ارزیابی تغییرات فیتوشیمیایی، مورفولوژیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی جمعیت‌های گیاه بیلهر (*Dorema aucheri*) کشت شده در محیط‌های مختلف

ابوالقاسم اکبریان[1]، مهدی رحیم‌ملک[2]*، محمدرضا سبزعلیان[2]، قدرت‌اله سعیدی[3]

۱- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشیار اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استاد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
* آدرس مکاتبه: اصفهان، دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات
کدپستی: ۸۴۱۵۶۸۳۱۱۱، تلفن: ۳۹۱۳۳۴۸ (۰۳۱۳)، نمابر: ۳۹۱۲۲۵۴ (۰۳۱۳)
پست الکترونیک: mrahimmalek@cc.iut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۱۲ **تاریخ تصویب:**۹۵/۸/۱۶

چکیده

مقدمه: بیلهر یا کندل کوهی با نام علمی ***Dorema aucheri*** متعلق به تیره چتریان و از جمله گیاهان دارویی انحصاری ایران می‌باشد. با توجه به خطر انقراض این گونه ارزشمند گیاهی تاکنون بررسی جامعی بر روی اثر ویژگی‌های اقلیمی بر صفات مختلف در جمعیت‌های گیاه بیلهر در مناطق مختلف جغرافیایی انجام نگرفته است.

هدف: بررسی تغییرات صفات مورفولوژیک، فیتوشیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در جمعیت‌های بیلهر کشت شده در محیط‌های مختلف بود.

روش بررسی: این تحقیق در قالب طرح آزمایشی بلوک کامل تصادفی در سه تکرار در نیمه دوم آبان ماه ۱۳۹۳ در سه منطقه مختلف آب و هوایی اجرا شد. محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی گیاه به روش رنگ‌سنجی اندازه‌گیری شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه به دو روش روبش رادیکال‌های آزاد **DPPH** و قدرت احیاکنندگی آهن **(FTC)** اندازه‌گیری شد و اسانس با روش تقطیر با آب به دست آمد. برای بررسی اثر عوامل محیطی بر صفات فیتوشیمیایی از تجزیه همبستگی کانونیک **(CCA)** استفاده شد.

نتایج: نتایج حاکی از آن بود که صفات مورد بررسی بین جمعیت‌ها و مکان‌های مختلف از نظر آماری تفاوت معنی‌داری داشتند. از لحاظ درصد اسانس و محتوای ترکیبات فنولیک، جمعیت گرگو در محیط کشت مارگون و جمعیت دیشموک در شرایط اصفهان به ترتیب بیشترین و کمترین میزان را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: جمعیت گرگو عملکرد بهتری از لحاظ صفات فیتوشیمیایی و بیشتر صفات مورفولوژیک در کلیه مناطق مورد بررسی از خود نشان داد که پیشنهاد می‌شود در زمینه اهلی‌سازی این جمعیت گیاهی مطالعه بیشتری انجام شود.

گل‌واژگان: ***Dorema aucheri***، آنتی‌اکسیدان، ترکیبات فنولیک، صفات مورفولوژیک، عوامل اقلیمی

مقدمه

ذخایر ژنتیکی موجود در هر کشور یکی از گران‌بهاترین منابع بالقوه کشاورزی آن کشور به شمار می‌روند. هدف اصلی از مطالعه تنوع بین ودرون جمعیت‌های مختلف گیاهی و ارتباط میان کلکسیون‌های ژرم‌پلاسم، در نهایت مورد استفاده قرار دادن این اطلاعات برای تولید و توسعه ارقام دارای بهره-وری بهتر از گونه‌های کشت شده می‌باشد [۱]. به طور کلی، ژنتیک (توده) روی عملکرد گیاه و همچنین روی متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی اثر دارد و اثر متقابل منطقه و توده بر عملکرد ماده خشک کل و گیاه بسیار معنی‌دار بوده و بسته به منطقه و نوع توده متفاوت می‌باشد [۲]. جابه‌جایی توده‌ها و گونه‌های مختلف از منطقه‌ای به منطقه دیگر و اجبار گیاه به سازگاری با محیط جدید می‌تواند باعث تغییر نسبت متابولیت-های ثانویه و در بعضی موارد نیز القاء متابولیت‌های دارویی جدید شوند [۳]. تحقیقات نشان داده‌اند که تغییر شرایط محیطی با بر هم زدن شرایط مطلوب، سبب بروز اختلالات متابولیسمی در سلول‌های گیاهی می‌شوند که یکی از عوامل اصلی این اختلالات، افزایش تولید انواع اکسیژن فعال یا ROS می‌باشد. گیاهان برای مقابله با این ترکیبات، مکانیسم‌هایی را در خود توسعه داده‌اند که به طور کلی به عنوان دفاع‌های آنتی-اکسیدانی شناخته می‌شوند [۴]. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی باعث افزایش قدرت آنتی‌اکسیدان‌های موجود در بدن می‌شوند و در نتیجه کاهش ابتلا به بعضی بیماری‌ها مانند سرطان‌ها، بیماری-های قلبی و سکته‌های مغزی را با خود به دنبال دارند. علاوه بر این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی خود به عنوان ترکیبات دارویی مهم قابل توجه می‌باشند و از توانایی بالایی برای مقابله با بسیاری از بیماری‌ها برخوردارند [۵].

جنس دورما از تیره چتریان دارای دو گونه *Dorema aucheri* و *Dorema ammoniacum* بومی ایران می‌باشد [۶]. بیلهر (*Dorema aucheri*) به عنوان گیاه دارویی سرشار از ترکیبات فلاونوئیدی و کومارینی مطرح می‌باشد [۷]. فلاونوئیدهای موجود در گیاه بیلهر از دسته‌ای از ترکیبات فیتواستروژنی می‌باشند که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدآلرژی، ضدالتهابی و ضدسرطانی هستند [۸]. بیلهر به عنوان گیاه دارویی برای کنترل دیابت و کاهش درد توسط مردم مناطق مرکزی ایران استفاده می‌شود [۹]. این گونه گیاهی در استان‌های کهگیلویه و بویراحمد، چهارمحال و بختیاری، لرستان، کردستان و فارس رویش دارد [۱۰]. ساقه و برگ‌های بیلهر به عنوان چاشنی در مواد غذایی استفاده می‌شود [۱۱]. برخی از مطالعاتی که در این گیاه انجام شده است در زمینه فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات اسانس گیاه بیلهر در رویشگاه طبیعی این گیاه بوده است؛ به طوری که ترکیب‌های شیمیایی این گیاه توسط امیری و همکاران [۱۲] شناسایی شد. طی مطالعه‌ای، مینابادی و همکاران [۱۳] خاصیت آنتی میکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی این گیاه را بررسی کردند. از طرفی مطالعه بر روی ترکیبات اسانس در میوه و ترکیبات فنولیک در ریشه گیاه بیلهر (*D. aucheri*) نیز گزارش شده است [۱۵، ۱۴]. بیشتر مطالعاتی که روی این گیاه انجام شده است در زمینه مطالعات پزشکی بوده است؛ که از آن جمله می‌توان به بررسی سمیت گیاه بیلهر و اثر آن در شیوع سرطان در مناطق دارای مصرف زیاد بیلهر [۱۶، ۹]، تأثیر عصاره گیاه بیلهر بر تومورهای القاء شده غدد پستانی [۱۷] و بر غلظت خونی هورمون‌ها [۸] و اثرات ضد دردی و ضد التهابی عصاره آبی- الکلی گیاه بیلهر [۱۸] اشاره نمود.

اقلیم بر تمامی عوامل موثر بر محیط و رشد گیاهان به صورت مستقیم و غیرمستقیم تأثیر می‌گذارد. آزمایش‌هایی که در سال‌های اخیر انجام شده، نقش مؤثر عوامل اقلیمی روی پراکنش گیاهان را نشان می‌دهد [۲۰، ۱۹]. بر اساس برخی از بررسی‌ها با اینکه فاکتور آب و هوا، بیشترین نقش را در رشد و پراکنش گیاهان دارد اما گیاهان در ارتباط با تعدادی از عوامل مختلف شامل اقلیم، ویژگی‌های خاک و شرایط طبیعی توسعه پیدا می‌کنند [۲۲، ۲۱]. در بررسی خصوصیات خاک با پوشش گیاهی مراتع استان قم توسط ترنج زر و همکاران [۲۳] نشان داده شد که عوامل خاکی در تغییر پوشش گیاهی تأثیر عمده‌ای دارد به طوری که در گونه‌های مورد مطالعه، ماده آلی، درصد شن و هدایت الکتریکی به ترتیب بیشترین رابطه را با گونه‌های گیاهی داشتند. جیانگ و همکاران [۲۴] نیز با استفاده از روش CCA، الگوهای تنوع گونه‌ای در اکوسیستم‌های کوهستانی در مناطق بیابانی چین را بررسی کرده و تأثیر عوامل محیطی بر

خصوصیات جوامع گیاهی را مشخص کردند.

یکی از اهداف مهم در گیاهان دارویی، انتخاب جمعیت‌های با میزان بالای متابولیت‌های ثانویه و بالابردن میزان ترکیبات حائز اهمیت در این گیاهان می‌باشد که این هدف مهم با شناسایی پارامترهای مؤثر مورفولوژیک و فیتوشمیایی و شناخت روابط بین گیاهان و عوامل محیطی به ویژه خاک امکان‌پذیر است. با این وجود هنوز بررسی جامعی بر ویژگی‌های اقلیمی و اثر آن بر روی میزان فعالیت کلروفیل و آنتی‌اکسیدان گیاه دارویی بیلهر در مناطق مختلف جغرافیایی انجام نگرفته است. لذا هدف از این تحقیق بررسی تغییرات صفات مورفولوژیک، فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدان و ارزیابی میزان فلاونوئید و محتوای کلروفیل در جمعیت‌های مختلف بیلهر در مناطق مختلف جغرافیایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

تمامی مواد شیمیایی استفاده شده از شرکت‌های Merck و Sigma خریداری شدند.

مواد گیاهی و شرایط محیط آزمایش

بذرهای پنج جمعیت گیاهی بیلهر از مناطق مختلف اصفهان (دامنه و فریدون‌شهر) و کهگیلویه و بویراحمد (مارگون، گرگو و دیشموک) جمع‌آوری شد و در قالب طرح آزمایشی بلوک کامل تصادفی در سه تکرار در نیمه دوم آبان ماه ۱۳۹۳ در سه منطقه مختلف آب و هوایی شامل مزرعه تحقیقاتی دانشگاه صنعتی اصفهان، داران (اصفهان) و مارگون (کهگیلویه و بویراحمد) کشت شد. اندازه هر کرت ۲ مترمربع و در هر کرت ۶ ردیف با فاصله بین ردیف ۳۰ سانتی‌متر و فاصله بوته روی ردیف ۲۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. آبیاری اولیه بلافاصله پس از کاشت گیاهان و پس از جوانه‌زنی و استقرار گیاه با توجه به شرایط منطقه‌ای و رشد گیاهان انجام شد. خصوصیات اقلیمی و ویژگی‌های خاک مناطق جمع‌آوری و کاشت جمعیت‌ها ی مختلف بیلهر در جدول شماره ۱ آورده شده است.

اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک

برای اندازه‌گیری صفات مورد بررسی در هر واحد آزمایشی (پلات) از تکرارها، ۵ تک بوته با حذف اثر حاشیه‌ای انتخاب و صفات مورد نظر اندازه‌گیری شد. طول برگ، عرض برگ، مساحت برگ، تعداد انشعاب‌های فرعی، قطر و ضخامت قاعده ساقه، و میزان سبزینگی اندازه‌گیری شد. سطح پنج برگ از هر کرت بوسیله دوربین دیجیتالی متصل به رایانه (مساحت سنج رایانه‌ای مدل Hitachi Kp-ccssi) بر حسب سانتی-مترمربع اندازه‌گیری شد. قطر پنج ساقه از پنج بوته نمونه-برداری شده برحسب میلی‌متر، بوسیله کولیس اندازه‌گیری شد و متوسط اعداد پنج بوته به عنوان قطر ساقه در نظر گرفته شد. ضخامت قاعده ساقه برحسب میلی‌متر، بوسیله کولیس اندازه-گیری شد. میزان سبزینگی ۱۰ برگ از هر یک از توده‌های گیاهی با استفاده از دستگاه SPAD اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری کلروفیل و کاروتنوئید

برای اندازه‌گیری محتوی کلروفیل و کاروتنوئید از روش آرنون [۲۵] استفاده شد. در این روش ۱ گرم از قسمت پهنک برگ به قطعات کوچکی خرد شد و در داخل هاون چینی به همراه ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد به طور کامل له شد. نمونه حاصل با استفاده از قیف بوخنر متصل به پمپ خلأ صاف شد و مجدداً ۱۰ میلی‌لیتر استون برای حل شدن باقیمانده کلروفیل به برگ‌ها اضافه شد، به طوری که مواد باقیمانده در بالای صافی کاملاً سفید و فاقد کلروفیل باشند. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ شد. سپس محتوی هر لوله آزمایش با استون ۸۰ درصد به حجم ۳۰ میلی‌لیتر رسانده شد و آنگاه میزان جذب نوری هریک از عصاره‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰، ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر خوانده شد. از استون ۸۰ درصد به عنوان محلول شاهد (blank) استفاده شد. داده‌های حاصل جهت محاسبه غلظت کاروتنوئید و کلروفیل (میلی‌گرم در گرم برگ تازه) به ترتیب در روابط آرنون وارد شدند:

جدول شماره ۱- ویژگی‌های آب و هوایی و خاک محل جمع‌آوری و مناطق کاشت جمعیت‌های مختلف بیلهر (*Dorema aucheri*)

ردیف	محل جمع‌آوری/ محل کاشت	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	ارتفاع (متر)	رس (٪)	شن (٪)	سیلت (٪)	ماده آلی (٪)	اسیدیتی	بارندگی (سالیانه)	دما (سالیانه)
	محل جمع‌آوری										
۱	گرگو، کهگیلویه و بویراحمد	۳۰° ۲۷' ۴۰" N	۵۱° ۴۰' ۳۹" E	۲۲۷۴/۸۳	۱۷	۳۴	۴۹	۲/۷۹	۷/۸	۶۲۳/۹	۱۵
۲	مارگون، کهگیلویه و بویراحمد	۳۰° ۴۰' ۰۵" N	۵۱° ۳۵' ۱۶" E	۲۰۴۸	۳۰	۲۷	۴۳	۳/۳۸	۷/۳	۶۳۹/۱۶	۱۴/۳
۳	دیشموک، کهگیلویه و بویراحمد	۳۱° ۲۱' ۱۷" N	۵۰° ۲۴' ۵۲" E	۱۹۴۸/۹۶	۳۰	۱۴	۵۶	۲/۲۱	۷/۸	۴۴۵/۴۵	۱۶/۴
۴	دامنه، اصفهان	۳۳° ۱' ۲" N	۵۰° ۲۹' ۲۴" E	۲۳۵۰/۴۰	۳۳	۳۲	۳۵	۰/۹۷	۷/۷	۳۴۳/۹۹	۱۱/۹
۵	فریدونشهر، اصفهان	۳۳° ۵۶' ۲۴" N	۵۰° ۷' ۲۶" E	۲۵۳۷/۳۶	۲۶	۳۶	۳۸	۲/۷	۷/۶	۶۲۸/۴۷	۱۲/۲
	محل کاشت										
۱	داران، اصفهان	۳۲° ۵۹' ۳۹" N	۵۰° ۲۴' ۴۱" E	۲۳۴۵	۴۴/۴	۱۴/۴	۴۱/۲	۰/۵۵	۷/۷	۲۶۶/۶۹	۱۱/۱
۲	مارگون، کهگیلویه و بویراحمد	۳۰° ۵۹' ۳۱" N	۵۱° ۴' ۵۳" E	۲۱۷۵	۱۷	۳۷	۴۶	۳/۸۷	۷/۲	۶۳۹/۱۶	۱۴/۳
۳	اصفهان، اصفهان	۳۲° ۴۳' ۱۴" N	۵۱° ۳۱' ۴۲" E	۱۶۷۳	۳۴	۱۶	۴۹	۰/۶۳	۷/۸	۱۴۸/۹۳	۱۷/۱

$$cholorophyll(a)=\frac{[(12.7\times Abs663)-(2.6\times Abs645)\times mlAcetone]}{mgLeaf}$$

$$cholorophyll(b)=\frac{[(22.9\times Abs645)-(4.68\times Abs663)\times mlAcetone]}{mgLeaf}$$

Cx+c= (1000 Abs470- 1/82 Ca- 85/02 Cb) / 198**× ml Acetone / mg leaf

در این روابط Abs ۶۴۵، Abs ۶۶۳ و Abs ۴۷۰ به ترتیب جذب در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر می‌باشد. Ca مقدار کلروفیل a، Cb مقدار کلروفیل b و Cx+c مقدار کل کاروتنوئیدها می‌باشد.

درصد اسانس برگ گیاه

برگ گیاهان مورد آزمایش در مرحله رشد کامل گیاه برداشت و به مدت یک هفته در سایه خشک شد. سپس برگ‌های خشک شده بوسیله آسیاب کاملاً پودر شده و مقدار ۵۰ گرم پودر برگ‌ها در دستگاه کلونجر قرار داده شده و با استفاده از روش تقطیر با آب مقطر به مدت ۳-۴ ساعت فرآیند اسانس‌گیری انجام شد. در پایان درصد اسانس مربوط به هر جمعیت محاسبه و ثبت شد. برای محاسبه درصد اسانس از رابطه زیر استفاده شد (۲۶).

وزن خشک ماده اولیه (گرم) / وزن اسانس (گرم) × ۱۰۰ = درصد اسانس

اندازه‌گیری ترکیبات فنولیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی

مقدار کل ترکیبات فنولیک موجود در عصاره این گیاه توسط رنگ سنجی به روش فولین- سیوکالتو اسلینکارد و همکاران [۲۷] تغییر داده شده، مورد بررسی قرار گرفت. مقدار جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد و مخلوطی از واکنش‌گر به عنوان شاهد استفاده شد. مقدار کل ترکیبات فنولیک با استفاده از معادله خط رسم شده برای اسید تانیک، بر مبنای میلی‌گرم در گرم ماده خشک بیان شد [۲۸]. به منظور بررسی خاصیت آنتی‌رادیکالی به روش DPPH، ۰/۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره به ۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی‌مولار رادیکال آزاد DPPH در متانول ۸۰ درصد افزوده شد. جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. یک نمونه حاوی ۰/۱ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد و ۵ میلی‌لیتر محلول DPPH به عنوان کنترل استفاده شد. در نهایت قدرت عصاره گیاهی در به دام انداختن رادیکال‌های آزاد DPPH از طریق فرمول زیر محاسبه شد:

% Radical scavenging activity = (OD control - OD sample / OD control) × 100.

در این رابطه OD sample جذب نمونه، OD control جذب کنترل و RSA میزان فعالیت حذف‌کنندگی رادیکال آزاد است. برای بررسی بهتر فعالیت آنتی‌رادیکالی عصاره از شاخص IC_{50} استفاده شد. IC_{50} بیانگر مقدار میلی‌گرم عصاره است که قادر به حذف ۵۰ درصد از رادیکال‌های DPPH موجود در محیط می‌باشد [۲۹]. عدد کنترل براساس طول موج جذب در دستگاه اسپکتوفتومتر BeckmanDU530 توسط ۰/۱ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد و ۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH (حل شده در متانول ۸۰ درصد) در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد و نصف این عدد در تابع به دست آمده از چهار غلظت، قرار داده شد و در نهایت مقدار x (میزان IC_{50}) محاسبه شد [۳۰]. برای تعیین قدرت احیاکنندگی آهن، محلولی از ۱۰۰ میکروگرم عصاره در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد. یک میلی‌لیتر از این محلول با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH=۶/۵) و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول آبی یک درصد فری‌سیانید پتاسیم [K3Fe(CN)6] مخلوط و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۱۰ درصد اسید تری‌کلرواستیک به مخلوط اضافه شد. محلول به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت g× ۱۵۰۰سانتریفوژ شد. در نهایت، ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر محلول

کلریدفریک (FeCl3) مخلوط و جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. افزایش جذب در مخلوط واکنش به مفهوم قدرت احیاکنندگی بیشتر عصاره (آنتی‌اکسیدانی) می‌باشد [۳۱].

اندازه‌گیری محتوی تام فلاونوئید عصاره‌ها

میزان فلاونوئید تام با روش رنگ‌سنجی آلومنیوم کلراید اندازه‌گیری شد. ۰/۱ گرم از نمونه‌های گیاهی با متانول ۸۰ درصد به حجم ۱۰ میلی‌لیتر در فالکون رسید و سپس عصاره حاصل روی شیکر با سرعت rpm ۱۱۰ به مدت هشت ساعت قرار گرفت. پس از این مدت به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره حاصل آب مقطر اضافه شد تا حجم پنج میلی‌لیتر به دست بیاید، سپس به محصول حاصل ۰/۳ میلی‌لیتر $NaNo_2$ 5% و پس از پنج دقیقه ۰/۶ میلی‌لیتر AlCl3 10% اضافه شد و در نهایت دو میلی‌لیتر NaOH یک مولار و دو میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و شدت جذب در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و غلظت نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین به دست آمد.

$$Y=0.0312\ X - 0.07$$

آزمون‌های آماری

تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار SAS ver. 9 انجام شد و میانگین صفات با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) مورد مقایسه قرار گرفتند. تجزیه همبستگی کانونیک (CCA) با استفاده از نرم‌افزار آماری PAST3 انجام شد. گراف‌های مربوط به محتوای کلروفیل نیز با نرم‌افزار آماری Excel ترسیم شد.

نتایج

نتایج نشان داد که صفات مورد بررسی بین جمعیت‌ها و مکان‌های مختلف از نظر آماری تفاوت معنی‌داری داشتند (جدول شماره ۲). جدول تجزیه مرکب داده‌ها نشان داد که برهمکنش جمعیت و مکان، برای همه صفات معنی‌دار بود (جدول شماره ۲). میانگین درصد اسانس جمعیت گرگو در منطقه مارگون بیشترین میزان را به خود اختصاص داد (۰/۶۷ درصد) در حالی که جمعیت دیشموک در منطقه اصفهان کمترین درصد اسانس (۰/۲۶ درصد) را نشان داد.

از لحاظ طول برگ، سه جمعیت مارگون و گرگو و فریدونشهر در منطقه کاشت داران به ترتیب با ۶/۸، ۶/۵ و ۶/۴ سانتی‌متر از سایر جمعیت‌ها بیشتر بود. جمعیت‌های دامنه و دیشموک با ۵/۸۷ و ۵/۳۳ سانتی‌متر طول برگ کمتری داشتند. بیشترین مقدار عرض برگ مربوط به جمعیت دیشموک با ۱/۸ سانتی‌متر در منطقه اصفهان و کمترین آن مربوط به جمعیت فریدونشهر با ۱/۲۱ سانتی‌متر در منطقه مارگون بود (جدول شماره ۳).

بیشترین میزان سطح برگ در منطقه داران در جمعیت‌های گیاهی مارگون و گرگو با ۸/۴۱ و ۷/۳۶ سانتی‌مترمربع به دست آمد. جمعیت‌های گرگو و فریدونشهر در منطقه مارگون کمترین سطح برگ را با ۳/۰۷ و ۳/۰۸ سانتی‌مترمربع داشتند.

وزن تر جمعیت مارگون در دو منطقه داران و مارگون به ترتیب ۱۶/۶۷ و ۱۶/۳۳ گرم در بوته بود و از لحاظ آماری از سایر جمعیت‌ها بیشتر بود و حداقل آن مربوط به جمعیت گرگو به میزان ۶/۶۱، ۶/۲۵ و ۵/۹ گرم در بوته به ترتیب در مناطق کاشت داران، اصفهان و مارگون بود. به همین ترتیب جمعیت مارگون به ترتیب با ۳/۲۶ و ۳/۱۷ گرم بوته وزن خشک بیشتری نسب به سایر جمعیت‌ها داشت. حداقل وزن خشک نیز مربوط به جمعیت گرگو با ۱/۲۹ گرم بود.

بیشترین ضخامت قاعده ساقه مربوط به جمعیت گرگو با ۲/۶۶ و ۲/۷ میلی‌متر در دو مکان کشت داران و مارگون بود. کمترین ضخامت قاعده ساقه نیز در جمعیت دیشموک با ۱/۴۴ میلی‌متر در منطقه داران به دست آمد. بیشترین قطر ساقه نیز در جمعیت گرگو با ۲/۲۴ میلی‌متر در منطقه داران بود. کمترین قطر ساقه در دو جمعیت مارگون و فریدونشهر با ۰/۸۸ و ۰/۸۵ میلی‌متر در منطقه اصفهان بود. جمعیت مارگون با ۶ انشعاب فرعی در منطقه مارگون نسبت به سایر جمعیت‌ها بیشترین انشعاب فرعی را داشت.

از لحاظ محتوای ترکیبات فنولیک، جمعیت گرگو با ۱۰۴/۴۴ میلی‌گرم اسید تانیک / گرم ماده خشک در منطقه مارگون بیشترین و جمعیت دیشموک با ۱۴/۳۱ میلی‌گرم اسید

جدول شماره ۲- تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک، ترکیبات فنولیک، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در جمعیت‌های بیلهر مورد مطالعه در سه منطقه

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات													
		درصد اسانس	طول برگ	عرض برگ	مساحت برگ	وزن تر بوته	وزن خشک بوته	ضخامت قاعده ساقه	قطر ساقه	انشعاب فرعی	ترکیبات فنولیک	فلاونوئید کل	IC50	DPPH(٪ پاکسازی رادیکال‌های آزاد)	FTC(قدرت احیاکنندگی آهن)
مکان	۲	۰/۰۷**	۲۱/۵۲**	۰/۱۸**	۴۳/۱۸**	۵/۷۳**	۰/۱۷	۰/۱۹	۰/۱۸	۱/۴	۹۲۷/۱۸**	۱/۱۳	۰/۳**	۱۵۰۷/۹۷**	۰/۰۸**
بلوک (مکان)	۶	۰/۰۰۱	۰/۱۷	۰/۰۳	۰/۱۵	۰/۸۷	۰/۱۲	۰/۰۴	۰/۰۲	۱/۰	۱۲/۳۷	۰/۸۷	۰/۰۰۲	۱۵/۲	۰/۰۰۲
ژنوتیپ	۴	۰/۰۶**	۲/۳۸**	۰/۱۵**	۴/۹۹**	۱۲۴/۴۲**	۳/۲۴**	۱/۱۱**	۰/۵۶**	۴/۹۷**	۸۳۴۳/۵**	۱۰/۲۴**	۱۴/۸۵**	۸۲/۹۸**	۰/۰۳**
ژنوتیپ * مکان	۸	۰/۰۱**	۰/۸۵**	۰/۰۴	۱/۳۳**	۷/۶۲**	۰/۸۶**	۰/۳*	۰/۲۶**	۱/۹*	۱۸۱/۵۴**	۲/۳**	۰/۲۱**	۱۴۸/۰۹**	۱۰/۰۱۷**
خطای آزمایشی	۲۴	۰/۰۰۲	۰/۲۴	۰/۰۲	۰/۳۲	۱/۰۱	۰/۰۷	۰/۱	۰/۰۷	۰/۶۴	۳۷/۶۸	۰/۵۲	۰/۰۰۲	۱۲/۲۵	۰/۰۰۱
ضریب تغییرات (٪CV)		۱۰/۵۹	۹/۳۹	۹/۲۹	۱۰/۲۳	۷/۸۶	۱۱/۶۴	۱۵/۶۹	۱۹/۵۳	۲۱/۰۳	۱۱/۵	۱۱/۷۶	۲/۴۲	۹/۴۲	۸/۶۱
(R^2)		۰/۹۲	۰/۹۱	۰/۷۶	۰/۹۴	۰/۹۶	۰/۹۲	۰/۷۵	۰/۷۴	۰/۷۴	۰/۹۷	۰/۸۴	۰/۹۹	۰/۹۴	۰/۹۳

* و **: میانگین مربعات تیمارها به ترتیب در در سطح احتمال ۵ ٪ و ۱ ٪ معنی‌دار هستند.

جدول شماره ۳- میانگین صفات مورفولوژیک جمعیت‌های بیلهر در سه منطقه

جمعیت	طول برگ (سانتی‌متر)			عرض برگ (سانتی‌متر)			سطح برگ (سانتی‌متر مربع)			وزن تر (گرم)		
	منطقه			منطقه			منطقه			منطقه		
	اصفهان	داران	مارگون	اصفهان	داران	مارگون	اصفهان	داران	مارگون	اصفهان	داران	مارگون
گرگو	۴/۶۳^{c}	۶/۵^{ab}	۳/۸۶^{ab}	۱/۳۴^{b}	۱/۶^{a}	۱/۲۳^{b}	۴/۴۱^{b}	۷/۳۶^{b}	۳/۰۷^{c}	۶/۲۵^{d}	۶/۶۱^{c}	۵/۹^{c}
مارگون	۶/۴^{a}	۶/۸^{a}	۴/۵۳^{a}	۱/۵۳^{b}	۱/۷۳^{a}	۱/۶۵^{a}	۶/۹۵^{a}	۸/۴۱^{a}	۵/۱^{a}	۱۳/۱۷^{c}	۱۶/۶۷^{a}	۱۶/۳۳^{a}
دیشموک	۴/۸۳^{bc}	۵/۳۳^{c}	۳/۳۴^{b}	۱/۸^{a}	۱/۵۷^{a}	۱/۴۶^{ab}	۶/۱۵^{a}	۵/۹۷^{c}	۳/۲۳^{bc}	۱۴/۰۰^{c}	۱۴/۶۷^{b}	۱۳/۵^{b}
دامنه	۵/۷۳^{ab}	۵/۸۷^{bc}	۴/۴۳^{a}	۱/۵۴^{b}	۱/۵^{a}	۱/۳^{b}	۶/۲۶^{a}	۶/۲۸^{c}	۳/۸۴^{b}	۱۵/۵۳^{b}	۱۳/۳۳^{b}	۱۲/۰۳^{b}
فریدونشهر	۶/۲۳^{a}	۶/۴^{ab}	۳/۱۸^{b}	۱/۳۶^{b}	۱/۵^{a}	۱/۲۱^{b}	۶/۰۳^{a}	۶/۸۴^{bc}	۳/۰۸^{c}	۱۷/۰۰^{a}	۱۴/۳۳^{b}	۱۲/۶۸^{b}

حروف غیرمشابه به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ به روش آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) می‌باشد.

ادامه جدول ۳- میانگین صفات مورفولوژیک جمعیت های بیلهر در سه منطقه

جمعیت	وزن خشک (گرم)			ضخامت قاعده ساقه (میلی‌متر)			قطر ساقه (میلی‌متر)			تعداد انشعاب فرعی		
	منطقه			منطقه			منطقه			منطقه		
	اصفهان	داران	مارگون	اصفهان	داران	مارگون	اصفهان	داران	مارگون	اصفهان	داران	مارگون
گرگو	۱/۲۹^{c}	۱/۳۱^{d}	۱/۳۲^{d}	۲/۳۹^{a}	۲/۶۶^{a}	۲/۷^{a}	۱/۵۲^{a}	۲/۲۴^{a}	۱/۵۱^{a}	۴/۰۰^{a}	۳/۳۳^{ab}	۴/۶۷^{ab}
مارگون	۲/۲۹^{b}	۳/۲۶^{a}	۳/۱۷^{a}	۱/۵۳^{c}	۱/۸۹^{bc}	۱/۶۴^{c}	۰/۸۸^{b}	۱/۳۸^{a}	۱/۲۶^{a}	۴/۶۷^{a}	۴/۰۰^{a}	۶/۰۰^{a}
دیشموک	۲/۱۵^{b}	۲/۷۵^{ab}	۲/۴۹^{b}	۲/۳^{abc}	۱/۴۴^{c}	۱/۷۲^{bc}	۱/۶۵^{a}	۱/۰۲^{b}	۱/۳۹^{a}	۳/۶۷^{ab}	۲/۶۷^{b}	۳/۳۳^{bc}
دامنه	۳/۰۳^{a}	۱/۸۹^{c}	۱/۸۲^{cd}	۱/۷۸^{abc}	۲/۱۸^{ab}	۲/۵۱^{a}	۱/۲۳^{ab}	۱/۳۵^{b}	۱/۴۲^{a}	۴/۶۷^{a}	۳/۳۳^{ab}	۳/۶۷^{bc}
فریدونشهر	۳/۲۳^{a}	۲/۲۸^{bc}	۲/۱۲^{bc}	۱/۶۴^{bc}	۱/۹۱^{bc}	۲/۱۹^{ab}	۰/۸۵^{b}	۱/۱۹^{b}	۱/۳۲^{a}	۲/۳۳^{b}	۴/۰۰^{a}	۲/۶۷^{c}

حروف غیرمشابه به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ به روش آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) می باشد.

تانیک / گرم ماده خشک در منطقه داران کمترین میزان ترکیبات فنولیک را داشتند (جدول شماره ۴).

جمعیت دامنه با ۷/۷۹ و ۷/۷۳ میلی‌گرم کوئرستین/ گرم برگ خشک به ترتیب در مناطق داران و مارگون بیشترین میزان فلاونوئید کل را در بین جمعت‌های گیاهی مورد مطالعه به خود اختصاص داد. کمترین میزان فلاونوئید کل با ۴/۴۸ و ۳/۶۴ میلی‌گرم کوئرستین/ گرم برگ خشک در جمعیت مارگون در دو منطقه اصفهان و داران مشاهده شد.

نتایج تجزیه واریانس اختلاف بسیار معنی‌داری را بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در مکان‌های مختلف از نظر صفت خاصیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH نشان داد ($P<0/01$). نتایج مقایسه میانگین قدرت پاکسازی رادیکال‌های آزاد DPPH توسط عصاره ژنوتیپ‌های مختلف بیلهر در شرایط محیطی مختلف نشان داد که بیشترین قدرت پاکسازی مربوط به منطقه مارگون و ژنوتیپ‌های مارگون و گرگو به ترتیب با ۶۲/۹۲ و ۵۶/۳۶ درصد بود، در حالی که کمترین قدرت

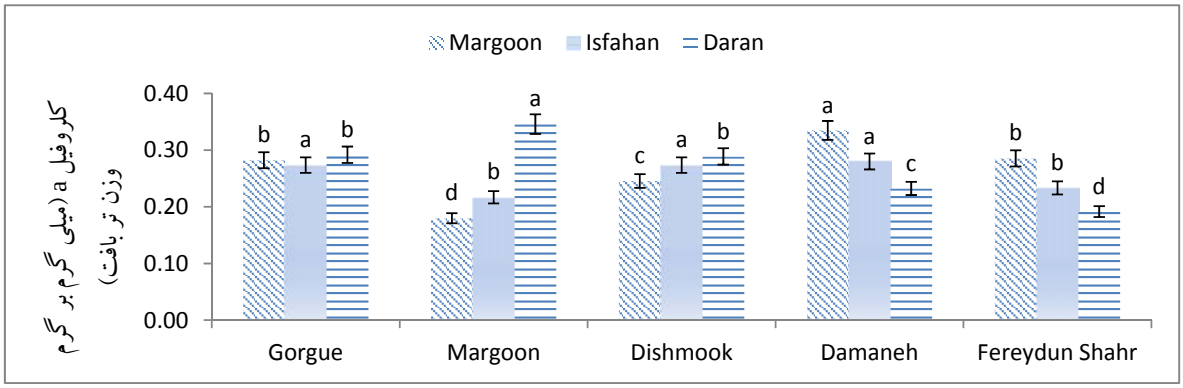
جدول شماره ۴- میانگین صفات درصد اسانس، ترکیبات فنولیک، فلاونوئید و آنتی‌اکسیدان جمعیت های بیلهر در سه منطقه

جمعیت	اسانس (%)			ترکیبات فنولیک (میلی‌گرم تانیک اسید / گرم ماده خشک)			فلاونوئید کل (میلی‌گرم کوئرستین/ گرم برگ خشک)			IC50 (µg/ml)			DPPH (٪ پاکسازی رادیکال‌های آزاد)			FTC (قدرت احباکنندگی آهن) (جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر)		
	منطقه			منطقه			منطقه			منطقه			منطقه			منطقه		
	اصفهان	داران	مارگون	اصفهان	داران	مارگون	اصفهان	داران	مارگون	اصفهان	داران	مارگون	اصفهان	داران	مارگون	اصفهان	داران	مارگون
گرگو	۰/۳۸^{ab}	۰/۴۳^{a}	۰/۶۷^{a}	۷۲/۳۶^{a}	۸۴/۶۳^{a}	۱۰۴/۴۴^{a}	۵/۷۶^{ab}	۵/۵۹^{c}	۷/۴۶^{a}	۰/۳۹^{c}	۰/۴۳^{d}	۰/۴۱^{b}	۳۲/۶۹^{a}	۳۴/۶^{a}	۵۶/۳۶^{a}	۰/۳۳^{ab}	۰/۳۶^{b}	۰/۴۴^{b}
مارگون	۰/۳^{bc}	۰/۳۵^{b}	۰/۴۷^{b}	۲۴/۴۵^{c}	۲۶/۵۲^{c}	۲۸/۷۶^{d}	۴/۴۸^{b}	۳/۶۴^{d}	۵/۲۵^{b}	۰/۵۳^{b}	۰/۴۵^{d}	۰/۳۴^{c}	۲۷/۱۴^{c}	۲۸/۰۶^{c}	۶۲/۹۲^{a}	۰/۳۱^{ab}	۰/۵۷^{a}	۰/۴۳^{b}
دیشموک	۰/۲۶^{c}	۰/۳۱^{b}	۰/۲۸^{d}	۲۲/۰۷^{c}	۱۴/۳۱^{c}	۱۹/۴۲^{d}	۶/۴۶^{ab}	۶/۵۴^{b}	۴/۷^{b}	۲/۹۳^{a}	۱/۸۶^{c}	۲/۸۹^{a}	۲۹/۱۵^{bc}	۳۳/۵۷^{ab}	۴۵/۲۳^{b}	۰/۲۸^{b}	۰/۳۷^{b}	۰/۳۵^{c}
دامنه	۰/۴۱^{c}	۰/۴۴^{a}	۰/۴۴^{c}	۷۱/۲۲^{a}	۷۶/۶۷^{a}	۸۷/۷۶^{b}	۶/۵۶^{a}	۷/۷۳^{a}	۷/۷۹^{a}	۲/۸۹^{a}	۲/۷۲^{b}	۲/۸۵^{a}	۳۱/۶۵^{ab}	۳۴/۱۱^{ab}	۳۹/۴۷^{b}	۰/۳۴^{ab}	۰/۴۴^{b}	۰/۴۲^{b}
فریدونشهر	۰/۴۳^{a}	۰/۴۲^{a}	۰/۵۵^{b}	۴۰/۷۱^{b}	۵۸/۸۷^{b}	۶۸/۴^{c}	۶/۶۲^{a}	۶/۰۹^{bc}	۶/۹۱^{a}	۲/۹۱^{a}	۲/۸۶^{a}	۲/۹۱^{a}	۳۳/۲۵^{a}	۲۹/۳۶^{bc}	۳۹/۴۸^{b}	۰/۳۶^{a}	۰/۴۲^{b}	۰/۶۵^{a}

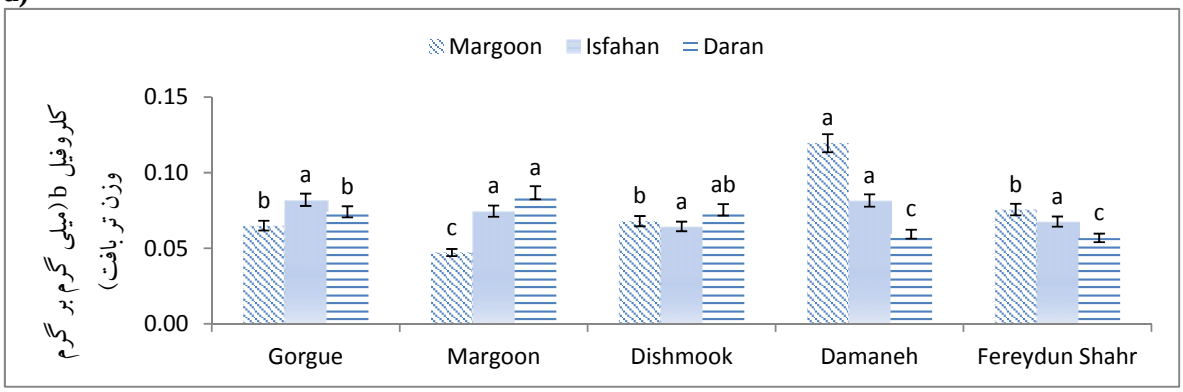
حروف غیرمشابه به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ به روش آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) می‌باشد.

پاکسازی در ژنوتیپ مارگون و مناطق اصفهان و داران با میزان ۲۷/۱۴ و ۲۸/۰۶ درصد مشاهده شد (جدول شماره ۴). فعالیت آنتی‌رادیکالی عصاره با استفاده از شاخص IC_{50} نشان داد که دو جمعیت گرگو و مارگون با ۰/۳۹ و ۰/۳۴ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره قدرت حذف رادیکال‌های آزاد بیشتری نسبت به سایر جمعیت‌های گیاهی داشتند و جمعیت‌های دیشموک و دامنه با ۲/۹۳ و ۲/۹۱ میکروگرم در میلی‌لیتر در منطقه اصفهان کمترین قدرت حذف رادیکال‌های آزاد را داشتند. نتایج تجزیه واریانس بررسی قدرت احیاءکنندگی آهن در بین مکان‌ها و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، اختلاف بسیار معنی‌داری را نشان داد ($P<۰/۰۱$). در این آزمایش، جذب نوری نمونه‌ها رابطه مستقیمی با خاصیت احیاءکننده نمونه‌ها داشت. به عبارت دیگر جذب نوری بیشتر بیانگر خاصیت احیاءکنندگی بیشتر می‌باشد. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که کمترین جذب نوری و در نتیجه قدرت احیاءکنندگی آهن در ژنوتیپ دیشموک (۰/۲۸) و مارگون (۰/۳۱) در منطقه اصفهان مشاهده شد، در حالی که بیشترین جذب نوری و قدرت احیاءکنندگی آهن در ژنوتیپ فریدونشهر (۰/۶۵) در منطقه مارگون و ژنوتیپ مارگون (۰/۵۷) در منطقه داران به دست آمد (جدول شماره ۴).

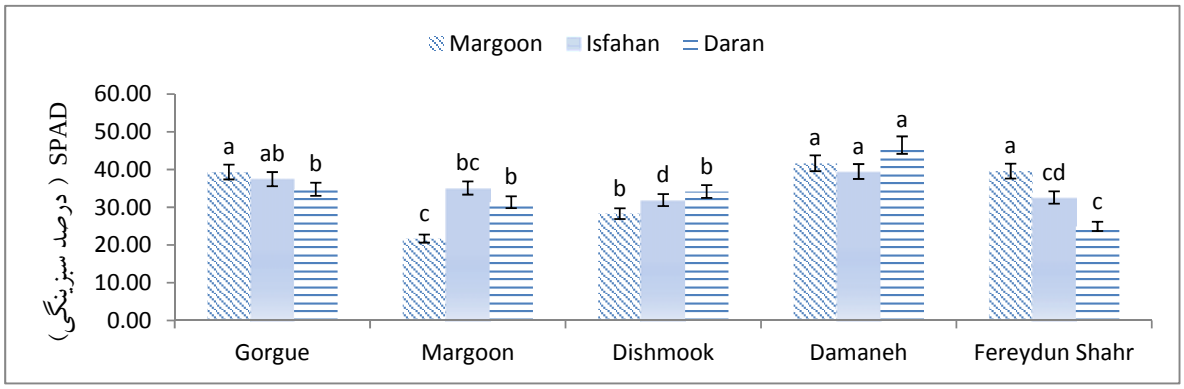
میزان کلروفیل a در برگ جمعیت مارگون در منطقه داران با ۰/۳۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بافت و جمعیت دامنه در منطقه مارگون با ۰/۳۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بافت بیشترین میزان بود. کمترین میزان کلروفیل a مربوط به دو جمعیت فریدونشهر و مارگون با ۰/۱۹ و ۰/۱۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بافت به ترتیب در مناطق داران و مارگون بود. روند تغییر میزان کلروفیل b نیز مشابه کلروفیل a در جمعیت‌های گیاهی بود. از لحاظ میزان سبزینگی جمعیت دامنه در هر سه محیط بیشترین میزان را داشت. از لحاظ محتوای کاروتنوئید، جمعیت‌های گیاهی واکنش متفاوتی نسبت به محیط کاشت نشان دادند و در هر منطقه جمعیت‌های مختلف متغیر بودند (شکل شماره ۱- A الی D).



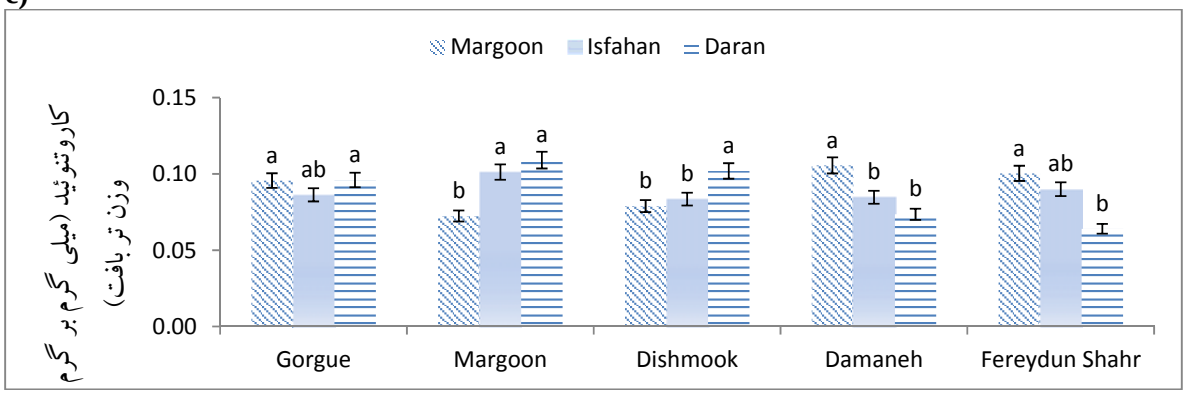
a)



b)



c)



d)

شکل شماره ۱– a: محتوای کلروفیل a (میلی‌گرم بر گرم وزن تر بافت) جمعیت‌های مختلف بیلهر در ۳ منطقه

b: محتوای کلروفیل b (میلی‌گرم بر گرم وزن تر بافت) جمعیت‌های مختلف بیلهر در ۳ منطقه

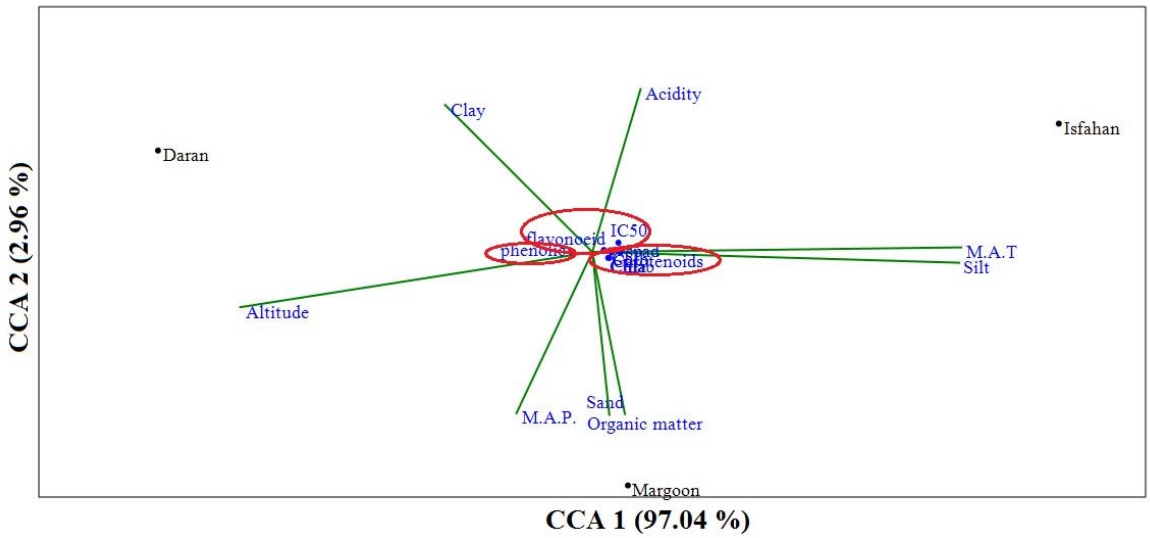
c: درصد سبزینگی جمعیت‌های مختلف بیلهر در ۳ منطقه

d: محتوای کاروتنوئید جمعیت‌های مختلف بیلهر در ۳ منطقه

اثر عوامل محیطی بر صفات فیتوشیمیایی

برای بررسی اثر عوامل محیطی بر صفات فیتوشیمیایی مورد بررسی از تجزیه همبستگی کانونیک (CCA) براساس ماتریکس هشت عامل محیطی و هشت صفت فیتوشیمیایی استفاده شد (شکل شماره ۲). دو متغیر کانونی اول توانستند ۱۰۰ درصد تغییرات صفات را توجیه کنند. ضریب همبستگی متغیر اول کانونیک (CCA1) در ارتباط با صفات محیطی نشان داد که سیلتی بودن خاک و دما بیشترین همبستگی مثبت را با این متغیر داشتند و ارتفاع، رسی بودن خاک و بارندگی بیشترین تأثیر منفی را در شکل‌گیری این متغیر نشان دادند.

ضریب هبستگی متغیر کانونیک اول در ارتباط با صفات آنتی‌اکسیدانی و محتوای کلروفیل نشان داد که کاروتنوئید، درصد سبزینگی، IC_{50}، فلاونوئید، کلروفیل a و کلروفیل b، به طور مثبت و ترکیبات فنولیک به صورت منفی در شکل‌گیری اولین گروه کانونیک بیشترین تأثیر را داشتند. ضریب همبستگی دومین متغیر کانونیک در ارتباط با عوامل محیطی یک همبستگی مثبت با رسی بودن خاک و اسیدیتی و همبستگی منفی با شنی بودن خاک، ماده آلی خاک، بارندگی و ارتفاع نشان داد. توزیع این متغیر در ارتباط با صفات فیتوشیمیایی نشان داد که IC_{50}، فلاونوئید، و کلروفیل b، به طور مثبت و کلروفیل a، کاروتنوئید و درصد سبزینگی به طور منفی بیشترین تأثیر را در شکل‌گیری دومین متغیر کانونیک داشتند. این مجموعه کانونیک به طور مثبت در ارتباط با گیاهان کشت شده در منطقه اصفهان بودند. براساس بای پلات دو متغیر اول



شکل شماره ۲- بای پلات تجزیه همبستگی کانونیک (CCA) جمعیت‌های مختلف بیلهر بر اساس صفات فیتوشیمیایی و ویژگی‌های خاک و اقلیم مناطق کشت گیاهان

CCA، صفات فیتوشیمیایی همبستگی‌های معنی‌داری با صفات محیطی نشان دادند (شکل شماره ۲). طبق این بای پلات ترکیبات فنولیک بیشترین عملکرد را در شرایط خاک رسی و ارتفاع زیاد و دما و اسیدیتی کمتر نشان می‌دهد. فلاونوئید و IC_{50} تحت تأثیر دو عامل محیطی ارتفاع کمتر و دمای زیاد قرار می‌گیرند. سایر صفات فیتوشیمیایی مورد بررسی از جمله میزان اسانس، محتوای کلروفیل، کاروتنوئید و درصد سبزینگی نیز در خاک‌های سیلتی و دمای زیاد و ارتفاع کمتر بیشترین میزان را نشان می‌دهند.

بحث

میزان اسانس جمعیت گرگو از سایر جمعیت‌ها بیشتر بود (جدول شماره ۴). تغییرات بسیار زیادی بین جمعیت‌های مختلف گیاه بیلهر از لحاظ میانگین اسانس مشاهده شد. عملکرد اسانس در این تحقیق با نتایج مطالعه حسینی و همکاران [۳۲] در گونه *D. ammoniacum* مشابهت داشت درحالی که سایر تحقیق‌های انجام شده در گونه *D. ammoniacum* مقادیر اسانس بسیار کمتری در مقایسه با این مطالعه نشان داده بود [۳۴، ۳۳]. این تفاوت بین جمعیت‌ها از لحاظ عملکرد اسانس می‌تواند ناشی از عوامل محیطی باشد [۳۵]. گل‌پرور و قاسمی پیربلوطی [۳۶] گزارش کردند که اسانس صفتی کمی و پیچیده است و تحت تأثیر عوامل مختلف ژنتیکی و محیطی قرار می‌گیرد. در این مطالعه میزان اسانس، تحت تأثیر عوامل محیطی قرار گرفت و در شرایط خاک‌های سیلتی و دمای زیاد و ارتفاع کمتر بیشترین میزان را نشان داد. مطالعات قبلی نیز نشان دادند که دما، بارندگی، شرایط خاک و ارتفاع می‌تواند بر عملکرد اسانس و متابولیت‌های ثانویه تأثیر بگذارد [۳۷]. بنابراین گونه گیاهی که بتواند حداکثر استفاده را از این عوامل ببرد، بالاترین عملکرد را خواهد داشت. صفات فیتوشیمیایی مورد مطالعه نظیر فنول تام (TPC) و فلاونوئید تام (TFC)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش‌های DPPH، و قدرت احیاءکنندگی (FTC) در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری در بین جمعیت‌های مورد ارزیابی در مکان‌های مختلف از خود نشان دادند. این امر نشان‌دهنده وجود تنوع بالا از لحاظ صفات فیتوشیمیایی مورد بررسی و امکان گزینش برای این صفات در میان ژنوتیپ‌های مورد مطالعه درشرایط محیطی مختلف می‌باشد. مقایسه میانگین صفات فیتوشیمیایی مورد مطالعه نشان‌دهنده دامنه گسترده اختلاف در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از لحاظ صفات فیتوشیمیایی بود (جدول شماره ۴). ترکیبات

آنتی‌اکسیدان فراوانی در گیاهان موجود می‌باشند که شناسایی تک تک آنها کاری دشوار می‌باشد از طرفی محتوای فنولی و آنتی‌اکسیدان‌ها در گیاهان به فاکتورهای ژنتیکی و محیطی بستگی دارند [۳۸]. گزارش‌های قبلی بیانگر این واقعیت هستند که ترکیبات فنولیک و فلاونویید در افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان تأثیر بسزایی دارند و فنولیک‌ها قدرت پاکسازی بالاتری در مقایسه با فلاونوئیدها دارند [۲۹، ۲۷]. برای درک اثر عوامل محیطی بر روی صفات آنتی‌اکسیدانی و محتوای کلروفیل گیاهان مورد بررسی در این تحقیق، از CCA استفاده شد. ویژگی‌های محیطی از جمله ارتفاع و سیلتی بودن خاک و دما همبستگی مثبتی با متغیر اول CCA (CCA1) نشان دادند. متغیر دوم CCA (CCA2) با فلاونوئید و کلروفیل b و با ویژگی‌های اقلیمی از جمله خاک رسی و اسیدیتی همبستگی مثبت نشان داد. ماده آلی خاک، شنی بودن خاک و میزان بارندگی نیز همبستگی منفی با متغیر دوم نشان دادند. بنابراین همبستگی‌های فوق نشان می‌دهد که بیشترین میزان ترکیبات فنولیک در شرایط خاک رسی، ارتفاع زیاد و دما و pH کمتر به دست می‌آید. فلاونوئید کل و IC_{50} در خاک‌های رسی و بارندگی زیاد کمترین میزان و در خاک‌های سیلتی با دمای زیاد بیشترین مقدار را خواهند داشت. سایر صفات فیتوشیمیایی مورد بررسی از جمله میزان اسانس، محتوای کلروفیل، کاروتنوئید و درصد سبزینگی نیز در خاک‌های سیلتی و دمای زیاد و ارتفاع کمتر بیشترین میزان را نشان می‌دهند. رحیم ملک و همکاران [۴۰] در مطالعه‌ای روی جمعیت‌های گیاهی مختلف مورد (*Myrtus communis* L.) تأثیر ویژگی-های خاک بر صفات فیتوشیمیایی را نشان دادند به طوری که جمعیت‌های گیاهی جمع‌آوری شده از خاک‌های لومی و رسی، مقادیر بیشتری از لحاظ برخی صفات فیتوشیمیایی و در خاک-های شنی نیز از لحاظ برخی دیگر از ترکیبات فیتوشیمیایی عملکرد بهتری نشان دادند.

نتایج این تحقیق نشان داد که بین میزان کلروفیل، کاروتنوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در جمعیت‌های گیاهی مورد مطالعه با عوامل محیطی ارتباط هماهنگی وجود دارد. این امر نشان‌دهنده امکان گزینش برای این صفات در میان ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در شرایط محیطی مختلف می‌باشد. با توجه به اینکه امروزه استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در صنایع غذایی به منظور جلوگیری از تشکیل رادیکال‌های آزاد و بدون داشتن عوارض جانبی، کاربرد وسیعی پیدا کرده است [۴۲، ۴۱] لذا نتایج این مطالعه که برای اولین بار در زمینه فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات اسانس گیاه بیلهر در شرایط مزرعه‌ای این گیاه انجام شده است می‌تواند امکان استفاده از تولید آنتی‌اکسیدان طبیعی در شرایط محیط کشت برای مصارف غذایی و دارویی و همچنین انجام تحقیقات پزشکی در محیط تحت کنترل شده را فراهم کند. بنابراین مطالعه جامع‌تری می‌توان درباره این ترکیبات طبیعی گیاهی در شرایط محیط کشت و با در نظرگرفتن شاهد (آنتی‌اکسیدان سنتزی و مصنوعی و ...) در طرح‌های آزمایشی انجام داد. در مجموع با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، و اطلاعات موجود در سایر مطالعات در ارتباط با نقش عوامل اقلیمی و شرایط خاک در فرایندهای رشد و نموی و میزان متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی پیشنهاد می‌شود سازگاری عمومی و خصوصی گیاهان به مناطق مختلف محیطی همواره مدنظر قرار گیرد. جمعیت‌های گیاهی گرگو و دیشموک به ترتیب بهترین و ضعیف‌ترین عملکرد را در در ارتباط با صفات فیتوشیمیایی و مورفولوژیک در مناطق مختلف مورد بررسی نشان دادند. این مطالعه اولین گام برای ورود در برنامه‌های به نژادی در جهت بهبود فرایند اهلی شدن جمعیت گیاهی بیلهر و نهایتاً بهبود عملکرد این گیاه دارویی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق به طور کلی نشان داد که شرایط خاک، دما و ارتفاع می‌تواند بر عملکرد اسانس، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان متابولیت‌های ثانویه در جمعیت‌های گیاهی مورد مطالعه تأثیر بگذارد. در این تحقیق جمعیت‌های گیاهی مورد ارزیابی در دو مکان داران و مارگون که شرایط آب و هوایی نزدیک-تری به شرایط سازگار گیاهان دارویی داشتند نسبت به منطقه اصفهان نتایج بهتری در رابطه با متابولیت‌های ثانویه گیاه بیلهر نشان دادند. در مجموع جمعیت گرگو عملکرد بهتری از لحاظ صفات فیتوشیمیایی و بیشتر صفات مورفولوژیک در کلیه

مناطق مورد بررسی از خود نشان داد که پیشنهاد می‌شود در زمینه اهلی‌سازی این جمعیت گیاهی مطالعه بیشتری انجام شود.

منابع

1. Alawala S, Suman A, Arro JA, Veremis JC and Kimbeng CA. Target region amplification polymorphism (TRAP) for assessing genetic diversity in sugarcane germplasm collections. *Crop Sci*. 2006, 46: 448-455.

2. Buter B, Orlacchio C, Soldati A and Berger K. Significance of genetic and environmental aspects in the field cultivation of *Hypericum perforatum. Planta Med.* 1998, 64: 400-419.

3. Carmentamayo MD. Review of clinical trials evaluating safety and efficacy of milk thistle (*Silybum marianum* L.). *Integr. Cancer Ther.* 2007; 6: 146 - 157.

4. Kulisic T, Radinoc A, Katalinic V and Milos M. Use of diffrent method for testing antioxidative activity of orengo essential oil. *Food Chem*. 2004, 85: 633-640.

5. Prior RL and Cao G. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables. Diet and health implications. *Hortic. Sci.* 2000, 35: 588-592.

6. Ahangarpour A, Oroojan A and Heydari H. Effect of Hydro-Alcoholic Extract of Dorema Aucheri on Serum Levels of Testosterone, FSH and Sperm Count in Nicotinamide-STZ- Induced Diabetic Rat Models. *ZUMS J*. 2013; 21 (87): 22-31.

7. Jaimand K, Rezaee MB, Soltanipoor MA and Mozaffarian V. Volatile constituents of *Teucrium stocksianum* Boiss. ssp. *stocksianum* from Iran *J. Essent. Oil Res*. 2006; 18: 476 - 87.

8. Azarnioushan F, Khatamsaz S and Sadeghi H. The effect of hydro alcoholic extract of *Dorema aucheri* on blood concentration of gonadotropin and androgen hormones in adult male rats. *Armaghan Danesh* 2009, 14: 63-70.

9. Mostafavi SH, Fazilati M, Mostafavi SA, Vahhabi MR, Mostafavi F, Omidvarinia Sh, Zandi-Atashbar N, Derakhshanian H and Hajipoor AR. Hepatotoxicity of *Dorema aucheri* (Bilhar) in Albino Mice. *Arch. Iran Med*. 2013, 16: 530 - 532.

10. Mozaffarian, V. A dictionary of Iranian plant names. Farhang Moaser. 1998, 740 PP.

11. Mirzaee A, Hakimi MH and Sadeghi H. Total antioxidant activity and phenolic content of *Dorema aucheri*. *Iranian J. Biochem. Mol. Biol.* 2005; 116: 11-18.

12. Amiri H and Biraminia L. Phytochemical evalution of *Ferulago angulata*, *Bunium persicum* and *Dorema aucheri* from Kerman province (Iran). *Eco-phytochem. J. Med. Pl*. 2014; 4: 1-10.

13. Mianabadi M, Hoshani M and Salmanian S. Antimicrobial and Anti-oxidative Effects of Methanolic Extract of *Dorema aucheri* Boiss. *J. Agr. Sci. Tech*. 2015; 17: 623-634.

14. Masoudi SH, Esmaeili A, khalilzadeh MA, Rustaiyan A, Moazami N and Akhgar MR. Volatile constituents of Dorema aucheri Boiss., Seseli libanotis (L.) W. D. Koch var. *armeniacum* Bordz. and *Conium maculatum* L. three Umbelliferae herbs growing wild in Iran. *Flavour Fragr J*. 2006; 21: 801-804.

15. Khan A, Farooq U, Ullah F, Iqbal J, Khan AF, Zaib S, Khan AR and Azarpira A. Determination of biological activities and total phenolic contents of flowers of *Jasminum humile* and roots of *Dorema aucheri. J. Chem. Soc. Pak*. 2014; 36 (2): 291-295.

16. Ghavamizadeh M, Mohammadi J, Mirzaei A, Sadegh H and Akbartabar M. Cytotoxicity of *Dorema aucheri*, *Achillea millefolium* and *Artemisia aucheri* by artemia uramiana brine shrimp lethality test (BSLT). *Armaghan Danesh* 2013; 5 (77): 389 -399.

17. Afshoon S, Ostad Rahimi AR, Sadeghi H, Afshoon T and Mahdavi R. The effect of *Dorema*

aucheri extract on breast tumor induced by DBMA in Rats. *Armaghane Danesh* 2010; 15 (3): 224-232.

18. Mokhtari M, Shariati M and Niknam H. Analgesic and anti-inflammatory effect of alcoholic extract of *Dorema aucheri* using formalin and carrageenan model in rat. *J. Raf. Univ. Med. Sci*. 2008; 7 (3): 181-190.

19. Khodagholi D. Evaluation of bioclimatic river basin. PhD thesis in climatology, Faculty of Humanities, University of Isfahan. 2005.

20. Yaghmaie L, Soltani S and Khodagholi M. Effect of climatic factors on distribution of *Artemisia sieberi* and *Artemisia aucheri* in Isfahan province using multivariate statistical methods. *JCPP*. 2008; 12 (44): 359-370.

21. Jafari M, Rostampour M, Tavili A, Zare Chahkoohaki MA and Farzadmehr J. Direct gradient analysis of plant species and environmental factors in rangeland ecological groups of Zirkouh ghain. *J. Rangeland*. 2009; 2 (4): 329 - 343.

22. Gavili Kilaneh E and Vahabi MR. The effect of some soil characteristics on range vegetation distribution in central Zagros, Iran. *JWSS*. 2012; 16 (59): 245-258.

23. Toranjzar H, Jafari M, Azarnivand H and Ghannadha MR. Investigation on relationship between soil characteristics and vegetation properties in Voshnaveh rangeland in Qom province. *Desert*. 2005; 10 (2): 349-360.

24. Jiang Y, Kang M, Zhu Y and Xu G. Plant biodiversity paterns on Helan Mountain, Chaina. *Acta Oecologoca*. 2007; 32: 125-133.

25. Arnon AN. Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agron. J*. 1967; 23: 112-121.

26. Siddiqui MH, Oad FC and Jmaro MGH. Emergence and nitrogen use efficiency of maize under different tillage operation and fertility levels. *Asian J. Plant Sci*. 2006; 5 (3): 508 - 510.

27. Slinkard K. and. Singleton VL. Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Viticult*. 1977; 28: 49 - 55.

28. Singleton VL and Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult*. 1965; 16: 144-158.

29. Kerepesi I and Galiba G. Osmotic and salt stress Induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedling. *Crop Sci*. 2000; 40 (2): 482 - 487.

30. Bors W, Saran M and Elstner EF. Screening for plant anti-oxidants. 1992, pp: 277-295.

31. Ardestani A and Yazdanparast R. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem*. 2007; 104: 21 - 29.

32. Hosseini SAR, Naseri HR, Azarnivand H, Jafari M, Rowshan V and Panahian AR. Comparing stem and seed essential oil in *Dorema ammoniacum* D. Don. From Iran. *J. Essent. Oil Bear. Pl*. 2015; 17: 1287 - 1292.

33. Delnavazi MR, Tavakoli S, Rustaie A, Batooli H and Yassa N. Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils and extracts of *Dorema ammoniacum* roots and aerial parts. *Res. J. Pharmacogn*. 2014; 1: 11 - 18.

34. Yousefzadi M, Heidari M, Akbarpour M, Mirjalili MH, Zeinali A and Parsa M. In vitro Cytotoxic activity of the essential oil of *Dorema ammoniacum* D. Don. *Middle East J. Sci. Res*. 2011; 7: 511-514.

35. Rajabi Z, Ebrahimi M, Farajpour M, Mirza M and Ramshini H. Compositions and yield variation of essential oils among and within nine *Salvia* species from various areas of Iran. *Ind. Crop Prod*. 2014; 61: 233 - 239.

36. Golparvar AR and Ghasemi Pirbalouti A. Genetic improvement of essence percent and dry flower yield using indirect selection in German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *J. Herbal Drugs* 2011; 1 (4): 33-40.

37. Fattahi B, Nazeri V, Kalantari S, Bonfill M and Fattahi M. Essential oil variation in wild-growing populations of *Salvia* reuterana Boiss. collected

from Iran: Using GC–MS and multivariate analysis. *Ind. Crops Prod*. 2016; 81: 180 - 190.

38. Khalighi - Sigaroodi F, Ahvazi M, Ebrahimzadeh H and Rahimifard N. Chemical composition of the essential oil and antioxidant activities, total phenol and flavonoid content of the extract of *Nepeta pogonosperma*. *JMP*. 2013; 4 (48): 185-198.

39. Smirnoff N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *Plant Phytol*. 1993; 125 (1): 27-58.

40. Rahimmalek M, Mirzakhani M and Ghasemi Pirbalouti A. Essential oil variation among 21 wild myrtle (*Myrtus communis* L.) populations collected from different geographical regions in Iran. *Ind. Crop Prod*. 2013; 51: 328 - 333.

41. Aghaei ZJ, Rahimmalek M, Talebi M, Goli SAH, Comparison of total phenolic content and antioxidant activity in different *Salvia* species using three model systems. *Ind.Crops Prod*. 2015; 77: 409 - 414.

42. Esmaeili MA and Sonboli A. Antioxidant, free radical scavenging activities of *Salvia brachyantha* and its protective effect against oxidative cardiac cell injury. *Food Chem. Toxicol*. 2010; 48 (3): 846-853.

Assessment of Phytochemical, Morphological and Antioxidant Variation of Bilehar (*Dorema aucheri*) Populations Cultivated in Different Environmental Conditions

Akbrian A (PhD Student)[1], Rahimmalek M (Ph.D.)[2*], Sabzalian MR (Ph.D.)[1], Saeidi Gh (Ph.D.)[1]

1- Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
*Corresponding author: Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan 84156 83111, Iran
Tel: +98-313-3913348, Fax: +98-313-3912254
Email: mrahimmalek@cc.iut.ac.ir

Abstract

Background: Bilehar or Kandal koohi (*Dorema aucheri*) which belongs to umbeliferae family is an endemic species of Iran. In respect to the extinction risk of this valuable species, until now no study has been performed to evaluate the effect of climate features on different traits in *D. aucheri* populations in different geographical areas.

Objectives: The goal of the study was to investigate phytochemical, morphological and antioxidant variation of Bilehar (*Dorema aucheri*) populations cultivated in different environmental conditions.

Methods: The experiment was conducted in a randomized complete block design in three replicates in November 2014 in three different areas. The total phenolics and flavonoid content were determined colorimetrically. The antioxidant activity of extracts were measured using two model systems, DPPH free radical scavenging (DPPH) and reducing iron (FTC). The essential oil was extracted based on hydro- distillation. To investigate the effect of environmental factors on phytochemical characteristics, Canonical Correlation Analysis (CCA) was applied.

Results: The results revealed the presense of significant differences between populations and various locations for the studied characteristics. Gorgue and Dishmook populations possessed the highest and the lowest amount of phenolics and essential oil in Margon and Isfahan provinces, respectively.

Conclusion: Finally, Gorgue possessed the best performance among all populations in respect to the phytochemical and morphological traits in all provinces, so, further studies are suggested to be done for the domestication of this plant population.

Keywords: *Dorema aucheri*, Antioxidant, Climatic factors, Morphological traits, Phenolic compounds