

ارزیابی تنوع برخی از شاخص‌های فیتوشیمیایی عصاره برگ در ژنوتیپ‌های مختلف گیاه زرشک (*Berberis*) در شمال غرب ایران

ناصر قلیزاده مقدم^۱، بهمن حسینی^{۲*}، ابوالفضل علیرضالو^۳

^۱دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی محصولات باغبانی، گروه علوم باغبانی،

دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

^۲دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

^۳استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۰۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۲۴

چکیده

در این تحقیق برگ تعداد ۲۸ ژنوتیپ از گیاه زرشک در اردیبهشت ۱۳۹۵ از شمال غرب کشور جمع آوری گردید. نمونه‌ها پس از عصاره‌گیری با دستگاه اولتراسونیک، از نظر صفات فیتوشیمیایی فنول کل (روش فولین سیوکالتیو)، فلاونوئید کل (روش کلرید آلومینوم)، کلروفیل a، b و کارتنوئید (روش لیچن تالر) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (روش FRAP و DPPH) مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین میزان فنول کل به ترتیب در ژنوتیپ‌های Z۸ و Z۱۹ به میزان ۷۵/۹۶ و ۱۳/۵۹ (میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک) می‌باشد. بیشترین و کمترین میزان فلاونوئید کل به ترتیب در ژنوتیپ‌های Z۲۰ و Z۱۹ به میزان ۱۴/۹۹ و ۲/۱۰ (میلی‌گرم کوئرستین بر صد گرم ماده خشک) مشاهده شد. بیشترین میزان کلروفیل a، b و کارتنوئید به ترتیب در ژنوتیپ‌های Z۳، Z۲۶، Z۸ به میزان ۲۶/۳۲، ۵/۳۷ و ۱۸/۸۶ (میلی‌گرم بر صد گرم ماده خشک) گزارش شد. بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روش FRAP به ترتیب مربوط به ژنوتیپ Z۸ به میزان ۴/۱۴ (میکرومول آهن بر گرم ماده خشک گیاه) بود. بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روش DPPH نیز متعلق به ژنوتیپ Z۶ به میزان ۹۲/۳۰ درصد بود و این که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با میزان فنول و فلاونوئید کل در عصاره‌های گیاه ارتباط مستقیم دارد و می‌توان از خواص آنتی‌اکسیدانی ژنوتیپ‌های Z۲۰ و Z۸ گیاه زرشک که از بیشترین میزان فنول و فلاونوئید کل برخوردارند، در صنایع غذایی و دارویی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: آذربایجان، آنتی‌اکسیدان، برگ زرشک، فنول، فلاونوئید، کارتنوئید

ژنوتیپ‌های مختلف زرشک، تفاوت‌های معنی‌داری از لحاظ خصوصیات مورد مطالعه دارند (Yildiz et al., 2014). متفاوت بودن خصوصیات فیتوشیمیایی در ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های مختلف، در سایر گیاهان دارویی نیز به اثبات رسیده است. در یک بررسی، خصوصیات فیتوشیمیایی گونه‌های مختلف مریم‌گلی (*Salvia officinalis*) در مکان‌های مختلف مورد تحقیق و آزمایش قرار گرفت (Maksimovic et al., 2007). در سایر مطالعات انجام گرفته در گیاهان دارویی از جمله برگ بو (*Laurus nobilis*)، آویش‌سن (*Thymus*)، دارچین (*Cinnamomum verum*)، نعناع (*Mentha*) و بومادران (*Achillea millefolium*) نتایج نشان داد که میزان مواد موثره این گیاهان تحت تاثیر ژنوتیپ و مکان جمع‌آوری می‌باشد (Marzouki et al., 2009; Horwath et al., 2008; Kumar et al., 2012; Chauhan et al., 2009; Ebrahimi et al., 2012). تنوع ژنتیکی، قابلیت بقای یک گونه و یا جمعیت را از طریق ایجاد توانایی سازگاری با تغییرات محیطی فراهم می‌کند. بنابراین تنوع ژنتیکی برای بقای طولانی مدت یک گونه ضروری است (Bataillon et al., 1996). ادامه روند افزایش تولید و بهبود کیفیت مواد غذایی بستگی به حفاظت و به‌کارگیری مؤثر منابع ژنتیکی دارد که با بهره‌برداری درست از آنها می‌توان ارقام مناسب‌تر گیاهی را تولید کرد. از طرفی بهبود خصوصیات مورفولوژیکی، بیولوژیکی و همچنین تغییر سطوح ترکیبات موثره، بستگی به وجود تنوع ژنتیکی دارد (Hazler-Pilepic et al., 2008). ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاهان اطلاعات مناسبی در مورد نحوه طبقه‌بندی ژنوتیپ‌های جمعیت در اختیار به‌نژادگران قرار می‌دهد. با توجه به اهمیت بررسی تنوع گیاهان دارویی که دارای مواد موثره ارزشمندی هستند. در این تحقیق خصوصیات فیتوشیمیایی برگ‌های

تیره زرشک (Berberidaceae) شامل ۱۵ جنس و ۶۵۰ گونه است که بیشتر آنها در مناطق معتدله نیمکره شمالی پراکنده‌اند. جنس زرشک (*Berberis*) دارای ۵۰۰ گونه است که شماری از آنها و از جمله زرشک زالزالکی، زرشک زرافشانی، زرشک خراسانی، زرشک راست خوشه، زرشک معمولی و زرشک ژاپنی در ایران وجود دارد (Alemardan et al., 2013).

برگ زرشک خوراکی به‌عنوان قابض و در درمان عوارض ناشی از فقدان ویتامین C نیز به کار می‌رود. همچنین برگ زرشک در اسهال مزمن، آب آوردن بافت‌ها و در اسکوربوت استفاده می‌شده است. ماده‌ای به نام متوکسی هیدونوکارپین در عصاره برگ زرشک وجود دارد که در ترکیب با بربرین می‌تواند برخی باکتری‌های مقاوم را نابود کند. طبق مطالعات انجام شده روی برگ زرشک، ترکیباتی مثل ویتامین C، ویتامین K، کربوهیدراتها، آلکالوئیدها و همچنین ترکیبات فلاونوئیدی است که مصرف پزشکی دارند (Imanshahidi and Hosseinzadeh., 2008; Zarei et al., 2015). آنالیز فیتوشیمیایی عصاره خام گونه *B. vulgaris* وجود آلکالوئیدها، تانن‌ها و ترکیبات فنولیک را در این گونه اثبات کرده است (Rounsaville and Ranney, 2010).

طبق مطالعه‌ای که در استان گلستان بر روی خصوصیات فنولوژیکی و فیتوشیمیایی (فلاونوئید تام، فنول تام، آنتوسیانین، آلکالوئیدها) اندام‌های مختلف زرشک بی‌دانه انجام گرفت، مشخص شد که میوه و برگ بیشترین مقدار متابولیت‌های ثانویه را دارا بودند (Mazandarani et al., 2013). همچنین در مطالعه دیگر خصوصیات فیزیکوشیمیایی، مواد موثره و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ۱۹ ژنوتیپ از زرشک بی‌دانه (*B. vulgaris*) جمع‌آوری شده از شمال شرقی آناتولی ترکیه را مورد آزمایش قرار دادند. نتایج نشان داد که

ژنوتیپ‌ها و گونه‌های مختلف زرشک در منطقه شمال غرب کشور که دارای تنوع وسیعی از این گیاه دارویی مهم می‌باشد، بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

مناطق پراکنش: شناسایی و پراکنش گونه‌ها در شمال غرب کشور با استفاده از منابع مختلف در این زمینه و بازدید از این مناطق در فصل بهار ۱۳۹۵ انجام شد. مشخصات مناطق مورد مطالعه مطابق جدول ۱ می‌باشد.

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی: در این مرحله ۲۸ نمونه برگ از ژنوتیپ‌های زرشک موجود در استان‌های آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی در خردادماه ۱۳۹۵ جمع‌آوری شد. نمونه‌های مذکور پس از برداشت، جهت شناسایی و انجام آزمایشات فیتوشیمیایی به گروه علوم باغبانی دانشگاه ارومیه منتقل شده و در شرایط آزمایشگاه با دمای 25°C ، خشک و نگهداری شدند.

عصاره‌گیری: نمونه‌های خشک شده برگ، بوسیله‌هاون چینی و نیتروژن مایع به‌صورت کامل پودر شده و عصاره‌گیری متانولی توسط دستگاه اولتراسونیک با اضافه کردن ۲۰ میلی‌لیتر محلول متانول ۸۰ درصد روی هر نمونه در دمای ۳۰ درجه و قدرت ۱۲۰ هرتز (Elmasonic) در مدت زمان ۳۰ دقیقه گردید. سپس نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی، فیلتر شدند.

اندازه‌گیری فنول کل: جهت اندازه‌گیری فنول کل از معرف فولین سیوکالتیو استفاده شد. ۱۰ میکرولیتر از عصاره متانولی موردنظر به میزان بیست برابر رقیق شد. سپس میزان ۹۰ میکرولیتر آب دیونیزه به میزان مشخصی از عصاره‌های رقیق شده اضافه گردید. در مرحله بعد میزان ۶۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتیو ۱۰ درصد به هریک از نمونه‌ها اضافه کرده

و به مدت ۵ الی ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در مرحله آخر میزان ۴۸۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد به هر یک از عصاره‌ها اضافه و به مدت ۳۰ الی ۴۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی قرار گرفت. قرائت جذبی محلول موردنظر در طول موج ۷۶۰ نانومتر به‌وسیله اسپکتروفتومتر (MODEL: UV2100 PC) انجام شد. آب دیونیزه به‌عنوان شاهد و گالیک‌اسید به‌عنوان استاندارد استفاده گردید. منحنی استاندارد بر اساس گالیک‌اسید، ترسیم و نتایج به‌صورت میلی‌گرم اکی‌والان گالیک‌اسید بر وزن خشک گیاه گزارش شد (Ebrahimzadeh et al., 2008).

اندازه‌گیری فلاونوئید کل: جهت اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل به مقدار ۸۰ میکرولیتر از عصاره متانولی مورد نظر، ۱۵۰ میکرولیتر نیتريت سدیم ۵ درصد اضافه کرده و بعد از مدت زمان ۵ دقیقه میزان ۳۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد اضافه شد. سپس بعد از مدت ۵ دقیقه میزان ۱ میلی‌لیتر محلول سود ۱ مولار بر روی هر نمونه اضافه کرده و با آب مقطر به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. طول موج جذبی محلول مورد نظر در طول موج ۳۸۰ نانومتر و نسبت به محلول شاهد قرائت شد. از محلول کوئرستین جهت رسم نمودار استاندارد استفاده شد و میزان فلاونوئید کل عصاره براساس میلی‌گرم (کوئرستین بر گرم) وزن خشک گیاه گزارش شد (Chang et al., 2002).

کاروتنوئید کل و کلروفیل a و b: جهت اندازه‌گیری میزان کلروفیل a، b و کاروتنوئید کل، میزان ۵۰ میلی‌لیتر متانول ۹۶ درصد به ۱ گرم از هر نمونه پودر شده اضافه گردید. سپس به مدت ۱ دقیقه در دور rpm ۱۰۰۰ سانتریفیوژ کرده و با کاغذ صافی دولایه صاف شدند. محلول بدست آمده به مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۲۵۰۰ سانتریفیوژ گردید. فاز رویی جداسازی و جذب محلول در طول موج‌های ۶۶۶، ۶۵۳ و ۴۷۰ نانومتر

نسبت به شاهد (متانول ۹۶ درصد) اندازه‌گیری شد. استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه گردید (Dere et al., 1998).
میزان کاروتنوئید و کلروفیل a و b برای هر عصاره با

Ca=15.65 A666 - 7.340 A653
Cb=27.05 A653 - 11.21 A666
Cx+c = 1000 A470 - 2.860 Ca - 129.2 Cb/245

جدول ۱: مناطق جمع‌آوری جمعیت‌های مختلف زرشک

ارتفاع (متر)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	محل جمع‌آوری	ژنوتیپ
۱۴۰۴	۴۵° ۰۸' ۴۱"	۳۷° ۲۰' ۲۶"	آذربایجان غربی / خان دره	<i>B. carataegina</i>
۱۳۵۷	۴۵° ۰۵' ۰۰"	۳۸° ۰۵' ۷۵"	آذربایجان غربی / مقتتالو	<i>B. vulgaris</i>
۱۵۰۶	۴۵° ۲۷' ۳۵"	۳۶° ۵۳' ۱۰"	آذربایجان غربی / نقده	<i>B. vulgaris</i>
۱۲۷۸	۴۵° ۲۱' ۱۳"	۳۸° ۱۵' ۵۵"	آذربایجان شرقی / قره تپه	<i>B. vulgaris</i>
۱۳۲۸	۴۴° ۴۵' ۲۷"	۳۸° ۱۴' ۱۷"	آذربایجان غربی / مقانجوق	<i>B. vulgaris</i>
۱۴۲۷	۴۵° ۲۱' ۳۳"	۳۸° ۲۲' ۲۵"	آذربایجان شرقی / امستجان	<i>B. vulgaris</i>
۱۳۹۲	۴۵° ۴۱' ۱۹"	۳۸° ۱۰' ۲۹"	آذربایجان شرقی / شبستر	<i>B. vulgaris</i>
۱۳۲۶	۴۵° ۵۶' ۴۷"	۳۸° ۱۵' ۴۰"	آذربایجان شرقی / صوفیان	<i>B. vulgaris</i>
۱۳۹۰	۴۵° ۵۶' ۰۳"	۳۸° ۱۹' ۲۰"	آذربایجان شرقی / مرند	<i>B. vulgaris</i>
۱۳۲۱	۴۵° ۴۸' ۲۱"	۳۸° ۴۹' ۳۱"	آذربایجان شرقی / داران	<i>B. integerima</i>
۹۸۰	۴۵° ۵۰' ۱۲"	۳۸° ۵۴' ۱۹"	آذربایجان شرقی / جلفا	<i>B. integerima</i>
۶۴۵	۴۶° ۰۰' ۲۷"	۳۸° ۵۲' ۰۶"	آذربایجان شرقی / سیه رود	<i>B. integerima</i>
۶۰۱	۴۶° ۱۰' ۰۱"	۳۸° ۵۰' ۱۲"	آذربایجان شرقی / جرجن	<i>B. integerima</i>
۵۳۹	۴۶° ۱۳' ۵۵"	۳۸° ۵۱' ۴۵"	آذربایجان شرقی / دوزال	<i>B. integerima</i>
۵۳۹	۴۶° ۲۳' ۲۱"	۳۸° ۵۰' ۵۴"	آذربایجان شرقی / اوشتین	<i>B. integerima</i>
۳۹۷	۴۷° ۰۱' ۴۵"	۳۹° ۰۹' ۵۱"	آذربایجان شرقی / خومارلو	<i>B. integerima</i>
۴۱۰	۴۷° ۰۳' ۴۸"	۳۸° ۴۸' ۳۹"	آذربایجان شرقی / کلیبر	<i>B. integerima</i>
۱۳۷۹	۴۶° ۵۴' ۵۹"	۳۸° ۵۳' ۳۶"	آذربایجان شرقی / عاشقلو	<i>B. integerima</i>
۱۳۹۴	۴۶° ۰۹' ۲۸"	۳۸° ۱۲' ۱۶"	آذربایجان شرقی / امد	<i>B. vulgaris</i>
۱۳۶۳	۴۵° ۵۹' ۴۵"	۳۸° ۰۴' ۱۱"	آذربایجان شرقی / تبریز	<i>B. vulgaris</i>
۱۳۴۸	۴۶° ۴۹' ۳۱"	۳۸° ۵۳' ۵۷"	آذربایجان شرقی / عاشقلو	<i>B. integerima</i>
۱۳۶۹	۴۷° ۰۰' ۰۰"	۳۸° ۵۰' ۱۳"	آذربایجان شرقی / عاشقلو	<i>B. integerima</i>
۱۴۷۸	۴۶° ۰۵' ۳۳"	۳۷° ۵۶' ۰۵"	آذربایجان شرقی / اسکو	<i>B. vulgaris</i>
۱۸۱۵	۴۵° ۵۷' ۳۸"	۳۷° ۳۸' ۲۳"	آذربایجان شرقی / آذرشهر	<i>B. vulgaris</i>
۱۱۴۰	۴۶° ۱۰' ۳۰"	۳۷° ۲۹' ۰۲"	آذربایجان شرقی / عجبشیر	<i>B. vulgaris</i>
۱۴۵۰	۴۷° ۳۳' ۱۲"	۳۸° ۲۳' ۳۵"	اردبیل / هیتق	<i>B. vulgaris</i>
۱۶۳۱	۴۶° ۱۷' ۴۸"	۳۷° ۲۸' ۲۹"	آذربایجان شرقی / مراغه	<i>B. vulgaris</i>
۱۳۸۷	۴۸° ۱۴' ۰۸"	۳۷° ۲۸' ۲۹"	اردبیل / آق کند	<i>B. vulgaris</i>

جدول ۲: تجزیه واریانس خصوصیات فیتوشیمیایی ژنوتیپ‌های زرشک در مناطق مختلف

میانگین مربعات (Mean of square)					درجه	منابع
کلروفیل b	کلروفیل a	کاروتنوئید کل	فلاونوئید کل	فنل کل	آزادی	تغییرات
۴/۴۴**	۱۱۳/۸۳**	۳۸/۰۸**	۲۵/۷۶**	۶۸۹/۷۲**	۲۷	ژنوتیپ
۰/۱۴	۰/۰۵۹	۰/۱۴	۰/۱۸	۳/۶۰	۵۶	اشتباه
۱۶/۷	۱/۵۳	۱۶/۰۷	۴/۷۵	۴/۰۱		CV%

** معنی داری در سطح احتمال یک درصد

جدول ۳: میزان ترکیبات فیتوشیمیایی ژنوتیپ‌های زرشک

کلروفیل b	کلروفیل a	کاروتنوئید کل	فلاونوئید کل	فنول * کل	محل جمع آوری	ژنوتیپ
۴/۳۵۴	۱۹/۸۱	۱۴/۷۷	۱۲/۱۱۲	۶۳/۷۴۱	آذربایجان غربی / خان دره	Z1 <i>B.carataegin</i>
۱/۸۶۶	۲۴/۳۱۸	۸/۲۵۴	۶/۴۱۲	۳۱/۶۳۲	آذربایجان غربی / مقینالو	Z2 <i>B.vulgaris</i>
۳/۷۰۴	۲۶/۳۱۶	۱۲/۰۷۷	۹/۹۵	۴۷/۸۷۷	آذربایجان غربی / نقده	Z3 <i>B.vulgaris</i>
۱/۳۷۰	۱۲/۶۹۰	۱۳/۳۶۹	۱۰/۴۵۴	۵۷/۶۱۹	آذربایجان شرقی / قره تپه	Z4 <i>B.vulgaris</i>
۲/۳۵۴	۱۲/۷۷۶	۱۲/۹۶۲	۱۳/۶	۷۲/۶۳۹	آذربایجان غربی / مقانچوق	Z5 <i>B.vulgaris</i>
۱/۹۲۹	۱۷/۷۲۰	۱۱/۰۰۳	۱۲/۲۷۵	۷۳/۳۴۶	آذربایجان شرقی / امستجان	Z6 <i>B.vulgaris</i>
۰/۹۸۱	۱۳/۱۱۰	۱۷/۷۰۹	۱۲/۱۲۵	۵۸/۱۶۳	آذربایجان شرقی / شبستر	Z7 <i>B.vulgaris</i>
۱/۶۵۸	۱۲/۹۲۷	۱۸/۸۶۱	۱۳/۳۶۶	۷۵/۹۵۹	آذربایجان شرقی / صوفیان	Z8 <i>B.vulgaris</i>
۲/۹۴۱	۱۹/۷۱۵	۹/۷۴۰	۷/۹۶۲	۴۹/۱۲۹	آذربایجان شرقی / مرند	Z9 <i>B.vulgaris</i>
۱/۰۵۷	۲۳/۵۹۲	۱۰/۲۰۹	۷/۷۱۲	۳۶/۱۲۲	آذربایجان شرقی / داران	Z10 <i>B.integerima</i>
۱/۸۶۲	۱۴/۶۴۹	۷/۴۰۱	۸/۰۱۶	۳۸/۹۷۹	آذربایجان شرقی / جلفا	Z11 <i>B.integerima</i>
۰/۶۰۷	۱۶/۰۳۶	۱۸/۰۳۸	۸/۲۰۴	۴۳/۰۰۶	آذربایجان شرقی / سیه رود	Z12 <i>B.integerima</i>
۲/۴۰۱	۲۴/۳۶۲	۱۲/۸۶۰	۸/۱	۳۹/۱۷۰	آذربایجان شرقی / جرجن	Z13 <i>B.integerima</i>
۱/۷۴۸	۲۵/۰۳۱	۱۴/۱۵۴	۷/۱۲۹	۳۶/۱۴۹	آذربایجان شرقی / دوزال	Z14 <i>B.integerima</i>
۰/۵۵۷	۱۱/۷۲۵	۸/۳۰۱	۵/۶۵	۳۳/۰۲۰	آذربایجان شرقی / اوشتین	Z15 <i>B.integerima</i>
۱/۲۳۸	۱۴/۷۳۰	۱۴/۰۷۲	۸/۸۲۵	۳۸/۷۳۴	آذربایجان شرقی / خومارلو	Z16 <i>B.integerima</i>
۱/۵۳۳	۴/۹۱۷	۱۱/۸۹۱	۸/۵۳۷	۴۵/۲۶۵	آذربایجان شرقی / کلیبر	Z17 <i>B.integerima</i>
۲/۵۷۶	۲۱/۲۸۹	۸/۷۳۷	۱۰/۱۲۵	۴۷/۴۱۴	آذربایجان شرقی / عاشقلو	Z18 <i>B.integerima</i>
۱/۸۱۲	۶/۵۰۵	۲/۶۸۴	۲/۱۰۴	۱۳/۵۹۱	آذربایجان شرقی / امند	Z19 <i>B.vulgaris</i>
۱/۴۸۰	۱۱/۱۹۷	۱۳/۵۸۱	۱۴/۹۸۷	۷۲/۷۷۵	آذربایجان شرقی / تبریز	Z20 <i>B.vulgaris</i>
۲/۸۹۵	۸/۷۹۶	۱۱/۹۰۳	۹/۱۱۶	۴۵/۹۴۵	آذربایجان شرقی / عاشقلو	Z21 <i>B.integerima</i>
۳/۱۵۱	۱۲/۱۸۱	۱۲/۱۳۴	۶/۷۷۹	۳۳/۱۲۹	آذربایجان شرقی / عاشقلو	Z22 <i>B.integerima</i>
۲/۴۸۳	۲۵/۳۷۴	۱۵/۶۷۱	۱۲/۷۷۹	۶۳/۳۳۳	آذربایجان شرقی / اسکو	Z23 <i>B.vulgaris</i>
۲/۹۰۹	۱۳/۰۶۶	۱۵/۲۷۰	۷/۶۳۷	۳۸/۴۰۸	آذربایجان شرقی / آذرشهر	Z24 <i>B.vulgaris</i>
۵/۱۹۴	۱۹/۳۶۸	۱۴/۴۶۸	۶/۱۵۴	۳۳/۰۲۰	آذربایجان شرقی / عجبشیر	Z25 <i>B.vulgaris</i>
۵/۳۷۶	۱۳/۴۵۶	۹/۵۷۶	۴/۹	۳۷/۵۳۷	اردبیل / هیق	Z26 <i>B.vulgaris</i>
۲/۴۲۷	۱۰/۴۲۳	۱۵/۰۵۹	۸/۳۲۹	۴۹/۸۶۳	آذربایجان شرقی / مراغه	Z27 <i>B.vulgaris</i>
۲۳/۰۸۷	۷/۴۹۰	۱۵/۱۰۴	۸/۳۱۶	۴۹/۹۴۵	اردبیل / آق کند	Z28 <i>B.vulgaris</i>
۰/۶۳	۰/۳۹	۰/۳۴	۰/۶۹	۳/۱۰		LSD

فنول کل (mg GAE/g DW)، فلاونوئید کل (mg/g DW)، کاروتنوئید کل (μg/g DW)، کلروفیل a و b (μg/g)

۳۰ دقیقه در دمای °C ۲۵ قرار داده شد. قرائت جذبی محلول مورد نظر در طول موج ۵۱۷ نانومتر نسبت به شاهد (Blank) که در تهیه آن نیز در روش بالا بجای عصاره از اتانول ۸۰ درصد استفاده شده بود، انجام گرفت (Nakajima et al., 2004).

جهت محاسبه فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH از فرمول زیر استفاده شد

$$\text{RSA} = \frac{(\text{Abs control})t = 30 \text{ min} - (\text{Abs sample})t = 30 \text{ min}}{(\text{Abs control})t = 30 \text{ min}} \times 100$$

Abs blank: میزان جذب Blank

Abs sample: میزان جذب نمونه

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های بدست آمده در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی بوسیله نرم‌افزار SAS آنالیز شدند. از آزمون LSD جهت محاسبات مقایسه میانگین داده‌ها و کلاستر بندی داده‌ها بر اساس روش Ward و معیار مربع فواصل اقلیدسی انجام گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP: میزان ۵۰ میکرولیتر از عصاره‌های متانولی مورد نظر را به ۳ میلی‌لیتر محلول معرف FRAP (بافر استات سدیم ۳۰۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۳/۶، فریک-تریس پریدیل-است-ریازین و فریک کلرید) که به صورت تازه تهیه شده است اضافه شد. سپس محلول حاصل را داخل حمام بن ماری به مدت ۳۰ دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم. قرائت جذبی محلول مورد نظر در طول موج ۵۹۳ نانومتر نسبت به محلول شاهد انجام گرفت. جهت رسم نمودار استاندارد از سولفات آهن استفاده گردید و نتایج به صورت میلی مول Fe^{2+} بر گرم وزن خشک بیان شد (Zugic et al., 2014).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH: جهت سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH میزان ۲۰ میکرولیتر از عصاره ۵ برابر رقیق شده متانولی به ۲ میلی‌لیتر محلول DPPH اضافه گردید. محلول حاصل با دور متوسط همزده شد و به مدت

جدول ۴: تجزیه واریانس خصوصیات آنتی‌اکسیدانی ژنوتیپ‌های مختلف زرشک

میانگین مربعات (Mean of square)		درجه آزادی	منابع تغییرات
فعالیت آنتی‌اکسیدانی (FRAP)	فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH)		
۱/۵۰**	۷۵۷/۷۹**	۲۷	ژنوتیپ
۰/۰۳	۵/۴۷	۵۶	اشتباه
۸/۱۳	۳/۲۸		CV%

** معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد

Z۸ (آذربایجان شرقی - صوفیان) به میزان (mg/g) ۷۵/۹۶ (DW) و کمترین مقدار فنول کل مربوط به ژنوتیپ Z۱۹ (آذربایجان شرقی - امند) به میزان (mg/g) ۱۳/۵۶ (DW) می‌باشد.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان می‌دهد که میزان فلاونوئید کل ژنوتیپ‌های مختلف زرشک در

نتایج

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس فنول کل ژنوتیپ‌های زرشک نشان می‌دهد که میزان فنول کل ژنوتیپ‌های زرشک در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار هستند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان می‌دهد که بیشترین مقدار فنول کل مربوط به ژنوتیپ

آذربایجان شرقی - صوفیان) و کمترین فعالیت آنتی اکسیدانی به میزان $1/003 (\mu\text{mol Fe}^{++}/\text{g DW})$ مربوط به ژنوتیپ Z19 (آذربایجان شرقی - امند) بود. همچنین طبق نتایج از جدول تجزیه واریانس میزان فعالیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH نیز همانند روش FRAP در سطح احتمال یک درصد معنی دار می باشد. میزان فعالیت آنتی اکسیدانی ژنوتیپ های زرشک به روش DPPH نیز متغیر می باشد و بیشترین مقدار مربوط به ژنوتیپ Z6 (آذربایجان شرقی - امستجان) به میزان $92/30$ درصد و کمترین مقدار مربوط به ژنوتیپ Z19 (آذربایجان شرقی - امند) به میزان $33/09$ درصد بود.

دسته بندی جمعیت ها: برای ترسیم دندروگرام داده های فیتوشیمیایی گونه ها و ژنوتیپ های زرشک از روش Ward استفاده شد. نتایج نشان داد که ژنوتیپ های مختلف در چهار گروه اصلی شامل گروه یک (Z1, Z23, Z4, Z7, Z5, Z20, Z8, Z6)، گروه دو (Z2, Z13, Z14, Z11, Z24, Z3, Z9, Z18)، گروه سه (Z10, Z25, Z15, Z26, Z16, Z22, Z12, Z21, Z17, Z28, Z27) و گروه چهار (Z19) می باشند. بیشترین فاصله مربوط به سه ژنوتیپ Z3 از یک گروه و دو ژنوتیپ Z10 و Z25 از یک گروه دیگر می باشد و کمترین فاصله مربوط به دو ژنوتیپ Z5 و Z20 از یک گروه می باشد. ژنوتیپ های Z5 و Z20 در مولفه های میزان فنول کل، میزان فلاونوئید کل و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی دارای مقادیر بالا و مشابه به هم بودند. ژنوتیپ های Z3، Z10 و Z25 دارای میزان های کمتری از فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی اکسیدانی بودند.

در این پژوهش تجزیه و تحلیل چند متغیره، به منظور دسته بندی نمونه ها با توجه به خصوصیات فیتوشیمیایی (فنول کل، فلاونوئید کل، کارتنوئید کل و کلروفیل a و b) و فعالیت آنتی اکسیدانی (با روش

سطح احتمال یک درصد معنی دار بوده و همچنین نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده ها نشان می دهد که میزان فلاونوئید کل ژنوتیپ های زرشک از $(\text{mg}/100\text{g DW})$ $2/10$ مربوط به کد Z19 واقع در (استان آذربایجان شرقی - امند) تا $(\text{mg}/100\text{g DW})$ $14/99$ مربوط به کد Z20 واقع در (استان آذربایجان شرقی - تبریز) متغیر می باشد.

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس کلروفیل a و b و کارتنوئید نشان می دهد که تفاوت ژنوتیپ های زرشک در سطح احتمال یک درصد معنی دار می باشد و همچنین نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان می دهد که بیشترین مقدار کلروفیل a مربوط به ژنوتیپ Z3 (آذربایجان غربی - نقده) به میزان $(\text{mg}/100\text{g DW})$ $26/32$ و کمترین مقدار مربوط به ژنوتیپ Z17 (آذربایجان شرقی - کلیبر) به میزان $(\text{mg}/100\text{g DW})$ $4/91$ می باشد. همچنین بیشترین مقدار کلروفیل b به میزان $(\text{mg}/100\text{g DW})$ $5/37$ مربوط به ژنوتیپ Z26 (اردبیل - هیتق) و کمترین میزان $(\text{mg}/100\text{g DW})$ $0/55$ مربوط به ژنوتیپ Z15 (آذربایجان شرقی - اوشتین) می باشد. همچنین بیشترین و کمترین میزان کارتنوئید ژنوتیپ های زرشک به ترتیب مربوط به ژنوتیپ های Z8 (آذربایجان شرقی - صوفیان) و Z19 (آذربایجان شرقی - امند) به میزان $(\text{mg}/100\text{g DW})$ $18/86$ و $(\text{mg}/100\text{g DW})$ $2/68$ می باشند.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس میزان فعالیت آنتی اکسیدانی ژنوتیپ های زرشک به روش FRAP نشان می دهد که میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در ژنوتیپ های زرشک در سطح احتمال یک درصد معنی دار است. میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در ژنوتیپ های زرشک طبق روش FRAP متغیر بوده و شامل بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی به میزان $(\mu\text{mol Fe}^{++}/\text{g DW})$ $4/14$ مربوط به ژنوتیپ Z8

FRAP و DPPH) انجام شد. با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ۷ متغیر اولیه در قالب دو متغیر جدید (دو مؤلفه اصلی) تعیین شدند که این دو مؤلفه در مجموع ۷۱ درصد (۵۲ درصد برای مؤلفه اول و ۱۹ درصد برای مؤلفه دوم) از تغییرات کل را توجیه نمودند. اولین مؤلفه همبستگی بالایی با محتوای فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (FRAP و DPPH) برگ‌های زرشک داشت. همچنین دومین مؤلفه همبستگی بالایی با کلروفیل a و b داشت.

بحث

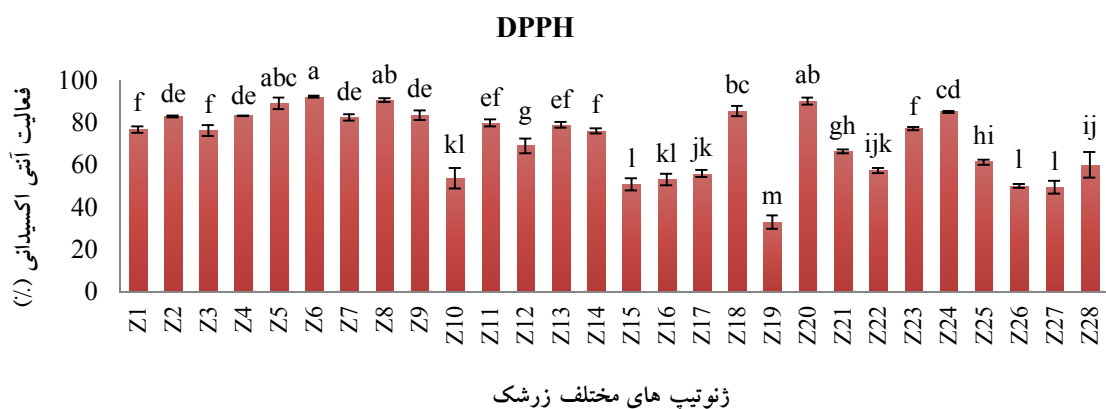
در تحقیق حاضر میزان فنول کل ۱۳/۵۹ الی ۷۵/۹۶ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک متغیر بود که تا حدودی با سایر نتایج گزارش شده مطابقت داشت. در مطالعه‌ای که به بررسی میزان فنول کل در اندام‌های مختلف زرشک پرداختند و نشان داده شد که میزان فنول کل از (mg/g DW) ۱۰/۳۴ تا ۵۲/۵۴ متغیر می‌باشد (Zovko Koncic et al., 2010). همچنین آن‌ها نشان دادند که میزان فنول کل در برگ‌ها بیشتر از سایر اندام‌های زرشک است. متفاوت بودن میزان فلاونوئید در سایر مطالعات نیز به اثبات رسیده است که با تحقیق حاضر مطابقت داشت. بررسی‌های انجام شده روی اندام‌های مختلف زرشک نشان داد که میزان فلاونوئید کل از (mg/g DW) ۰/۲۴ تا ۴/۲۳ متغیر می‌باشد و بیشترین میزان فلاونوئید کل در اندام برگ بود (Zovko et al., 2010). بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی زرشک نشان می‌دهد که این خاصیت به علت ترکیبات فنولی است (Farag et al., 2003; Hanachi and Golkho., 2009).

طبق مطالعات انجام شده روی برخی گونه‌های زرشک مشخص شد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با میزان فلاونوئید و فنول ارتباط مستقیم دارد (Motalleb et al., 2005). در مطالعه دیگری که صورت گرفت میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ارتباط

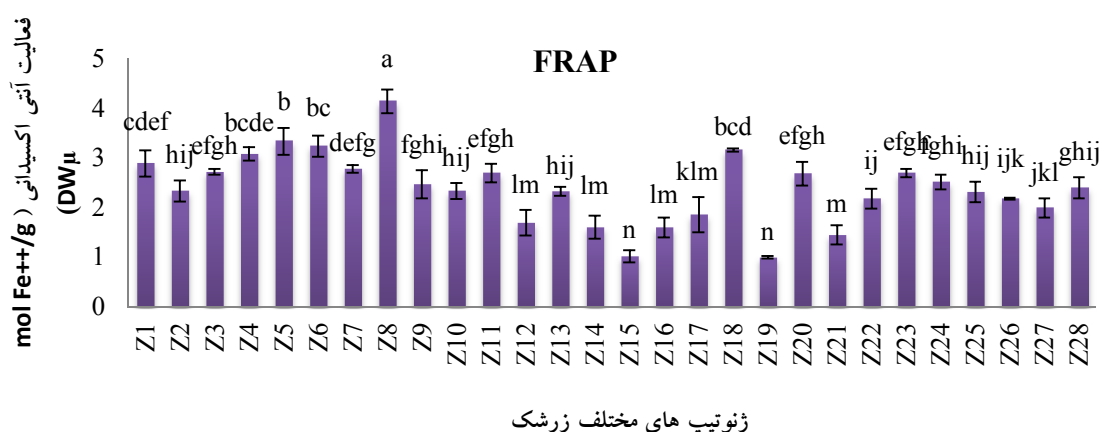
مستقیم با فنول کل می‌باشد و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی رابطه ضعیفی با میزان فلاونوئید کل دارد (Zovko et al., 2010). مطالعات دیگری نشان می‌دهد که علاوه بر ترکیبات فنولیک فاکتورهای دیگری نیز روی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان تأثیر دارند (Grassmann, 2005). در این مطالعه میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ژنوتیپ‌های زرشک با میزان فنول کل و فلاونوئید کل در ارتباط مستقیم می‌باشد. میزان ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدهای موجود در ژنوتیپ‌های زرشک علاوه بر ارتباط به گونه‌های مختلف تحت تأثیر اقلیم مناطق مختلف نیز می‌باشد. طبق مطالعه انجام گرفته روی اندام‌های مختلف زرشک نشان داده شد که بیشترین میزان فنول مربوط به اندام میوه و سپس گل و برگ می‌باشد و همچنین بیشترین میزان فلاونوئید مربوط به اندام برگ می‌باشد (مازندرانی و همکاران، ۱۳۹۲). مهمترین ترکیبات فلاونوئیدی زرشک شامل سه ترکیب روتین، کوئرستین و کامفرول می‌باشد (Zovko et al., 2010). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که عوامل محیطی مانند میزان بارش و میانگین دما و همچنین غلظت عناصر غذایی موجود در خاک می‌توانند سطح ترکیبات پلی‌فنولیک برگ را تغییر دهند (Rezende et al., 2015). در مطالعه دیگری که صورت گرفت نشان داده شد که ژنوتیپ‌ها اثرات متفاوتی بر روی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند (Scalzo et al., 2005).

طی تحقیقی که اثر ژنوتیپ و سال برداشت بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان میوه مورتیلا انجام شد نشان داد که علاوه بر ژنوتیپ، فصل برداشت، میزان بارش و سایر عوامل زنده و غیرزنده نیز بر روی میزان فنول کل و خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان تأثیر دارند (Alfaro et al., 2013). نتایج این تحقیق نشان داد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با میزان فنول کل و فلاونوئید کل رابطه مستقیم دارد. همچنین میزان فنل کل و فلاونوئید کل علاوه بر ژنوتیپ تحت

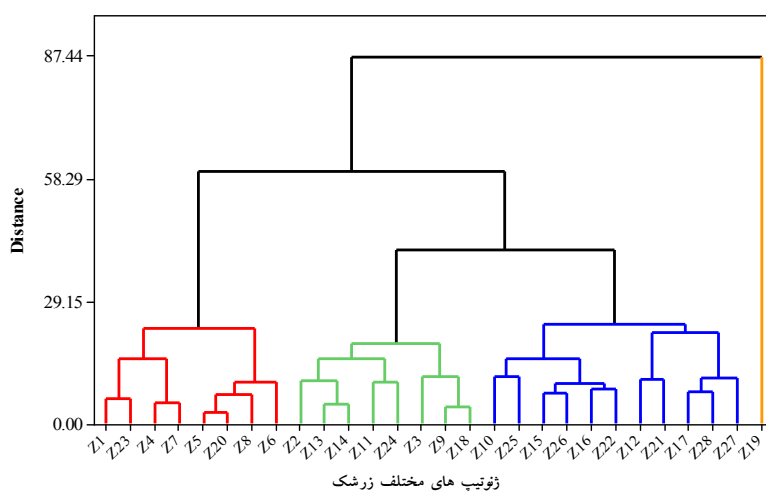
تأثیر عوامل محیطی از قبیل میزان بارش و میانگین دمای دارد. همچنین میزان فنول کل و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی به عوامل زنده، مواد مغذی خاک و زمان برداشت نیز در ارتباط است.



شکل ۱: مقایسه میانگین خصوصیات آنتی اکسیدانی (DPPH) ژنوتیپ های مختلف زرشک



شکل ۲: مقایسه میانگین خصوصیات آنتی اکسیدانی (FRAP) ژنوتیپ های مختلف زرشک



شکل ۳: دندروگرام ژنوتیپ های مختلف زرشک بر اساس خصوصیات فیتوشیمیایی

- Polymorphic DNA markers. Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research, 3(4): 69-73.
8. Ebrahimzadeh, M.A., Hosseinimehr, S.J., Hamidinia, A. and Jafari, M. 2008. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Feijoa sallowiana* fruits peel and leaves. Journal of Pharmacol-online, 1: 7-14.
 9. Farag, R.S. El-Baroty, G.S. and Basuny, A.M. 2003. The influence of phenolic extracts obtained from the olive plant (cv. Picual and Kronakii), on the stability of sunflower oil. International Journal of Food Science and Technology, 102:46-52.
 10. Fatehi, M., Saleh, T.M., Fatehi-Hassanabad, Z., Farrokhfal, Kh., Jafarzadeh, M. and Davodi, S. 2005. A pharmacological study on *Berberis vulgaris* fruit extract. Journal of Ethno pharmacology, 102(1): 46-52.
 11. Grassmann, J. 2005. Terpenoids as plant antioxidants. Vitam. Horm. 72: 505-535.
 12. Hanachi, P., and Golkho, Sh. 2009. Using Hplc to determine the composition and antioxidant activity of *Berberis vulgaris*. European Journals Publishing, 29(1): 47-54.
 13. Hazler Pilepic, K., Males, Z. and Plazibat, M. 2008. Genetic structure in *Hypericum perforatum* L. Population. Periodicum Biologorum. 110(4): 367-3710.
 14. Horwath, A.B., Grayer, R.J., Keith-Lucas, D.M. and Simmonds, M.S.J. 2008. Chemical characterization of wild population of *Thymus* from different climatic regions in southeast Spain. Biochemical Systematics and Ecology, 36:117-133.
 15. Kumar A., Jhadwal, N., Lal, M. and Singh, M. 2012. Antibacterial activity of some medicinal plants used against UTI causing pathogens. Journal of Life science and Pharma Research. 4: 278-83.
 16. Imanshahidi, M. and Hosseinzadeh, H. 2008. Pharmacological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine. Phytother Res, 22: 999-1012.
 17. Maksimovic, M., Vidic, D., Milos, M., Editasolic, M., Abadzic, S. and Siljak-yakovley, S., 2007. Effect of the environmental condition on essential oil profile in two Dinaric *Salvia* species: *S. brachyodon* Vandas and *S. officinalis* L. Biochemical Systematics and Ecology, 35: 437-478.
 18. Marzouki, H., Elaissi, A., Khaldi, A., Bouzid, S., Falconieri, D., Marongiu, B., Piras, A. and Porcedda, S., 2009. Seasonal and geographical variation of *Laurus nobilis* L. essential oil from Tunisia. Open Nat. Prod. J., 2: 86-91.
 19. Mazandarani, M., Ghasemi, N., Bayat, H., 2013. Investigation of secondary active compounds of medical plant (*Berberis vulgaris* L) and its comparison among different part of the plant in South East of Golestan province. Plant Environmental Physiology, 8: 59-70.
 20. Motalleb, G., Hanachi, P., Kua, S.H., Fauziah, O. and Asmah, R. 2005. Evaluation of phenolic content and total antioxidant activity in *Berberis vulgaris* fruit extract. Journal of Biological Sciences, 5: 648-653.
 21. Neel, M.C. and Ellstr N.C. 2003. Conservation of genetic diversity in the endangered plant *Eriogonum ovalifolium* var. *vineum* (Polygonaceae). Journal of Conservation Genetics, 37: 352-354.
 22. Nakajima, J.I., Tanaka, I., Seo, S., Yamazaki, M. and Saito, K. 2004. LC/PDA/ESI-MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries. Journal of BioMed Research International, 5: 241-247.
 23. Rezende V.L., Oliveira-Filho A.T., Eisenlohr P.V., Kamino L.H.Y. and Vibrans A.C. 2015. Restricted geographic distribution of tree species calls for urgent conservation efforts in the Subtropical Atlantic Forest. Biodiversity and Conservation 24: 1057-1071.
 24. Rounsaville T.J. and Ranney T.G. 2010. Ploidy levels and genome sizes of *Berberis* L. and *Mahonia* nutt. Species, hybrids, and cultivars. Hort science, 45: 1029-1033.

25. Scalzo, J., Mezzetti, B. and Battino, M. 2005. Total antioxidant capacity evaluation: Critical steps for assaying berry antioxidant features. *Biofactors*, 23: 221–227.
26. Yildiz, H., Ercisli, S., Sengul, M., Topdas, E.F., Beyhan, O., Cakir, O., Narmanlioglu, HK. And Orhan, E. 2014. Some Physicochemical Characteristics, Bioactive Content and Antioxidant Characteristics of Non-Sprayed Barberry (*Berberis vulgaris* L.) Fruits from Turkey. *Erwerbs-Obstbau*, 56: 123-129.
27. Zarei, A., Changizi-Ashtiyani, S., a Taheri, S. and Ramezani, M. 2015. A quick overview on some aspects of endocrinological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* L. *Avicenna J Phytomed*, 5 (6): 485-497.
28. Zovko Koncic, M., Kremer, D., Schühly, W., Brantner, A., Karlovic, K. and Kalodera, Z. 2010. Chemical differentiation of *Berberis croatica* and *B. vulgaris* using HPLC fingerprinting. *Croatica Chemica Acta*, 83: 451–456.
29. Zugic, A., Đorđević, S., Arsic, I., Markovic, G., Zivkovic, J., Jovanovic, S. and Tadic, V. 2014. Antioxidant activity and phenolic compounds in 10 selected herbs from Vrujci Spa, Serbia. *Journal of Industrial Crops and Products*, 52: 519-527.

Evaluation of diversity in some phytochemical characteristics in leaf extract among some genotypes of *Berberis* species in North West of Iran

Gholizadeh Mogadam, N.¹, Hosseini, B.^{2*}, Alirezalu, A.³

¹M.Sc. student of Biotechnology and Molecular Genetics of Horticultural Products, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

²Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

³Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 26-4-2017 ; Accepted: 14-6-2017

Abstract

In this study the leaves of 28 genotypes of *Berberis* were collected in May 2016 from North West of Iran. The samples were extracted by ultrasonic technique, total phenol, flavonoid, chlorophyll a, b and carotenoid were measured by folin ciocalteu, aluminum chloride and Litchenthaler method, respectively. The antioxidant capacity were evaluated differently by using FRAP and DPPH methods. The results were showed that the highest and the lowest total phenol content, were observed respectively, in genotypes Z8 and Z19 (75.96 - 13.59 mg GAE / gram dry weight), respectively. The highest and the lowest total flavonoid were respectively in genotypes Z20 and Z19 (14.99 - 2.10 mg / 100 grams of dry matter). The highest of chlorophyll a, b and carotenoid were observed in genotypes Z3, Z26, Z8 respectively (26.32 - 5.37 and 18.86 mg dry matter). The highest antioxidant activity in DPPH was observed in Z6 genotype (92.30%) and in FRAP method with 4.14 μ mol of iron per gram of dry matter was reported in Z8 genotype, respectively. According to these results it was found that the antioxidant activity correlated with total phenol and flavonoid contents and can be used these genotypes as a good natural antioxidant in pharmaceutical industry's.

Keywords: Antioxidant, Azerbaijan, *Berberis* genotype, Carotenoid, Flavonoid, Phenol

*Corresponding author; b.hosseini@urmia.ac.ir