مقاله پژوهشی

Research Article

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۹، شماره ۱، صفحه ۱۰۵-۹۵ (۱۴۰۲)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2022.358971.3183
شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350905.1402.39.1.7.2

تأثیر شرایط اکولوژیک بر خاصیت پاداکسایشی و میزان کمّی و کیفی اسانس گیاه *Thymbra spicata* L.

علی اصغر حاتم‌نیا[1]

۱- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران، پست الکترونیک: a.hatamnia@ilam.ac.ir

تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۱ تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: آبان ۱۴۰۱

چکیده

آویشن زوفایی (*Thymbra spicata* L.) گیاهی از خانواده نعنا (Lamiaceae) است که در مناطق وسیعی از ایران پراکنش دارد. در این مطالعه اکوتیپ‌های مختلف آویشن زوفایی از سه منطقه مختلف در سطح استان ایلام جمع‌آوری گردید و میزان فنول و فلاونویید کل، فعالیت پاداکسایشی، بازدهی اسانس و همچنین میزان ترکیب‌های اسانس با استفاده از دستگاه‌های GC و GC-MS ارزیابی شد. نتایج نشان داد که همبستگی مثبت و معنی‌داری بین محتوای فنول و فلاونویید کل با فعالیت پاداکسایشی مشاهده گردید، به‌طوری که عصاره آویشن زوفایی جمع‌آوری شده از کوه مانشت با محتوای فنول و فلاونویید بالا دارای بیشترین فعالیت پاداکسایشی بود. ترکیب اصلی اسانس آویشن زوفایی جمع‌آوری شده در مناطق مختلف با شرایط اکولوژیکی مختلف تیمول می‌باشد که در محدوده بین ۲۲/۶٪ تا ۴۰/۷٪ متغیر بود. دیگر ترکیب‌های اصلی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کارواکرول، پارا-سیمن و گاما-ترپینن بودند. نتایج نشان داد که نمونه آویشن زوفایی جمع‌آوری شده از منطقه کاوران دارای بیشترین درصد اسانس (با میانگین ۲/۴٪) و نمونه جمع‌آوری شده از کوه مانشت دارای کمترین درصد اسانس (با میانگین ۱/۴٪) بودند. نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که بازدهی اسانس و میزان کمّی و کیفی ترکیب‌های اسانس نه تنها به عوامل ژنتیکی بلکه به عوامل اکولوژیکی و محیطی ازجمله ارتفاع از سطح دریا، میانگین دمای سالیانه و بارش سالیانه بستگی دارد.

واژه‌های کلیدی: آویشن زوفایی (*Thymbra spicata* L.)، پاداکسایشی، اسانس، تیمول، کارواکرول.

مقدمه

تیره نعنا (Lamiaceae) شامل تعدادی از گونه‌های گیاهی معطر می‌باشد که از لحاظ اقتصادی دارای اهمیت بوده و دارای ترکیب‌های معطر و اسانس است، ازجمله این گیاهان معطر می‌توان به آویشن زوفایی (*Thymbra spicata* L.) اشاره کرد. این گیاه سرشار از اسانس بوده و دارای کاربردهای صنعتی بسیاری می‌باشد (Markovic *et al.*, 2011؛ Kirkan *et al.*, 2019).

ترکیب‌های فنولی دارای نقش‌های متفاوتی در گیاهان هستند. ترکیب‌های فنولی با توجه به ساختاری که دارند در گیاهان دارای عملکردهای متفاوتی ازجمله نقش حمایتی، حفاظت در برابر اشعه زیانبار فرابنفش، گرده‌افشانی و پراکنش دانه‌ها، واکنش‌های دفاعی در مقابل تنش‌های زیستی و غیرزیستی هستند. بسیاری از ترکیب‌های فنولی می‌توانند باعث کاهش رشد گیاهان مجاور شوند (آللوپاتی)، یا دارای نقش حفاظتی در مقابل علف‌خواران و پاتوژن‌ها

Copyright: © 2023 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijmapr.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

هستند. به همین علت است که ترکیب‌های فنولی به‌عنوان ترکیب‌های گیاهی با ارزش با عملکردهای گیاهی خیلی مهم هستند (Laura *et al.*, 2019). علاوه‌براین، ترکیب‌های فنولی دارای فعالیت‌های فیزیولوژیکی ازجمله ضدالتهابی، ضدعفونی، ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانتی هستند. فعالیت آنتی‌اکسیدانتی ترکیب‌های فنولی به‌دلیل ظرفیت این ترکیب‌ها در مهار آسیب‌های سلولی ناشی از اکسیداسیون از قبیل پراکسیداسیون لیپیدها و اکسیداسیون DNA به‌علت فعالیت جاروب کردن رادیکال‌های آزاد می‌باشد (Masibo & He, 2008).

بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه اگرچه به‌وسیله عوامل ژنتیکی کنترل می‌شود، اما به میزان زیادی تحت تأثیر عوامل محیطی ازجمله دما، میزان نور، میزان بارش سالیانه، زمان برداشت و غیره است. تجارب کشاورزی زیادی در ارتباط با ویژگی‌های کمّی و کیفی متابولیت‌های استخراج شده از گیاهان وجود دارد که نتیجه آنها افزایش رشد و محصول گیاهیست. یکی از این تجارب، افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه در میوه‌ها و سبزیجات موجود در رژیم غذایی می‌باشد که دارای فواید سودمندی در ارتباط با سلامتی انسان‌هاست (Naghdi Badi *et al.*, 2017).

تحقیقات نشان داد که منشأ متفاوت گیاه، تغییرات فصلی و شرایط محیطی میزان و ترکیب اسانس موجود در گونه‌های مختلف آویشن را می‌تواند تحت تأثیر قرار دهد (Alizadeh, 2017).

Barakat و همکاران (۲۰۱۳) نمونه‌های آویشن زوفایی را در زمان‌های مختلف در طول یک سال جمع‌آوری کردند و بعد از اسانس‌گیری نشان دادند که کارواکرول، پارا–سیمن و گاما–ترپینن ترکیب‌های اصلی اسانس هستند. همچنین، نتایج آنان نشان داد که مقادیر اسانس و نوع ترکیب‌های شیمیایی آنها با توجه به زمان جمع‌آوری متفاوت بوده، به‌طوری که مقدار اسانس بین ۳/۵٪ تا ۶/۶٪ متغیر است.

Stefanaki و همکاران (۲۰۱۸) اسانس آویشن زوفایی را در فصل بهار و تابستان در جزیره خیوس (Chios) یونان مطالعه کردند و نشان دادند که مانند دیگر مناطق مدیترانه‌ای ترکیب اصلی آویشن زوفایی کارواکرول است و پارا–سیمن، گاما–ترپینن، کاریوفیلن اکسید و تیمول دیگر ترکیب‌های عمده اسانس آویشن زوفایی هستند. در مطالعه دیگر، Sarikaya و همکاران (۲۰۱۹) اسانس آویشن زوفایی را ارزیابی کردند و نشان دادند که ترکیب‌های اصلی شامل کارواکرول، تیمول، لینالول، گاما–ترپینن و پارا–سیمن هستند. بنابراین نتایج این محققان نشان داد که میزان اسانس گیاهان نه تنها به عوامل ژنتیکی بلکه به عوامل محیطی دیگر ازجمله زمان برداشت نمونه‌ها بستگی دارد.

هدف از انجام این پژوهش، اندازه‌گیری میزان فنول، فلاونویید و بررسی خواص پاداکسایشی نمونه‌های مختلف آویشن زوفایی و اندازه‌گیری ترکیب‌های فیتوشیمیایی اسانس آویشن زوفایی و بررسی تأثیر شرایط اکولوژیکی روی میزان کمّی ترکیب‌های فیتوشیمیایی اسانس نمونه‌های مختلف آویشن زوفایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی گیاه مورد مطالعه

نمونه‌های مربوط به آویشن زوفایی از سه رویشگاه مختلف با شرایط اکولوژیکی متفاوت در سطح استان ایلام در شهریورماه سال ۱۳۹۹جمع‌آوری شدند. در این مطالعه از طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی استفاده شد، به‌طوری که ما در هر رویشگاه سه نقطه را به شکل تصادفی انتخاب کرده و بعد داخل هر نقطه برگ‌های آویشن زوفایی را جمع‌آوری کردیم. قسمت‌های مربوط به اندام‌های هوایی جمع‌آوری شد و در سایه بر روی کاغذهای روزنامه به شکل گسترده پخش شدند و برای جلوگیری از کپک‌زدگی هر روز کاغذ روزنامه تعویض می‌شد. نمونه‌ها پس از خشک شدن در سایه به‌وسیله هاون چینی به حالت پودر خیلی ریز درآمدند. سپس در پاکت‌های کاغذی بسته‌بندی و برای عصاره‌گیری به آزمایشگاه منتقل شدند. جزئیات مربوط به اکوتیپ‌های مختلف در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی مناطق جمع‌آوری جمعیت‌های آویشن زوفایی (***Thymbra spicata***) از استان ایلام

Table 1. Geographical characteristics of *Thymbra spicata* populations collecting sites from Ilam province

Samples	Collection site	Altitude (m)	Longitude	Latitude	Average temperature (°C)	Precipitation (mm)	Relative humidity (%)
T1	Manesht Mountain	2498	33 68' 96"	46 45' 56"	17.8	410.6	41
T2	Kale Jemen Mountain	1703	33 50' 27"	46 34' 40"	19.2	348.6	42
T3	Kaveran Mountain	970	33 41' 14"	45 56' 28"	25.6	215	36

تهیه عصاره‌های گیاهی برای سنجش فعالیت‌های پاداکسایشی

برای تهیه عصاره گیاهی جهت مطالعه فعالیت‌های پاداکسایشی ۳ گرم از هر یک از پودر نمونه‌های گیاهی با ۵۰ میلی‌لیتر متانول مخلوط شد. عصاره‌گیری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه سوکسله در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد (Wijeratne *et al*., 2006).

تعیین محتوای فنول کل

برای اندازه‌گیری محتوای فنول کل موجود در عصاره‌ها از معرف فولین سیوکالتیو طبق روش Tsantili و همکاران (۲۰۱۰) با اندکی تغییرات استفاده شد. ابتدا ۰/۲ میلی‌لیتر معرف سیوکالتیو و ۲/۶ میلی‌لیتر آب مقطر به ۰/۲ میلی‌لیتر از هر یک از عصاره‌های گیاهی اضافه شد. پس از ۳ دقیقه ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم (۷٪) به مخلوط واکنش اضافه شد. بعد از ۹۰ دقیقه جذب مخلوط واکنش در دمای اتاق توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت گردید. محتوای فنول کل با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید تعیین شد.

تعیین محتوای فلاونویید

محتوای فلاونویید موجود در عصاره‌های مورد مطالعه با اندکی تغییرات طبق روش Lenucci و همکاران (۲۰۰۶) انجام شد. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره همراه با ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر با مقدار ۱ میلی‌لیتر از AlCl3 (۲٪) در محلول متانولی (۵٪ اسید استیک در متانول) مخلوط گردید. واکنش به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد، سپس جذب آن در ۴۳۰ نانومتر در برابر یک نمونه شاهد بدون واکنش‌کننده قرائت گردید. محتوای فلاونویید با استفاده از منحنی کوئرستین تعیین شد.

سنجش ظرفیت پاداکسایشی کل

فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌ها به روش فسفومولیبدات آنالیز شد (Pulido *et al*., 2000). ۰/۳ میلی‌لیتر عصاره با ۳ میلی‌لیتر معرف (سولفوریک اسید ۰/۶ مولار، سدیم فسفات ۲۸ میلی‌مولار و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی‌مولار) مخلوط شده به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب‌گرم ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. جذب نمونه‌ها در ۶۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل به‌صورت میکروگرم آسکوربیک اسید بر گرم وزن خشک نمونه گزارش شد.

ظرفیت جاروب‌کنندگی رادیکال‌های DPPH

میزان جاروب‌کنندگی رادیکال پایدار DPPH (۲،۲- دی‌فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل) طبق روش Burits و Bucar (۲۰۰۰) با اندکی تغییر تعیین گردید. ۵۰ میکرولیتر از عصاره با ۵ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH (۰/۰۰۴٪) مخلوط شد. جذب مخلوط بعد از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و تاریکی در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد و درصد فعالیت جاروب‌کنندگی عصاره‌ها طبق فرمول زیر محاسبه گردید.

درصد جاروب‌کنندگی =

(1–A sample / A blank) ×100 رادیکال DPPH

A sample: جذب مخلوط واکنش حاوی عصاره؛ A blank: جذب مخلوط واکنش بدون عصاره

روش اسانس‌گیری

عمل اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب (به نسبت ۵:۱ ماده خشک گیاهی به آب مقطر) با استفاده از دستگاه کلونجر (به مدت ۳ ساعت) انجام شد و درصد اسانس به‌صورت میلی‌لیتر بر ۱۰۰ گرم ماده خشک محاسبه گردید.

بکارگیری کروماتوگرافی گازی (GC) و کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی (GC-MS)

برای محاسبه درصد ترکیب‌های اسانس از دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Agilent-6890 ساخت کمپانی Agilent آمریکا با آشکارساز یونش شعله‌ای (FID) و گاز نیتروژن به‌عنوان گاز حامل استفاده شد. ستون مورد استفاده در کروماتوگرافی گازی دارای طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فاز ساکن آن ۰/۲۵ میکرومتر بود. آنالیز GC/MS ترکیب‌های اسانس با دستگاه کروماتوگراف گازی Finnigan Thermo که با سیستم مس اسپکترومتری (model GC TRACE; TRACE MS plus) جفت شده بود، انجام شد. از ستون غیرقطبی (30 m X 0.250 mm, 0.25 µm film HP-5MS thickness) استفاده شد. پروفیل دمایی به‌صورت زیر بود: ابتدا دما به مدت ۲ دقیقه روی ۴۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد، بعد تا دمای ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۳ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافت، در نهایت دما با سرعت ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه به ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و ۲ دقیقه در این دما ماند. گاز حامل هلیم و سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و انرژی یونیزاسیون 70 ev بود. بعد از تزریق اسانس بدست آمده به دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی، با توجه به الگوی خروج آلکان‌های نرمال، شاخص بازداری برای ترکیب‌ها محاسبه و در نهایت مقایسه آنها با شاخص‌های مرجع، ترکیب‌های عمده تشکیل‌دهنده اسانس شناسایی شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ انجام شد. برای همه آزمایش‌های انجام شده سه تکرار در نظر گرفته شد. اختلاف بین نمونه‌ها به‌صورت مقادیر میانگین و خطای استاندارد (SE) بیان گردید. اختلاف‌ها با استفاده از آنالیز واریانس تک‌سویه (ANOVA) در سطح آماری ۵٪ (P<۰/۰۵) آنالیز و معنی‌دار گردید. همبستگی بین فاکتورهای مختلف نیز تعیین شد.

نتایج

نتایج مربوط به خاصیت پاداکسایشی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که نمونه‌های آویشن زوفایی مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ بر فنول کل، فلاونویید کل و ظرفیت پاداکسایشی کل داشته و تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ بر سنجش DPPH دارد (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات جمعیت‌های آویشن زوفایی (***Thymbra spicata***) از مناطق مختلف استان ایلام

Table 2. ANOVA of some *Thymbra spicata* populations traits from different regions of Ilam province

S.O.V.	d.f.	Mean Square			
		Total phenols	Total flavonoids	Total antioxidant capacity	DPPH
Population	2	1.837**	0.005**	150.671**	11.517*
Experimental error	6	0.014	0.000	0.610	0.597
C.V. (%)		0.5	1.5	0.48	0.72

* and **: significant at 5 and 1% probability levels, respectively.

محتوای فنول کل

نتایج میانگین داده‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ درصد بین میزان فنول کل نمونه‌های آویشن زوفایی وجود دارد. به‌طوری که نمونه‌های جمع‌آوری شده از کوه مانشت و کاروان به‌ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان فنول کل هستند (۸/۶۰ و ۷/۱۴ میلی‌گرم گالیک اسید/گرم وزن خشک) (جدول ۳).

محتوای فلاونوییید کل

نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین میزان فلاونوییید کل نمونه‌های آویشن زوفایی جمع‌آوری شده از نقاط مختلف وجود دارد، به‌طوری که بیشترین و کمترین میزان فلاونوییید کل در نمونه‌های جمع‌آوری شده از کوه مانشت (۰/۳۰ میلی‌گرم کوئرستین/گرم وزن خشک) و کوه کاوران (۰/۲۲ میلی‌گرم کوئرستین/گرم وزن خشک) است (جدول ۳).

ظرفیت پاداکسایشی کل

جدول ۳ ظرفیت پاداکسایشی کل را در نمونه‌های آویشن زوفایی جمع‌آوری شده از نقاط مختلف نشان می‌دهد. نمونه‌های آویشن زوفایی جمع‌آوری شده از کوه مانشت بیشترین ظرفیت پاداکسایشی کل را نشان دادند (۵۹/۲۱٪). نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ بین نمونه‌ها وجود دارد.

ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH (درصد بازدارندگی) در نمونه آویشن زوفایی جمع‌آوری شده از کوه مانشت (۳۷/۴۷٪) بیشتر از سایر نمونه‌ها بود و کمترین میزان ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH مربوط به نمونه جمع‌آوری شده از کوه کله‌جمن (۳۳/۵۵٪) است. نتایج نشان داد که نمونه‌های آویشن زوفایی جمع‌آوری شده از کوه کاوران و کوه کله‌جمن تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند (جدول ۳).

نتایج نشان داد که محتوای فنول کل، فلاونوییید کل، ظرفیت پاداکسایشی کل و ظرفیت جمع‌آوری DPPH نمونه‌ها کاملاً تابع ارتفاع بوده و با افزایش ارتفاع، افزایش میزان بارندگی و کاهش میانگین دمایی محتوای فنول کل، فلاونوییید کل، ظرفیت پاداکسایشی کل و ظرفیت جمع‌آوری DPPH نمونه‌های آویشن زوفایی نیز افزایش یافت. به‌طوری که نمونه‌های آویشن زوفایی جمع‌آوری شده از مرتفع‌ترین نقطه که مربوط به کوه مانشت است دارای بیشترین محتوای فنول کل می‌باشد.

جدول ۴ همبستگی بین میزان فنول کل، فلاونوییید کل، شاخص‌های خاصیت پاداکسایشی و ترکیب‌های اصلی اسانس (تیمول، پارا-سیمن، گاما-ترپینن و کارواکرول) را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که ضریب همبستگی مثبت معنی‌داری بین میزان فنول کل با فلاونوییید کل (r=۰/۹۱۴) و ظرفیت پاداکسایشی کل (r=۰/۹۸۱) وجود دارد. همچنین بین میزان فلاونوییید کل با ظرفیت پاداکسایشی کل ضریب همبستگی مثبت معنی‌داری وجود دارد (r=۰/۹۵۶). بااین‌حال، بین ظرفیت جمع‌آوری DPPH با پارامترهای دیگر ضریب همبستگی معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج جدول همبستگی نشان داد که بین ترکیب‌های تیمول، پارا-سیمن و گاما-ترپینن با فنول کل، فلاونوییید کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل ضریب همبستگی مثبت معنی‌داری وجود دارد (جدول ۴).

ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس

ترکیب اصلی اسانس آویشن زوفایی جمع‌آوری شده در مناطق مختلف با شرایط اکولوژیکی مختلف، تیمول می‌باشد که در محدوده بین ۲۲/۶٪ تا ۴۰/۷٪ متغیر است. از دیگر ترکیب‌های اصلی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف، می‌توان به کارواکرول، پارا-سیمن و گاما-ترپینن اشاره کرد. تمامی ترکیب‌های مختلف شناسایی شده همراه با درصد آنها در جدول ۵ نشان داده شده است.

جدول ۳- مقایسه میانگین صفات جمعیت‌های آویشن زوفایی (***Thymbra spicata***) از مناطق مختلف استان ایلام

Table 3. Means comparison of some *Thymbra spicata* populations traits from different regions of Ilam province

	Total phenols (mg gallic acid per g dry weight)	Total flavonoids (mg catechin per g dry weight)	Total antioxidant capacity (μg ascorbic acid per g dry weight)	DPPH radical scavenging (%)	Essential oil (%)
T1	8.60 ± 0.08a	0.30 ± 0.008a	59.21 ± 0.48a	37.47 ± 0.38a	1.38 ± 0.034c
T2	8.36 ± 0.08a	0.26 ± 0.004b	56.35 ± 0.31b	33.55 ± 0.45b	1.56 ± 0.029b
T3	7.14 ± 0.03b	0.22 ± 0.005c	45.76 ± 0.52c	35.55 ± 0.55a	2.43 ± 0.044a

T1, T2, and T3: populations from Manesht Mountain, Kale Jemen Mountain, and Kaveran Mountain, respectively.
Similar letters in each column indicate the absence of significant differences between treatments (Tukey test).

جدول ۴- همبستگی صفات جمعیت‌های آویشن زوفایی (***Thymbra spicata***) از مناطق مختلف استان ایلام

Table 4. Traits correlation of *Thymbra spicata* populations from different regions of Ilam province

	Total phenols	Total flavonoids	Total antioxidant capacity	DPPH	thymol	ρ-cymene	γ-terpinene	carvacrol
Total phenols	1	0.914**	0.981**	116.0	0.924**	0.959**	0.708*	-0.950**
Total flavonoids		1	0.956**	436.0	0.782*	0.845**	0.846**	-0.826**
Total antioxidant capacity			1	196.0	0.911**	0.953**	0.744*	-0.941**
DPPH				1	-0.200	-0.089	0.739*	0.125
thymol					1	0.993**	0.422	-0.997**
ρ-cymene						1	0.528	-0.999**
γ-terpinene							1	0.495
carvacrol								1

* and **: significant at 5 and 1% probability levels, respectively.

بنابراین، به‌طور کلی ترکیب‌های اصلی تشکیل‌دهنده اسانس در نمونه‌های آویشن زوفایی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان ایلام به‌ترتیب زیر است.

نمونه کوه مانشت (T1): تیمول (۳۶/۸٪)، پارا-سیمن (۱۴/۱٪)، گاما-ترپینن (۱۲/۱٪)، متیل استات (۱۱/۶٪)، ایندول (۱۰/۱٪) و کارواکرول (۹/۲٪).

نمونه کوه کله‌جمن (T2): تیمول (۴۰/۷٪)، پارا-سیمن (۱۴/۷٪)، ایندول (۱۲٪)، متیل استات (۹/۸٪)، کارواکرول (۷/۷٪) و گاما-ترپینن (۴/۸٪).

نمونه منطقه گرمسیری (T3): ایندول (۲۶/۷٪)، تیمول (۲۲/۶٪)، کارواکرول (۱۸/۶٪)، پارا-سیمن (۸/۳٪)، متیل استات (۷/۹٪) و گاما-ترپینن (۳/۷٪).

جدول ۳ بازده اسانس را در نمونه‌های آویشن زوفایی نشان می‌دهد. نمونه آویشن زوفایی جمع‌آوری شده از کوه کاوران دارای بیشترین بازده اسانس (با میانگین ۲/۴۳٪) و نمونه آویشن زوفایی جمع‌آوری شده از کوه مانشت دارای کمترین بازده اسانس (با میانگین ۱/۳۸٪) است. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ بین نمونه‌ها وجود دارد.

بحث

نتایج نشان داد که بیشترین میزان محتوی فنول و فلاونویید کل در عصاره آویشن زوفایی جمع‌آوری شده از کوه مانشت و کمترین آن در منطقه گرمسیری کاوران بدست آمده است.

جدول ۵- ترکیب‌های اسانس جمعیت‌های آویشن زوفایی (***Thymbra spicata***) از مناطق مختلف استان ایلام

Table 5. Essential oil compounds of *Thymbra spicata* populations from different regions of Ilam province

No.	Compound	RI	Amount (%)		
			T1	T2	T3
1	α-thujene	929	0.3	0.2	0.1
2	α-pinene	934	0.3	0.3	0.2
3	myrcene	985	0.6	0.3	0.2
4	α-phellandrene	1002	0.1	0	0
5	α-Terpinene	1014	1.7	0.8	0.6
6	***p*-cymene**	**1023**	**14.1**	**14.7**	**8.3**
7	**γ-terpinene**	**1056**	**12.1**	**4.8**	**3.7**
8	*cis*-sabinene hydrate	1066	0.3	0.2	0.3
9	linalool	1097	0.6	1.2	1.0
10	borneol	1168	0.2	0.5	1.4
11	terpinene-4-ol	1180	0.3	0.6	0.6
12	**thymol**	**1292**	**36.8**	**40.7**	**22.6**
13	**menthyl acetate**	**1294**	**11.7**	**9.8**	**7.9**
14	**indol**	**1299**	**10.1**	**12.0**	**26.8**
15	**carvacrol**	**1305**	**9.2**	**7.7**	**18.6**
16	thymyl acetate	1350	0.2	0.4	0.3
17	carvacryl acetate	1373	0	0	0.6
18	*trans*-caryophyllene	1425	0.5	0.6	0.4
19	spathulenol	1578	0.3	0.6	0.6
20	caryophyllene oxide	1584	0.6	1.6	1.4
	Total		**99.0**	**97.0**	**95.6**

T1, T2, and T3: populations from Manesht Mountain, Kale Jemen Mountain, and Kaveran Mountain, respectively.

از آنجایی که منطقه گرمسیری کاوران نسبت به کوه مانشت دارای سطح ارتفاع پایین‌تر، میزان بارندگی کمتر و میانگین دمایی بیشتر می‌باشد، بنابراین تولید ترکیب‌های اسانس در آویشن زوفایی این منطقه زودتر شروع شده است؛ از سوی دیگر مسیر موالونیک اسید مسیر مشترک برای بیوسنتز ترکیب‌های فنولی و ترپن‌ها می‌باشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که قسمتی از پیش‌ماده‌ها برای بیوسنتز ترکیب‌های فنولی به سمت تولید ترکیب‌های ترپنی رفته، بنابراین با توجه به شرایط اکولوژیکی و محیطی سه منطقه جمع‌آوری نمونه‌های آویشن زوفایی می‌توان نتیجه گرفت که در منطقه گرمسیری ارتفاعات کاوران میزان بیشتری از پیش‌ماده‌ها به سمت تولید ترکیب‌های ترپنی و تولید اسانس رفته، بنابراین در این منطقه میزان ترکیب‌های فنولی کمتر و بازدهی اسانس بیشتر می‌باشد و در منطقه کوه مانشت به‌عکس است و نسبت به دو منطقه دیگر دارای ترکیب‌های فنولی بیشتر و بازدهی اسانس کمتری می‌باشد.

ترکیب‌های فنولی دارای نقش‌های متفاوتی در گیاهان هستند. ازجمله این نقش‌ها می‌توان به فعالیت پاداکسایشی آنها اشاره کرد. از آنجایی که ترکیب‌های فنولی دارای گروه‌های هیدروکسیلی بوده و این گروه‌ها قادر به احیاء رادیکال‌های آزاد اکسیژن و خنثی کردن آنها می‌باشد. بنابراین یک همبستگی مثبت و معنی‌داری بین میزان ترکیب‌های فنولی و فلاونوییدی با میزان فعالیت پاداکسایشی وجود دارد. نتایج بدست آمده از این تحقیق نیز تأییدکننده این حقیقت است. به‌طوری که عصاره آویشن زوفایی جمع‌آوری شده از کوه مانشت با بیشترین میزان ترکیب‌های فنولی و فلاونوییدی دارای بیشترین فعالیت پاداکسایشی بوده و عصاره آویشن زوفایی جمع‌آوری شده از کوه کاوران با کمترین میزان ترکیب‌های فنولی و فلاونوییدی دارای کمترین فعالیت پاداکسایشی می‌باشد.

نتایج نشان داد که بیشترین بازدهی اسانس مربوط به اسانس آویشن زوفایی جمع‌آوری شده از منطقه گرمسیری

کوه کاوران (۲/۴۳٪) ایلام می‌باشد که دارای ارتفاع کمتر، بارش سالیانه کمتر و میانگین دمای سالیانه بیشتری نسبت به مناطق دیگر است. نتایج محققان دیگر نیز تأییدکننده نتایج ما می‌باشد، به‌طوری که Kizil (۲۰۱۰) با مطالعه بر روی نمونه گیاه آویشن زوفایی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور ترکیه نشان داد که نمونه‌های گیاهی جمع‌آوری شده در نواحی با ارتفاع پایین نسبت به نمونه‌های جمع‌آوری شده در نواحی با ارتفاع بالاتر دارای بازدهی اسانس بیشتری می‌باشد. این نتایج نشان‌دهنده این واقعیت است که میزان اسانس در آویشن زوفایی متأثر از شرایط محیطی بوده و در نواحی با ارتفاع پایین که دارای شرایط محیطی گرمتری هستند بازدهی اسانس بیشتر است.

ترکیب اصلی اسانس آویشن زوفایی جمع‌آوری شده در مناطق مختلف با شرایط اکولوژیکی مختلف تیمول می‌باشد که در محدوده بین ۲۲/۵۹٪ تا ۴۰/۶۷٪ متغیر است. یکی دیگر از ترکیب‌های اصلی اسانس آویشن زوفایی کارواکرول است که در محدوده بین ۷/۷٪ تا ۱۸/۵۶٪ متغیر می‌باشد. بیشترین میزان کارواکرول مربوط به کاوران منطقه گرمسیری (۱۸/۵۶٪) است. این منطقه دارای ارتفاع کمتر، بارش سالیانه کمتر و میانگین دمای سالیانه بیشتری نسبت به کوه مانشت و کله‌جمن می‌باشد، از سوی دیگر چون جمع‌آوری نمونه‌های آویشن زوفایی در شهریورماه انجام شده است، بنابراین نمونه‌های گیاهی این منطقه انرژی خورشیدی بیشتری به دلیل دمای بیشتر جذب کرده و سرعت تبدیل ترکیبات واسطه‌ای گاما-ترپینن و پارا-سیمن به محصول نهایی کارواکرول به میزان بیشتری انجام شده است. بنابراین، اسانس نمونه‌های جمع‌آوری شده از کوه کاوران (با ارتفاع پایین، بارش سالیانه کمتر و میانگین دمایی بیشتر) دارای درصد بیشتر محصول نهایی کارواکرول و درصد کمتر واسطه‌های گاما-ترپینن و پارا-سیمن نسبت به اسانس نمونه‌های جمع‌آوری شده از کوه مانشت و کله‌جمن (با ارتفاع بالاتر، بارش سالیانه بیشتر و میانگین دمایی کمتر) می‌باشد.

مطالعات دیگر نیز مطابقت با نتایج این تحقیق دارد. به‌طوری که مطالعات نشان داده است که میزان ترکیب‌های ثانویه و اسانس در گیاهان در ماه‌های گرم سال بیشتر از ماه‌های دیگر سال است. Omer (۱۹۹۹) نشان داد که میزان ترکیب کارواکرول در برداشت دوم (ماه‌های گرم سال) نسبت به برداشت اول (ماه‌های خنک سال) بیشتر می‌باشد که می‌توان آن را به شرایط محیطی ازجمله فاکتور دما نسبت داد. به‌طور کلی، گیاهانی که در فصل تابستان رشد می‌کنند در دمای بالاتری رشد کرده و میزان انرژی خورشیدی بیشتری را جذب می‌کنند. بنابراین، در این شرایط دمایی بیشتر تبدیل ترکیب‌های گاما-ترپینن و پارا-سیمن به ترکیب‌های کارواکرول و تیمول با سرعت بیشتری انجام می‌شود (Omer, 1999).

Vokou و همکاران (۱۹۹۳) گزارش کردند که ارتفاع از سطح دریا یک فاکتور محیطی مهم می‌باشد که می‌تواند روی میزان اسانس تأثیر بگذارد، به‌طوری که با کاهش ارتفاع از سطح دریا میزان اسانس نمونه گیاهی مربوطه افزایش یافته است. در تحقیقی دیگر، محققان نشان دادند که ترکیب اسانس گونه گیاهی *Espeletia schultzii* جمع‌آوری شده از مکان‌های مختلف متفاوت می‌باشد (Ibanez & Usubillaga, 2006). این گزارش نشان‌دهنده این واقعیت است که ارتفاع از سطح دریا می‌تواند یک فاکتور مهم تأثیرگذار بر روی ترکیب‌های فیتوشیمیایی گیاه باشد.

تحقیقات نشان داده است که ترکیب‌های اسانس نه تنها در میان نمونه‌های گیاهی جمع‌آوری شده از نواحی مختلف، بلکه در میان نمونه‌های گیاهی جمع‌آوری شده در یک ناحیه با ارتفاعات مختلف نیز متفاوت می‌باشد که نشان‌دهنده تأثیر محیط بر روی ترکیب‌های اسانس نمونه‌های گیاهیست (Kouyakhi *et al.*, 2008). علاوه‌براین، در گزارش Kouyakhi و همکاران (۲۰۰۸) نمونه‌های گیاهی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف با ارتفاع یکسان از سطح دریا دارای اسانس‌هایی با ترکیب‌های متفاوت هستند که نشان‌دهنده تأثیر شرایط محیطی محل جمع‌آوری یا تنوع

ژنتیکی روی اسانس نمونه‌ها می‌باشد. Barakat و همکاران (۲۰۱۳) نمونه‌های آویشن زوفایی را در زمان‌های مختلف در طول یک‌سال جمع‌آوری کردند و بعد از اسانس‌گیری نشان دادند که مقادیر اسانس و نوع ترکیب‌های شیمیایی آنها با توجه به زمان جمع‌آوری متفاوت بوده، به‌طوری که مقدار اسانس بین ۳/۵٪ تا ۶/۶٪ متغیر است. همچنین اختلاف معنی‌داری در میزان سه ترکیب اصلی کارواکرول، گاما–ترپینن و پارا–سیمن بین ماه‌های مختلف سال وجود دارد. بنابراین نتایج این محققان نشان داد که میزان اسانس گیاهان متأثر از شرایط محیطی و زمان برداشت است.

گزارش‌های زیادی نشان داده است که کارواکرول، گاما–ترپینن، پارا–سیمن و تیمول ترکیب‌های اصلی اسانس آویشن زوفایی هستند (Kizil, 2010؛ Barakat, *et al*., 2013؛ Stefanki *et al*., 2018؛ Sarikaya *et al*., 2019). Tumen و همکاران (۱۹۹۴) درصد اسانس و ترکیب‌های آن را در دو واریته آویشن زوفایی جمع‌آوری شده از ۱۲ ناحیه از کشور ترکیه مورد مطالعه قرار دادند. این محققان نشان دادند که میزان اسانس بین ۳/۴–۰/۵٪ متغیر است. این مطالعه نشان داد که ترکیب اصلی اسانس کارواکرول می‌باشد که در مکان‌های مختلف بین ۷۰/۹۸–۹/۲۱٪ متغیر است. البته در یکی از نمونه‌ها، تیمول (۵۰/۷۱٪) ترکیب اصلی می‌باشد.

بنابراین، به‌طور کلی عوامل اکولوژیکی و محیطی مختلفی روی میزان بازدهی اسانس، درصد اسانس، تعداد ترکیب‌های اسانس و درصد این ترکیب‌ها تأثیر دارند. ازجمله این عوامل می‌توان به ارتفاع از سطح دریا، میانگین دمای سالیانه، بارش سالیانه، فصل برداشت نمونه گیاهی، منشأ بذر و گیاه و تغییرات آب و هوایی اشاره کرد.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی باید گفت که هدف از این تحقیق، بررسی ترکیب‌های فنولی، خاصیت پاداکسایشی و تأثیر شرایط اکولوژیک بر اسانس گیاه دارویی آویشن زوفایی و بررسی میزان کمّی و کیفی ترکیب‌های اسانس در مناطق مختلف استان ایلام است. همبستگی مثبت و معنی‌داری بین محتوای فنول و فلاونویید کل با فعالیت پاداکسایشی مشاهده شد، به‌طوری که عصاره آویشن زوفایی جمع‌آوری شده از کوه مانشت با محتوای فنول و فلاونویید بالا دارای بیشترین فعالیت پاداکسایشی بود. بیشترین بازدهی اسانس مربوط به اسانس آویشن زوفایی جمع‌آوری شده از منطقه گرمسیری کوه کاوران می‌باشد که دارای ارتفاع کمتر، بارش سالیانه کمتر و میانگین دمای سالیانه بیشتری نسبت به مناطق دیگر است. ترکیب‌های اصلی اسانس آویشن زوفایی جمع‌آوری شده در مناطق مختلف با شرایط اکولوژیکی مختلف شامل تیمول، کارواکرول، پارا–سیمن و گاما–ترپینن می‌باشد که میزان آنها در مناطق مختلف متفاوت است. بنابراین، بازدهی اسانس و میزان کمّی و کیفی ترکیب‌های اسانس نه تنها به عوامل ژنتیکی بلکه به عوامل اکولوژیکی و محیطی ازجمله ارتفاع از سطح دریا، میانگین دمای سالیانه، بارش سالیانه، فصل برداشت نمونه گیاهی، منشأ بذر و گیاه و تغییرات آب و هوایی بستگی دارد.

سپاسگزاری

از همکاری مسئولان محترم دانشگاه ایلام و سازمان جهاد کشاورزی استان ایلام، به‌ویژه جناب آقای مهندس محمدعلی اقدسی، جناب آقای دکتر حشمت زرین‌جوب و جناب آقای مهندس بابک افرا به‌دلیل راهنمایی‌ها و کمک‌های انجام شده، تقدیر و تشکر بعمل می‌آید.

References

- Alizadeh, A., 2017. Essential oil constituents, phenolic content and antioxidant activity of two endemic *Satureja* species from Iran. Bangladesh Journal of Botany, 46(3): 925-931.
- Barakat, A., Wakim, L.H., Apostolides, N.A., Srour, G. and El Beyrouthy, M., 2013. Variation in the essential oils of *Thymbra spicata* L. growing wild in Lebanon according to the date of harvest. Journal of Essential Oil Research, 25(6): 506-511.
- Burits, M. and Bucar, F., 2000. Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil. Phytotherapy Research, 14(5): 323-328.
- Ibanez, J. and Usubillaga, A., 2006. The essential oil of *Espeletia schultzii* of different altitudinal populations. Flavour and Fragrance Journal, 21(2): 286-289.

Plant Nutrition, 22(1): 103-114.
- Pulido, R., Bravo, L. and Saura-Calixto, F., 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. Journal of agricultural and food chemistry, 48(8): 3396-3402.
- Laura, A., Moreno-Escamilla, J.O., Rodrigo-García, J. and Alvarez-Parrilla, E., 2019. Phenolic compounds: 253-271. In: Yahia, E. and Carrillo-Lopez, A., (Eds.). Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables. Woodhead Publishing, 510p.
- Sarikaya, A.G., 2019. Leaf and Flower Volatile Oil Components of Two Thyme Taxa *Origanum onites* L. and *Thymbra spicata* var. *spicata* L. in Turkey. Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi, 17: 346-350.
- Stefanaki, A., Cook, C.M., Lanaras, T. and Kokkini, S., 2018. Essential oil variation of *Thymbra spicata* L. (Lamiaceae), an East Mediterranean "oregano" herb. Biochemical Systematics and Ecology, 80: 63-69.
- Tsantili, E., Shin, Y., Nock, J.F. and Watkins, C.B. 2010. Antioxidant concentrations during chilling injury development in peaches. Postharvest Biology and Technology, 57(1): 27-34.
- Tumen, G., Ermin, N., Özek, T., Kürkçüoglu, M. and Baser, K.H.C., 1994. Composition of essential oils from two varieties of *Thymbra spicata* L. Journal of Essential Oil Research, 6(5): 463-468.
- Vokou, D., Kokkini, S. and Bessiere, J.M., 1993. Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. Biochemical Systematics and Ecology, 21(2): 287-295.
- Wijeratne, S.S., Abou-Zaid, M.M. and Shahidi, F., 2006. Antioxidant polyphenols in almond and its coproducts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(2): 312-318.
- Lenucci, M.S., Cadinu, D., Taurino, M., Piro, G. and Dalessandro, G., 2006. Antioxidant composition in cherry and high-pigment tomato cultivars. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(7): 2606-2613.
- Kirkan, B., Sarikurkcu, C. and Amarowicz, R., 2019. Composition, and antioxidant and enzyme-inhibition activities, of essential oils from *Satureja thymbra* and *Thymbra spicata* var. *spicata*. Flavour and Fragrance Journal, 34(6): 436-442.
- Kizil, S., 2010. Determination of essential oil variations of *Thymbra spicata* var. *spicata* L. naturally growing in the wild flora of East Mediterranean and Southeastern Anatolia regions of Turkey. Industrial Crops and Products, 32(3): 593-600.
- Kouyakhi, E.T., Naghavi, M.R. and Alayhs, M., 2008. Study of the essential oil variation of *Ferula gummosa* samples from Iran. Chemistry of Natural Compounds, 44(1): 124-126.
- Naghdi Badi, H., Abdollahi, M., Mehrafarin, A., Ghorbanpour, M., Tolyat, M. and Qaderi, A., 2017. An overview on two valuable natural and bioactive compounds, thymol and carvacrol, in medicinal plants. Journal of Medicinal Plants, 16(63): 1-32.
- Markovic, T., Chatzopoulou, P., Šiljegović, J., Nikolić, M., Glamočlija, J., Ćirić, A. and Soković, M., 2011. Chemical analysis and antimicrobial activities of the essential oils of *Satureja thymbra* L. and *Thymbra spicata* L. and their main components. Archives of Biological Sciences, 63(2): 457-464.
- Masibo, M. and He, Q., 2008. Major mango polyphenols and their potential significance to human health. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 7(4): 309-319.
- Omer, E.A., 1999. Response of wild Egyptian oregano to nitrogen fertilization in a sandy soil. Journal of

Effects of ecological conditions on antioxidant properties, quantity, and quality of *Thymbra spicata* L. essential oil

A.A. Hatamnia[1]

1- Department of Biology, Faculty of Science, Ilam University, Ilam, Iran, E-mail: a.hatamnia@ilam.ac.ir

Received: June 2022 Revised: October 2022 Accepted: November 2022

Abstract

Thymbra spicata L. (from Lamiaceae family) is distributed in large areas of Iran. In this study, the amount of total phenols and flavonoids, antioxidant activity, and percentage and essential oil composition in different ecotypes of this species from three different regions in Ilam province was evaluated. The results showed that total phenols and flavonoids content was correlated with antioxidant activity positively and significantly, so that plant essential oil from Manesht Mountain with high phenols (8.6 mg gallic acid per g dry weight) and flavonoids (0.30 mg quercetin per g dry weight) content had the highest antioxidant activity, too. The main essential oil compound of the plant from regions with different ecological conditions was thymol (22.6-40.7%). Carvacrol, *p*-cymene, and γ-terpinene were the other main essential oil compounds of *T. spicata* from different regions. The results showed that the plant sample from Kaveran region and Manesht Mountain had the highest (2.4%) and lowest (1.4%) essential oil content, respectively. Overall, based on the results of the present study, it could be suggested that the essential oil percentage and composition of *T. spicata* depended not only to the genetic factors, but also to the ecological factors such as altitude, average annual temperature, and annual rainfall.

Keywords: *Thymbra spicata* L., antioxidant, essential oil, thymol, carvacrol.