E-ISSN: 2538-2187 | P-ISSN: 2251-7901

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology

https://jab.alzahra.ac.ir/

Vol. 36, No. 4 (2024) 10-23.

Paper Type: Original Article

Evaluation of Some Phenolic Derivative Contents in the Vegetative Growth Stage of Medicinal Plant *Ziziphora clinopodioides* Lam. from North Khorasan Province

Azadeh Taheri[1], Monireh Cheniany[2,*], Ali Ganjeali[3], Afsaneh Arefi-Oskouie[4]

[1] *PhD, Department of Biology-Plant Physiology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran; azadetaheri94@gmail.com.*

[2] *Assistant proffesor, Department of Biology-Plant Physiology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran; cheniany@um.ac.ir.*

[3] *Professor, Department of Biology-Plant Physiology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran; ganjeali@um.ac.ir.*

[4] *Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran; a.arefi@sbmu.ac.ir.*

Citation:

Taheri, A., Cheniany, M., Ganjeali, A., & Arefi-Oskouie, A. (2024). Evaluation of some phenolic derivative contents in the vegetative growth stage of medicinal plant *Ziziphora clinopodioides* lam. from North Khorasan province. *The quarterly scientific journal of applied biology, 36*(4), 10-23.

Received: 04/12/2022 Accepted: 26/11/2023

Abstract

Introduction: *Ziziphora clinopodioides* Lam. is a perennial plant from the Lamiaceae family, widely distributed in different regions of Iran (north, northwest, northeast, west, center, and east). This research aimed to investigate the content of some phenolic derivatives (phenolic, flavonoid, flavone & flavonol, *ortho*-diphenol, and phenolic acid) during the vegetative growth of three populations of *Z. clinopodioides* belonging to North Khorasan province.

Methods: For this purpose, the seeds collected from the regions ('Darkesh and Haver', 'Teymourtash', and 'Reine') were planted in pots and harvested at two vegetative growth periods (two and five months). After the sampling, the aerial part and root were separated and the mentioned phenolic derivatives were measured by spectrophotometric methods.

Results: The results showed that the content of phenolic derivatives is significantly affected by the type of population, plant part (aerial part and root), and age (growth stage). Therefore, the aerial part of *Z. clinopodioides* belonging to Darkesh and Haver population, in the two-month stage, has more phenolic derivatives (total content of phenolics 11.91 mg GAE/g DW, flavonoids 13.55 mg CAT/g DW, flavone & flavonols 5.94 mg QUE/g DW, *ortho*-diphenols 2.95 mg GAE/g DW, and phenolic acids 2.44 mg CAE/g DW) than the five-month stage.

Conclusion: In general, apart from the aerial part and the root, 'Darkesh and Haver' and 'Teymourtash' populations were reported as the selected population in terms of higher phenolic derivative contents in both vegetative growth stages. These results will help to select superior populations with a higher content of metabolites and optimal use in the food and pharmaceutical industries.

Keywords: Flavonoid compounds, Phenolic compounds, Pot culture, *Ziziphora clinopodioides.*

Corresponding Author: cheniany@um.ac.ir

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا (س)
دوره ۳۶، شماره (۴)، (۱۴۰۲)، ۲۳-۱۰
https://jab.alzahra.ac.ir

نوع مقاله: پژوهشی

بررسی محتوای برخی مشتقات فنلی در دوره رشد رویشی گیاه دارویی کاکوتی کوهی (*Ziziphora clinopodioides* Lam.) از استان خراسان شمالی

آزاده طاهری[۱]، منیره چنیانی[۲*]، علی گنجعلی[۳]، افسانه عارفی اسکوئی[۴]
[۱]دانش آموخته دکتری، گروه زیست شناسی-فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
[۲]استادیار، گروه زیست شناسی-فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
[۳]استاد، گروه زیست شناسی-فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
[۴]استاد، گروه علوم پایه، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
نویسنده مسئول: ***cheniany@um.ac.ir***

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۰۵

چکیده

مقدمه: کاکوتی‌کوهی (*Ziziphora clinopodioides Lam.*) گیاهی چندساله از تیره‌ی نعناع است که در مناطق مختلف ایران (شمال، شمال‌غرب، شمال‌شرق، غرب، مرکز و شرق) پراکندگی گسترده دارد. این پژوهش با هدف بررسی محتوای برخی مشتقات فنلی (فنل، فلاونوئید، فلاون و فلاونول، ارتو-دی‌فنل و اسیدفنلی) در دوره رشد رویشی سه جمعیت کاکوتی‌کوهی، متعلق به استان خراسان‌شمالی صورت گرفت.

روش‌ها: به این منظور بذرهای جمع‌آوری‌شده از مناطق درکش و هاور، تیمورتاش و رئین، در گلدان کاشته و در دو دوره رشد رویشی دوماهگی و پنج‌ماهگی برداشت شدند. پس از عملیات نمونه‌برداری، بخش هوایی و ریشه گیاهان از هم تفکیک و مشتقات فنلی مذکور با روش‌های اسپکتروفتومتری سنجش گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که محتوای مشتقات فنلی به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر نوع جمعیت، اندام گیاهی (بخش هوایی و ریشه) و سن گیاه (مرحله‌ی رشد) قرار می‌گیرد. بر این اساس بخش هوایی کاکوتی‌کوهی متعلق به جمعیت درکش و هاور، در مرحله‌ی دوماهگی که جوان‌تر است، میزان مشتقات فنلی بیشتر [فنل‌کل ۱۱/۹۱ mg GAE/g DW، فلاونوئیدکل ۱۳/۵۵ mg CAT/g DW، فلاون و فلاونول‌کل ۵/۹۴ mg QUE/g DW، ارتو-دی‌فنل کل ۲/۹۵ mg GAE/g DW و اسید فنلی کل ۲/۴۴ mg CAE/g DW] نسبت به مرحله پنج‌ماهگی دارد.

نتیجه‌گیری: درمجموع و صرف‌نظر از بخش هوایی و ریشه، جمعیت درکش و هاور و تیمورتاش در هر دو مرحله رشد رویشی به‌عنوان جمعیت منتخب از لحاظ تولید حداکثری مشتقات فنلی گزارش شدند. این نتایج به انتخاب جمعیت‌های برتر دارای محتوای متابولیتی بیشتر و به دنبال آن استفاده بهینه در صنایع غذایی و دارویی کمک شایانی خواهد نمود.

کلیدواژه‌ها: ترکیبات فلاونوئیدی، ترکیبات فنلی، کاکوتی‌کوهی، کشت گلدانی.

۱- مقدمه

کاکوتی‌کوهی (*Ziziphora clinopodioides* Lam.) گیاهی چندساله از تیره‌ی نعناع (Lamiaceae)، با قاعده چوبی، بوته‌ای، به ارتفاع ۵۰-۵ سانتی‌متر، ساقه‌ها متعدد از قاعده منشعب، با شاخه‌های فراوان، برگ‌ها بیضوی، سرنیزه‌ای یا دایره‌ای، بی کرک یا دارای کرک‌های متنوع، گل‌آذین

متشکل از گل‌های متعدد بدون دمگل یا با دمگل‌های به طول ۴ میلی‌متر به شکل کله‌ای-انتهایی است [1]. این گونه از پراکنش وسیعی در جزایر بالکان شرقی، آسیای‌غربی و جنوبی، آسیای‌مرکزی، کوه‌های هیمالیا و ایران برخوردار است. رویش کاکوتی‌کوهی در ایران متعلق به استان‌های گلستان، آذربایجان‌شرقی و غربی، اردبیل، زنجان، قزوین، همدان، کرمانشاه، کردستان، لرستان، خراسان، سمنان، تهران، یزد، فارس، مرکزی، چهارمحال و بختیاری و اصفهان است [2]. در کتب طب سنتی، کاکوتی‌کوهی با نام 'مشک طرامشک' نام برده شده است درحالی‌که توسط مردم محلی استان خراسان‌شمالی با نام 'آنوخ' مصرف دارویی دارد [3].

علاوه بر متابولیت‌های اولیه ضروری، گیاهان آلی همچنین قادر به سنتز طیف گسترده‌ای از ترکیبات آلی با وزن مولکولی پایین (کمتر از ۱۵۰ کیلو دالتون) به نام متابولیت‌های ثانوی هستند [4]. ترکیبات فنلی گروهی از متابولیت‌های ثانوی گیاهی هستند که کمیت و کیفیت آن‌ها به‌ویژه در سطح جنس، گونه، واریته و جمعیت متفاوت است [5]. تولید متابولیت‌های ثانوی به‌شدت وابسته به رشدونمو گیاه است و توسط آن تنظیم می‌شود [6]. همچنین، تولید این متابولیت‌ها می‌تواند در هر مرحله از رشد و نمو اتفاق بیفتد [7]. علاوه بر این، متابولیت‌های ثانوی از طریق مسیرهای تنظیمی ویژه در بافت‌ها و اندام‌های خاص سنتز می‌شوند، بنابراین بیوسنتز و تجمع آن‌ها اغلب منحصر به این بافت‌ها یا اندام‌های ویژه است [8]. مقدار این ترکیبات در بافت‌های گیاهی، در بخش‌های مختلف گیاه و در طول فصل رشد تغییر می‌کند [6].

ترکیبات موجود در گونه‌های مختلف جنس کاکوتی شامل ترکیبات فرار، آلکالوئیدها، پلی فنل‌ها، فلاونوئیدها، پلی‌ساکاریدها، ترکیبات پکتینی، ویتامین‌ها، اسیدهای چرب و نیز استرول‌ها است [9]، [10]. ترکیبات فنلی این جنس شامل کافئیک‌اسید، رزمارینیک‌اسید و مشتقات فلاونوئیدها ازجمله لوتئولین، لینارین، دیوسمین و تیمونین است [11]. تحقیقات بیوشیمیایی در خصوص گونه کاکوتی‌کوهی نشان می‌دهد که اجزای شیمیایی غالب این گونه، روغن‌های فرار، ویتامین‌ها، اسیدهای آلی، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و گلیکوزیدها هستند [12]. گزارش‌های آلپ و همکاران [13] نشان داده است که این گونه غنی از ترکیبات پلی‌فنل، فلاونوئید و اسیدهای آمینه آزاد است که ترکیبات فلاونوئیدی آن خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهاب و ضد سرطان نشان می‌دهند. اثرات ضدالتهابی فلاونوئیدهایی مانند اپی ژنین، لوتئولین، دیوسمین، آگلیکون دیاسمتین و لینارین نیز گزارش شده است [14]. همچنین بررسی‌های فارماکولوژیکی مشخص نمود که ترکیبات فنلی گیاه کاکوتی‌کوهی به دلیل تغییرات در هدایت کانال کلسیم و پتاسیم منجر به گشادشدن عروق می‌شوند [15].

مسلم شده است که محتوای ترکیبات ثانوی در طول فصل رشد تغییر می‌کند و سن برداشت گیاه ممکن است از نظر کشاورزی و اقتصادی اهمیت زیادی داشته باشد. از سوی دیگر، بررسی تفاوت‌های متابولیکی میان جمعیت‌های مختلف از یک گیاه دارویی، می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در مورد جمعیت‌های برتر (از لحاظ تولید متابولیت‌های دارویی) فراهم نماید تا ضمن شناسایی جمعیت‌ها و ارقام برتر، به‌عنوان بهترین منابع برای تولید این متابولیت‌ها، شرایط بهینه کشت و زمان برداشت مناسب در شرایط آزمایشگاهی ایجاد و میسر گردد. لذا، برای استفاده بهینه از فراورده‌های گیاهان دارویی و پیشبرد استراتژی‌های اصلاحی، داشتن اطلاعات اولیه در مورد ترکیبات شیمیایی عمده با اهمیت دارویی، بخش‌های گیاهی دارای ماده موثره بیشتر و مرحله رشدی که حداکثر تولید مواد موثره در آن رخ می‌دهد، ضروری است. بر پایه بررسی‌ها، هیچ مطالعه‌ای برای بررسی تاثیر سن یا مراحل رشدونمو بر محتوای ترکیبات ثانوی و ازجمله مشتقات فنلی کاکوتی‌کوهی صورت نگرفته است. لذا پژوهش حاضر به‌عنوان اولین گزارش، تغییرات محتوای مشتقات فنلی (فنل، فلاونوئید، فلاون و فلاونول، ارتو-دی‌فنل و اسیدفنلی) را ضمن رشد رویشی در شرایط کنترل‌شده گلخانه، از سه جمعیت این گونه موردمطالعه قرار داده است.

۲- مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه کاکوتی‌کوهی در شهریورماه از سه منطقه درکش و هاور، روستای تیمورتاش و روستای رئین واقع در استان خراسان‌شمالی جمع‌آوری گردید و با همکاری کارشناس هرباریوم و آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشکده علوم پایه دانشگاه فردوسی مشهد مورد شناسایی قرار گرفت (**جدول ۱**). بذرهای جمع‌آوری‌شده پس از فرآیند خشک شدن در تاریکی، تا زمان استفاده در ظرف‌های پلاستیکی مخصوص و در یخچال نگهداری شدند.

جدول ۱- مختصات جغرافیایی مناطق نمونه‌برداری بذور گونه کاکوتی‌کوهی.

Table 1- Geographical coordinates of the sampling areas of *Z. clinopodioides* seeds.

Collection Site	Voucher Number	Longitude (E)	Latitude (N)	Height Above Sea Level (M)
Darkesh and Haver	13222	56° 47′ 6.38″	37° 24′ 52.00″	1743
Teymourtash	13223	57° 07′ 7.28″	37° 28′ 4.62″	1785
Reine	13224	57° 03′ 1.85″	37° 23′ 8.63″	2049

۲-۱- کشت گلدانی

این آزمایش در قالب طرح آماری کاملا تصادفی و با ۳ تکرار و برای ۳ جمعیت گونه کاکوتی‌کوهی، در گلخانه تحقیقاتی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد انجام گرفت. بذرهای جمع‌آوری‌شده کاکوتی‌کوهی با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۵ درصد (v/v) استریل و سپس ۲ الی ۳ نوبت با آب‌مقطر استریل شست‌وشو شدند و درنهایت بذرها در گلدان‌های پلاستیکی دو کیلویی (برای کشت گیاهان به مدت دو ماه) و چهار کیلویی (برای کشت گیاهان به مدت پنج ماه) پرشده از خاک و شن به نسبت ۱:۱ (اواخر مهرماه) کشت داده شدند. برای هر منطقه سه گلدان انتخاب و در هر گلدان ۸ عدد بذر کشت شدند که پس از جوانه‌زنی تعداد پنج عدد گیاه در هر گلدان تا مرحله دوماهگی و پنج‌ماهگی نگهداری شدند. تا زمان جوانه‌زنی بذرها، آبیاری هر روز یک‌بار به‌صورت اسپری بر سطح خاک صورت گرفت و پس از جوانه‌زدن هر سه روز یک‌بار انجام شد. به‌منظور جلوگیری از تنش عناصر غذایی و تامین نیتروژن، فسفر و پتاسیم برای رشد گیاهان، کود NPK ۰/۲ درصد (w/v)، هر دو هفته یک‌بار به گلدان‌ها اضافه گردید. عملیات نمونه‌برداری دو ماه پس از جوانه‌زنی در اواخر آذرماه (مرحله رشدی دوماهگی) و پنج ماه پس از جوانه‌زنی در اواخر بهمن‌ماه (مرحله رشدی پنج‌ماهگی) صورت گرفت. پس از برداشت نمونه‌های گیاهی هر منطقه، بخش هوایی گیاه از ریشه تفکیک و پس از خشک شدن در آون (مدل 5-1486، شرکت Memmert، آلمان) با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت، جهت انجام سنجش‌های بعدی مورداستفاده قرار گرفت.

۲-۲- آماده‌سازی عصاره‌های گیاهی

فرآیند عصاره‌گیری از نمونه‌های گیاهی به روش آنگودا و همکاران [16] انجام شد. مقدار ۰/۲۵ گرم از پودر بخش هوایی و ریشه با ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد (v/v) خیسانده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در حمام اولتراسونیک (مدل S ۲۶۰۰، شرکت Parsonic، ایران) با فرکانس ۵% ± ۲۵ (KHz) و قدرت ۱۰۰ وات قرار داده شدند. عصاره حاصل پس از فیلتر شدن توسط کاغذ صافی (واتمن شماره یک)، به مدت ۲۴ ساعت در زیر هود معمولی قرار گرفت تا حلال آن به‌طور کامل حذف شود. عصاره خشک‌شده به‌دست آمده در این مرحله به‌عنوان پودر خشک حاصل از عصاره برای سنجش‌های بیوشیمیایی مورداستفاده قرار گرفت. عصاره متانولی برای سنجش هرکدام از مشتقات فنلی (فنل، فلاونوئید، فلاون و فلاونول، ارتو-دی‌فنل و اسیدفنلی) با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در متانول ۸۰ درصد (v/v) تهیه شد.

۲-۳- سنجش محتوای فنل‌کل

سنجش فنل‌کل به روش فولین-سیوکالچو انجام شد [17]. ابتدا محلول ۱۰ درصد (v/v) از فولین-سیوکالچو تهیه و به میزان ۲/۵ میلی‌لیتر از آن داخل لوله‌های آزمایش ریخته شد، سپس ۲۰۰ میکرو لیتر از عصاره متانولی به آن اضافه گردید. به مخلوط حاصل پس از ۵ دقیقه استراحت، ۲ میلی‌لیتر محلول Na_2CO_3 ۷/۵ درصد (w/v) اضافه و جذب نمونه‌ها پس از ۹۰ دقیقه قرار گرفتن مخلوط واکنش در تاریکی، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل ۷۸۰۰، شرکت Jasco، ژاپن) در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. میزان ترکیبات فنلی بر مبنای مقدار جذب ناشی از واکنش عصاره با معرف فولین-سیوکالچو و بر اساس مقایسه آن با محلول استاندارد گالیک‌اسید محاسبه شد. برای شاهد نیز به‌جای عصاره از متانول ۸۰ درصد (v/v) استفاده شد. محتوای فنل‌کل بر اساس نمودار استاندارد گالیک‌اسید و برحسب میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن خشک نمونه (mg GAE/g DW) بیان گردید.

۲-۴- سنجش محتوای فلاونوئیدکل

میزان فلاونوئیدکل عصاره‌ها با روش رنگ‌سنجی $AlCl_3$ تعیین شد [18]. روش مذکور به این صورت است که ۳۰۰ میکرو لیتر از عصاره با ۳/۴ میلی‌لیتر متانول ۳۰ درصد (v/v) مخلوط شد. سپس ۱۵۰ میکرو لیتر از $NaNO_2$ ۰/۵ مولار و ۱۵۰ میکرو لیتر $AlCl_3$ ۰/۳ مولار به آن افزوده شد.

پس از انکوبه شدن به مدت ۵ دقیقه، ۱ میلی‌لیتر NaOH ۱ مولار به مخلوط واکنش اضافه گردید و بلافاصله جذب آن در طول‌موج ۴۱۸ نانومتر خوانده شد و محتوای فلاونوئید بر اساس نمودار استاندارد کاتچین برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک (mg CAT/g DW) سنجیده شد. برای شاهد از متانول ۳۰ درصد (v/v) استفاده شد.

۲-۵- سنجش محتوای فلاون و فلاونول‌کل

تعیین محتوای فلاون و فلاونول‌کل عصاره‌ها به روش کسالک و همکاران [19] انجام شدند. به‌طور خلاصه، ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره یا محلول استاندارد با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۵۰ درصد (v/v)، ۰/۵ میلی‌لیتر $AlCl_3$ ۱۰ درصد (w/v) و ۰/۱ میلی‌لیتر CH_3CO_2K (۱ مولار) مخلوط گردید و درنهایت با ۲/۸ میلی‌لیتر آب‌مقطر به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. مخلوط واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری و سپس جذب نوری در طول‌موج ٤١٥ نانومتر ثبت شد. مقدار ترکیبات فلاون و فلاونول در هر نمونه با نمودار استاندارد کوئرستین برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک نمونه (mg QUE/g DW) محاسبه شد. در نمونه شاهد به‌جای عصاره از متانول ۸۰ درصد (v/v) استفاده گردید.

۲-۶- سنجش محتوای ارتو-دی‌فنل کل

محتوای ارتو-دی‌فنل کل عصاره‌ها بر اساس روش اصلاح‌شده کاراسکو-پانکوربو و همکاران [20] انجام شد. به این منظور ابتدا به ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره متانولی، ۲ میلی‌لیتر متانول آبی ۵۰ درصد (v/v) و ۰/۵ میلی‌لیتر $Na_2MoO_4*2H_2O$ ۵ درصد (w/v) اضافه شد. نمونه‌ها پس از یک هم زدن معمولی به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط تاریکی و دمای (۲۵ ± ۲ ℃) قرار گرفتند. درنهایت جذب نوری نمونه‌ها در طول‌موج ۳۷۰ نانومتر و با استفاده از منحنی کالیبراسیون گالیک‌اسید، برحسب میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن خشک نمونه (mg GAE/g DW) محاسبه شد. در نمونه شاهد، متانول ۵۰ درصد (v/v) به‌جای عصاره مورداستفاده قرار گرفت.

۲-۷- سنجش محتوای اسیدفنلی کل

جهت سنجش محتوای اسیدهای فنلی کل، به ۵۰۰ میکرو لیتر از عصاره متانولی، ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۵ میلی‌لیتر HCl ۰/۱ مولار و ۰/۵ میلی‌لیتر معرف آرنو [Na_2MoO_4 آبی ۱۰ درصد (w/v) و $NaNO_2$ آبی ۱۰ درصد (w/v)] اضافه گردید. پس از افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر NaOH ۱ مولار، مخلوط حاصل با استفاده از ۰/۵ میلی‌لیتر آب‌مقطر به حجم نهایی ۵ میلی‌لیتر رسانده و بلافاصله جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۴۹۰ نانومتر ثبت شد. برای تهیه نمونه شاهد از متانول ۸۰ درصد (v/v) به جای عصاره استفاده شد. محتوای اسیدهای فنلی‌کل عصاره‌ها، بر مبنای منحنی استاندارد کافئیک‌اسید محاسبه و برحسب میلی‌گرم کافئیک‌اسید در گرم وزن خشک نمونه (mg CAE/g DW) ارایه گردید [21].

۲-۸- تجزیه‌وتحلیل آماری

در این تحقیق تمامی سنجش‌ها با سه تکرار انجام شد و نتایج به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد بیان شد. داده‌های حاصل از سنجش‌های اسپکتروفتومتری با روش آنالیز واریانس دو طرفه و آزمون دانکن برای مقایسه میانگین بین جمعیت‌ها در سطح معنی‌داری ۵ درصد ($P < 0.05$) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ورژن ۲۶) مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفتند. نمودارها و جدول‌ها توسط نرم‌افزار اکسل ترسیم گردید.

۳- نتایج

۳-۱- محتوای فنل‌کل

آنالیز واریانس داده‌های مربوط به محتوای فنل‌کل در سه جمعیت درکش و هاور، تیمورتاش و رئین نشان داد که جمعیت، سن گیاه (مرحله رشد) و اثر متقابل جمعیت و سن، تاثیر معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) بر محتوای فنل‌کل اندازه‌گیری شده در بخش هوایی و ریشه گیاه دارند (**جدول‌های ۲** و **۳**). نتایج حاصل از اندازه‌گیری محتوای فنل‌کل بخش هوایی هر سه جمعیت نشان‌دهنده کاهش محتوای فنل‌کل در دوره رشد پنج‌ماهگی نسبت به دوره رشد دوماهگی بود. فنل‌کل بخش هوایی دو جمعیت تیمورتاش و رئین در مرحله دوماهگی به طرز معنی‌داری کمتر از جمعیت درکش و هاور بود اما در مقایسه با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشت (**شکل ۱-A**). محتوای فنل‌کل ریشه، در مرحله دوماهگی جمعیت‌های درکش و هاور،

تیمورتاش و رئین، به ترتیب ۲/۵، ۳/۲ و ۱/۸ برابر محتوای آن در مرحله پنج‌ماهگی بود. بیش‌ترین محتوای فنل‌کل (۰/۶۷ mg GAE/g DW ± ۱۴/۱۹) در ریشه جمعیت منطقه تیمورتاش (دوره رشد دوماهگی) و کم‌ترین محتوای آن (۰/۰۱ mg GAE/g DW ± ۱/۰۱) در بخش هوایی جمعیت درکش و هاور (دوره رشد پنج‌ماهگی) به‌دست آمد.

جدول ۲- آنالیز واریانس داده‌های مربوط به محتوای کل ترکیبات فنل، فلاونوئید، فلاون و فلاونول، ارتو-دی‌فنل و اسیدفنلی در عصاره بخش هوایی کاکوتی‌کوهی به کمک آنالیز واریانس دو طرفه.

Table 2- Variance analysis of data related to the content of total phenolic, flavonoid, flavone & flavonol, *ortho*-diphenol, and phenolic acid in the shoot extract of *Z.clinopodioides* by using two-way analysis of variance.

Source of Changes	df	Mean Squares Total Phenol (mg GAE/g DW)	Total Flavonoid (mg CAT/g DW)	Total Flavone/Flavonol (mg QUE/g DW)	Total Ortho-Diphenol (mg GAE/g DW)	Total Phenolic Acid (mg CAE/g DW)
Population	2	24.13 **	46.64 **	0.30 **	0.60 **	0.38 **
Age (growth stage)	1	129.28 **	167.39 **	90.15 **	20.44 **	10.45 **
Population × age	2	34.54 **	41.31 **	0.99 **	0.73 **	0.48 **
Error	12	0.05	0.20	0.03	0.003	0.002

** و* به ترتیب نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح P < ۰/۰۱ و P < ۰/۰۵ است.

** and * indicate a significant difference between the means at P < 0.01 and P < 0.05 levels, respectively.

جدول ۳- آنالیز واریانس داده‌های مربوط به محتوای کل ترکیبات فنل، فلاونوئید و فلاون و فلاونول، ارتو-دی‌فنل و اسیدفنلی در عصاره ریشه کاکوتی‌کوهی به کمک آنالیز واریانس دو طرفه.

Table 3- Variance analysis of data related to the content of total phenolic, flavonoid, flavone & flavonol, *ortho*-diphenol, and phenolic acid in the root extract of *Z.clinopodioides* by using two-way analysis of variance.

Source of Changes	df	Mean Squares Total Phenol (mg GAE/g DW)	Total Flavonoid (mg CAT/g DW)	Total Flavone/Flavonol (mg QUE/g DW)	Total *Ortho*-Diphenol (mg GAE/g DW)	Total Phenolic Acid (mg CAE/g DW)
Population	2	32.53 **	2.32 **	3.45 **	9.52 **	8.89 **
Age (growth stage)	1	216.46 **	10.73 **	17.14 **	29.83 **	68.67 **
Population × age	2	18.78 **	2.51 **	0.03 ns	6.46 **	10.54 **
Error	12	0.31	0.05	0.09	0.02	0.01

** و* به ترتیب نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح P < ۰/۰۱ و P < ۰/۰۵ و ns معرف عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح P < ۰/۰۵ است.

** and * respectively indicate a significant difference between the means at the level of P < 0.01 and P < 0.05, and ns represents no significant difference at P < 0.05 level.

۲-۳- محتوای فلاونوئیدکل

تجزیه واریانس حاصل از اندازه‌گیری محتوای فلاونوئیدکل در هر سه جمعیت موردبررسی، حاکی از تاثیر معنی‌دار (P < ۰/۰۵) عوامل جمعیت، سن و اثر متقابل آن‌ها بر غلظت ترکیبات فوق در بخش هوایی و ریشه بود (**جدول‌های ۲ و ۳**). بیش‌ترین محتوای فلاونوئید کل (۰/۵۰ mg CAT/g DW ± ۱۳/۵۵) در بخش هوایی گیاهان دوماهه متعلق به منطقه درکش و هاور و کم‌ترین محتوای (۰/۰۶ mg CAT/g DW ± ۱/۳۴) این ترکیبات در بخش هوایی گیاهان پنج‌ماهه، متعلق به منطقه رئین بود. مقایسه میانگین ترکیبات فلاونوئیدی در هر سه جمعیت، نشان داد که بخش هوایی گیاهان پنج‌ماهه از محتوای کمتری نسبت به گیاهان دوماهه برخوردار هستند. بر این اساس بخش هوایی کاکوتی‌کوهی در مرحله دوماهگی که جوان‌تر است، میزان ترکیبات فلاونوئیدی بیشتری نسبت به مرحله پنج‌ماهگی دارد. درحالی‌که در ریشه، محتوای فلاونوئیدکل در هر سه جمعیت، با افزایش سن (مرحله‌ی پنج‌ماهگی) افزایش یافت. محتوای فلاونوئیدکل ریشه گیاهان پنج‌ماهه در جمعیت درکش و هاور به طرز معنی‌داری، بیشتر از دو جمعیت دیگر بود. جمعیت تیمورتاش و رئین تفاوت معنی‌داری از این لحاظ با هم نداشتند (**شکل ۱-B**).

۳-۳- محتوای فلاون و فلاونول‌کل

نتایج آنالیز واریانس مشخص کرد که تاثیر هر یک از دو عامل سن گیاه و جمعیت و همچنین اثر متقابل آن‌ها، بر محتوای فلاون و فلاونول‌کل بخش هوایی و ریشه جمعیت‌های درکش و هاور، تیمورتاش و رئین معنی‌دار (P < ۰/۰۵) است (**جدول‌های ۲ و ۳**). تنها مورد استثناء با بررسی اثر متقابل جمعیت و سن در عصاره ریشه به‌دست آمد که نشان داد تفاوت بین میانگین محتوای ترکیبات ذکرشده در سطح (P < ۰/۰۵) معنی‌دار نیست (**جدول ۳**). نتایج مربوط به مقایسه میانگین ترکیبات فلاون و فلاونول‌کل در مرحله رشدی دوماهگی و پنج‌ماهگی در بخش‌های مختلف کاکوتی‌کوهی در **شکل ۱-B**، نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود در هر دو بخش موردمطالعه، با پیشرفت دوره رشد رویشی (افزایش سن)، از مرحله دوماهگی به پنج‌ماهگی میزان ترکیبات فلاون و فلاونول به طرز معنی‌داری کاهش یافت. افزایش محتوای ترکیبات مذکور در مرحله دوماهگی در مقایسه با پنج‌ماهگی، در بخش هوایی جمعیت‌های درکش و هاور، تیمورتاش و رئین به ترتیب ۷/۴۲، ۳/۹۶ و ۵/۷۳ برابر و در ریشه آن‌ها، به ترتیب ۱/۹۷، ۱/۸۴ و ۲/۶۴ برابر بودند. آنالیز آماری مقادیر فلاون و فلاونول‌کل با آزمون دانکن در بخش‌های هوایی و ریشه، تفاوت معنی‌داری را در هر دو مرحله رشد رویشی در سطح احتمال خطا ۵ درصد نشان داد.

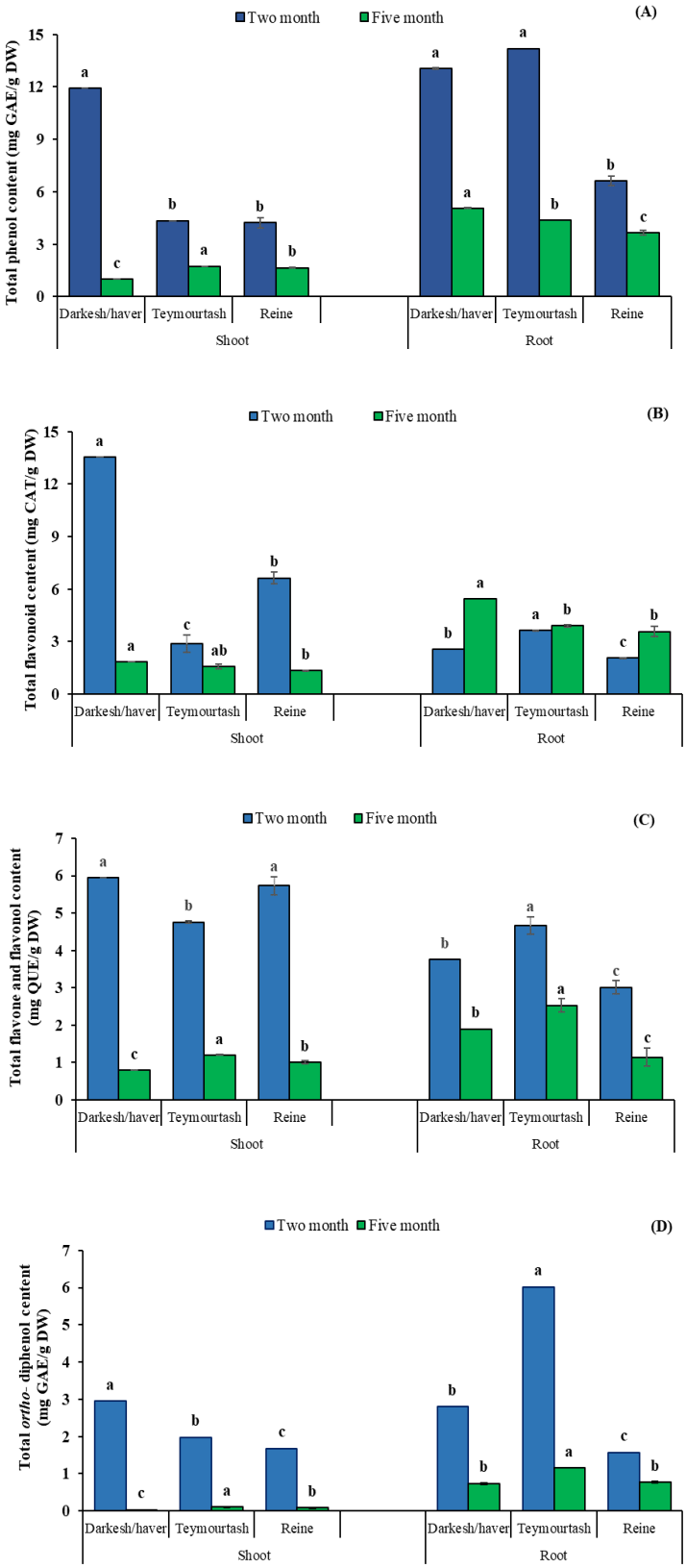
۳-۴- محتوای ارتو-دی‌فنل کل

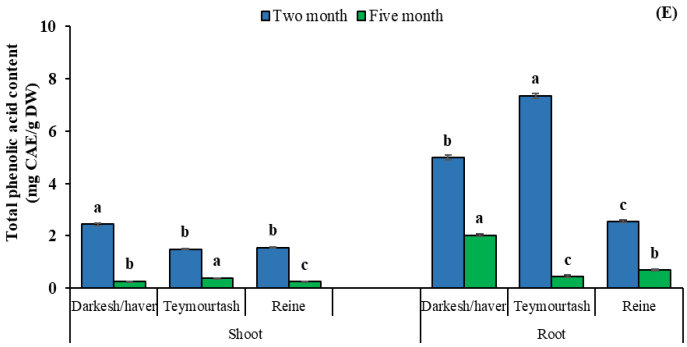
تحلیل واریانس نتایج ارتو-دی‌فنل کل در بخش هوایی و ریشه جمعیت‌های موردبررسی، نشان داد که علاوه بر سن گیاه و جمعیت، برهمکنش بین این دو عامل نیز، تاثیر معنی‌داری (P < ۰/۰۵) بر محتوای ترکیبات فوق دارد (**جدول‌های ۲ و ۳**). بررسی مقایسه میانگین داده‌های مربوط به محتوای ارتو-دی‌فنل کل، دال بر آن بود که در هر سه جمعیت، محتوای ارتو-دی‌فنل گیاهان دوماهگی بیشتر از گیاهان پنج‌ماهه است (**شکل ۱-D**). بیشترین محتوای ارتو-دی‌فنل در ریشه جمعیت تیمورتاش (۶/۰۲ ± ۰/۱۷ mg GAE/g DW) و کمترین محتوای آن در بخش هوایی جمعیت درکش و هاور (۰/۰۳ ± ۰/۰۰۲ mg GAE/g DW) سنجش شد. محتوای ارتو-دی‌فنل کل بخش هوایی گیاهان دوماهه متعلق به جمعیت درکش و هاور، به طرز چشمگیری بیشتر بود و مقدار آن ۹۸/۳۳ برابر مقدار سنجش شده در گیاهان پنج‌ماهه برآورد شد. بعد از گیاهان منطقه درکش و هاور، در دو جمعیت رئین و تیمورتاش، محتوای ارتو-دی‌فنل در بخش هوایی گیاهان دوماهه، به ترتیب ۲۱ و ۱۸ برابر گیاهان پنج‌ماهه بود. به‌عبارت‌دیگر، محتوای ارتو-دی‌فنل کل در گیاهان جمعیت درکش و هاور، بیش از دو جمعیت دیگر تحت تاثیر سن تغییر نمود و سن گیاه (افزایش سن طی دوره رشد رویشی) تاثیر منفی و کاهنده‌ای بر محتوای ترکیبات مذکور در بخش هوایی هر سه جمعیت داشت. از سوی دیگر، محتوای ارتو-دی‌فنل کل ریشه، در مرحله دوماهگی، برای جمعیت‌های تیمورتاش، درکش و هاور و رئین، به ترتیب ۵/۱۸، ۳/۷۸ و ۲/۰۳ برابر مرحله پنج‌ماهگی بود. درنتیجه کاهش یافتن تراز کل ترکیبات ارتو-دی‌فنل با افزایش سن، در بخش هوایی گیاهان دوماهه چشمگیرتر از ریشه بود.

۳-۵- محتوای اسیدفنلی کل

بر اساس نتایج آنالیز واریانس، علاوه بر دو عامل جمعیت و سن، اثر متقابل آن‌ها نیز تاثیر معنی‌داری (P < ۰/۰۵) بر محتوای کل اسیدهای فنلی بخش هوایی و ریشه هر سه جمعیت موردبررسی داشت (**جدول‌های ۲ و ۳**). مقایسه میانگین محتوای اسیدهای فنلی مشخص کرد که ریشه‌ها در مقایسه با بخش هوایی، منابع غنی‌تری از این ترکیبات هستند (**شکل ۱-E**). بیشترین محتوای اسیدهای فنلی (۷/۳۵ ± ۰/۰۹ mg CAE/g DW)، متعلق به ریشه جمعیت تیمورتاش بود و کمترین محتوای اندازه‌گیری (۰/۲۵ ± ۰/۰۰۲ mg CAE/g DW)، به بخش هوایی جمعیت رئین اختصاص داشت. همانند سایر مشتقات فنلی، تراز کل اسیدهای فنلی در گیاهان دوماهه بیشتر از گیاهان پنج‌ماهه برآورد شد. با بالا رفتن سن گیاهان و رسیدن به مرحله پنج‌ماهگی، محتوای اسیدهای فنلی کل در هر دو بخش هوایی و ریشه کاهش یافت. در اوایل رشد رویشی (مرحله‌ی دوماهگی) مقدار این متابولیت‌ها در بخش هوایی، در جمعیت درکش و هاور ۹/۰۳، در جمعیت رئین ۶/۲ و در جمعیت تیمورتاش ۳/۸۲ برابر اواخر رشد رویشی (مرحله‌ی پنج‌ماهگی) بود. در هر سه جمعیت، با افزایش سن، محتوای اسیدفنلی کل ریشه کاهش یافت. مقایسه گیاهان دوماهگی نسبت به گیاهان

پنج‌ماهگی، به ترتیب حاکی از کاهش ۱۶/۳۳، ۳/۶۹ و ۲/۴۷ برابری اسیدفنلی تام در ریشه جمعیت‌های تیمورتاش، رئین و درکش و هاور (معنی‌دار در سطح ۵ درصد) بود.





شکل ۱- مقایسه محتوای کل ترکیبات: الف- فنل؛ ب- فلاونوئید؛ ج- فلاون و فلاونول؛ د- ارتو-دی‌فنل؛ ه- اسیدفنلی عصاره بخش هوایی و ریشه سه جمعیت درکش و هاور، تیمورتاش و رئین در مراحل رشد رویشی دوماهگی و پنج‌ماهگی کاکوتی کوهی. داده‌ها به‌صورت میانگین سه تکرار ± انحراف معیار نشان داده شده‌اند. مقایسه میانگین‌ها در هر روش عصاره‌گیری، به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شده است و حروف یکسان در هر روش نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح P < ۰/۰۵ است.

Figure 1- Comparison of the total content of compounds: a. Phenol, b. flavonoid, c. flavon and flavonol, d. ortho-di-phenol, e. Phenolic acid of aerial and root extracts of three populations Darkash and Havar, Timurtash and Rein in two-month and five-month vegetative growth stages of *Z. clinopodioides*. The data are shown as the means of three replicates ± standard error. The comparison of the means in each extraction method was done using Duncan's multiple range test, and the same letters in each method indicated the absence of significant differences between the means at the level of P < 0.05.

۴- آنالیز همبستگی

همبستگی بین داده‌های مربوط به محتوای مشتقات فنلی (محتوای فنل کل، فلاونوئید کل، فلاون و فلاونول کل، ارتو-دی فنل کل و اسیدفنلی کل)، جمعیت و سن گیاه (مرحله رشد)، حاصل از عصاره بخش هوایی و ریشه کاکوتی‌کوهی بر اساس ضریب همبستگی اسپیرمن تعیین شد (**جدول ۴**).

نتایج به‌دست آمده دال بر وجود یک همبستگی مثبت قوی بین محتوای فنل، فلاونوئید، فلاون و فلاونول، ارتو-دی فنل و اسیدفنلی بخش هوایی با همبستگی بین ۰/۷۵۲ و ۰/۹۸۰ بود. به استثناء محتوای فلاونوئید ریشه که دارای همبستگی منفی با سایر مشتقات فنلی بود، همبستگی مثبت و قوی بین ۰/۷۷۸ و ۰/۹۳۴، میان سایر مشتقات فنلی ریشه مشاهده گردید. همبستگی میان انواع مشتقات فنلی در بخش هوایی و ریشه با عامل جمعیت ضعیف و منفی بود، درحالی‌که همبستگی معنی‌دار قوی و منفی برای دوره رشد (سن گیاه) با مشتقات فنلی به ثبت رسید. محتوای فلاونوئید ریشه، تنها مشتق فنلی بود که با مرحله رشد همبستگی مثبت و قوی (r=۰/۶۵۲) داشت. از طرفی ضریب همبستگی صفر برای عامل جمعیت و سن گیاه در هر دو بخش گیاهی موردبررسی حاصل گردید که نشان از مستقل بودن این دو عامل و عدم همبستگی میان آن‌ها است.

جدول ۴- آنالیز همبستگی اسپیرمن بین محتوای مشتقات فنلی، جمعیت و سن (مرحله رشد) در کاکوتی‌کوهی.

Table 4- Spearman's correlation analysis between the content of phenolic derivatives, population and age (growth stage) in *Z. clinopodioides*.

		Total Phenol		Total Flavonoid		Total Flavone and Flavonol		Total Ortho-Diphenol		Total Phenolic Acid		Population		Age (Growth Stage)	
		Shoot	Root	Shoot	Root	Shoot	Root	Shoot	Root	Shoot	Root	Shoot	Root	Shoot	Root
Total phenol	Shoot	1													
	Root		1												
Total flavonoid	Shoot	**0.760		1											
	Root		-0.329		1										
Total flavone and flavonol	Shoot	**0.933		**0.789		1									
	Root		**0.895		-0.325		1								
Total *ortho*-diphenol	Shoot	**0.980		**0.752		**0.917		1							
	Root		**0.843		*-0.510		**0.934		1						
Total phenolic acid	Shoot	**0.861		**0.911		**0.915		0.872 **		1					
	Root		** 0.910		-0.307		0.826 **		0.778**		1				
Population	Shoot	-0.105		-0.354		0.026		-0.118		-0.249		1			
	Root		-0.367		-0.393		-0.262		-0.053		-0.236		1		
Age (growth stage)	Shoot	**-0.867		**-0.868		** -0.868		-0.869 **		-0.868 **		0.00		1	
	Root		-0.867**		0. 675**		**-0.846		**-0.870		**-0.868		0.00		1

** و * به ترتیب نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح ۰/۰۱ > P و ۰/۰۵ > P است.

** and * indicate a significant difference between the means at P < 0.01 and P < 0.05 levels, respectively.

۵- بحث

میزان و نوع مواد موثره موجود در گیاهان که عمدتا متابولیت‌های ثانوی هستند، در طول دوره رشدونمو گیاه تغییر می‌کند. متابولیت‌های ثانوی در اکثر موارد در خانواده‌ها و گونه‌های خاصی از سلسله گیاهان تولید می‌شوند. این ترکیبات به مقدار خیلی کم، در مرحله خاصی از چرخه زندگی گیاه تولید و عمدتا در سلول‌ها و بافت‌های تخصصی ذخیره می‌شوند. هر چند تولید مواد موثره گیاهان دارویی توسط فرایندهای ژنتیکی هدایت می‌شود، اما به‌طور قابل‌توجهی تحت تاثیر عوامل محیطی نیز قرار می‌گیرد، به‌طوری‌که این عوامل موجب تغییر در رشد گیاهان دارویی و همچنین کمیت و کیفیت مواد موثره موجود می‌شود [22]. کمیت و کیفیت متابولیت‌های ثانوی ازجمله ترکیبات فنلی، بین گونه‌های مختلف یک جنس، جمعیت‌های مختلف یک گونه، اندام‌های گیاه و مراحل مختلف رشدونمو متفاوت است [23]. تنوع جمعیتی متابولیت‌های ثانوی از گونه‌های گیاهی مختلف به‌وفور در طول چندین دهه بررسی شده است. با این دیدگاه، این پژوهش نیز با هدف بررسی تولید متابولیت‌های ثانوی-فنلی در چند جمعیت از گیاه دارویی کاکوتی‌کوهی و در دو دوره رشد و بخش‌های مختلف گیاه، به‌منظور بررسی سطح تولید این ترکیبات در شرایط کنترل‌شده گلخانه‌ای صورت گرفت.

مطابق نتایج، طی دوره رشد رویشی در شرایط کنترل‌شده گلخانه‌ای، با افزایش سن (از مرحله دوماهگی تا پنج‌ماهگی)، محتوای کل ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی، فلاون و فلاونول، ارتو-دی‌فنل و اسیدفنلی در بخش هوایی جمعیت‌های درکش و هاور، تیمورتاش و رئین کاهش یافت. همسو با نتایج حاضر، بررسی محتوای فنل‌کل در مراحل رشد رویشی، تشکیل غنچه و گلدهی کامل گیاه *Fumaria vaillantii*، نشان داد که با افزایش سن سطح این ترکیبات کاهش می‌یابد و مرحله رویشی، به‌عنوان بهترین زمان برداشت گیاه جهت استفاده بهینه از ترکیبات فنلی گیاه معرفی شد [24]. فرآیندهای مختلف بیوسنتز و یا تخریب پلی‌فنل‌ها، سیستم‌های انتقال آن‌ها، برهمکنش بین اندام‌های گیاهی و همچنین مرحله فنولوژی هر اندام در توزیع ترکیبات فنلی مختلف دخیل هستند [25]، [26]. گزارش‌های مختلفی وجود دارد که تغییر میزان و نوع متابولیت‌های ثانوی را در طول رشدونمو گیاهان و یا در مراحل فنولوژی موردبررسی قرار داده است. به گزارش ایشیکورا [27]، محتوای فنل و فلاوانول کل برگ در برخی از گیاهان مانند سماق (*Rhus* L.)، افرا (*Acer* L.) و گوشوارک (*Euonymus* L.)، پس از یک افزایش سریع در اوایل رشد رویشی، در مراحل بعدی ثابت می‌ماند. بررسی تغییر ترکیبات فنلی در مراحل گیاهچه‌ای، رشد رویشی و گلدهی گونه‌ای دارویی از خانواده مارچوبه (*Asparagus racemosus*) حاکی از آن بود که در دوره رشد رویشی، مقدار فنل کل به بیشینه تجمع خود می‌رسد [28]. درحالی‌که در بسیاری از گیاهان، نظیر رازیانه دریایی (*Crithmum maritimum* L.) [29]، گل راعی (*Hypericum* L.) [30] و بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) [31] گلدهی مرحله‌ای از رشدونمو است که با افزایش ترکیبات فنلی در بخش‌های هوایی گیاه همراه است.

مقایسه داده‌های فنل کل بین جمعیت‌های موردبررسی نشان داد که جمعیت تیمورتاش دارای بیشترین محتوی فنل کل است، به‌گونه‌ای که ریشه این جمعیت از محتوای بیشتر فنل‌کل نسبت به بخش هوایی برخوردار است. جمعیت‌های وحشی گونه‌های گیاهان دارویی از مناطق مختلف جهان برای ارزیابی تنوع مشتقات فنلی موردبررسی قرار گرفتند [17]، [32]، [33]. ورما و شوکلا [34] اشاره می‌کنند که عوامل ژنتیکی، انتوژنی و موفوژنتیکی گیاهان و همین‌طور عوامل محیطی مسئول نوسانات در سنتز متابولیت‌های ثانوی در گیاهان دارویی هستند. از این نظر، لی و همکاران [8] ثابت کردند که محتوای فنل‌ها، فلاونوئیدها و ترپنوئیدها با سن گیاه، مرحله گلدهی یا میوه‌دهی تغییر می‌کند. به‌عنوان‌مثال، در بعضی موارد محتوای متابولیت‌های فوق در مرحله گلدهی یا میوه‌دهی افزایش یافتند؛ درصورتی‌که در مرحله رویشی پایدار بودند. در پژوهشی که توحیدی و همکاران [17] بر فنل‌کل گونه‌های مختلف جنس آویشن (*Thymus* spp.) انجام دادند، تفاوت معنی‌داری بین محتوای فنل‌کل نمونه‌های متعلق به مناطق مختلف مشاهده کردند و این تفاوت را به منشا جغرافیایی و همچنین به عوامل اقلیمی و محیطی نسبت دادند. همچنین تاثیر تنوع ژنتیکی و بیولوژیکی، شرایط جغرافیایی و تغییرات فصلی بر تغییرات فنلی جمعیت‌های متفاوت از دو گونه کتان هندی *Corchorus capsularis* و *Corchorus olitorius* [35] و جمعیت‌های گیاه اسطوخودوس (*Lavandula* × *intermedia*) [36] مورد تاکید قرار گرفته است. بااین‌حال، زیمر و همکاران [37] دریافتند که تنوع ژنتیکی نقش حیاتی در ایجاد تفاوت‌های درون‌گونه‌ای برای محتوای فنل نسبت به شرایط محیطی دارد.

بر اساس نتایج این تحقیق، تغییرات محتوای فلاونوئید تحت تاثیر مرحله رشد رویشی، تنوع جمعیتی و همچنین بخش گیاهی موردبررسی قرار گرفت و بیشترین محتوای فلاونوئید در مرحله دوماهگی و در بخش هوایی جمعیت درکش و هاور حاصل شد. همسو با نتایج حاضر، علی و همکاران [38] بیشترین مقدار فلاونوئید کل را در برگ‌ها و ساقه‌های گونه‌ای از آویشن (*Thymus numidicus* Poir.) نسبت به ریشه‌ها گزارش کردند. برخلاف

گیاهان رشد یافته دوماهگی، محتوای فلاونوئید در ریشه گیاهان پنج‌ماهگی نسبت به اندام هوایی این گیاهان افزایش یافت. این نتایج با نتایج سایر پژوهشگران در شیرین‌بیان سرسان (*Glycyrrhiza echinata* L.) [39]، *Anabasis articulate* [40] و پای شیر (*Alchemilla vulgaris* L.) [41] که محتوای فلاونوئید ریشه بیشتر از بخش هوایی بود، مطابقت دارد.

فلاون‌ها و فلاونول‌ها دیگر ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در جمعیت‌های موردمطالعه بودند که تفاوت معنی‌داری را بین عصاره بخش‌های گیاهی موردبررسی نشان دادند. محتوای فلاون و فلاونول‌کل در بخش هوایی گیاهان رشد یافته به مدت دو ماه تقریبا دو برابر بخش زیرزمینی این گیاهان در دو جمعیت درکش و هاور و رئین بود درحالی‌که در جمعیت تیمورتاش تغییر محسوسی در محتوای این ترکیبات، بین بخش هوایی و ریشه مشاهده نشد. به‌طور مشابه، در پژوهشی که توسط بنهامو و همکاران [40] روی گونه *A. articulate* انجام شد، محتوای فلاونول کل ساقه‌ها تقریبا دو برابر ریشه گیاه گزارش گردید.

نتایج بررسی محتوای ارتو-دی‌فنل و اسیدهای فنلی مشخص کرد که ریشه‌ها در مقایسه با بخش هوایی، منابع غنی‌تری از این متابولیت‌ها هستند. بروجا و همکاران [41] گزارش کردند که محتوای اسیدفنلی در عصاره ریشه گیاه *A. vulgaris* در مرحله گلدهی کامل تقریبا دو برابر محتوای متابولیت فوق در عصاره اندام هوایی است. بااین‌حال، متکووسکی و همکاران [21]، تفاوت معنی‌داری در محتوای اسیدهای فنلی در بین گونه‌های متفاوت مریم‌گلی (*Salvia miltiorrhiza, S. przewalskii*, and *S. verticillata*) با سطح بالاتری در برگ نسبت به ریشه مشاهده نمودند. همچنین غلظت بیشتری از اسیدهای فنلی اندام هوایی *Gentiana cruciate* در مقایسه با ریشه آن، در گزارش میهایلوویک و همکاران [42] مشاهده شد. این تنوع در میان گونه‌ها و بین برگ‌ها و ریشه‌ها، به پویایی سنتز پلی‌فنل در اندام‌های گیاهی نسبت داده شده است که به مرحله رشد نیز وابسته است [43].

درمجموع و صرف‌نظر از بخش هوایی و ریشه، جمعیت درکش و هاور در هر دو مرحله رشد رویشی به‌عنوان جمعیت منتخب از لحاظ تولید حداکثری ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی گزارش می‌شوند. با توجه به یکسان بودن شرایط کشت گیاهان، این نتایج می‌تواند نشان‌دهنده تاثیر ژنتیک بر مسیر سنتز و تجمع این ترکیبات در جمعیت‌های مختلف باشد که این امر به‌نوبه خود می‌تواند منجر به راه‌اندازی مسیر تولید ترکیبات ثانویه با توجه به نیاز گیاه در طول دوره رشدی درنظرگرفته شود.

۶- نتیجه‌گیری

میزان و نوع متابولیت‌های ثانوی در طول دوره رشد و نمو گیاه تغییر می‌کند. مقدار این ترکیبات در بافت‌های گیاهی، در بخش‌های مختلف گیاه در طول فصل رشد تغییر می‌کند. همچنین، تولید این متابولیت‌ها می‌تواند در هر مرحله از رشد و نمو اتفاق بیفتد. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که محتوای ترکیبات فنلی به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر نوع جمعیت، بخش گیاهی (بخش هوایی و ریشه) و سن گیاه (مرحله رشد) قرار می‌گیرد. بر این اساس بخش هوایی کاکوتی‌کوهی در بین دو مرحله رویشی موردبررسی، در مرحله دوماهگی که جوان‌تر است، میزان مشتقات فنلی بیشتری نسبت به مرحله پنج‌ماهگی دارد. مقایسه جمعیت‌ها نشان داد که جمعیت درکش و هاور و تیمورتاش در هر دو مرحله رشد رویشی به‌عنوان جمعیت منتخب از لحاظ تولید حداکثری مشتقات فنلی گزارش شدند. نتایج مطالعه حاضر به بهبود درک ما از تغییرپذیری و تجمع پلی‌فنل‌ها، انتخاب جمعیت‌های برتر و دارای محتوای متابولیتی بیشتر و همچنین انتخاب مرحله مطلوب رشد در گیاهان دارویی برای به‌کارگیری در صنایع غذایی و دارویی کمک شایانی خواهد نمود.

سپاسگزاری

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند تا بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد بابت تامین هزینه‌های پژوهش حاضر از محل اعتبارات متمرکز این معاونت (با کد طرح به شماره ۳/۵۰۵۵۸) تشکر و قدردانی نمایند.

اعلام تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نگارندگان بیان نشده است.

منابع

[1] Mozaffarian V. (2015). *Identification of medicinal and aromatic plants of Iran*. Farahang Moaser. (**In Persian**). https://www.gisoom.com/book/11131259/

[2] Jamzad, Z. (2012). *Flora of Iran: Lamiaceae*. Publications of Forestry and Pasture Research Institute. (**In Persian**). https://www.gisoom.com/book/1875124/

[3] Ghaviandam Bovanlo, A., & Mazandarani, M. (2017). Aut ecology and phytochemical survey of Ziziphora clinopodioides Lam. with ethnopharmacology and floristic spectrum of medicinal plants in Bovanlou region (Northern Khorasan province). *Eco-phytochemical journal of medicinal plants*, *5*(3), 63-74. (**In Persian**). https://sanad.iau.ir/journal/ejmp/Article/600657?jid=600657&lang=en

[4] Oksman-Caldentey, K. M., & Inzé, D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in plant science*, *9*(9), 433–440. DOI:10.1016/j.tplants.2004.07.006

[5] Holeski, L. M., Hillstrom, M. L., Whitham, T. G., & Lindroth, R. L. (2012). Relative importance of genetic, ontogenetic, induction, and seasonal variation in producing a multivariate defense phenotype in a foundation tree species. *Oecologia*, *170*(3), 695–707. DOI:10.1007/s00442-012-2344-6

[6] Fenner, M. (1998). The phenology of growth and reproduction in plants. *Perspectives in plant ecology, evolution and systematics*, *1*(1), 78–91. DOI:10.1078/1433-8319-00053

[7] Shukla, S., Mehta, A., Bajpai, V. K., & Shukla, S. (2009). In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of Stevia rebaudiana Bert. *Food and chemical toxicology*, *47*(9), 2338–2343. DOI:10.1016/j.fct.2009.06.024

[8] Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., & Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant physiology and biochemistry*, *148*, 80–89. DOI:10.1016/j.plaphy.2020.01.006

[9] Zou, G. A., Guo, D., Zhao, H. Q., & Aisa, H. A. (2015). Bioactive constituents of Ziziphora clinopodioides. *Chemistry of natural compounds*, *51*(5), 961–963. DOI:10.1007/s10600-015-1462-x

[10] Amiri, H., Beyraminia, L., & Hemmati Hassan Gavyar, P. (2017). Chemical composition and antioxidant activity of essential oil and methanol extract of aerial parts of Ziziphora clinopodioides Var. rigida. *Journal of kerman university of medical sciences*, *24*(4), 329–337.

[11] Zhang, X., Ding, W., Li, J., Liu, F., Zhou, X., & Tian, S. (2015). Multi-elemental analysis of Ziziphora clinopodioides from different regions, periods and parts using atomic absorption spectrometry and chemometric approaches. *Revista brasileira de farmacognosia*, *25*(5), 465–472. DOI:10.1016/j.bjp.2015.07.021

[12] Zhu, Y., Xiong, Y., Wang, H., & Li, P. (2017). Pharmacognostical and phytochemical studies on Ziziphora clinopodioides Lam. – A Kazakh and Uygur ethnomedicinal plant. *Journal of pharmacy and pharmacognosy research*, *5*(6), 345–353. DOI:10.56499/jppres17.208_5.6.354

[13] Alp, S., Ercisli, S., Dogan, H. Ü. L. Y. A., Temim, E., Leto, A., Zia-Ul-Haq, M., ... & Aladag, H. (2016). Chemical composition and antioxidant activity Ziziphora clinopodioides ecotypes from Turkey. *Romanian biotechnological letters*, *21*(2), 11298–11303.

[14] Šmejkal, K., Malaník, M., Zhaparkulova, K., Sakipova, Z., Ibragimova, L., Ibadullaeva, G., & Žemlička, M. (2016). Kazakh Ziziphora species as sources of bioactive substances. *Molecules*, *21*(7), 826. DOI:10.3390/molecules21070826

[15] Senejoux, F., Demougeot, C., Kerram, P., Aisa, H. A., Berthelot, A., Bévalot, F., & Girard-Thernier, C. (2012). Bioassay-guided isolation of vasorelaxant compounds from Ziziphora clinopodioides Lam. (Lamiaceae). *Fitoterapia*, *83*(2), 377–382. DOI:10.1016/j.fitote.2011.11.023

[16] Annegowda, H. V., Bhat, R., Min-Tze, L., Karim, A. A., & Mansor, S. M. (2012). Influence of sonication treatments and extraction solvents on the phenolics and antioxidants in star fruits. *Journal of food science and technology*, *49*(4), 510–514. DOI:10.1007/s13197-011-0435-8

[17] Tohidi, B., Rahimmalek, M., & Arzani, A. (2017). Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of Thymus species collected from different regions of Iran. *Food chemistry*, *220*, 153–161. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.09.203

[18] Esmaeili, A. K., Taha, R. M., Mohajer, S., & Banisalam, B. (2015). Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid content of various solvent extracts from in vivo and in vitro grown Trifolium pratense L. (Red Clover). *BioMed research international*, *2015*. DOI:10.1155/2015/643285

[19] Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S., & Vladimir-Knežević, S. (2004). Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta pharmaceutica*, *54*(1), 65–72. https://repozitorij.unizg.hr/islandora/object/pharma:1377

[20] Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Gallina-Toschi, T., & Fernández-Gutiérrez, A. (2005). Analytical determination of polyphenols in olive oils. *Journal of separation science*, *28*(9–10), 837–858.

[21] Matkowski, A., Zielińska, S., Oszmiański, J., & Lamer-Zarawska, E. (2008). Antioxidant activity of extracts from leaves and roots of Salvia miltiorrhiza Bunge, S. przewalskii Maxim., and S. verticillata L. *Bioresource technology*, *99*(16), 7892–7896. DOI:10.1016/j.biortech.2008.02.013

[22] Omidbeigi, R. (2014). *Production and processing of medicinal plants*. Publications affiliated to Astan Quds Razavi. (**In Persian**). https://www.gisoom.com/book/1995655/

[23] Valares Masa, C., Sosa Díaz, T., Alías Gallego, J. C., & Chaves Lobón, N. (2016). Quantitative variation of flavonoids and diterpenes in leaves and stems of Cistus ladanifer L. at different ages. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *21*(3), 275. DOI:10.3390/molecules21030275

[24] Moghaddam, M., Miran, S. ., & Mehdizadeh, L. (2018). Total phenolic content and antioxidant activity of Fumaria vaillantii extract at three phenological stages assayed by various methods. *International journal of horticultural science and technology*, *5*(1), 93–102.

[25] Hudaib, M., Speroni, E., Di Pietra, A. M., & Cavrini, V. (2002). GC/MS evaluation of thyme (Thymus vulgaris L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, *29*(4), 691–700. DOI:10.1016/S0731-7085(02)00119-X

[26] Yosr, Z., Hnia, C., Rim, T., & Mohamed, B. (2013). Changes in essential oil composition and phenolic fraction in Rosmarinus officinalis L. var. typicus Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity. *Industrial crops and products*, *43*(1), 412–419. DOI:10.1016/j.indcrop.2012.07.044

[27] Ishikura, N. (1976). Seasonal changes in contents of phenolic compounds and sugar in Rhus, Euonymus and Acer leaves with special reference to anthocyanin formation in autumn. *The botanical magazine tokyo*, *89*(4), 251–257. DOI:10.1007/BF02493301

[28] Verma, V., & Kasera, P. K. (2007). Variations in secondary metabolites in some arid zone medicinal plants in relation to season and plant growth. *Indian journal of plant physiology*, *12*(2), 203. https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/80818110/ijpp-12-2-019-libre.pdf?1644858194=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DVariations_in_Secondary_Metabolites_in_S.pdf&Expires=1718030269&Signature=SXXew8VKLNGK9Ciqp-JjIbpdIMtX1SAgwqTpZCRH3wtnISQb1GaITfdNDhyNFNkfTqRTWn-wQYi5UDUw691e1iZgTQ3uIAAJxEV4L2eUaIxTWkBtmYESBlEgiN5ouKLiw8rzvwA61uP4kBj3XmEazoRLoddf8OnL3OEHPDjRhB8ozTxDENCjyCYgTiR1UxO4ud3HfcMFiTD4FztKSlt8hNOH7FZwPSnEhYyxa52bFhzi0sK9bsmydyBxF0pQtkIm2ybySLyfY2pctR-5JO5PInNk-jwx~VVkO4dtSLEKrqtY2zveMOTwxCBT8zWGYTT2Ax~O6YubEAYeKicvz3aHgQ__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA

[29] Maleš, Ž., Žuntar, I., Nigović, B., Plazibat, M., & Vundać, V. B. (2003). Quantitative analysis of the polyphenols of the aerial parts of rock samphire-Crithmum maritimum L. *Acta pharmaceutica*, *53*(2), 139–144.

[30] Ayan, A. K., Yanar, O., Cirak, C., & Bilgener, M. (2007). Morphogenetic and diurnal variation of total phenols in some hypericum species from Turkey during their phenological cycles. *Bangladesh journal of botany*, *36*(1), 39–46. DOI:10.3329/bjb.v36i1.1547

[31] Saeb, K., Gholamrezaee, S., & Asadi, M. (2011). Variation of antioxidant activity of Melissa officinalis leaves extracts during the different stages of plant growth. *Biomedical and pharmacology journal*, *4*(2), 237–243. DOI:10.13005/bpj/288

[32] Jaouadi, R., Cardoso, S. M., Silva, A. M. S., Ben Hadj Yahia, I., Boussaid, M., & Zaouali, Y. (2018). Variation of phenolic constituents of Tunisian Thymus capitatus (L.) Hoff. et Link. populations. *Biochemical systematics and ecology*, *77*, 10–15. DOI:10.1016/j.bse.2017.12.009

[33] Boulila, A., Sanaa, A., Salem, I. Ben, Rokbeni, N., M'rabet, Y., Hosni, K., & Fernandez, X. (2015). Antioxidant properties and phenolic variation in wild populations of Marrubium vulgare L. (Lamiaceae). *Industrial crops and products*, *76*, 616–622. DOI:10.1016/j.indcrop.2015.07.069

[34] Verma, N., & Shukla, S. (2015). Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*, *2*(4), 105–113. DOI:10.1016/j.jarmap.2015.09.002

[35] Biswas, A., Dey, S., Li, D., Yiu, L., Zhang, J., Huang, S., ... & Deng, Y. (2020). Comparison of phytochemical profile, mineral content, and in vitro antioxidant activities of Corchorus capsularis and Corchorus olitorius leaf extracts from different populations. *Journal of food quality*, *2020*, 1–14. DOI:10.1155/2020/2931097

[36] Bajalan, I., Mohammadi, M., Alaei, M., & Pirbalouti, A. G. (2016). Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of extracts from different populations of lavandin. *Industrial crops and products*, *87*, 255–260. DOI:10.1016/j.indcrop.2016.04.059

[37] Zimmer, M., Auge, H., von Wühlisch, G., Schueler, S., & Haase, J. (2015). Environment rather than genetic background explains intraspecific variation in the protein-precipitating capacity of phenolic compounds in beech litter. *Plant ecology and diversity*, *8*(1), 73–79. DOI:10.1080/17550874.2013.871655

[38] Ben El Hadj Ali, I., Bahri, R., Chaouachi, M., Boussaïd, M., & Harzallah-Skhiri, F. (2014). Phenolic content, antioxidant and allelopathic activities of various extracts of Thymus numidicus Poir. organs. *Industrial crops and products*, *62*, 188–195. DOI:10.1016/j.indcrop.2014.08.021

[39] Çakmak, Y. S., Aktumsek, A., & Duran, A. (2012). Studies on antioxidant activity, volatile compound and fatty acid composition of different parts of Glycyrrhiza echinata L. *EXCLI journal*, *11*, 178–187. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4941799/

[40] Benhammou, N., Ghambaza, N., Benabdelkader, S., Atik-Bekkara, F., & Kadifkova Panovska, T. (2013). Phytochemicals and antioxidant properties of extracts from the root and stems of Anabasis articulata. *International food research journal*, *20*(5), 2057–2063.

[41] Boroja, T., Mihailović, V., Katanić, J., Pan, S. P., Nikles, S., Imbimbo, P., … Bauer, R. (2018). The biological activities of roots and aerial parts of Alchemilla vulgaris L. *South african journal of botany*, *116*, 175–184. DOI:10.1016/j.sajb.2018.03.007

[42] Mihailović, V., Mišić, D., Matić, S., Mihailović, M., Stanić, S., Vrvić, M. M., ... & Stanković, M. S. (2015). Comparative phytochemical analysis of Gentiana cruciata L. roots and aerial parts, and their biological activities. *Industrial crops and products*, *73*, 49–62. DOI:10.1016/j.indcrop.2015.04.013

[43] Stankovic, M. S., Niciforovic, N., Topuzovic, M., & Solujic, S. (2011). Total phenolic content, flavonoid concentrations and antioxidant activity, of the whole plant and plant parts extracts from Teucrium montanum L. var. montanum, f. supinum (L.) reichenb. *Biotechnology and biotechnological equipment*, *25*(1), 2222–2227. DOI:10.5504/bbeq.2011.0020