیبات فنلی دیگری به‌جز فنل‌های کافئول در انباشت فنل کل گل‌های سرخارگل در سال دوم رشد مؤثر باشند. در بیشتر پژوهش‌ها، محتوای فنل کل در گل‌های سرخارگل اغلب بیشتر از شاخساره و ریشه‌ها گزارش شده است که نتیجه این آزمایش موافق با نتایج این پژوهش‌ها بود (Lin *et al*., 2011; Wills & Stuart, 1999; Thygesen *et al*., 2007). با این‌حال، عوامل محیطی که ممکن است بر تجمع فنل‌ها در سرخارگل تأثیرگذار باشد، هنوز شناخته نشده است (Chen *et al*., 2008).

فلاونوئیدهای گیاهی درواقع، متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که مقدار انها در اندام‌های مختلف سرخارگل نسبتاً پایین گزارش شده است (Pellati *et al*., 2004). در این آزمایش، افزایش مقدار فلاونوئیدها همانند مشتقات اسید کافئیک و فنل کل در کشت زودهنگام سرخارگل‌ها در تیر ماه و کشت خالص سرخارگل‌ها به‌دست آمد (شکل ۸-A, B) که این افزایش احتمالاً به‌علت افزایش طول دوره رشد رویشی گیاه و ایجاد فرصت بیشتر در استفاده از منابع رشد و استفاده از دما و نور بیشتر (شرایط تنش) در روزهای بلند تابستان نسبت به کشت در مرداد ماه باشد. کاهش فلاونوئیدها در الگوی ۲:۲ سرخارگل و لوبیا سبز نیز (شکل ۸-B)، احتمالاً می‌تواند به‌علت رقابت بیشتر گیاهان برای دسترسی به منابع رشد و محدودیت منابع رشد نسبت به تک‌کشتی سرخارگل‌ها باشد.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که در میان تاریخ کشت‌های تابستانه در کشت مخلوط جایگزینی سرخارگل با لوبیا سبز، کشت زودهنگام سرخارگل‌ها در تابستان (۱۰ تیر) موجب افزایش ماده خشک، مشتقات اسید کافئیک و محتوای فنل و فلاونوئید کل در گل سرخارگل‌های دوساله در مرحله گل‌دهی کامل شد. در میان الگوهای کشت نیز، کشت دو در میان سرخارگل و لوبیا سبز، موجب افزایش ماده خشک گل در گل‌دهی کامل سرخارگل‌های دوساله

شد؛ ولی، بیشترین مقدار ویژگی‌های فیتوشیمیایی اندازه‌گیری‌شده در سرخارگل‌هایی به‌دست آمد که به‌صورت تک‌کشتی کشت شدند. در نتیجه، کشت مخلوط در افزایش تولید ماده خشک اندام‌های گیاه نسبت به ویژگی‌های فیتوشیمایی، موفق‌تر بود. از آنجایی که کاهش کاربرد نهاده‌های شیمیایی در تولید گیاهان دارویی از اهمیت بالایی برخوردار است؛ در آزمایش حاضر، با وجود کاهش ترکیبات فنلی در کشت مخلوط، به‌نظر می‌رسد افزایش ماده خشک گیاه می‌تواند کاهش ترکیبات فنلی را جبران نماید؛ با این حال پیشنهاد می‌شود سایر گیاهان همراه در کشت و تولید این گیاه مورد بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری

از حمایت و مساعدت مالی پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، جهت اجرای این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Ali Ehyaei, M. & Behbehani Zade, A. A. (1993). Methods of soil chemical analysis. Soil and Water *Research Institute of Agricultural Extension and Education*, 1, 128 pages. (in Farsi)
2. Bagheri, M., Zaefarian, F., Akbarpour, V. & Asadi, G. A. (2012). Assessment of growth indices of soybean, vegetative sweet basil and borage in intercropping different ratios. *Journal of Plant Production*, 19(3), 1-26. (in Farsi)
3. Barnes, J., Anderson, L. A., Gibbons, S. & Phillipson, J. D. (2005). *Echinacea* species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 57, 929-954.
4. Bauer, R. (2000). Chemistry, pharmacology and clinical application of *Echinacea* products. In: G. Mazza and B.D. Oomah (eds.), Herbs, Botanicals and Teas. Technomic publishing Company, Inc.: Lancaster, Pennsylvania, USA, pp. 45-73.
5. Becker, H. & Hsieh, W. C. (1985). Chicoree-saure und deren derivate aus *Echinacea* arten. *Zeitschrift für Naturforschung*, 40, 585-587.
6. Bergeron, C., Gafner, S., Batcha, L. L. & Angerhofer, C. K. (2002). Stabilization of caffeic acid derivatives in *Echinacea purpurea*. L. glycirin extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3967-3970.
7. Binns, S.E., Hudson, J., Merali, S. & Arnason, J. T. (2002). Antiviral activity of characterized extracts from *Echinacea* spp. (Heliantheae: Asteraceae) against herpes simplex virus (HSV-I). *Planta Medica*, 68, 780-783.
8. Boo, H. O., Chon, S. U. & Lee, S. Y. (2006). Effects of temperature and plant growth regulators on anthocyanin synthesis and phenylalanine ammonia-lyase activity in chicory (*Cichorium intybus* L.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 81(3), 478-482.
9. Cech, N. B., Eleazer, M. S., Shoffner, L. T., Crosswhite, M. R., Davis, A. C. & Mortenson, A. M. (2006). High performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for simultaneous analysis of alkamides and caffeic acid derivatives from *Echinacea purpurea* extracts. *Journal of Chromatography A*, 7, 1085-1097.
10. Chen, C. L., Zhang, S. C. & Sung, J. M. (2008). Biomass and caffeol phenols production of *Echinacea purpurea* grown in Taiwan. *Journal of Experimental Agriculture*, 44, 497-507.
11. Du, G., Li, M., Ma, F. & Liang, D. (2009). Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and vitamin C in actinidia fruits. *Food Chemistry*, 113, 557-562.
12. Duke, S. O. & Naylor, A. W. (1974). Effect of light on phenylalanine ammonia-lyase activity in darke-grown *Zea mays* (L.) seedlings. *Plant Science Letters*, 2, 289-293.
13. Glowniak, K., Zgórka, G. & Kozyra, M. (1996). Solid-phase extraction and reverse-phase high-performance liquid chromatography of free phenolic acids in some *Echinacea* species. *Journal of Chromatography A*, 730, 25-29.
14. Gray, D. E., Pallardy, S. G., Garrett, H. E. & Rottinghaus, G. E. (2002). Acute drought stress and plant age effects on alkamides and phenolic acid content in purple coneflower roots. *Planta Medica*, 69, 50-55.
15. Hikosaka, K. & Hirose, T. (1997). Leaf angle as a strategy for light competition: optimal and evolutionarily stable light extinction coefficient within a canopy. *Ecoscience*, 4, 501-507.
16. Hitchcock, C. L. & Cronquist, A. (1973). Flora of the Pacific Northwest, University of Washington Press, Seattle.

17. Hu, C. & Kitts, D. D. (2000). Studies on the antioxidant of *Echinacea* root extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1466-1472.
18. Kishore, G., Ranjan, S., Pandey, A. & Gupta, S. (2010). Influence of altitudinal variation on the antioxidant potential of tartar buckwheat of western Himalaya. *Food Science and Biotechnology*, 19, 1355-1363.
19. Klindt Andersen, M., Hauggaard-Nielsen, H., Weiner, J. & Steen Jensen, E. (2007). Competitive dynamics in two- and three-component intercrops. *Journal of Applied Ecology*, 44, 545-551.
20. Knee, M. & Thomas, L. C. (2002). Light utilization and competition between *Echinacea purpurea*, *Panicum virgatum* and *Ratibida pinnata* under greenhouse and field conditions. *Ecological Research*, 17, 591-599.
21. Kong, L., Yuan, D., Chen, Y., Yin, J., Makino, T., Uno, T., Zhang, S. & Kano, Y. (2006). Quality evaluation of *Echinacea* species cultivated in China. *Asian Journal of Traditional Medicines*, 1, 25-30.
22. Koocheki, A., Shabahang, J., Khorramdel, S. & Amin Ghafouri, A. (2012). Row intercropping of borage (*Borago officinalis* L.) with bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on possible evaluating of the best strip width and assessing of its ecological characteristics. *Agroecology*, 4, 1-11. (in Farsi)
23. Kreft, S. (2005) Cichoric acid content and biomass production of *Echinacea purpurea* plants cultivated in Slovenia. *Pharmaceutical Biology*, 43, 662-665.
24. Lin, S. D., Sung, J. M. & Chen, C. L. (2011). Effect of drying and storage conditions on caffeic acid derivatives and total phenolics of *Echinacea Purpurea* grown in Taiwan. *Food Chemistry*, 125, 226-231.
25. Lopez–Bellido, F. J., Lopez-Bellido, R. J., Khalil, S. K. & Lopez-Bellido, L. (2008). Effect of planting date on winter Kabuli Chickpea growth and yield under rainfed mediterranean conditions. *Agronomy Journal*, 100, 957-964
26. Luo, X. B., Chen, B., Yao, S. Z. & Zeng, J. G. (2003). Simultaneous analysis of caffeic acid derivatives and alkamides in roots and extracts of *Echinacea purpurea* by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 986, 73-81.
27. Miller, C. S. (2004). The genus *Echinacea*. Medicinal and Aromatic Plants. Industrial Profiles. CRC Press. pp. 270.
28. Min, H. M., Trick, H. N. & Rajasheka, E. B. (2009). Secondary metabolism and antioxidant are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. *Journal of Plant Physiology*, 166, 180-191.
29. Mirhashemi, S. M., Koocheki, A., Parsa, M. & Nassiri Mahallati, M. (2009). Evaluation of growth indices of Ajowan and Fenugreek in pure culture and intercropping based on organic agriculture. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 7, 685-694. (in Farsi)
30. Mobin, M., Wu, C. H., Tewari, R. K. & Paek, K. Y. (2015). Studies on the glyphosate-induced amino acid starvation and addition of precursors on caffeic acid accumulation and profiles in adventitious roots of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 120, 291-301.
31. Mohsen-Abadi, GH. R. & Jahansooz, M. R. (2013). Evaluation of yield and radiation use efficiency in intercropping of barley and vetch in different nitrogen levels. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 44, 419-427. (in Farsi)
32. Nachigera, G. M., Ledent, J. F. & Draye, X. (2008). Shoot and root competition in potato/maize intercropping: effects on growth and yield. *Environmental and Experimental Botany*, 64, 180-188.
33. Paz, J.O., Woli, P., Garcia, A. & Hoogenboom, G. (2012). Cotton yields as influenced by ENSO at different planting dates and spatial aggregation levels. *Agricultural Sysytems*, 111, 45-52.
34. Pellati, F., Benvenuti, S., Magro, L., Melegari, M. & Soragni, F. (2004). Analysis of phenolic compounds and radical scavengin activity of *Echinacea* spp. *Journal of Pharmaceuticalan Biomedical Analysis*, 35, 289-301.
35. Percival, S. S. (2000). Use of *Echinacea* in medicine. *Biochemical Pharmacology*, 60, 155-158.
36. Perry, N. B., Burgess, E. J. & Glennie, V. (2001). *Echinacea* standardization: analytical methods for phenolic compounds and typical levels in medicinal species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1702-1706.
37. Pietta, P., Mauri, P. & Bauer, R. (1998). MECK analysis of different *Echinacea* species. *Planta Medica*, 64, 649-652.
38. Pouramir, F., Nassiri Mahallati, M., Koocheki, A. & Ghorbani, R. (2010). Assessment of Sesame and Chickpea yield and yield components in the replacement series intercropping. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 8, 747-757. (in Farsi)
39. Runhle, E. S., Heins, R. D., Cameron, A. C. & Carlson, W. H. (2001). Photocontrol of flowering and stem extension of the intermediate-day plant *Echinacea purpurea*. *Physiologia Plantarum*, 112, 433-441.
40. Sabet, M. S., Salmanzadeh, M. & Moieni, A. (2017). Identification of gene sequences involved in chicoric acid biosynthesis pathway in *Echinacea purpurea* through RNA-SEQ transcriptome analysis. *Journal of Plant Physiology & Pathology*, 5, 5.

41. Sabra, A., Adam, L., Daayf, F. & Renault, S. (2012). Salinity-induced changes in caffeic acid derivatives, alkamides and ketones in three *Echinacea* species. *Environmental and Experimental Botany*, 77, 234-241.
42. SAS Institute. (2002). *SAS/STAT user's Guide*. Release G. 12. SAS Institute Cary. North Carolina, USA.
43. Schieffer, G. W. & Kohn, M. (2002). HPLC assay of *Echinacea purpurea*/Goldenseal (*Hydrastis canadensis*) combination formulations for phenolic acids, alkylamides, and alkaloids. *Journal of Liquid Chromatography and amp Related Technologies*, 25, 263-274.
44. Seidler-Lozykowska, K. & Dabrowska, J. (2003). Yield and polyphenolic acids content in purple coneflower (*Echinacea purpurea* Moench.) at different growth stages. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 10, 7-12.
45. Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R. S. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteau Reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
46. Stanisavijevic, I., Stojicevic, S., Velickovic, D., Veljkovic, V. & Lazic, M. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of Echinacea (*Echinacea purpurea* L.) extracts obtained by classical and ultrasound extraction. *Biotechnology and Bioengineering, Bioeng*, 17, 478-483.
47. Thomsen, M. O., Frette, X. C., Christensen, K. B., Christensen, L. P. & Grevsen, K. (2012). Seasonal variations in the concentrations of lipophilic compounds and phenolic acids in the roots of *Echinacea purpurea* and *Echinacea pallid*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 12131-12141.
48. Thygesen, L., Thulin, J., Mortensen, A., Skibsted, L. H. & Molgaard, P. (2007). Antioxidant activity of cichoric acid and alkamides from *Echinacea purpurea* alone and in combination. *Food Chemistry*, 101, 74-81.
49. Tsai, Y., Chiou, S., Chan, K., Sung, J. & Lin, S. (2012). Caffeic acid derivatives, total phenols, antioxidant and antimutagenic activities of *Echinacea purpurea* flower extracts. *Food Science and Technology International*, 46, 169-176.
50. Wills, R. B. H. & Stuart, D. L. (1999). Alkylamide and cichoric acid levels in *Echinacea purpurea* grown in Australia. *Food Chemistry*, 67, 385-388.
51. Wu, C. H., Murthy, H. N., Hahn, E. J., Lee, H. L. & Paek, K. Y. (2007). Efficient extraction of caffeic acid derivatives from adventitious roots of *Echinacea purpurea*. *Czech Journal of Food Sciences*, 26, 254-258.