

ORIGINAL ARTICLE

Grouping of Medicinal Pecan Plant Ecotypes (*Peganum harmala* L.) Based on Biochemical Traits in Hamadan and Kermanshah Provinces

Leila Akbari^{1*}, Mehdi Kakaei²

¹Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Engineering Sciences, Razi University Agriculture and Natural Resources Campus, Kermanshah, Iran.

²Faculty of Engineering, Department of Agricultural Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran.

Correspondence

Leila Akbari

Email: L.akbari@razi.ac.ir

How to cite

Akbari, L., & Kakaei, M. (2024). Grouping of Medicinal Pecan Plant Ecotypes (*Peganum harmala* L.) Based on Biochemical Traits in Hamadan and Kermanshah Provinces. *Crop Biotechnology*, 13(46), 33-44.

ABSTRACT

The most valuable products obtained from the (*Peganum harmala* L.) are phenolic compounds and other biochemical contents, which widely is used in treating of many diseases. This study has been done with the goal of evaluating the effect of different habitats on some biochemical and physiological parameters in pecan plant. First, the samples were identified and collected simultaneously in the four studied habitats. A factorial experiment with a completely randomized design with three replications was conducted in the central laboratory of Razi University in 2023. Results of the analysis of the variance of the studied traits has been showed, that there is a significant difference between the ecotypes and also the two leaf and seed samples in the characteristics of total chlorophyll content, soluble sugar, flavonoid and anthocyanin. The results showed that, there is a significant difference between the ecotype and the sample in chlorophyll b index. The difference between the samples is due to the type of ecotype and the effect of the environment. There is a significant positive correlation between chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll. Phenol and flavonoid content showed significant negative correlation with total chlorophyll and positive and significant correlation with anthocyanin. Considering the content of biochemical compounds and the high content of phenols and flavonoids as antioxidant compounds in the studied samples, it can be stated that Ecotype No. 2 can be introduced to researchers as a suitable sample for further studies in the pharmaceutical field. The authors are grateful for the cooperation of the director of the Faculty of Engineering Sciences and Natural Resources, Razi University.

KEYWORDS

Anthocyanin, Chlorophyll, Genetic diversity, Flavonoid, Habitat, Total phenol.

نشریه علمی

زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های *Peganum harmala* L. بر اساس مارکرهای بیوشیمیایی در چهار رویشگاه مختلف استان همدان و کرمانشاه

لیلا اکبری^{۱*}، مهدی کاکایی^۲

^۱گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم مهندسی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.
^۲دانشکده فنی مهندسی، گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران.

چکیده

با ارزش‌ترین فرآورده‌های بدست آمده از گیاه اسپند ترکیبات فنلی و سایر محتوای بیوشیمیایی می‌باشد که در درمان بسیاری از بیماری‌ها کاربرد وسیعی دارد. این مطالعه با هدف ارزیابی اثر رویشگاه‌های مختلف بر برخی از پارامترهای بیوشیمیایی در گیاه اسپند صورت پذیرفت. ابتدا نمونه‌ها به طور هم‌زمان در چهار رویشگاه مورد مطالعه شناسایی و جمع‌آوری شدند. آزمایشی به صورت فاکتوریل، فاکتور اول اکوتیپ‌ها در چهار سطح و فاکتور دوم نمونه در دو سطح در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه رازی در سال ۱۴۰۲ اجرا گردید. نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات مورد بررسی نشان داد که در صفات محتوای کلروفیل کل، فنل کل، فلاوونوئید و آنتوسیانین اختلاف معنی‌داری بین اکوتیپ‌ها و همچنین دو نمونه برگ و دانه وجود دارد. در بررسی اثر متقابل اکوتیپ در نمونه نیز نتایج حاکی از معنی‌دار بودن شاخص کلروفیل b و قند محلول می‌باشد. اختلاف بین نمونه‌ها می‌تواند ناشی از نوع اکوتیپ و عوامل محیطی باشد. در بررسی و تعیین همبستگی بین صفات مورد بررسی نیز همبستگی مثبت و معنی‌داری بین کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل مشاهده گردید. محتوای فنل و فلاوونوئید نیز دارای همبستگی منفی و معنی‌دار با کلروفیل کل و همبستگی مثبت و معنی‌دار با آنتوسیانین را نشان دادند. در نمونه‌های مورد بررسی با توجه به محتوای ترکیبات بیوشیمیایی و نیز محتوای بالای فنل‌ها و فلاوونوئیدها و همچنین اهمیت این گیاه دارویی با ارزش به واسطه دارا بودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مهم می‌توان بیان داشت که اکوتیپ شماره ۲ می‌تواند به عنوان یک نمونه مناسب جهت مطالعات گسترده‌تر در حوزه کشت، دارویی و درمان به پژوهشگران معرفی گردد.

واژه‌های کلیدی

آنتوسیانین، تنوع ژنتیکی، رویشگاه، فنل کل، فلاوونوئید، کلروفیل.

نویسنده مسئول:

لیلا اکبری

رایانامه: L.akbari@razi.ac.ir

استناد به این مقاله:

اکبری، لیلا و کاکایی، مهدی (۱۴۰۳). بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های گیاه اسپند (*Peganum harmala* L.) بر اساس مارکرهای بیوشیمیایی در چهار رویشگاه مختلف استان همدان و کرمانشاه. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۳(۴۶)، ۳۳-۴۴.

مقدمه

آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی و نحوه مدیریت و استفاده از آن برای دسترسی به مجموعه های ژنتیکی در مراحل مختلف پروژه‌های اصلاحی از ضروریات پایه‌ای هر برنامه اصلاحی است. شناخت تنوع ژنتیکی درون و بین ژرم پلاسماها و کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی نسبی موجود در بین و درون افراد و جمعیت‌ها امکان نمونه‌گیری، ارزیابی، سازماندهی و حفاظت ژرم پلاسما را بطور مؤثرتری فراهم می‌سازد. بلندی‌های زاگرس و هم‌چنین تنوع اقلیمی بالا به دلیل ارتفاعات و دشت‌های پهن سبب ایجاد تنوع اقلیمی وسیعی در این اکوسیستم شده و همین امر نیز سبب حضور تنوع قابل توجهی از گیاهان در این مناطق شده است. بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان همواره از طریق صفات مورفولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی همواره متداول بوده است (ال باکاتوشی و همکاران، ۲۰۱۱).

با توجه به اهمیت گیاهان داروئی به عنوان ذخایر ژنتیکی ارزشمند در صورت استفاده بیش از حد به عنوان منابعی زنده و جبران‌ناپذیر تمام شدنی و اگر با دقت و خردمندی استفاده شوند پایدار خواهند بود. اهمیت گیاهان داروئی در گذشته نادیده گرفته شده است. در حال حاضر به عنوان یک منبع مقرون به صرفه در سیستم بهداشتی و مراقبتی و هم‌چنین به عنوان منبعی برای درآمد محسوب می‌شوند. جنس اسپند شامل چهار گونه است که به طور گسترده در مناطق معتدل گرم تا نیمه گرمسیری از مدیترانه تا مغولستان و هم‌چنین مناطق خاصی از آمریکا پراکنده شده است. در میان این گونه‌ها، گونه (*Peganum harmala* L.) از منطقه مدیترانه تا آسیای مرکزی پراکندگی دارد. (ابراهیمی و زرین‌پنجه، ۲۰۱۵)

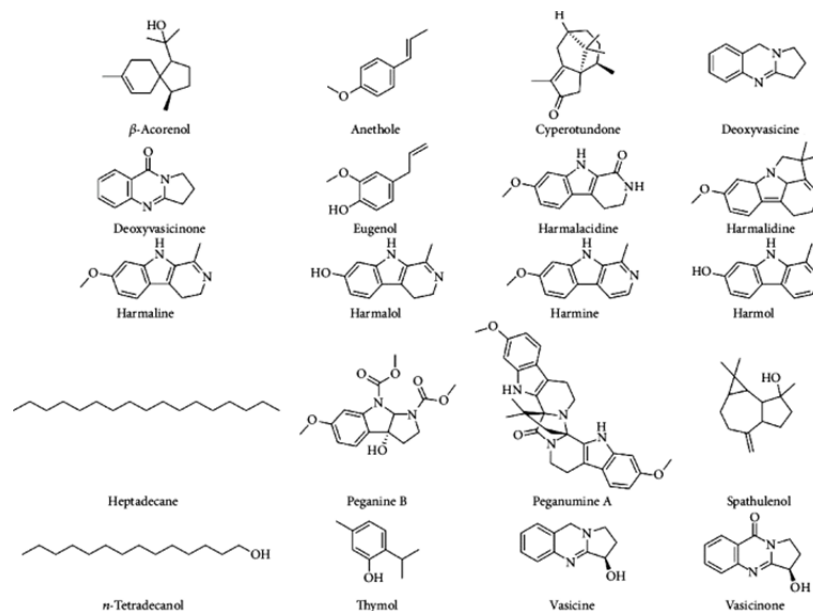
گیاه اسپند بومی منطقه مدیترانه شرقی، گیاهی چندساله و متعلق به خانواده Zygophyllaceae است. در مناطق پلکانی، استپی، خاک‌های سردم‌نی و شرایط نیمه‌خشک به طور خود به خودی رشد می‌کند. درختچه‌ای به ارتفاع ۰/۳ - ۰/۸ متر با گل‌های سفید، ریشه‌های خزنده کوتاه، کپسول‌های دانه‌گرد با بیش از ۵۰ دانه است. این گیاه به طور گسترده‌ای به عنوان یک گیاه داروئی در خاورمیانه، شمال آفریقا و آسیای مرکزی توزیع و مورد استفاده قرار می‌گیرد (فریسون و همکاران، ۲۰۱۱؛ وانترب و رنز د کراینی، ۲۰۰۸). این گیاه در ایران به طور سنتی به عنوان یک ضدعفونی کننده استفاده می‌شده است و با سوزاندن دانه‌های آن عامل ضدعفونی کننده به دست می‌آید (آرشاد و همکاران،

۲۰۰۸؛ فتحی زاده و همکاران، ۲۰۰۶). پروفایل فیتوشیمیایی، کاربرد سنتی توسط مردم کاربرد داروئی و کلینیکی این گیاه داروئی به خوبی شناخته شده است. این گیاه برای درمان انواع بیماری‌های انسان مانند آسم، یرقان، قولنج و غیره مورد توجه قرار گرفته است (بوخاری و همکاران، ۲۰۰۸). اسپند به علت دارا بودن ترکیبات آلکالوئیدی نظیر، هارمین، هارمالین و هارمالول مورد توجه خاص محققین می‌باشد (شکل ۱). تاکنون مطالعات فراوانی روی جنبه‌های مختلف اسپند انجام گرفته است. آلکالوئید هارمالا بیشتر در دانه، کپسول و ریشه‌ها و به میزان ۲ تا ۷ درصد وزن خشک یافت می‌شود (فریسون و همکاران، ۲۰۰۸). فارماکولوژیک‌ترین ترکیبات فعال *Peganum harmala* چندین آلکالوئید هستند که در دانه‌ها و ریشه‌ها یافت می‌شوند. گزارش شده است که این گیاه دارای اثرات ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدویروسی است. مجموعه وسیعی از متابولیت‌های ثانویه را گیاهان داروئی تولید می‌کنند که این مواد در موارد متعددی به عنوان مکانیسم‌های دفاعی در برابر میکروارگانیسم‌ها، حشرات و گیاه‌خواران عمل می‌کنند (میرجانا و همکاران، ۲۰۰۴). اندام‌های مختلف یک گیاه داروئی دارای مقادیر متفاوتی از ترکیبات شیمیایی هستند. از طرف دیگر، عکس‌العمل گونه‌های مختلف نسبت به غلظت‌های مختلف عصاره اندام‌های گیاهی متفاوت می‌باشد. در تمامی گیاهان میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی رابطه مستقیم با فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آن‌ها دارد. در بسیاری از گیاهان کوئرستین، یک فلاونوئید طبیعی و بدون گلیکوزید است. فلاونوئید بدون گلیکوزید نسبت به فلاونوئید گلیکوزیددار آنتی‌اکسیدان قوی‌تری است. بسیاری از مطالعات حاکی از اثر آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی ماده کوئرستین است (محمدی سانی و ابراهیمی، ۲۰۱۵). آنتی‌اکسیدان‌ها با حذف رادیکال‌های آزاد یا ممانعت از تشکیل آن‌ها، سبب حفظ سلول‌ها در برابر آسیب اکسیداتیو می‌شوند (جوئی و همکاران، ۲۰۱۵). مکانیسم ترکیبات فنلی برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی خنثی کردن رادیکال‌های آزاد است به طوری که غلظت این بیومولکول‌ها پس از مواجهه گیاه با تنش به سرعت افزایش و شرایط پاسخ به تنش را در گیاه تعدیل می‌کند (فیگوئی روا و همکاران، ۲۰۱۶). وظایف مختلف ترکیبات فنلی در گیاه شامل: ماده رنگی در گیاهان، خواص ضد بیماری و آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتری و آفت‌کش طبیعی، عامل حفاظت گیاه در برابر امواج ماوراء بنفش، عامل عایق‌بندی

(۲۰۰۷). در تحقیقی میزان فنل کل حاصل از عصاره آبی و الکل‌ی گیاه اسپند مورد بررسی قرار گرفته است که میزان فنل کل به ترتیب ۱۰/۹ و ۸/۷ میلی‌گرم در گرم وزن خشک گیاه گزارش شده است (تواها خالد و همکاران، ۲۰۰۷).

در نتایج حاصل از بررسی صفات بیوشیمیایی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های گیاه آقطی جمع‌آوری شده در مناطق مختلف شمال کشور نشان داده شده است که عامل ارتفاع بر میزان متابولیت‌های ثانویه مؤثر بوده است. به طوری که با افزایش ارتفاع از سطح دریا، میزان فنل و فلاونوئید در اندام برگ روند کاهشی داشته است در حالی که در سایر بخش‌های گیاه این روند افزایشی بوده است. همچنین در بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با افزایش ارتفاع میزان فعالیت آنزیم‌ها افزایش نشان داده است. وجود اختلاف معنی‌دار در اندام‌های مختلف گیاه آقطی و همچنین مناطق مختلف نمونه‌برداری بیانگر آن است که میزان فلاونوئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در میوه و برگ بیشتر از اندام‌های ساقه و ریشه است (پولکی خشکردی و همکاران، ۲۰۲۳). در بررسی تأثیر ارتفاع و رویشگاه گیاهی بر میزان فلاونوئید و ترکیبات فنلی کل در گیاهان آقطی، گزنه، گل‌گاوزبان، علف‌مار و گل‌راعی بیان داشتند که بیشترین میزان بیان را علف‌مار داشته است که بیشترین میزان ترکیبات مؤثره این گیاهان در ارتفاعات مشاهده شده است که نتایج تحقیق حاضر در تأثیر ارتفاع بر میزان فنل، فلاونوئید و سایر ترکیبات مؤثره در اندام‌های ساقه، برگ و میوه اسپند مشابه بوده است (قنبری و همکاران، ۲۰۲۲).

کننده دیواره سلولی گیاهی در برابر گازها (شهیدی و نرکی، ۲۰۰۴). در گیاهان، یکی از بهترین منابع آنتی‌اکسیدان طبیعی فلاونوئیدها است (قریبی و همکاران، ۲۰۱۵)، جزو بزرگترین گروه فنل‌های گیاهی و از ۸۰۰۰ ترکیبات فنلی طبیعی موجود تقریباً بیش از نیمی از آن‌ها را شامل می‌شوند. افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل با قدرت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فلاونوئیدی ارتباط دارد. به طوری که فلاونوئیدها به طور مستقیم باعث مهار مولکول‌های فعال سوپراکسید و هیدروکسیل می‌گردند (شارما و همکاران، ۲۰۱۲). از طرفی نیز آنتوسیانین‌ها مهم‌ترین گروه از رنگدانه‌های طبیعی بعد از کلروفیل هستند که در آب به صورت محلول بوده و در سطح وسیعی در مایع سلولی گیاه وجود دارند. این رنگدانه‌های فلاونوئیدی مسئول رنگ‌های مختلف در میوه‌ها، گل‌ها و سبزیجات هستند. آنتوسیانین‌ها توانایی جذب رادیکال‌های آزاد در بدن موجودات زنده را دارند (بوچرت و همکاران، ۲۰۰۵). از جمله مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر رشد و عملکرد گیاهان ارتفاع از سطح دریا است. در اثر تغییر ارتفاع تغییرات دمایی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در تغییرات ارتفاع رویش گیاه است. به طوری که با افزایش و یا کاهش ارتفاع عواملی مانند رطوبت نسبی، میزان آب در دسترس و حتی میزان تابش نور دریافتی برای گیاه نیز تغییر می‌کند (فیل کچ و همکاران، ۲۰۱۲). عصاره نعناع (*Mentha spicata* L.) با دارا بودن محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی را در مطالعات مختلف از خود نشان داده است (سوئیتی و همکاران،



شکل ۱. ترکیبات فیتوشیمیایی جدا شده از گونه‌های مختلف اسپند (شریفی را و همکاران، ۲۰۲۱)

ارزیابی‌های آزمایشگاهی

آزمایش به صورت فاکتوریل در پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در سال ۱۴۰۲ انجام شد. در این بررسی فاکتور اول اکوتیپ‌ها در چهار سطح (روستای موسی‌آباد دو نمونه، روستای نجف‌آباد و روستای کارخانه) و فاکتور دوم نمونه در دو سطح (دانه و برگ) مورد بررسی قرار گرفتند. اندام‌های هوایی گیاه جمع‌آوری و سپس در دمای اتاق در سایه خشک شدند. قطعات ذکر شده به صورت مجزا آسیاب، پودر و ریز شدند (شکل ۲). جهت تهیه عصاره‌های گیاهی (یک گرم) پودر از هر نمونه با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر حلال متانول به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شدند. جهت استخراج مواد مؤثره گیاهی و سپس حذف ناخالصی‌ها با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند، مایع رویی آن‌ها جهت تعیین محتوای مواد مؤثره جمع‌آوری گردید. جهت تعیین محتوای فنل کل موجود در عصاره‌ها از معرف (Folin-Ciocalteu) که به نسبت ۱:۱۰ رقیق شده بود) به ۵۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی افزوده شد. سپس محلول حاصل با ۱ میلی‌لیتر کربنات سدیم یک مولار مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای اتاق و تاریکی انکوبه گردید. در نهایت جذب محلول با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت جهت تعیین محتوای فنل کل برحسب میلی‌گرم اکی والان‌های گالیک اسید در ۱۰۰ گرم عصاره با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید بیان گردید (بورداک، ۲۰۱۶). تعیین محتوای فلاونوئید موجود در عصاره‌ها طبق روش جیا و همکاران (جیا و همکاران، ۱۹۹۹) با اندکی تغییر تعیین شد. ۵۰ میکرولیتر عصاره در لوله آزمایش با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و سپس ۰/۰۷۵ میلی‌لیتر نیتريت سدیم پنج درصد به آن اضافه شد، بعد از ۵ دقیقه ۰/۱۵ میلی‌لیتر محلول (کلرید آلومینیوم) ۱۰ درصد اضافه شد و پس از گذشت شش دقیقه ۰/۵ میلی‌لیتر (NaOH) میلی‌لیتر یک مولار اضافه گردید و با آب مقطر حجم نهایی محلول به سه میلی‌لیتر رسانده شد و سپس در طول موج ۵۱۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر قرائت شد.

تعیین محتوای سطوح فنول کل، فلاونوئیدها، تانن‌ها و آنتوسیانین‌ها را از دانه‌های اسپند هارملا مورد ارزیابی قرار گرفته است. عصاره دانه‌های *Peganum harmala* از دو مکان مختلف در تونس (Oudref و Djerba) با حلال‌های استخراج متفاوت شامل پترولیوم اتر، کلروفرم، اتیل استات، اتانول و آب به دست آمد. نتایج حاصل از ارزیابی نشان داده است که ترکیب آن‌ها از نظر فنولیک (معادل ۲/۴۸ تا ۷۵/۵۲ گرم بر کیلوگرم اسید گالیک)، آنتوسیانین‌ها (معادل ۰ تا ۲۵/۵۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم سیانیدین) و فلاونوئیدها (۰ تا ۳/۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم معادل کوئرستین) می‌باشد (چبیر و همکاران، ۲۰۱۴).

در مطالعه عصاره‌های حاصل از نمونه‌های مختلف گیاه اسپند نیز نتایج حاکی از آن بوده است که عصاره‌ها اثر محافظت‌کننده عصبی، ضد سرطانی، ضد میکروبی و ضد ویروسی را نشان داده‌اند. همچنین در بهبود اختلالات تنفسی (آسم و سرفه)، درماتوز و استئوآرتریت زانو نیز مؤثر هستند (شریفی راد و همکاران، ۲۰۱۴).

با توجه به خواص درمانی چند منظوره و استفاده از قسمت‌های مختلف این گیاه این مطالعه با هدف ارائه بینشی در خصوص موقعیت جغرافیایی و تعیین محتوای بیوشیمیایی بین متابولیت‌های ثانویه کپسول و شاخساره چند اکوتیپ جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان همدان و کرمانشاه جهت تعیین بهترین اکوتیپ بر اساس محتوای ترکیبات بیوشیمیایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ارزیابی محل جغرافیایی و رویشگاه

در این مطالعه، نمونه‌های گیاهی چهار محل رویش شامل سه مکان در نقاط مختلف اسدآباد (استان همدان) شامل (نمونه اول: روستای موسی‌آباد ۱، نمونه دوم: روستای موسی‌آباد ۲ و نمونه سوم: روستای نجف‌آباد) و نمونه چهارم در شهر کنگاور (استان کرمانشاه) شامل (روستای کارخانه) واقع در بخش غربی ایران ارزیابی گردیدند (جدول ۱). ابتدا نمونه‌های گیاهی اسپند هم‌زمان (اوایل تیرماه ۱۴۰۲) در محل رویشگاه‌های فوق‌الذکر مورد نظر شناسایی و جمع‌آوری گردیدند.

جدول ۱. مشخصات جغرافیایی محل‌های جمع‌آوری اکوتیپ‌های مورد مطالعه

ردیف	محل جمع‌آوری	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)
۱	روستای موسی‌آباد، اسدآباد (همدان)	۴۸/۰۰۸۶	۳۴/۹۹۰۸۸	۱۵۰۰
۲	روستای نجف‌آباد - اسدآباد (همدان)	۴۷/۹۷۶۰	۳۴/۶۵۲۷۹	۱۵۰۰
۳	روستای کارخانه - کنگاور (کرمانشاه)	۴۷/۹۹۷۸	۳۴/۴۹۷۳۰	۱۲۰۰

سانتریفیوژ جدا و درون فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد. دو میلی لیتر از محلول آماده شده به یک فالکون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شده و یک میلی‌لیتر محلول فنل پنج درصد به محلول درون فالکون مرحله قبل اضافه و سپس پنج میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸٪ (v/v) به محلول بالا اضافه می‌شود و در نهایت پس از ۴۵ دقیقه، میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۸۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت گردید (شیلگل، ۱۹۵۶). تعیین مقدار رنگیزه‌های فتوستتزی شامل کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل با استفاده از روش (لیکتین تالر، ۱۹۸۷) انجام شد (شکل ۳).

ارزیابی‌های آماری

داده‌های حاصل از بررسی صفات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن با ضریب اطمینان ۹۵ درصد انجام گرفت. جهت رسم نمودارها از برنامه اکسل، Graph Pad و HeatMaper استفاده گردید.

محتوای فلاونوئیدی کل بر حسب میلی‌گرم اکی‌والان‌های کوئرستین موجود در ۱۰۰ گرم عصاره با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین بیان گردید. جهت محاسبه آنتوسیانین نمونه‌ها، دو صدم گرم از گیاه خشک وزن و با چهار میلی‌لیتر HCL یک درصد در متانول درون هاون چینی سائیده شده و سپس عصاره حاصل به مدت ۲۴ ساعت درون یخچال قرار گرفت. پس از ده دقیقه سانتریفیوژ محلول روئی جمع‌آوری و در طول موج های ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر قرائت گردید. میزان آنتوسیانین کل با فرمول زیر محاسبه گردید ($A = A_{530} - (0.25 \times A_{657})$ و به ترتیب نشان‌دهنده میزان آنتوسیانین کل، جذب در طول موج ۵۳۰ و جذب در طول موج ۶۵۷ نانومتر است (مایتا و همکاران، ۱۹۹۷). در تعیین محتوای قند کل نیز ۰/۲ گرم از نمونه تر وزن، در ازت مایع پودر و سپس درون تیوب دو میلی‌لیتری ریخته شده و سپس ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد روی هر نمونه اضافه می‌شود و به مدت ۵ دقیقه با ورتکس شده و سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. فاز رویی حاصل از



شکل ۲. تصویر نمونه‌های مورد مطالعه (برگ و دانه) در اسپند

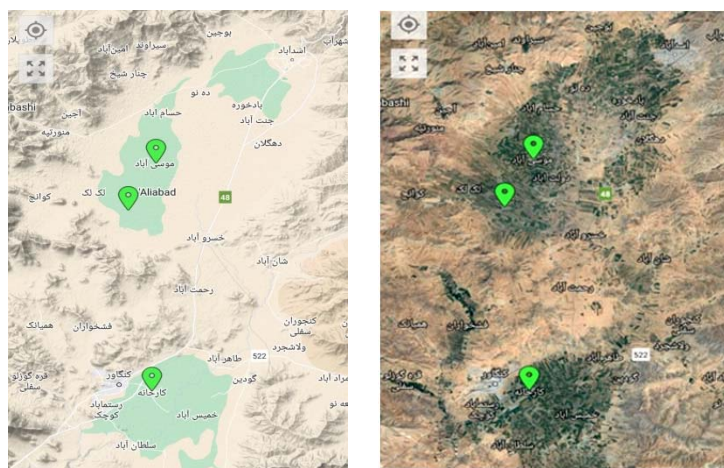


شکل ۳. تهیه عصاره حاصل از پودر نمونه‌ها و آماده‌سازی جهت قرائت صفات مورد بررسی در اکوتیپ‌های اسپند

نتایج

نتایج حاصل از بررسی موقعیت جغرافیائی چهار اکوتیپ مورد بررسی با استفاده از نقشه ماهواره ای نشان داد که با توجه به طول، عرض جغرافیائی و ارتفاع از سطح دریا، این اکوتیپ‌ها در یک طول جغرافیائی، عرض‌های مختلف جغرافیائی و با توجه به مناطق ارتفاع از سطح دریا نیز در آن‌ها متفاوت است (شکل ۴). به دلیل اینکه در عرض‌های جغرافیائی متفاوت قرار دارند محتوای ترکیبات بیوشیمیائی آن‌ها نیز متفاوت است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات مورد بررسی نتایج

نشان داد که در صفات محتوای کلروفیل کل، فلاوونوئید و آنتوسیانین اختلاف معنی‌داری بین اکوتیپ‌ها و هم‌چنین دو نمونه برگ و دانه وجود دارد و در بررسی اثر متقابل نیز نتایج نشان داده است که شاخص کلروفیل b و محتوای قند محلول معنی‌دار است (جدول ۲). اختلاف بین نمونه‌ها می‌تواند ناشی از تفاوت در اکوتیپ و اثر محیط باشد. در نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثرات اصلی مورد بررسی در بین اکوتیپ‌ها نیز، بیشترین محتوای فنل کل مربوط به نمونه‌های موسی‌آباد ۱ و ۲، نجف‌آباد و سپس روستای کارخانه بوده است.



شکل ۴. موقعیت اکوتیپ‌های مورد بررسی بر اساس GPS و تعیین محل‌های جمع‌آوری بر روی نقشه

جدول ۲. میانگین مربعات صفات بیوشیمیائی در اکوتیپ‌های مورد بررسی اسپند

میانگین مربعات					درجه آزادی		منابع تغییرات
آنتوسیانین	فلاوونوئید	فنل کل	قند محلول	کلروفیل کل	کلروفیل a	کلروفیل b	
۱۶۵/۵۲۵**	۱/۰۴۳**	۸/۰۲۵ ^{ns}	۶۵۴۵۳/۰۰۶**	۱۷۷/۱۴۳**	۱۹۵/۱۰۹**	۱/۱۰۹ ^{ns}	اکوتیپ نمونه
۹۷۵۱/۵۲۵**	۲۳/۶۶۹**	۲۴۹/۸۸۵**	۶۲۴۷۳/۳۵۳*	۹۶۳۲/۶۲۲**	۳۷۵۹/۹۲۹**	۱۳۴۱/۲۸۴**	اکوتیپ*نمونه
۱۰/۳۳۰ ^{ns}	۰/۰۷۳ ^{ns}	۱/۳۹۹ ^{ns}	۴۴۲۶۳/۶۳**	۱۳/۳۴۴ ^{ns}	۳۸/۱۱۰*	۴/۲۲۷ ^{ns}	خطای آزمایشی
۱۷/۱۱۷	۰/۰۷۱	۵/۹۱۵	۷۹۶۳/۶۹۳	۱۷/۴۵۵	۱۰/۳۶۴	۲/۵۴۳	

^{ns} غیر معنی دار، *، ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

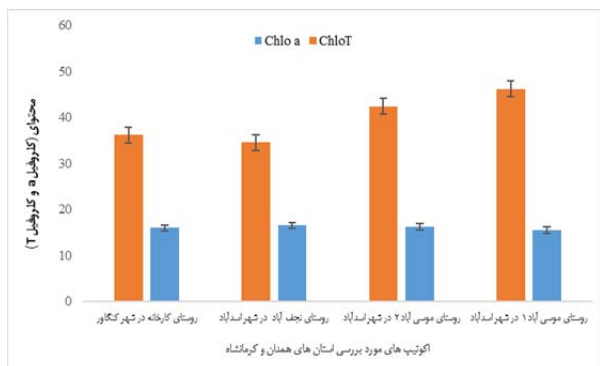
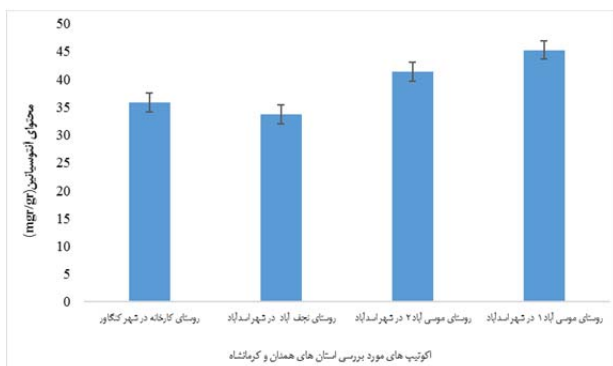
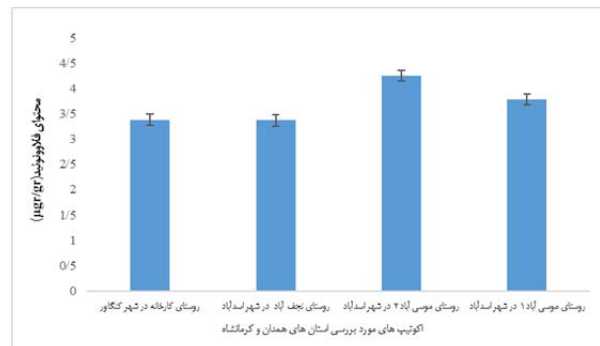
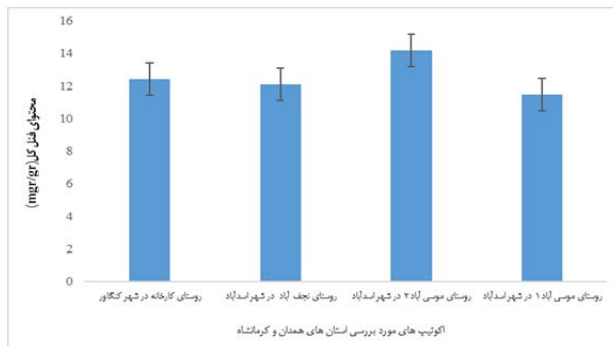
کارخانه و نمونه شماره ۱ روستای موسی‌آباد بیشترین مقدار قند در دانه را به خود اختصاص داده‌اند. در بررسی محتوای کلروفیل b نیز روند تغییر در محتوای این ترکیب در اثر متقابل بین اکوتیپ و نمونه معنی‌دار شده است.

در نتایج حاصل از همبستگی بین صفات مورد بررسی (جدول ۳) نیز همبستگی مثبت و معنی‌دار بین کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل وجود دارد. محتوای فنل و فلاوونوئید همبستگی منفی و معنی‌دار با کلروفیل کل و همبستگی مثبت و معنی‌دار با آنتوسیانین نشان داده‌اند. محتوای فنل و فلاوونوئید نیز دارای همبستگی مثبت و معنی‌دار است.

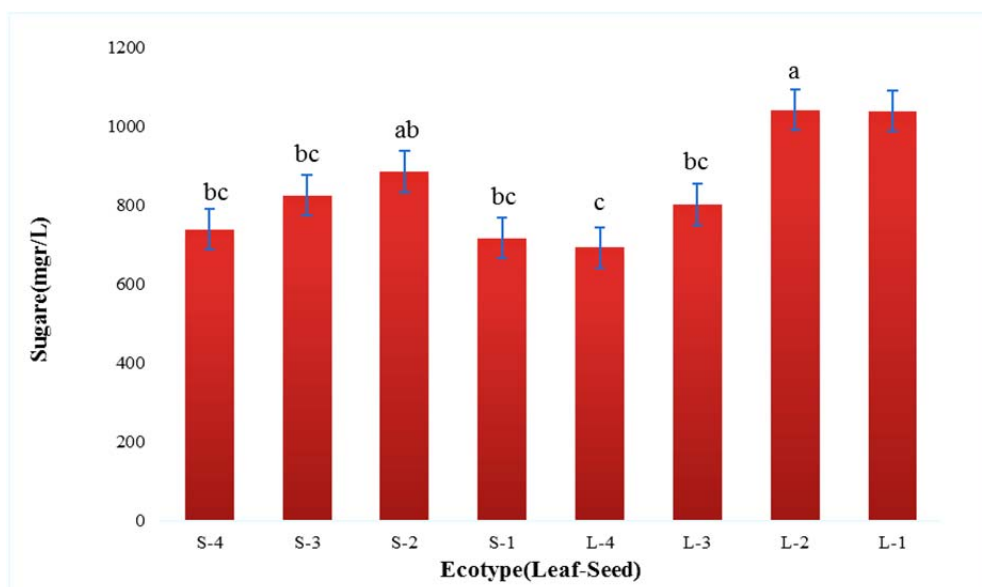
بر اساس رسم نمودار Heat map نیز میزان همبستگی بین صفات مورد بررسی تأیید گردید. میزان همبستگی بر اساس رنگ و میزان شدت و معنی‌داری صفات قابل مشاهده است (شکل ۸). در گروه‌بندی بر اساس تجزیه به مؤلفه‌های اصلی چهار اکوتیپ در گروه‌های مجزا قرار گرفته‌اند (شکل ۹). بر اساس این گروه‌بندی نیز نمونه موسی‌آباد ۲ بر اساس اهمیت متابولیت‌های ثانویه دارای بیشترین محتوای فنل و فلاوونوئید پس از نمونه موسی‌آباد ۱ بوده است. بر اساس گروه‌بندی با مؤلفه‌های اصلی نیز مؤلفه اول بیشترین سهم را در گروه‌بندی اکوتیپ‌ها داشته است (جدول ۴).

در بین نمونه‌های موسی‌آباد اکوتیپ شماره ۲ از محتوای فنل بالاتری (۱۴/۱۶۶ میلی‌گرم بر لیتر) و اکوتیپ روستای کارخانه از محتوای فنل پائین‌تری (۱۱/۴۵۳ میلی‌گرم بر لیتر) برخوردار بوده‌اند. در بررسی محتوای فلاوونوئید بین اکوتیپ‌ها نیز به ترتیب اکوتیپ‌های شماره ۲ و شماره ۱ روستای موسی‌آباد با مقادیر (۴/۲۵۱ و ۳/۷۹۹) و سپس نمونه‌های روستای کارخانه و روستای نجف‌آباد کمترین مقادیر را به خود اختصاص داده‌اند. در بررسی نتایج مقایسه میانگین محتوای آنتوسیانین و کلروفیل کل بالاترین مقادیر به ترتیب اکوتیپ‌های روستای موسی‌آباد نمونه‌های ۱ و ۲ سپس روستای کارخانه و روستای نجف‌آباد بوده‌اند (شکل ۵).

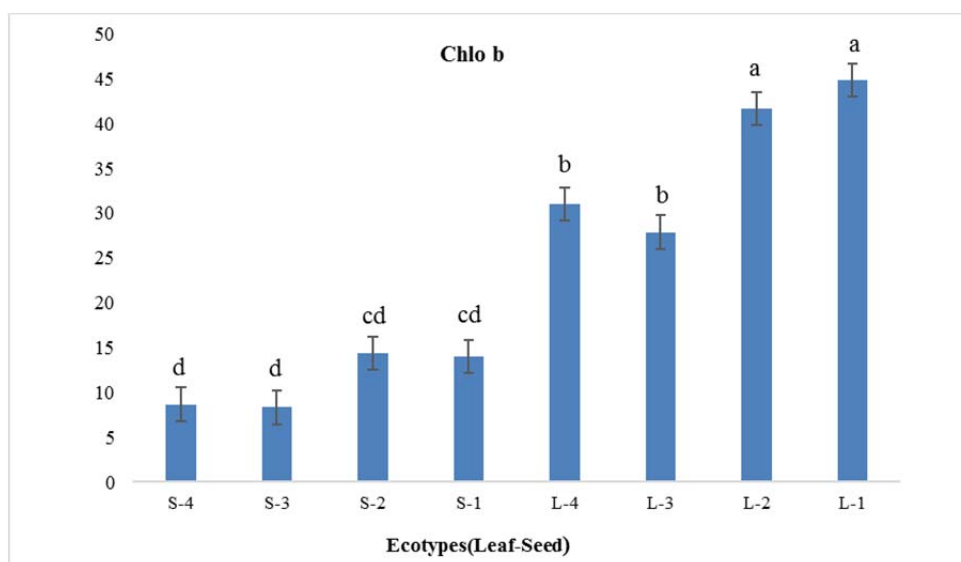
در مقایسه میانگین اثر متقابل اکوتیپ و نمونه در محتوای صفات کلروفیل b (mgr/L) (شکل ۶) و قند محلول (mgr/L) (شکل ۷) نیز نتایج نشان داد، میزان دو صفت در برگ بیشتر از دانه بوده است. محتوای قند محلول به ترتیب در برگ نمونه‌های شماره ۲ و ۱ روستای موسی‌آباد (۱۴۰۲/۰۲۳، ۱۰۳۹/۲۰۷) و سپس در نمونه‌های روستای نجف‌آباد و کارخانه بیشترین مقادیر را نشان داده‌اند. در بررسی محتوای قند محلول دانه‌ها نیز به ترتیب اکوتیپ‌های نمونه شماره ۲ روستای موسی‌آباد و سپس نمونه‌های نجف‌آباد، روستای



شکل ۵. مقایسه میانگین اثرات اصلی صفات فنل کل، فلاوونوئید، آنتوسیانین، کلروفیل a و کلروفیل b در اکوتیپ‌های مورد مطالعه



شکل ۶. میانگین اثر متقابل اکوتیپ در نمونه با بررسی محتوای قند محلول (mgr/L)

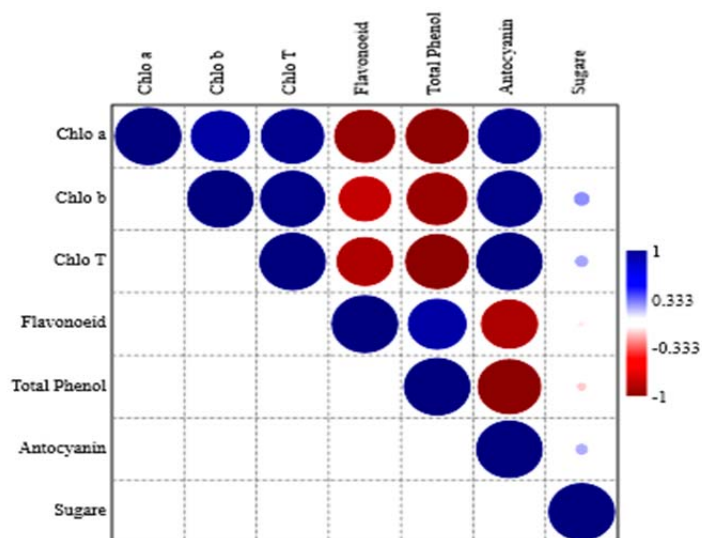


شکل ۷. میانگین اثر متقابل اکوتیپ و نمونه در بررسی محتوای کلروفیل b

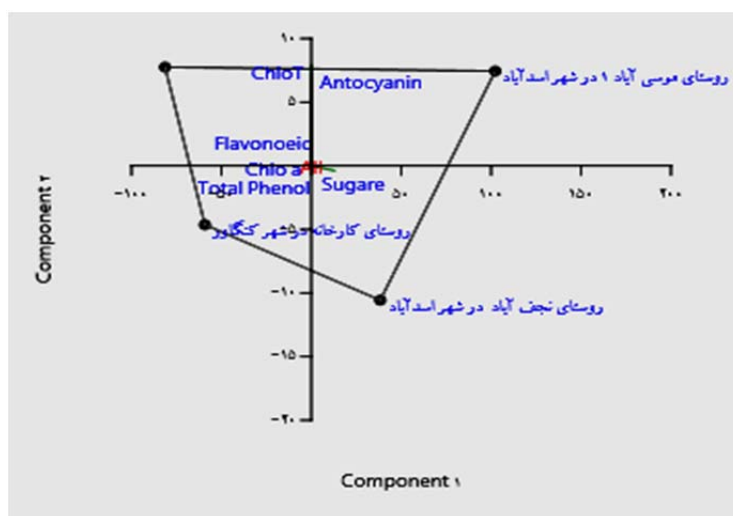
جدول ۳. جدول همبستگی ساده بین صفات مورد مطالعه در چهار اکوتیپ اسپند

	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total Chlorophyll	Flavonoeid (µgr/gr)	Total phenol	Antocyanin	Sugare (mgr/L)
Chlorophyll a	۱	۰/۸۸۶**	۰/۹۵۱**	-۰/۹۱۹**	-۰/۹۵۲**	۰/۹۵۶**	-۰/۳۸
Chlorophyll b		۱	۰/۹۷۸**	-۰/۷۸۰**	-۰/۹۱۲**	۰/۹۷۶**	۰/۲۲۴
Total Chlorophyll			۱	-۰/۸۴۶**	۰/۹۵۷**	۱**	۰/۱۷۸
Flavonoeid (µgr/gr)				۱	۰/۸۷۸**	-۰/۸۲۵**	۰/۰۸۳
total phenol					۱	۰/۹۵۸**	-۰/۱۳۱
Antocyanin						۱	۰/۱۷۴
Sugare(mgr/L)							۱

ns غیر معنی دار، *، ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد



شکل ۸. نمودار همبستگی بین صفات مورد بررسی توسط نرم‌افزار PAST



شکل ۹. نمودار بای‌پلات مربوط به صفات مورد بررسی و توده‌های ژنی با استفاده از روش تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA)

(شکل ۹). این یافته‌ها نشان دهنده آن است که ساختار جمعیتی اسپند تا حد زیادی با اکوتیپ و موقعیت جغرافیائی ارتباط داد.

بحث

نیاز به یک شناخت پایه از فراوانی، پراکنش گونه‌های گیاهی و ساختار ژنتیکی در مدیریت تنوع زیستی و حفاظت از منابع ژرم پلاسما از اهمیت بالایی برخوردار است. در شرایط مختلف رشدی گیاهان تولید متابولیت‌های ثانویه متفاوت است. بنابراین غلظت و نوع متابولیت‌های ثانویه تولید شده در گیاه با دخالت عوامل بسیاری از جمله تنوع گونه گیاهی، مرحله‌ی رشدی، فیزیولوژی، عوامل محیطی، ارتفاع از سطح دریا و خاک دچار تغییر می‌شوند

جدول ۴. سهم واریانس مؤلفه‌های اول و دوم در گروه‌بندی و رسم بای‌پلات اکوتیپ‌ها

PC	Eigenvalue	% Variance
۱	۷۳۵۱/۸۸	۹۸/۸۷۲
۲	۸۲/۸۶۹۳	۱/۱۴۵
۳	۱/۰۰۰۶	۰/۰۱۳

نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در بررسی و گروه بندی صفات و اکوتیپ‌ها نیز نشان داده است که مؤلفه اول با سهم واریانس (۹۸٪/۸۷۲) بیشترین سهم را در گروه‌بندی اکوتیپ‌ها به خود اختصاص داده است و بر این اساس نمونه‌ها با توجه به صفات مورد بررسی تفکیک و در گروه‌های مجزا جای گرفته‌اند

منطقه خواهد بود. بر این اساس و با توجه به محتوای ترکیبات بیوشیمیایی و محتوای بالای فنل‌ها و فلاونونوئیدها به عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های مورد بررسی می‌توان بیان داشت که اکوتیپ شماره ۲ روستای موسی‌آباد می‌تواند به عنوان یک نمونه مناسب جهت مطالعات گسترده‌تر در حوزه داروئی به پژوهشگران معرفی گردد. همچنین می‌توان از این اکوتیپ از نظر متابولیت‌های ثانویه به عنوان والدین در برنامه‌های اصلاحی بهره برد. همچنین شناسایی محتوای عصاره اسپند بر اساس روشگاه آن در مراحل مختلف رشدی گیاه ضروری است و امکان فراهم کردن استخراج مواد مؤثره در استفاده‌های کاربردی از فرآورده‌های آن و توان افزایش عملکرد دارویی گیاهان را سبب می‌شود.

References

- Arshad, N., Neubauer, C., Hasnain, S., & Hess, M. (2008). *Peganum harmala* can minimize Escherichia coli infection in poultry, but long-term feeding may induce side effects. *Poultry science*, 87(2), 240-249.
- Asghari, G., Ihsanpour, A., Akbari, A., & Akbari, A. (2006). Production of Arbutin by Biotransformation of Hydroquinone Using *Peganum harmala*, *Varthemia persica* and *Pycnocycla spinosa* Cell Suspension Cultures: Production of arbutin from hydroquinone. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(2), 91-96.
- Bermúdez, X., Cancela, M., Merchán, Y., & Sanchez Bermudez, A. (2021). Anthocyanins, Phenolic Compounds, and Antioxidants from Extractions of Six Eucalyptus Species. *Applied Sciences*, 11(21), 9818.
- Burdock, G.A. (2016). *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*; CRC Press: Boca Raton, FL. USA.
- Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A.H., Akpulat, A. 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 87, 215-220.
- Chabir, N., Ibrahim, H., Romdhane, H., Valentin, A., Moukarzel, B., Mars, M., & Bouajila, J. (2014). Seeds of *Peganum harmala* L. chemical analysis, antimicrobial and antioxidant activities, and cytotoxicity against human breast cancer cells. *Medicinal chemistry (Shariqah (United Arab Emirates))*, 11(1), 94-101.
- Ebrahimi, M. A., & Zarinpanjeh, N. (2015). Bio-elicitation of β -carboline alkaloids in Cell Suspension Culture of *Peganum harmala* L. *Journal of Medicinal Plants*, 14(55), 43-57.
- El-Bakatoushi R., Hegazy A. K., SaadH, and Fawzy M. (2011). Genetic diversity in coastal and inland desert populations of *Peganum harmala* L. (Peganaceae). *African Journal of Biotechnology*, 10(71), 15883-15890.
- Fadhil, S., Reza, M.E., Rouhollah, G., & Reza, V.R. (2007). Spectrophotometric Determination of Total Alkaloids in *Peganum harmala* L. Using Bromocresol Green. *Research Journal of Phytochemistry*, 1, 79-82.
- Fathiazad, F., Azarmi, Y., & Khodaie, L. (2006). Pharmacological Effects of *Peganum harmala* Seeds Extract on Isolated Rat Uterus: Effects of *Peganum harmala* on rat uterus. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(2), 81-86.
- Fille cache, A., Aliabadi, A., Farzane, H., Borzooei, M., & Adarasi, A. (2012). Ecology study of (*Salvia leriifolia*) in Sabzevar. Congress of Horticultural Sciences. Bu-Ali Sina University.
- Frison, G., Favretto, D., Zancanaro, F., Fazzino, G., & Ferrara, S. D. (2008). A case of beta-carboline alkaloid intoxication following ingestion of *Peganum harmala* seed extract. *Forensic science international*, 179(2-3), e37-e43.
- Frison, G., Favretto, D., Zancanaro, F., Fazzino, G., & Ferrara, S. D. (2008). A case of beta-carboline alkaloid intoxication following ingestion of *Peganum harmala* seed extract. *Forensic science international*, 179(2-3), e37-e43.

(ایسا، ۲۰۱۹). میزان کیفی و کمی متابولیت‌های ثانویه مؤثر در گیاهان داروئی هر منطقه، تحت تأثیر شرایط اقلیمی، عوامل محیطی و تنش‌های اکولوژیک آن منطقه می‌باشد. تغییرات حاصل از محتوای ترکیبات بیوشیمیایی نمونه‌ها می‌تواند تحت تأثیر عوامل دیگری مانند محل رشد گیاه و سن برگ‌ها باشد. در مطالعات مختلف دلیل عمده بالا بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی بعضی از عصاره‌های گیاهی بالا بودن ترکیبات فنلی در آن‌ها می‌باشد. این ترکیبات از طریق عصاره‌های گیاهی آن‌ها قابل استخراج می‌باشد (کاندان و همکاران، ۲۰۰۳). یافته‌ها نشان می‌دهد این گونه‌ها منبع خوبی از محتوای فنل و آنتوسیانین هستند و بهره‌برداری از آن‌ها به عنوان رویکردی برای کاهش ضایعات، از نظر اقتصادی و زیست محیطی به نفع

- Ghanbari A, Azimi M, Rafiei A, Biparva P, Ebrahimzadeh M A. 2020. Changes in the phytochemical content of the Cappers Collected from of different microclimates. *Plant Process and Function*, 9 (39), 165-178 (In Persian).
- Gharibi, Shima & Sayed-Tabatabaei, Badraddin & Saeidi, Ghodrattollah. (2015). Comparison of Essential Oil Composition, Flavonoid Content and Antioxidant Activity in Eight Achillea Species. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18, 1382-1394. (In Persian)
- Goel, N., Singh, N., & Saini, R.G. (2009). Efficient in vitro multiplication of Syrian Rue (*Peganum harmala* L.) using 6-benzylaminopurine pre-conditioned seedling explants. *Nature & Science*, 7(7), 129-34.
- Horwitz, W. (1984). Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. Washington, D.C. 14th Ed. AOAC.
- Isah., T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Journal of Biological Research*, 52, 1 -25.
- Jia, Z., Tang, M., & Wu, J. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559.
- Joyce, C., Pennycooke, S., & Stushnoff, C. (2005). Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia. *Environmental and Experimental Botany*, 53, 225-232.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In: Methods in Enzymology, eds. L. Packer, and R. Douce. New York: Academic Press. 350-382.
- Mirjana, S., Nada, B., & Valerija, D. (2004). Variability of *Satureja cuneifolia* Ten. essential oils and their antimicrobial activity depending on the stage of development. *European Food Research and Technology*, 218(4), 367-371.
- Polaki Khoshkrodi R, Bagheri N, Babaeian Jelodar N. 2023. Effect of altitude on some secondary metabolites of the medicinal plant (*Sambucus ebulus* L.) in three different habitats of Mazandaran province. *Plant Process and Function*, 12 (56), 1-16. (in Persian).
- Schlegel, HG. (1956). Die verwertung organischer sauren durch chlorella in lincht. *Planta*, 47, 510-515.
- Sharifi-Rad, J., Quispe, C., Herrera-Bravo, J., Semwal, P., Painuli, S., Özçelik, B., Ediz Hacıhasanoğlu, F., Shabnum Shaheen, Surjit Sen, Krishnendu Acharya, Amirian, M., Marina Salgado Castillo, C., Dolores López, Mauricio Schoebitz, M., Martorell, M., Goloshvili, T., Al-Harrasi, A. et al., (2021). "Peganum spp.: A Comprehensive Review on Bioactivities and Health-Enhancing Effects and Their Potential for the Formulation of Functional Foods and Pharmaceutical Drugs", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 5900422,1-22.
- Tawaha, K., Alali, F. Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., & El-Elimat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food chemistry*, 104(4), 1372-1378.
- Wanntorp, L., & Ronse De Craene, L. P. (2011). Flowers on the Tree of Life. In: Gower, D. J. (ed.) The Systematics Association Special Volume Series. Cambridge University Pres, UK.