غربالگری اسانس و عملکرد آنتی‌اکسیدانی جمعیت‌های خودروی گیاه دارویی (*Satureja bachtiarica* Bunge.) در غرب ایران به جهت شناسایی کموتایپ‌های بهینه از گیاه

مریم محمد زرین آبادی[1] ، مهدی صیدی[2*]، یحیی محمدی[3]

[1]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

[2]دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

[3]استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۰٤ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۰۱/۱۹

چکیده

این پژوهش با هدف ارزیابی عملکرد، تنوع فیتوشیمیایی اسانس و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کموتیپ‌های مختلف گیاه مرزه بختیاری از رویشگاه‌های مختلف و شناسایی کموتایپ بهینه به‌عنوان رقم زراعی طی سال‌های ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰ انجام شد. اندام‌های هوایی و گلدار هشت جمعیت از مرزه بختیاری (*Saturejabachtiarica* Bunge.) از نقاط مختلف استان‌های ایلام، گیلان غرب و یک نمونه کشت شده در گلخانه دانشگاه ایلام جمع‌آوری گردید. اسانس گیری با استفاده از دستگاه تقطیر با آب (طرح کلونجر)، آنالیز مواد موثره اسانس‌ها با استفاده از GC و GC/MS و عملکرد آنتی اکسیدانی نیز با استفاده از روش DPPH ارزیابی گردید. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین جمعیت‌ها از نظر عملکرد، ترکیب فیتوشیمیایی و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس اختلاف معنی‌داری وجود داشت. بیشترین و کمترین عملکرد اسانس به‌ترتیب مربوط به منطقه شلم (۱/۴۳ درصد) و گلخانه (۰/۴۴ درصد) بود. عمده ترکیبات اسانس گیاه شامل تیمول (۸۷/۳۰-۳۹/۲۸ درصد)، پارا- سیمن (۱۵/۶۳-۰/۳۰ درصد)، گاما- ترپینن (۰۴/۷۱-۲/۱۴ درصد) و کارواکرول (۰/۴۱-۸ درصد) بودند. رتبه بندی جمعیت‌ها بر اساس دو مولفه اول نشان داد که بیشترین تنوع فیتوشیمیایی مربوط به جمعیت شلم بود. جمعیت‌های مناطق شلم، سورگه، کبیرکوه و قلارنگ از نظر خواص فیتوشیمیایی در مقایسه با بقیه جمعیت‌ها شباهت بیشتری نشان دادند. تجزیه کلاستر بر اساس درصد اجزای تشکیل دهنده اسانس،جمعیت‌ها را به سه کموتایپ مختلف تفکیک نمود. بالاترین و پایین‌ترین میزان فنل کل به‌ترتیب ۰/۹۱±۲۹۲/۵ (قلارنگ) و ۱/۰۸±۱۹۴/۰۴ (گردکان) میلی‌گرم پیروکتکول در میلی‌لیتر اسانس بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی جمعیت‌ها از ۰/۴۵±۷۳/۸ (بدره) تا ۰/۹±۵۹/۱ (گلخانه) درصد متغیر بود. بالاترین و پایین‌ترین میزان IC_{50} به‌ترتیب ۰/۶۷ و ۰/۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که در مقایسه با BHT (IC_{50}=۰/۱۱mg/ml) رادیکال زدایی قابل قبولی داشتند. در پایان جمعیت‌های سورگه، قلارنگ، شلم، کبیر کوه، رنو و بدره (کلاستر دوم) به‌عنوان کموتایپ برتر جهت فرایند اهلی سازی معرفی گردید.

واژه‌های کلیدی: ایلام، **اسانس** پلی فنل‌ها، تیمول، کارواکرول، مرزه بختیاری.

*نویسنده مسئول: m.saidi@ilam.ac.ir; saidi490@yahoo.com

مقدمه

مرزه بختیاری با نام علمی (*Saturejabachtiarica* Bunge) متعلق به تیره Lamiaceae و یکی از گونه‌های انحصاری در ایران است (Ahmadi et al., 2009). سرشاخه‌های گل‌دار و قسمت‌های هوایی این گیاه معطر بوده و اهمیت دارویی و درمانی این گیاه بیشتر بخاطر اسانس آن می‌باشد. این گیاه دارای اثرات ضدالتهابی، ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی است (Saidi et al., 2013). در تحقیقات پیشین ۲۰ ترکیب مختلف در اسانس سرشاخه‌های مرزه بختیاری استان فارس شناسایی شده است که عمده ترین آنها کارواکرول (۴۹/۳ درصد)، پارا-سیمن (۱۲/۷درصد)، ترانس و آلفا برگامتون (۵/۸درصد) و تیمول (۴/۵ درصد) بودند (Sefidkon and Jamzad, 2000). علاوه بر مرزه بختیاری چندین گیاه دارویی معطر و بومی دیگر در استان ایلام به‌صورت خودرو می‌رویند که به‌دلیل کاربردهای مشابه به‌عنوان ادویه یا در طب سنتی، به‌دلیل برداشت بی‌رویه در معرض خطر قرار دارند. از بین این گیاهان می توان آویشن زوفایی[1] با ترکیب اصلی کارواکرول و لعل کوهستان (*Oliveriadecumbens*)، آویشن کرک آلود (*Thymus eriocalyx*) و آویشن دنایی (*Thymus daenensis*) باترکیب غالب تیمول (Saidi et al., 2012; Saidi, 2014) اشاره نمود.

اگرچه میزان تولید متابولیت‌های ثانویه ارتباط مستقیمی با ژنوتیپ گیاهان دارد، اما سنتز آنها به‌طور بارزی تحت تأثیرعوامل محیطی مانند شرایط آب و هوایی، ارتفاع از سطح دریا، خاک، میزان نور و رطوبت نسبی قرار می‌گیرد (Dehghan et al., 2014). به‌طور معمول، نوع و میزان اجزای تشکیل‌دهنده اسانس یک گونه گیاهی در رویشگاه‌های مختلف تغییرات زیادی نشان می‌دهند که علت آن رابه ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک مناطق مورد بررسی و تفاوت در ارقام و سن گیاه مرتبط می‌دانند (Fatahi and Fatahi, 2010).

اولین گام موثر به‌منظور جلوگیری از انقراض گونه‌های بومی با ارزش دارویی بالا و حفظ و توسعه ذخایر ژنتیکی آنها، بررسی شرایط رویشگاهی و شناسایی نیازهای محیطی و کشف بهترین شرایط اکولوژیکی است که در آن کیفیت وکمیت مواد موثره دارویی در حدقابل قبولی باشد. از طرفی برای اهلی سازی یک گیاه دارویی بایستی شناخت دقیقی از ویژگی‌های فیتوشیمیایی آن در رویشگاه‌های طبیعی حاصل شود تا با استفاده از فنون به‌نژادی و به‌زراعی بتوان بازدهی اسانس و کیفیت انواع زراعی آن‌را نسبت به خویشاوندان وحشی خود ارتقاء بخشید. علاوه بر این، علاقه شدید بومیان نواحی زاگرس مرکزی و غربی بویژه ایلامیان به استفاده از مرزه بختیاری در طب سنتی و به‌عنوان یک گیاه معطر و ادویه‌ای، چرای بیش از حد بوسیله دام‌ها و از همه مهم‌تر، پدیده‌های خشکسالی و ریزگردها که محیط زیست غرب کشور بویژه استان ایلام را در معرض خطر نابودی قرار داده‌اند، همگی باعث زوال رو به رشد جمعیت‌های وحشی مرزه بختیاری در استان ایلام شده‌اند. لذا از سال ۱۳۸۸ با جمع‌آوری جمعیت‌های مختلف مرزه بختیاری از رویشگاه‌های مختلف استان ایلام، تکثیر جنسی و غیر جنسی آنها، در جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی، مستند سازی و حفظ ژرم پلاسم این گیاه تلاش شده تا با بررسی تغییرات فیتوشیمیایی این جمعیت‌ها، زمینه را برای اهلی سازی و تعیین بهترین الگوی کاشت این گیاه ارزشمند در استان ایلام، گزینش لاین‌های خالص از بین جمعیت‌های برتر و در نهایت تولید دورگ‌های درون و بین گونه‌ای آن را فراهم آورد (Saidi et al., 2013; Mehdi Shahivand et al., 2013).

1. *Thymbraspicata*

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این مطالعه، سرشاخه‌های هوایی گیاه مرزه بختیاری در مرحله گلدهی کامل از رویشگاه طبیعی آن در استان‌های ایلام (شامل ارتفاعات ملهگون، بدره، شلم، سورگه، چلیسون، قلارنگ، کبیر کوه، کوه‌های رنو) و کرمانشاه (گیلان‌غرب) و یک نمونه کشت شده در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام، (مرداد و شهریور ۱۳۸۹) جمع‌آوری شدند. شناسایی این گیاهان در بخش تحقیقات گیاهشناسی، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور انجام شد.

روش استخراج اسانس: سرشاخه‌های گل‌دار هر یک از نمونه‌ها بعد از جمع‌آوری در سایه و در دمای اتاق خشک شدند. مواد گیاهی خشک شده با آسیاب برقی (دارای الک با منافذ به قطر ۲ میلی‌متر) خرد شده و ۱۰۰ گرم از پودر گیاه خشک شده پس از توزین جهت استخراج اسانس به روش تقطیر با آب توسط دستگاه کلونجر، برای مدت ۳ ساعت اسانس گیری شد. پس از استخراج، اسانس با استفاده از سولفات سدیم بی‌آب، آب‌گیری شده و تا زمان آنالیز در ظروف در بسته شیشه‌ای تیره رنگ، دور از نور و در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند.

شناسایی اجزای تشکیل دهنده اسانس: تجزیه فیتوشیمیایی اسانس‌ها با استفاده از دستگاه‌های کروماتوگرافی گازی (GC) و کروماتوگرافی گازیمتصل به طیف سنج جرمی (GC-MS) آزمایشگاه فیتوشیمی پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی انجام شد. پس از تزریق اسانس‌ها به دستگاه‌های فوق، شناسایی ترکیبات اسانس با استفاده از پارامترهای مختلف از قبیل زمان بازداری ترکیب‌ها (RT)، اندیس بازداری (RI)، مطالعه طیف‌های جرمی و مقایسه این طیف‌ها با ترکیبات استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانهٔ رایانه دستگاه GC-MS صورت گرفت. درصد نسبی هر کدام از ترکیبات تشکیل دهنده اسانس با توجه به سطح زیر منحنی آن در کروماتوگرام GC به روش نرمال کردن سطح و نادیده گرفتن ضرایب پاسخ بدست آمد (Adams, 2007).

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی: فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌ها بر اساس روش کولکارنی و آرادیا (Kulkarni and Aradhya, 2005) از روی غیر فعال کردن رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط ماده ۲ و۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) و بی‌رنگ کردن آن اندازه‌گیری شد.

محاسبه درصد مهار رادیکال DPPH در غلظت‌های مختلف اسانس (IC_{50}) Inhibition Concentration fifty: فاکتور IC_{50} بیانگر مقداری از اسانس است که قادر است ۵۰ درصد از رادیکال‌های ۲و۲-دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل ($DPPH^{\circ}$) اولیه موجود در محیط را خنثی کند. برای ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در این روش از $DPPH^{\circ}$ که یک رادیکال پایدار نیتروژن است، استفاده شد. به علت وجود الکترون منفرد، $DPPH^{\circ}$ دارای جذب قوی در طول موج ۵۱۷ نانومتر می‌باشد که در نتیجه محلول متانولی آن به رنگ بنفش پر رنگ است. در حضور آنتی‌اکسیدان‌ها، محلول به رنگ زرد یا بی‌رنگ، تغییر رنگ می‌دهد. درصد مهار با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Ou et al., 2002):

$$\text{Inhibition}(\%) = \left(\frac{\text{A control} - \text{A extract}}{\text{A control}}\right) \times 100$$

A control میزان جذب شاهد (نمونه حاوی تمام معرف‌ها به غیر از اسانس) و A extract میزان جذب نمونه در ۵۱۷ نانومتراست. سپس نمودار درصد مهار رادیکال دربرابرغلظت (رگرسیون خطی بین درصد مهار و غلظت‌های مربوطه) ترسیم گردید و با استفاده از معادله خط هر نمودار، میزان IC_{50} محاسبه شد. برای هریک از نمونه‌ها سه مرتبه آزمایش تکرار شد و

مقدار میانگین IC_{50} به دست آمد. بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) به‌عنوان شاهد مثبت برای مقایسه به کار گرفته شد.

سنجش میزان فنل کل: محتوی فنل کل اسانس‌ها با روش پیشنهادی سینگلتون و همکاران (Singleton et al., 1999) اندازه‌گیری شد. برای اینکار ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتیو ۱۰ درصد (Folin-Ciocalteu reagent) به همراه ۵۰۰ میکرولیتر بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی مولار با pH=۷/۸ و نیز ۱۰۰ میکرولیتر نمونه (اسانس رقیق شده با اتانول) پس از شیکر کردن، ۲ دقیقه به حال خود واگذاشته شد و سپس ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم به آن اضافه گردید تا واکنش معرف با پلی‌فنل‌ها متوقف شود. دوباره محلول شیکر شده و به‌مدت ۵ دقیقه در حمام آب گرم (بن ماری) با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در نهایت جذب محلول حاصل در طول موج ۷۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل APEL (PD-303 uv) اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

این تحقیق در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد و برای انجام محاسبات آماری، با استفاده از نرم‌افزارهای Minitab و SAS، تجزیه به مولفه‌های اصلی و تجزیه کلاستر انجام شد. جهت تعیین ضرایب همبستگی صفات مختلف از نرم افزار ، و جهت رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون. دانکن در سطح پنج درصد انجام شد.

نتایج

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین متوسط بازده (درصد، حجمی/ وزنی) اسانس جمعیت‌های مختلف مرزه بختیاری تفاوت معنی‌داری وجود داشت. مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۱) نیز نشان داد که بیشترین و کمترین عملکرد اسانس به‌ترتیب مربوط به نمونه شلم (۱/۳۹ درصد) با ارتفاع ۱۸۴۹ متری و نمونه گلخانه (۰/۴ درصد) با ارتفاع ۱۳۰۰ متری از سطح دریابود.

تجزیه فیتوشیمیایی اسانس‌ها، بیش از ۲۷ ترکیب را به‌عنوان اجزای تشکیل دهنده اسانس جمعیت‌های مورد مطالعه مشخص نمود. در همه جمعیت‌ها، تیمول (۸۷/۳۰-۳۹/۲۸ درصد)، پارا-سیمن (۳۰/۶۳-۰/۱۵ درصد)، گاماترپینن (۱۴/۷۱-۲/۰۴ درصد) و کارواکرول (۸/۴۱-۰ درصد) عمده ترین اجزای تشکیل‌دهنده اسانس بودند (جدول ۲). بیشترین محتوی تیمول به‌عنوان ترکیب اصلی اسانس به‌ترتیب مربوط به سه رویشگاه رنو (۸۷/۳۰ درصد)، بدره (۷۹/۴۵ درصد) و گیلان‌غرب (۷۸/۵۷ درصد) بود.

بررسی محتوی پارا-سیمن و گاماترپینن به‌عنوان دو پیش ماده تیمول نشان داد که بیشترین محتوی پارا-سیمن به‌ترتیب مربوط به سه منطقه گردکان (۳۰/۶۷ درصد)، گلخانه (۳۰/۴۸ درصد) و کبیرکوه (۲۵/۶۷ درصد) بود. در حالی که بیشترین محتوی گاماترپینن به ترتیب مربوط به سه رویشگاه گلخانه (۱۴/۷۱ درصد)، گردکان (۱۲/۲۸ درصد) و کوه‌های شلم (۹/۶۷ درصد) بود. بررسی محتوی کارواکرول بعنوان ایزومر تیمول نیز نشان داد که اسانس مربوط به مناطق چلیسون (۸/۴۱ درصد)، قلارنگ (۷/۱۸ درصد) و گردکان (۶/۱۶ درصد) دارای بالاترین میزان کارواکرول بود.

جدول ۱: میانگین عملکرد اسانس جمعیت‌های مرزه بختیاری استان ایلام.

ویژگی‌ها	رویشگاه									
	گردکان (۱)	سورگه (۲)	شلم (۳)	رنو (٤)	چلیسون (٥)	گلخانه (٦)	کبیرکوه (۷)	گیلانغرب (۸)	قلارنگ (۹)	بدره (۱۰)
درصد بازدهی اسانس (حجمی/وزنی)	۱/۱۸^{b}	۰/۷۳^{d}	۱/۴۳^{a}	۰/۷۲^{d}	۰/۸۰^{d}	۰/۴۴^{e}	۰/۷۴^{d}	۰/۹۲^{c}	۰/۹۶^{c}	۰/۸۲^{d}

اعداد دارای حداقل یک حرف مشترکدر سطح احتمال پنج درصد فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

جدول ۲: معرفی مهمترین اجزای تشکیل دهنده اسانس جمعیت‌های مختلف مرزه بختیاری در استان ایلام

No.	Components	شاخص بازداری	گردکان (۱)	سورگه (۲)	شلم (۳)	رنو (٤)	چلیسون (٥)	گلخانه (٦)	کبیرکوه (۷)	گیلانغرب (۸)	قلارنگ (۹)	بدره (۱۰)
1	Myrcene	۹۹۲	۱/۲۶	۰/۸۰	۰/۸۳	–	۰/۶۹	–	۰/۸۶	–	۰/۶۰	۰/۵۲
2	α-Terpinene	۱۰۲۲	۰/۳۰	۰/۷۵	۰/۳۷	۲/۳۵	–	۱/۱۲	–	۰/۵۶	۰/۸۴	۰/۸۹
3	*p*-Cymene	۱۰۲۹	۳۰/۶۷	۲۰/۵۱	۱۲/۷۳	۰/۱۵	۲۱/۴۱	۳۰/۴۸	۲۵/۶۷	۸/۶۲	۱۴/۲۲	۸/۳۳
4	*γ*-Terpinene	۱۰۶۳	۱۲/۲۸	۶/۹۹	۹/۶۷	۲/۰۴	۸/۳۸	۱۴/۷۱	۶/۵۲	۶/۹۲	۵/۲۳	۳/۲۳
5	*cis*-Linaloloxide	۱۱۷۴	۰/۵۱	–	۱/۱۷	–	۰/۴۴	–	۱/۵۷	–	۰/۱۰	۰/۷۲
6	Linalool	۱۱۷۷	۱/۶۹	۰/۱۹	–	–	۱/۸۷	۰/۱۷	–	۰/۲۲	۰/۲۱	۰/۱۴
7	Camphor	۱۱۷۹	۰/۳۶	۰/۳۵	۰/۱۳	–	۰/۲۳	۱/۶۴	۰/۳۱	۰/۸۲	–	۰/۲۵
8	Borneol	۱۱۸۰	۱/۳۲	۰/۵۱	–	۰/۲۶	۰/۱۹	–	–	–	۰/۲۱	۰/۳۹
9	Thymol	۱۲۹۰	۳۹/۵۷	۵۶/۱۵	۶۷/۳۲	۸۷/۳۰	۴۹/۴۱	۳۹/۲۸	۵۳/۸۲	۶۸/۵۷	۶۶/۵۶	۷۹/۴۵
10	Carvacrol	۱۳۰۴	۶/۱۶	۲/۸۴	۴/۲۹	۰/۱۸	۸/۴۱	۲/۹۶	۲/۹۲	–	۷/۱۸	۱/۰۹
11	trans-Caryophyllene	۱۴۳۷	۱/۷۳	۱/۳۰	۰/۹۶	۱/۰۴	۱/۹۶	–	۱/۳۷	–	۰/۶۰	–
12	(+) spathulenol	۱۵۹۶	۰/۱۷	۰/۸۵	–	۲/۵۵	۲/۲۶	–	۲/۶۹	–	۰/۸۷	۱/۰۶
13	(-)-Caryophyllene oxid	۱۶۰۳	۰/۵۱	۰/۲۳	۰/۱۴	۰/۲۸	۰/۲۰	۱/۶۳	۰/۲۸	۱/۰۱	۰/۲۲	۰/۲۷

جدول ۳: محتوی فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس جمعیت‌های مرزه بختیاری ایلام و کرمانشاه.

رویشگاه	محتوی فنل کل (میلی‌گرم پیروکتکول بر میلی لیتر)	فعالیت آنتی اکسیدانی (درصد)
گردکان	۱۹۴/۴۰^{f}	۶۶/۴۱^{c}
سورگه	۲۲۴/۲۶^{d}	۶۶/۶۸^{e}
شلم	۲۵۹/۸۵^{b}	۶۱/۵۹^{ef}
رنو	۲۲۵/۴۴^{d}	۶۴/۰۷^{cde}
چلیسون	۲۰۶/۰۶^{e}	۶۳/۵۵^{de}
گلخانه	۲۳۶/۰۴^{c}	۵۹/۱۱^{f}
کبیرکوه	۲۰۳/۴۵^{e}	۶۴/۹۹^{cd}
بدره	۲۹۱/۳۷^{a}	۷۳/۸۳^{a}
قلارنگ	۲۹۲/۵۵^{a}	۶۹/۶۴^{b}
گیلانغرب	۲۳۳/۶۲^{c}	۶۴/۶۲^{cd}

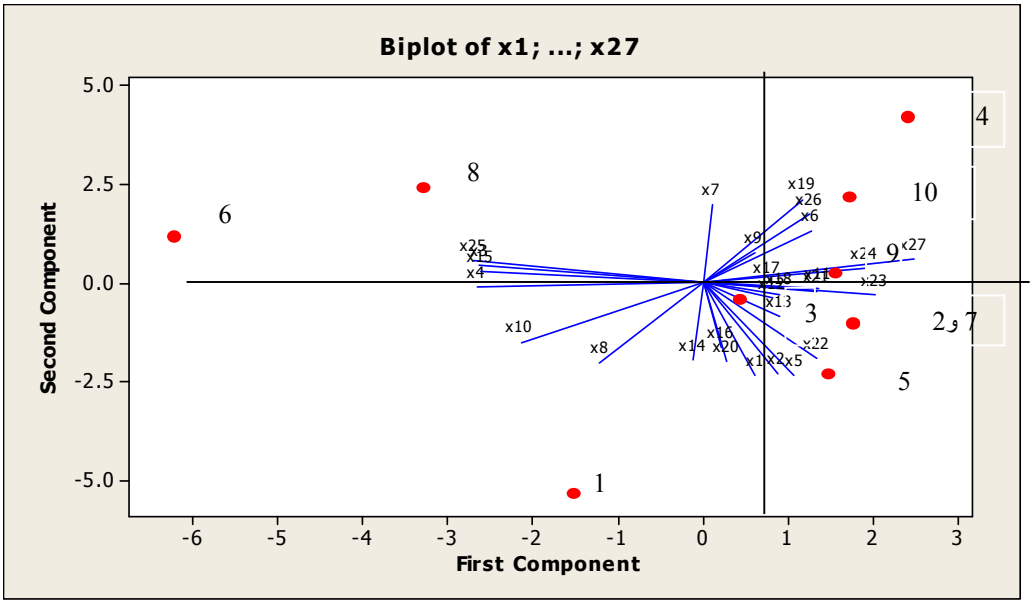
اعداد دارای حداقل یک حرف مشترکدر سطح احتمال پنج درصد فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

جدول ٤: میانگین IC_{50} اسانس جمعیت‌های مرزه بختیاری و آنتی‌اکسیدان مصنوعی BHT

جمعیت‌ها	درصد مهار رادیکال DPPH° (IC_{50}) Inhibition Concentration fifty IC_{50}(mg/ml)
گردکان	۰/۵۳
سورگه	۰/۴۳
شلم	۰/۶۳
رنو	۰/۴۸
چلیسون	۰/۴۹
گلخانه	۰/۴۰
کبیرکوه	۰/۵۱
بدره	۰/۵۰
قلارنگ	۰/۶۲
گیلانغرب	۰/۴۶
بوتیل هیدروکس تولوئن BHT	۰/۱۱

برآورد تنوع فیتوشیمیایی با استفاده از تجزیه و تحلیل‌های چند متغییره و تجزیه به مولفه‌های اصلی: با تجزیه ترکیبات شیمیایی اسانس ده جمعیت مرزه بختیاری به مولفه‌های اصلی، از بین ۲۷ متغییر ارزیابی شده هفت مولفه استخراج شد که در مجموع حدود ۹۶/۲ درصد از واریانس کل را توجیه می‌کردند. دو مولفه اول (۲۹/۶ درصد) و دوم (۵۶/۵ درصد) در مجموع ۸۶/۱ درصد از تغییرات موجود بین داده‌ها را توجیه نمودند (شکل ۱). رتبه بندی جمعیت‌ها بر اساس دو مولفه اول نشان داد که از بین ده جمعیت، بیشترین تنوع فیتوشیمیایی مربوط به منطقه شلم می‌باشد. جمعیت‌های مناطق شلم، سورگه، کبیرکوه و قلارنگ از نظر ویژگی‌های فیتوشیمیایی شباهت بیشتری به یکدیگر نشان دادند. دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر جمعیت‌های مورد مطالعه بر اساس ترکیبات فیتوشیمیایی (شکل ۲)، وجود سه کموتایپ

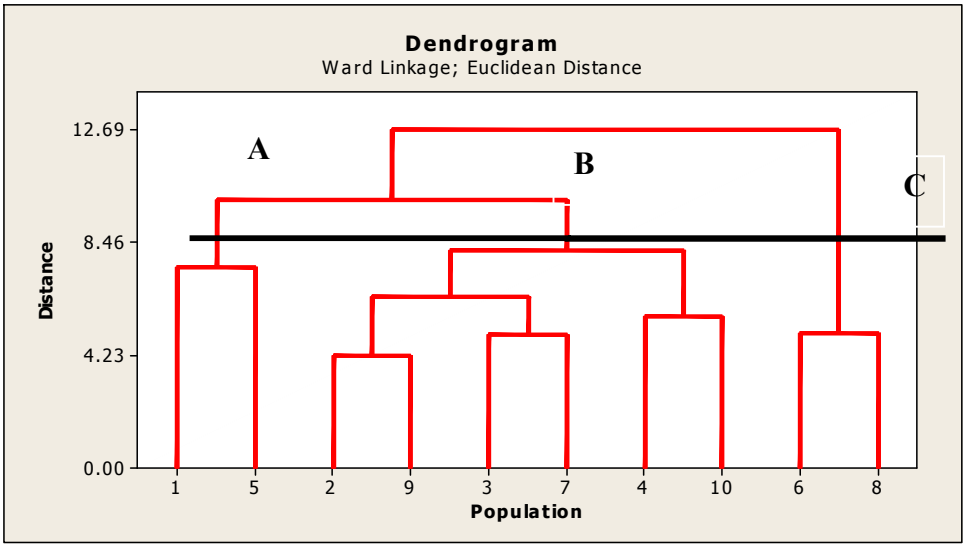
A[تیمول (۴۹/۴۱-۳۹/۵۷ درصد)، پارا-سیمن (۳۰/۶۷-۲۱/۴۱ درصد)، کارواکرول (۸/۴۱-۶/۱۶ درصد)]، کموتایپ B [تیمول (۸۷/۳-۵۳/۸۲ درصد)، پارا-سیمن (۲۵/۶۷-۰/۱۵ درصد)] و کموتایپ C [تیمول (۷۸/۵۷ -۳۹/۲۸ درصد)، پارا-سیمن (۳۰/۴۸-۸/۶۱ درصد)، گاماترپینن (۱۴/۷۱-۶/۹۲ درصد)]را به اثبات رساند. کلاستر اول (A) شامل جمعیت‌های گردکانو ارتفاعات چلیسون و عمده‌ترین ترکیبات مشترک بین این دو جمعیت، تیمول، پارا-سیمن، گاماترپینن و کارواکرول بود. کلاستر دوم (B) دارای سه زیر کلاستر بود که عبارت بودند از: زیر کلاستر اول شامل جمعیت‌های سورگه و قلارنگ که ترکیبات اصلی آنها تیمول و پارا-سیمن بود. زیر کلاستر دوم شامل جمعیت‌های شلم و کبیر کوه که تیمول، پارا-سیمن و کارواکرول عمده‌ترین ترکیبات مشترک بین آنها بود. زیر کلاستر سوم نیز شامل جمعیت‌های رنو و بدره بودکه تیمول و گاماترپینن عمده‌ترین ترکیبات مشترک آنها بودند. کلاستر سوم (C) جمعیت‌های گیلان‌غرب و گلخانه را در بر می‌گرفت که عمده‌ترین ترکیبات مشترک بین آنها تیمول، پارا-سیمن و گاماترپینن بود.



شکل ۱: بای پلات ترسیمی پراکندگی جمعیت‌ها بر اساس دو مولفه اصلی

محتوی فنل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی: تجزیه واریانس داده‌ها اختلاف معنی‌داری بین محتوی فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی جمعیت‌های مختلف مرزه بختیاری نشان داد. بیشترین محتوی فنل برای جمعیت قلارنگ ثبت گردید. گستره فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس ده منطقه ۵۹/۱۱ تا ۷۳/۸۳ درصد بود (جدول ۳). بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز متعلق به جمعیت بدره بود.

با بررسی میانگین IC_{50} اسانس‌ها و مقایسه آن با BHT (جدول ۴) مشخص گردید که اسانس مرزه بختیاری در غلظت‌های پایین (۴۰ تا ۶۳ میلی گرم در میلی لیتر) قادر به زدودن رادیکال‌های آزاد بوده و می‌توان از آن بعنوان جایگزین مواد نگهدارنده و آنتی اکسیدان مصنوعی استفاده نمود. از آنجایی که IC_{50} به‌طور معکوس با فعالیت ضدرادیکالی ترکیب‌ها در ارتباط است، هر چه IC_{50} کمتر باشد، فعالیت ضد رادیکالی بیشتر می‌شود (Borra et al., 2013).



شکل ۲: دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از فاصله اقلیدسی و الگوریتم Ward

۱: گردکان، ۲: سورگه، ۳: شلم، ۴: رنو، ۵: چلیسون، ۶: گلخانه، ۷: کبیرکوه، ۸: گیلانغرب، ۹: قلارنگ و ۱۰: بدره.

بحث

تحقیقات پیشین نشان دادند که بازده اسانس سرشاخه‌های مرزه بختیاری برای نمونه‌های جمع‌آوری شده از چهار محال و بختیاری، یزد و فارس به مراتب بالاتر از جمعیت‌های استان ایلام می‌باشد(Sefidkon and Jamzad, 2000). متابولیت‌های ثانویه نتیجه محتوم تنش‌ها هستند. بنابراین برای تولید حداکثری مواد دارویی مورد نظر، می‌توان با اعمال تیمارهای شیمیایی از قبیل محلول‌پاشی با تنظیم کننده‌های رشد گیاهی که منجر به تحریک چرخه‌های بیوشیمیایی درون گیاه می شوند و یا از طریق القاء تنش‌های محیطی بویژه تنش خشکی به این هدف دست یافت (Omidbaigi, 2005; MohamadiFarsaani et al, 2016).

از آنجایی که رشد و عملکرد دارویی گیاهان در اکوسیستم‌ها، تحت تأثیر عوامل مختلفی همانند نوع گونه، اقلیم، خاک، و موقعیت جغرافیایی قرار می‌گیرد (Mohamad Nejaad Gandgi, et al. 2014)، معمولاً بین نوع و میزان اجزاء تشکیل‌دهنده اسانس یک گونه گیاهی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف تفاوت‌هایی وجود دارد که علت آن احتمالا تفاوت بین ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مناطق مورد بررسی از قبیل ارتفاع و شیب منطقه می‌باشد (Sharaf Zadeh et al., 2008; Dehghan, et al., 2014).

این پژوهش به وضوح تأثیر اقلیم، ژنوتیپ و بر همکنش آنها بر محتوی منوترپن‌های آروماتیک را نمایان ساخت. پیش از این سفید کن و جمزاد (Sefidkon and Jamzad, 2000) در استان فارس و شریف زاده در استان یزد (Sharaf Zadeh et al., 2008) کارواکرول را به‌عنوان ترکیب اصلی اسانس مرزه بختیاری گزارش کردند. اما سفیدکن و همکاران (Sefidkon et al., 2004) تیمول را به‌عنوان ترکیب اصلی اسانس نمونه‌های چهارمحال و بختیاری گزارش نمودند. در حالی که در کلیه جمعیت‌های جمع‌آوری شده از استان ایلام، تیمول ماده موثره اصلی و غالب اسانس بود. از طرفی، درصد تیمول موجود در اسانس جمعیت‌های استان ایلام به مراتب بیشتر از جمعیت‌های سایر نقاط کشور بود. تفاوت در نوع و مقدار اجزای تشکیل‌دهنده اسانس یک گونه، منعکس کننده خاستگاه‌های متفاوت، تفاوت در شرایط محیطی هر محل و شرایط محیط کشت

(تفاوت در ارتفاع، تفاوت در عرضه نور خورشید و نوع خاک) است (Figueiredo et al., 2008; Dehghan et al., 2014).

یکی از یافته‌هاقابل توجه پژوهش حاضر این بود که درصد کارواکرول موجود در اسانس جمعیت‌های استان ایلام به مراتب کمتر از مرزه‌های بختیاری سایر استان‌ها بود. گیاهان معطری نظیر آویشن که غنی از تیمول می‌باشند نسبت به آنهایی که اسانسی غنی از کارواکرول تولید می‌کنند، طعم ورایحه خوشایندومطلوب‌تری دارند (Omidbeigi and Mahmoodi Sarvestani, 2010). لذا، یکی از دلایل اصلی اقبال بومیان استان ایلام برای جمع‌آوری و استفاده از مرزه بختیاری نسبت به آویشن زوفایی، وجود مقادیر بالای تیمول در نتیجه ارزش ادویه‌ای وچاشنی بی‌نظیرآن می‌باشد (Mehdi Shahivand et al., 2013).

از آنجایی که بیوسنتز دو ایزومر تیمول و کارواکرول با استفاده از پیش‌ماده‌های یکسانی صورت می گیرد، محتوی تیمول در جمعیت‌هایی که پارا-سیمن و کارواکرول بیشتری داشتند، به همان نسبت کمتر از جمعیت‌های دیگر بود. از طرفی، در نمونه-های مناطق رنو، بدره و گیلانغرب که بالاترین مقدار تیمول را دارا بودند، محتوی کارواکرول بسیار پایین بود. این موضوع نشان دهنده همبستگی منفی بین میزان تیمول و کارواکرول بود. پایین‌ترین محتوی تیمول براینمونه کشت شده در گلخانه ثبت گردید. در حالیکهمقدار گاماترپینن و پارا-سیمن در این نمونه بیشتر از سایر جمعیت‌ها بود. از آنجاییکه گاماترپینن و پارا-سیمن پیش ماده مورد نیاز برای بیوسنتز تیمول بوده و با افزایش محتوی تیمول، مقدار این دو پیش‌ماده کاهش می‌یابد، بنابراین در محیط‌های گلخانه‌ای که عاری از هرگونه تنش می‌باشند، احتمالا شرایط لازم برای تبدیل این دو پیش ماده به تیمول فراهم نیست. این تفاوت در ویژگی‌های کمی و کیفی اسانس جمعیت‌های مناطق مختلف، احتمالا ناشی از تفاوت‌های کموتایپی نیز بوده که خود حاصل تنوع ژنتیکی، شرایط محیطی و اقلیمی حاکم بر رویشگاه‌های مورد مطالعه و برهمکنش این دو می‌باشد (Amiot et al., 2005). عقیده بر این است که تولید تیمول به بعضی تغییرات بیرونی مانند شرایط آب و هوایی، خاک، زمان برداشت، و مقدار آبی که در اختیار گیاه قرار می‌گیرد،بستگی دارد. مشاهده رابطه عکس بین محتوی تیمول و کارواکرول در این پژوهش نشان داد که این گروه ازعوامل بر بیشتر شدن مقدار یک ماده نسبت به ایزومر آن تاثیر می‌گذارند (Kimura et al., 2006).

جمعیت‌هایی که از محتوی فنل بیشتری برخوردار بودند، درصد بیشتری از رادیکال‌های آزاد را خنثی کرده و فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری داشتند. پیش از این ترویلاس و همکاران (Trouillaset al., 2003) نیز ثابت کردند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره بابونه شیرازی با میزان ترکیبات فنلی موجود در آن رابطه مستقیم و مثبتی دارد. همچنین، روبرتو و باراتا (Ruberto and Baratta, 2000) فعالیت آنتی اکسیدانی بالای تیمول، کارواکرول، گاما و آلفا ترپینن و ترپینولن را که همگی از ترکیبات فنلی می‌باشند، گزارش کردند.

نتیجه‌گیری نهایی

این تحقیق نشان داد اسانس گیاه دارویی مرزه بختیاری به‌دلیل دارا بودن مقادیر بالای ترکیبات فنولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی چشمگیری دارد. به‌طور کلی، از نظر بازده اسانس بهترین گزینه‌ها برای اهلی سازی، جمعیت‌های شلم و گردکان، از نظر مواد موثره دارویی با ارزش از جمله تیمول جمعیت‌های رنو و گیلانغرب و از نظر محتوی فنل کل و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، جمعیت‌های قلارنگ و بدره بعنوان برترین جمعیت‌ها شناسایی شدند.

References

1. Adams R.P. 1996. Identification of Essential oil components by Gas Choromatography/Mass Spectroscopy. Allured publishing Corp., Carol Stream. USA.
2. Ahmadi, Sh., Sefidcon, F., Baba Khanlou, P., Asgari, F., Khademi, K., Valizade, N. and Karimifar, M.A. 2009. The comparison of existing components in *Satureja bachtiarica* essence in stages before flowering and full flowering in habitat and farm. Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research of Iran, 25(2): 159-169.
3. Amiot, J., Salmon, Y., Collin, C. and Thompson, J.D. 2005. Differential resistance to freezing and spatial distribution in a chemically polymorphic plant *Thymus Vulgaris*. Ecology Letters, 8: 370-377.
4. Borra, S. K., Gurumurthy, P., Mahendra, J., Jayamathi, K. M., Cherian, C.N. and Chand, R. 2013. Antioxidant and free radical scavenging activity of curcumin determined by using different in vitro and ex vivo models. Journal of Medicinal Plants Research, 7(36): 2680-2690.
5. Dehghan, Z., Sefidkon, F., Emami, S.M.and Kalvandi, R. 2014.The effects of ecological factors on essential oil yield and composition of *Ziziphora clinopodioides* Lam. Subsp. (*rigida Boiss*) Rech. f. Journal of Plant Researches (Iranian Journal of Biology), 27(1): 61-71.
6. Fatahi, M. and Fatahi, B. 2010. Principles of medicinal plants. Jahaad-e-Daneshgahi Publications, Tehran Unit, 1st Edition, Tehran, 486 p.
7. Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. and Scheffer, J.C. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oil. Flavour and Fragerance Journal, 23: 213-226.
8. Kimura, K., Yamaoka, M. and Kamisaka, Y. 2006. Inhibition of lipid accumulation and lipid body formation in oleaginous yeast by effective components in spices, carvacrol, eugenol, thymol and piperine. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 54: 3528-3534.
9. Kulkarni, A.P. and Aradhya, S.M. 2005. Chemical changes and antioxidant activity in Pomegranate arils during fruit development. Food Chemistry, 93: 319-324.
10. Mehdi Shahivand, Z., Saidi, M. and, Tahmaasebi, Z. 2013. Effects of plant spacing and irrigation intervals on yield and essential oil percentage of (*Satureja bachtiarica* Bunge.). Eco-phytochemistry Journal of Medical Plants, 2:25-38. (Abstract in English)
11. Mohamad Nejaad Gandgi, S.M., Moradi, H. Ghanbari, A. and Akbar Zaded, M. 2014. Evaluation of effect of altitude on quantity and quality of essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. cultivated in two region of Maazandaraan provience. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants, 2(1): 36-42.
12. Mohamadi Farsani, M., Ghasemi Pirbalouti, A., Bakhshi Khaniki, G. and Momtaz, H. 2016. Effect of paclobutrazol and brassinosteroid elicitors on expression gene 1-deoxy xylulose-5-phosphate reductoisomerase and its relationship with the biosynthesis of monoterpene carvacrol and thymol in *Thymus daenenesis* Celak under drought stress. Journal of Iranian Plant Ecophysiological Research, 11(43): 76-89.
13. Omidbaigi R. 2005. Production and processing of Medicinal plants. Vol 3, Aastaan Qouds publication, Tehran, 400 p.
14. Omidbeigi, R. and Mahmoodi Sarvestani, M. 2010. Effect of water stress on morphological traits, essential oil content and yield of anise hyssop (*Agastache foeniculum* [Pursh] Kuntze). Iranian Journal of Horticultural Sciences, 41(2): 153-161. (In Persian)
15. Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A. and Deemer, E.K. 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50: 3122-3128.

16. Ruberto, G. and Baratta, M.T. 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model system. Food Chemistry, 69: 167-174.
17. Saidi M. 2014. Antioxidant Activities and Chemical Composition of Essential Oils from *Satureja khuzestanica*, *Oliveria decumbens* and *Thymus daenensis*. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 17(3): 513-521.
18. Saidi M., Ghafourian, S., Mohamad Zarin-Abaadi, M., Movahedi Kh. and Sadeghifard. N. 2012. In vitro antimicrobial and antioxidant activity of black thyme (*Thymbra spicata* L.) essential oils. Romanian Archives of Microbiology and Immunology, 71(2): 61-69.
19. Saidi M., Movahedi, Kh. and Mehrabi A.A. 2013. Characterization of genetic diversity in *Satureja bachtiarica* germplasm in Ilam provience using ISSR and RAPD markers. International Journal of Agriculture & Crop Sciences., 5(17):1934-1940.
20. Saidi M., Movahedi, Kh. Mehrabi A.A. and Kahrizi D. 2013. Molecular genetic diversity of *Satureja bakhtiarica*. Molecular Biology Reports, 40:6501-6508.
21. Sefidkon F, Jamzad, Z. 2000. Essential oil of *Satureja bachtiarica* Bunge. Essential Oil Research, 12: 545-55.
22. Sefidkon, F., Jamzade, Z. and Barazande, M., 2004. *Satureja bachtiarica Bunge* essence as a rich source of Carvacrol, Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research of Iran, 20(4): 425-440.
23. Sharaf Zadeh, Sh., Khashkhoie, M. and Javidnia, K. 2008. The effects of nutrient ingredients on growth and effective component of *Thymus vulgaris* L. Iranian Horticulture Techniques and Sciences Journal, 9(4): 261-274.
24. Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidant activity by mean of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol, 299: 152-178.
25. Trouillas, P., Calliste, C.A. and Allais, D.P. 2003. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the limousine country side asherbal teas. Food Chemistry, 80: 399-407.

Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants, 5th Year, Volume Two, Summer 2017

Essential oil Screening and antioxidant activity of *Satureja bachtiarica* Bunge. population in Ilam Province for Isolation of Promising Chemotypes

Zarin Abaadi, M.M.[1], Seidi, M.[2]*, Mohammadi, Y.[3]

[1]Former M.Sc. student, Department of Horticulture, College of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran
[2]Associate Professor, Department of Horticulture, College of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran
[3]Assistant Professor, Department of Animal Sciences, College of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran

Received: 26-8-2017 ; Accepted: 8-4-2017

Abstract

This work carried out in order to evaluating of oil yield, phytochemical variation and antioxidant activity of essential oils in different populations of *Satureja bachtiarica* Bunge. In west of Iran. So the aerial parts of eight wild populations of this plant were collected from different regions of Ilam, Gilane-Gharb provinces and one sample was collected in greenhouse of Ilam University, during 2010 and 2011. The essential oils were obtained by hydro distillation method, were analyzed by GC/MS and the antioxidant activity of them were measured by DPPH assay. The analysis were showed that the populations had significant differences regarding yield, phytochemical composition and their antioxidant activity. Maximum and minimum oil yield were recorded from Shalam and Greenhouse populations, respectively. The main components of plant oil were thymol (39.28-87.30%), p-cymene (0.15-30.63%), γ-terpinene (2.04-14.71%) and carvacrol (0-8.41%). The Shalam population had the highest phytochemical diversity and then the Shalam, Soregeh, KabirKooh and Ghalaarang populations were the most similar populations according to their phytochemical composition. Cluster analysis of populations, which using Ward Algorithm were divided them into three chemotypes. The highest and lowest total phenols contents were recorded in Ghalaarang (292.5±0.91 mg Pyrocatechol/ml) and Gerdakaan (194.04 ±1.08 mg Pyrocatechol/ml) population, respectively. The antioxidant activity of these populations varied from 59.1±0.9 to 73.8±0.45 % in Green house and Badreh, respectively .The Shalam population had the highest (IC50=0.67 mg/ml) in comparison with synthetic antioxidant BHT (0.11 mg/ml). In cluster B including populations of Soregah, Ghalaarang, Shalam, KabirKooh, Renou, and Badreh were remarked for further domestication processes.

***Keywords*:** Antioxidant, Carvacrol, Gilan-e-Gharb, Ilam, Essential oil, *Satureja bachtiarica* Bunge., Thymol.

*Corresponding author; saidi490@yahoo.com, m.saidi@ilam.ac.ir