ارزیابی تنوع برخی از شاخص‌های فیتوشیمیایی عصاره گل در جمیعت‌های خودروی گیاه دارویی *Rheum ribes* L. در ایران

قادر قاسمی[۱]، محمد فتاحی*[۲]، ابوالفضل علیرضالو[۲]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گیاهان دارویی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

[۲]استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۹/۱۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۳۰

چکیده

استفاده از گیاهان دارویی و مواد فعال آنها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی اخیراً مورد توجه قرار گرفته است. اندام‌های مختلف ریواس به دلیل برخورداری از فلاونوئیدها و پروآنتوسیانین‌ها ی آنتی‌اکسیدانی اهمیت زیادی در صنایع غذایی و دارویی دارند. در این مطالعه خصوصیات فیتوشیمیایی اندام گل در ۱۳ ژنوتیپ (G۱-G۱۳) ریواس جمع آوری شده از مناطق مختلف کشور مورد ارزیابی قرار گرفت. عصاره‌گیری با استفاده از دستگاه اولتراسونیک انجام گرفت. شاخص‌های فیتوشیمایی اندام گل بر اساس محتوای فنول کل (روش فولین سیکالتو)، فلاونوئید کل (روش آلومینیوم کلراید)، ویتامین ث (به روش تیتر با یدید پتاسیم)، کربوهیدرات محلول (معرف آنترون و رنگ سنجی)، تانن (معرف وانیلین و رنگ سنجی)، کاروتنوئید کل، کلروفیل a و b (روش لیچن تالر) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش‌های DPPH و FRAP ارزیابی شدند. بیشترین میزان فنول و فلاونوئید کل به ترتیب در عصاره گل‌های ژنوتیپ G۸ و G۹ با مقدار (۱۱۰/۵۳ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک) و (۱/۴۹ میلی‌گرم کوئرسیتین بر وزن خشک) مشاهد شد. بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌ترتیب در ژنوتیپ های G۱ و G۸ با میزان ۹۴/۷۵ درصد و (۵۹/۸۶ میکرومول بر گرم وزن خشک) و کمترین میزان این شاخص‌ها در گل ژنوتیپ G۱۳ با میزان ۶۸/۱۷ درصد و (۷/۴۲ میکرو مول بر گرم وزن خشک) مشاهده شد. براساس این نتایج ژنوتیپ‌های مختلف ریواس حاوی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند که در بین آن‌ها ژنوتیپ‌های G۱، G۸ و G۹ سطوح بالایی از این را دارا می‌باشد که از آن در صنایع غذایی و داروسازی می‌توان استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، تنوع فیتوشیمیایی، ریواس (*Rheum ribes* L.)، فلاونوئید، فنل.

*نویسنده مسئول : mohamadfattahi@yahoo.com; mo.fattahi@urmia.ac.ir

مقدمه

تیره علف هفت بند (Polygonaceae) از مهمترین تیره‌های گیاهی است که تقریباً مشتمل بر ۸۰۰ گونه می‌باشد. یکی از مهمترین سرده‌های این خانواده، جنس ریواس (*Rheum*) می‌باشد که شامل ۱۰۳ گونه در مناطق معتدله و نیمه گرمسیری می‌باشد. از این جنس در فلور کشورمان چهار گونه (*R. ribes*، *R. turkestanicum*، *R. persicum* و *R. khorasanicum*) موجود بوده که دوتای آخری از گیاهان بومی ایران هستند (Emad et al ., 2013). ریواس گیاهی پایا، علفی و صخره دوست است که در نقاط کوهستانی اقلیم‌های خشک و نیمه خشک رویش دارد. در فصل بهار و اوایل تابستان می روید و دارای یک ریشه معمولی بوده که یک تا دو متر در خاک رشد می‌کند و به سرما و بخبندان مقاوم است (Li et al., 2003). دارای دو نوع ساقه هوایی و زیرزمینی است. دمبرگ که قسمت خوراکی و دارویی ریواس را تشکیل می دهد، گوشتی بوده و طول آن به بیش از نیم متر می رسد. در انتهای ساقه گل دهنده، گل آذین زرد متمایل به کرم در اوایل فصل بهار (اردیبهشت ماه) به خوبی نمایان است. گل‌ها به تعداد زیاد و به‌صورت خوشه در انتهای ساقه اصلی ایجاد می‌گردند و به رنگ سبز بوده و در اثر تلقیح بذر را تشکیل م دهند. میوه‌های بالدار و قرمز رنگ گیاه در اواخر اردیبهشت و اوایل خرداد ماه رسیده و قابل جمع‌آوری است (Emad et al., 2013). ریواس یک گیاه دارویی حاوی ریشه و ریزوم که در فهرست دارو نامه‌های چین، ژاپن و اروپا نام برده شده است (Zhao et al., 2009). از ریواس به‌طور گسترده به عنوان ملین و ضدعفونی کننده کبد در درمان سوءهاضمه و یرقان استفاده می‌شود (Fang et al., 2011; Fok, 2001; Tsai et al., 2004; Wang et al., 2011; Yu et al., 2005). بخش اعظم ریواس آب است. همچنین دارای تانن، آنتراکینون، آنتروگلیکوزیدها، فلاونوئیدها، اسیدهای آلی، پروتئین‌ها، چربی، کلسیم (به میزان ۹۶ میلی‌گرم درصد گرم ریواس خام)، آهن (۰/۸ میلی‌گرم)، پتاسیم نسبتاً زیاد، آهن و ویتامین‌های A، C، K، E و برخی ویتامین‌های گروه B وجود دارد. ترکیبات آنتراکینون آب گریز موجود در ریواس در بدن انسان دارای اثرات بیولوژیکی زیادی مانند ضدسرطان (Huang et al., 2007; Shoemaker et al., 2005) التهاب کبد (Arosio et al., 2000)، ضدمیکروب (Celine et al., 2004) و ضد التهاب (Tseng et al., 2006) دارد. تنوع ژنتیکی مواد موثره به گیاهان جهت مقابله با تغییرات آب و هوایی کمک می‌کنند و پایه اساسی برای انطباق با شرایط نامساعد آب و هوایی آینده است. کاهش تنوع ژنتیکی علاوه بر اینکه بازدهی برنامه اصلاحی را کاهش می‌دهد، باعث ایجاد یکنواختی ژنتیکی در مزارع و آسیب‌پذیری در برابر آفات و بیماری‌ها و تنش‌های محیطی می‌گردد. خویشاوندان وحشی یک منبع بالقوه و با ارزش از تنوع ژنتیکی هستند که بهنژادگران به آنها توجه ویژه دارند (Neel and Ellstr, 2003). برای این منظور می‌توان با مطالعه چندشکلی ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای فیتوشیمیایی، ژنوتیپ‌های ارزشمند را شناسایی نمود. طی یک تحقیق در ترکیه توسط مانزوروقلو و همکاران (Munzuroglu et al., 2000) ویتامین‌ها و برخی از موادی که از عوامل ایجاد کننده خاصیت آنتی‌اکسیدانی در ریواس می‌باشد را استخراج کردند. تاکنون مطالعه‌ای که، تنوع فیتوشیمیایی گل‌های جمعیت‌های خودرو ریواس را مورد ارزیابی قرار دهد، انجام نگرفته است، همچنین با توجه به اینکه جمعیت‌های خودررو ریواس، تاکنون در ایران جهت کشت، بهره‌برداری و استفاده در صنایع غذایی و داروسازی کشور مورد توجه جدی قرار نگرفته است. به دلیل مشخص نبودن ارزش دارویی گل‌های

ژنوتیپ‌ها و گونه‌های آن در کشور، این تحقیق با هدف ارزیابی تنوع فیتوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی تعدادی از ژنوتیپ‌های موجود در ایران انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

معرفی مناطق پراکنش: باتوجه به فلور ایران، ریواس در ایران که بیشتر در شمال‌غرب و مرکز و شمال‌شرق ایران رویش دارند محل‌هایی برای جمع آوری نمونه‌های گیاهی و انجام آزمایشات انتخاب شدند. بررسی و شناسایی پراکنش گونه‌ها با بهره گیری از منابع مختلف در این زمینه و بازدید از مناطق متعدد در فصل بهار ۱۳۹٤ انجام شد. مشخصات مناطق مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: مناطق جمع‌آوری جمعیت‌های مختلف ریواس (*Rheum ribes* L.)

ژنوتیپ	محل جمع‌آوری	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع (متر)
G۱	آذربایجان غربی/ اشنویه	٤٥°۱۱´۳٤"	۳۷°۰٥´۲٤"	۱۹٤۳
G۲	آذربایجان غربی / خوی	٤٥°۰٦´۰۰"	۳۸°۲۳´۰٦"	۱٥۹۳
G۳	آذربایجان غربی / تکاب	٤٦°٥۱´۰۹"	۳٦°۳۱´۱۱"	۲۱۹۱
G٤	آذربایجان غربی / بوکان	٤٥°٥۸´۲۰"	۳٦°۳۳´۲٦"	۱۷۱۸
G٥	آذربایجان شرقی / شبستر	٤٥°۲۱´٥۲"	۳۸°۲۲´۳۷"	۱۷۹۰
G٦	آذربایجان شرقی / سرای	٤٥°۳۳´۳٤"	۳۷°٥۱´٤٤"	۱۳۱۱
G۷	آذربایجان شرقی / مراغه	٤٦°۱۹´۲۱"	۳۷°۲۸´۲٤"	۲۹۷٦
G۸	تهران / لواسان	٥۱°۳٦´٥۱"	۳٥°٥۰´۰٤"	۲۱۳٤
G۹	مرکزی / اراک	٤۹°٤٥´۰۱"	۳٤°۰۲´٤۱"	۲۲٦۸
G۱۰	کرمانشاه / کرمانشاه	٤۷°۱٤´۲۱"	۳٤°۲٥´۱۲"	۳۰۳٥
G۱۱	زنجان / زنجان	٤۸°۳۳´۲۸"	۳٦°٤٤´۰۸"	۲۳۹۹
G۱۲	کردستان / بانه	٤٥°٥٤´٤۲"	۳٦°۰۲´۳۳"	۲۰۷۸
G۱۳	کردستان / سقز	٤٦°۱۸´۳۹"	۳٥°٥٦´۲۷"	۱۸۹٦

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی

در این مرحله ۱۳ نمونه گیاهی از جمعیت‌های مختلف ریواس جمع‌آوری و جهت شناسایی به گروه علوم باغبانی دانشگاه ارومیه منتقل شدند. نمونه‌های گل برای انجام مطالعات فیتوشیمیایی در ماه‌های فروردین و اردیبهشت ۱۳۹٤ از مناطق مذکور جمع‌آوری و بلافاصله در دمای معمولی و سایه خشک شدند.

عصاره‌گیری: گل‌های خشک شده ژنوتیپ‌های مختلف با استفاده از نیتروژن مایع پودر شده و عصاره‌گیری متانولی از آنها با استفاده از دستگاه اولتراسونیک انجام گرفت. یک گرم از هر نمونه داخل فالکون‌های ٥۰ میلی‌لیتری قرار داده شده و پس از اضافه کردن ۲۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد عصاره‌گیری به مدت نیم ساعت در دمای ۳۰ درجه اولتراسونیک و قدرت ۱۲۰هرتز (Elmasonic) انجام گرفت.

اندازه‌گیری میزان فنول کل: اندازه‌گیری مواد فنولی با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو[1] صورت گرفت. صد میکرولیتر عصاره از محلول استخراج شده اصلی برداشته و به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شد (۱۰ برابر

۱. Folin-Ciocalteu

رقیق شد). سپس ۱۸۰ میکرولیتر آب دی یونیزه به مقدار مشخصی از نمونه رقیق شده اضافه شد. در مرحله بعد ۱۲۰۰ میکرولیتر فولین به مخلوط افزوده و بعد از ۵ دقیقه به آن کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه شد. پس از آن نمونه‌ها به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق قرار داده شدند. در نهایت جذب در طول موج ۷۶۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر (MODEl: UV2100 PC) قرائت شد. آب دی یونیزه به عنوان شاهد و گالیک‌اسید به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. منحنی استاندارد بر اساس گالیک‌اسید، ترسیم و نتایج به صورت میلی‌گرم اکی‌والان گالیک‌اسید بر وزن خشک گیاه گزارش شد (Ebrahimzadeh et al., 2008).

اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل: برای سنجش میزان فلاونوئید کل به مقدار مشخصی از هر عصاره ۱۵۰ میکرولیتر نیتریت سدیم، ۳۰۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلراید (۱۰٪)، ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول استات سود ۱ مولار و بعد با آب مقطر به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. جذب مخلوط در طول موج ۳۸۰ نانومتر نسبت به شاهد قرائت گردید. برای رسم منحنی استاندارد از کوئرستین استفاده شد. میزان فلاونوئید کل عصاره‌ها بر اساس میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه گزارش شد (Chang et al., 2002).

کاروتنوئید کل و کلروفیل: برای سنجش میزان کاروتنوئید و کلروفیل، مقدار ۰/۰۵ گرم از بافت تازه گل با ۵ میلی‌لیتر استون در یک هاون چینی سرد و در حمام یخ هموژن شد. سپس به هموژنات حاصل ۱ گرم سولفات سدیم بدون آب افزوده و با استفاده از کاغذ صافی، صاف گردید. محلول صاف شده با استون به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد و به مدت ۱۰ دقیقه و در ۲۶۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. فاز رویی جداسازی و جذب محلول در طول موج‌های ۶۶۲، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد. از استون به عنوان شاهد استفاده شد. میزان کاروتنوئید و کلروفیل a و b برای هر عصاره با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه گردید (Lichtenthaler, 1987):

$$C_a = ۱۱/۲۴\ A_{۶۶۲} - ۲/۰۴\ A_{۶۴۵}$$

$$C_b = ۲۰/۱۳\ A_{۶۴۵} - ۴/۱۹\ A_{۶۶۲}$$

$$C_t = ۱۰۰۰\ A_{۴۷۰} - ۱/۹\ A\ C_a - ۶۳/۱۴ C_b / ۲۱۴$$

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH: برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH [1]، مقدار مشخصی از عصاره متانولی ۱۰ برابر رقیق شده نمونه را در یک لوله آزمایشی ریخته و به آن ۲۰۰۰ میکرولیتر از محلول DPPH (از قبل آماده شده) اضافه شد. محلول حاصل را تکان داده و در دمای آزمایشگاه به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری و جذب در ۵۱۷ نانومتر در اسپکتروفتومتر قرائت شد. جهت تهیه شاهد (blank) نیز به روش بالا عمل کرده فقط به جای عصاره ۵۰ میکرولیتر اتانول ۸۰ درصد استفاده شد (Nakajima et al., 2004).

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

Abs blank: میزان جذب بلانک

Abs sample: میزان جذب نمونه

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP: عصاره‌های رقیق شده نمونه‌ها و ۳ میلی‌لیتر معرف تازه FRAP [2] (بافر استات سدیم ۳۰۰ میلی مولار با اسیدیته ۳/۶، فریک-تریس پریدیل-اس-تریازین۳ و فریک کلرید) باهم مخلوط شدند. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت و جذب آن در طول موج

۱- Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH)

۲- Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP)

۳- 2,4,6-Tris(2-Pyridyl)-S-Triazine (TPTZ)

۵۹۳ نانومتر و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر نسبت به شاهد خوانده شد. از سولفات آهن برای رسم منحنی استاندارد استفاده گردید و نتایج داده‌ها براساس µmol Fe^{++}/g DW بیان شد (Zugic et al., 2014).

اندازه‌گیری میزان تانن کل: برای اندازه‌گیری محتوای تانن‌ها مقدار ۰/۵ گرم بافت گیاهچه در ۱۰ میلی‌لیتر متانول عصاره‌گیری شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. ۲ میلی‌لیتراز محلول رویی با ۵ میلی‌لیتر معرف وانیلین (وانیلین ۱ درصد، کلریدریک اسید ۸ درصد با نسبت ۵۰ به ۵۰ در متانول) حل و به مدت۲۰ دقیقه در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس، هر نمونه در شدت جذب ۵۲۰ نانومتر قرائت شد (Luthar and Kreft, 1999).

اندازه‌گیری میزان کربوهیدرات محلولبرای اندازه‌گیری کربوهیدرات محلول ۰/۵ گرم نمونه گیاهی با هاون چینی پودر شده و با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد مخلوط شد. در مرحله بعد فاز رویی جداسازی شد. جهت افزایش جداسازی کروهیدرات محلول ۵ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد به مواد گیاهی اضافه شد. بعد به مدت ۱۵ دقیقه و با دور ٤٥٠٠ سانتریفیوژ شد. ۵۰ میکرولیتر از محلول با ۳ میلی‌لیتر معرف آنترون (۱۵۰ میلی‌گرم آنترون خالص به‌علاوه ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۷۲ درصد) مخلوط شد ونمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش نگهداری شدند. سپس، هر نمونه در شدت جذب ٦٢٥ نانومتر قرائت شد. برای رسم منحنی استاندارد از گلوکز استفاده شد. میزان کربوهیدرات محلول کل عصاره ها بر اساس میلی‌گرم معادل گلوکز بر صد گرم وزن خشک گیاه گزارش شد (Irigoyen et al., 1992)

اندازه‌گیری ویتامین ث: ۱ گرم نمونه گیاهی را با استفاده از هاون چینی پودر شد و در داخل فالکون ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. بعد ۲۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به آن اضافه کرده و به مدت ۳۰ دقیقه التراسونیک شد. در مرحله بعد نمونه‌ها از کاغذ صافی عبور داده شدند. مقدار مشخصی عصاره را با ۲ میلی‌لیتر نشاسته ۱ درصد مخلوط کرده، به روش تیتراسیون و با استفاده از یدیدپتاسیم تیتر را انجام داده تا زمانی که رسوب‌های تیره یا خاکستری رنگ تشکیل شود.

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه داده‌های به‌دست آمده با سه تکرار و بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم افزارهای SAS آنالیز شدند. از آزمون LSD برای مقایسه میانگین داده‌ها استفاده شد. کلاستر بندی داده‌ها بر اساس روش Ward و معیار مربع فواصل اقلیدسی انجام شد. همچنین در این تحقیق آنالیز مولفه‌های اصلی[1] روی داده‌ها انجام گرفت.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که میزان فلاونوئید کل ژنوتیپ‌های مختلف ریواس در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که میزان فنل کل، ژنوتیپ‌های مختلف ریواس از ۱۱۰/۵۳ تا ۹/۸۰ (mg/g DW) متغیر می‌باشد (جدول ۳). بیشترین میزان فنل کل در گل‌های ژنوتیپ G۸ (نمونه تهران – لواسان) با ۱۱۰/۵۳ و کمترین آن در گل‌های ژنوتیپ G۱۳ (کردستان – سقز) با ۹/۸۰ (mg/g DW) بود. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که میزان فلاونوئید کل ژنوتیپ‌های مختلف ریواس در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

۱- Principal Components Analysis (PCA)

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

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (Mean of square)							
		کربوهیدرات	کاروتنوئید کل	کلروفیل a	کلروفیل b	فنل کل	فلاونوئید کل	تانن	ویتامین ث
ژنوتیپ	۱۲	۱/۵۰۲ **	۱۱٤/۲۵۳ **	۰/۰۰۱ **	۰/۰۰۷**	۲۳۵۸/۰۸۲**	۰/۳۹۲**	٤/٤۷۰**	۵۹۹/۳۳۳**
اشتباه	۲٦	۰/۰۰۵	۰/۰۳٤	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/٤۸٦	۰/۰۱۰	۰/۰۰۵	۱۲/۳۱۹
کل	۳۸								
CV%		۵/۹۵۸	۱/۱٦۰	۱۵/۵۱۱	۳۹/۹۸٦	۲/۱٤۵	۱۱/۹٤۰	۲/٦۷۱	۱۱/۱۰۵

** معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که میزان فلاونوئید کل، ژنوتیپ‌های مختلف ریواس از ۱/٤۹ تا ۰/۳۳ (mg/g DW) متغیر می‌باشد (جدول ۳). بیشترین میزان فلاونوئید کل در گل‌های ژنوتیپ G۹ (مرکزی – اراک) با ۱/٤۹ و کمترین آن در گل‌های ژنوتیپ G۱۳ (کردستان – سقز) با ۰/۳۳ (mg/g DW) می‌باشد. نوع، میزان و درصد فلاونوئیدها نشانه کیفیت گیاه است (Urbonaviciute et al., 2006). آثار بیولوژیک متعددی را در گیاهان به فلاونوئیدها نسبت می‌دهند. این ترکیبات نقش دفاع در برابر پاتوژن‌های گیاهی، تأثیرگذار در متابولیسم کربوهیدرات‌ها و همچنین، نقش احتمالی در فتوسنتز را دارا هستند (Harborne et al., 1975).

نتایج تجزیه واریانس ویتامین ث تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد بین ژنوتیپ‌های مختلف ریواس را نشان داد، که مقایسه میانگین ویتامین ث از ۵۹/۹۹ تا ۱۵/۵۷ متفاوت بودند. بیشترین میزان ویتامین ث در گل‌های ژنوتیپ G۹ (مرکزی– اراک) با ۵۹/۹۹ و کمترین آن در گل‌های ژنوتیپ G۷ (آذر بایجان شرقی– مراغه) با ۱۵/۵۷ (mg/g DW) بود. در حالی که بیشترین میزان تانن و کربوهیدرات محلول به‌ترتیب در ژنوتیپ‌های G۱۲ (کردستان – بانه) و G۱۰ (کردستان – سقز) با ٤/۹۱ و ۳/۲۰ (mg/۱۰۰g DW) بود.

نتایج تجزیه واریانس کلروفیل a و b و کاروتنوئید نشان داد که ژنوتیپ‌ها مختلف ریواس تفاوت‌های معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد از نظر خصوصیات داشتند (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها که میزان کلروفیل a، b و کاروتنوئید در ژنوتیپ‌های مختلف که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشتند را نشان داد. بیشترین میزان کلروفیل a، b و کاروتنوئید مربوط به ژنوتیپ G۷ (آذربایجان شرقی – مراغه) بود که به ترتیب معادل ۰/۰۸۳، ۰/۱۹ و ۲۷/۲۷ (µg/g DW) گزارش شد. همچنین کمترین میزان کلروفیل a، b و کاروتنوئید به ترتیب در ژنوتیپ G۱۳ (کردستان – سقز) ۰/۰۱، ۰/۰۰٦ و ۵/۰۳ مشاهده شد (جدول ۳). مطالعات بسیار اندکی روی میزان ترکیبات کاروتنوئیدی و کلروفیلی ژنوتیپ‌های مختلف ریواس صورت گرفته است.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی در این تحقیق که ژنوتیپ‌های مختلف ریواس با دو روش DPPH و FRAP مورد ارزیابی قرار گرفت، نتایج تجزیه واریانس نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه همانند سایر ترکیبات فیتوشیمیایی، در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ٤).

جدول ۳: میزان ترکیبات فیتوشیمیایی ژنوتیپ‌های ریواس

ژنوتیپ	محل جمع آوری	*فنول کل	فلاونوئید کل	ویتامین ث	تانن(۱۰۰ گرم)	کربوهیدرات (۱۰۰ گرم)	کاروتنوئید کل	کلروفیل a	کلروفیل b
G۱	آذربایجان غربی/ اشنویه	٦٧/٨٠٠	١/٠٦٦	١٩/٣٠٧	٢/٦٨٠	١/٠٤٣	١٧/٦٥٣	٠/٠٣٠	٠/٠١٠
G۲	آذربایجان غربی / خوی	١١/٧٠٠	٠/٣٧٣	٢٥/٦٦٧	٢/٦١٦	٠/٧٠٠	٨/٠٢٣	٠/٠١٦	٠/٠١٦
G۳	آذربایجان غربی / تکاب	٣٠/٣١٦	٠/٩٥٠	٣٤/٧٧٣	١/٦٥٠	١/٠٦٦	١٥/٢١٦	٠/٠٣٦	٠/٠٨٦
G٤	آذربایجان غربی / بوکان	١٥/٥٩٣	٠/٥٢٣	١٥/٦٨٧	٣/٤٥٣	١/٠٦٦	١٨/٥٨٦	٠/٠٥٠	٠/٠٣٦
G٥	آذربایجان شرقی / شبستر	٣٥/١٨٦	١/١٠٠	٢٨/٠٨٣	٣/٨٨٣	١/١٨٦	٢٠/٧٨٦	٠/٠٢٣	٠/٠٧٦
G٦	آذربایجان شرقی / سرای	٢٣/٩٤٦	١/٩٧٠	٤٣/٥٤٣	٤/٠٢٦	١/٠٦٠	١٨/٦٥٠	٠/٠٤٠	٠/٠٣٣
G٧	آذربایجان شرقی / مراغه	١٠/٤١٦	٠/٨٣٠	١٥/٥٧٧	٠/٩١٦	١/٧٨٣	٢٧/٢٧٣	٠/٠٨٣	٠/١٩٣
G٨	تهران / لواسان	١١٠/٥٣٦	١/٣٢٦	٥٦/٣٧٧	١/٧٠٠	٠/٥٣٠	١٦/٥٩٣	٠/٠٧٠	٠/٠٢٣
G٩	مرکزی / اراک	٣٥/٥١٦	١/٤٩٠	٥٩/٩٩٧	١/٠١٦	٠/٧٨٠	٢١/٥٣٣	٠/٠٦٣	٠/٠٥٠
G١٠	کرمانشاه / کرمانشاه	٢٦/٩١٣	١/٠١٣	٣٢/٠٢٧	٣/٧٦٠	٣/٢٠٣	١٦/٧٠٠	٠/٠٥٠	٠/٠٥٠
G١١	زنجان / زنجان	١٧/٥٧٣	٠/٤٣٦	٣١/٨٠٧	٢/٥٤٣	٠/٧٣٦	٧/٧٧٠	٠/٠٢٠	٠/٠٣٣
G١٢	کردستان / بانه	٢٧/٣٠٦	٠/٧٦٦	٢٣/٤٧٣	٤/٩١٦	١/٠٢٠	١٣/٣٧٠	٠/٠٦٠	٠/٠١٦
G١٣	کردستان / سقز	٩/٨٠٣	٠/٣٣٦	٢٤/٥٧٠	٢/٩٠٣	١/٨٨٦	٥/٠٣٣	٠/٠١٠	٠/٠٠٦

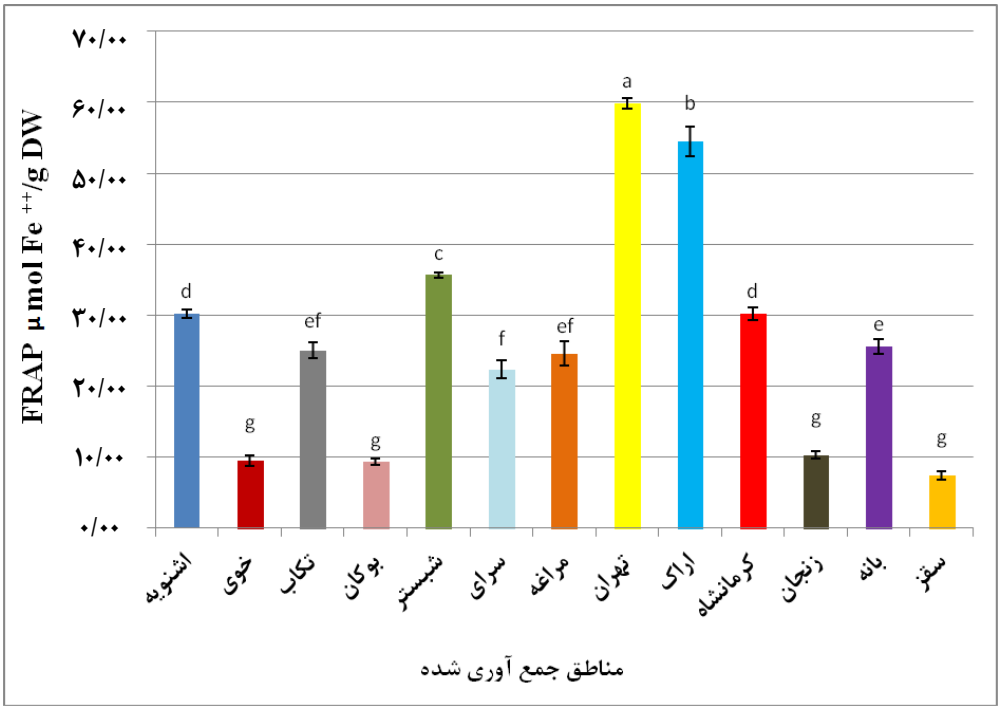
*فنول کل (mg GAE/g DW)، فلاونوئید کل (mg/g DW)، کاروتنوئید کل (µg/g DW)، کلروفیل a و b (µg/g DW)، تانن کل (mg/100g DW)، کربوهیدرات محلول (mg/100g DW)، ویتامین ث (mg/100 ml)

در روش FRAP میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ژنوتیپ‌ها از ٥٩/٨٦ تا ٧/٤٢ (µmol Fe^{++}/g DW) متغیر بود (شکل ۱). بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گل‌های ژنوتیپ G۸ (تهران – لواسان) با ٥٩/٨٦ و کمترین آن در ژنوتیپ G۱۳ (کردستان – سقز) با ٧/٤٢ (µmol Fe^{++}/g DW) مشاهده شد (شکل ۱). در روش DPPH میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ژنوتیپ‌ها از ٩٤/٧٥ تا ٦٨/١٧ درصد متغیر بود (شکل ۲). بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گل‌های ژنوتیپ G۱ (آذربایجان غربی – اشنویه) با ٩٤/٧٥ و کمترین آن در ژنوتیپ G۱۳ (کردستان – سقز) با ٦٨/١٧ درصد مشاهده شد. از مهمترین ترکیبات فلاونوئیدی این جنس که سبب فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن می‌شوند می‌توان به کاتچین، روتین، کوئرستین، کامفرول و میرستین و از ترکیبات فنلی به گالیک‌اسید، کافئیک‌اسید، کوماریک‌اسید و ویتامین ث اشاره نمود (Ercisli and Esitken, 2004).

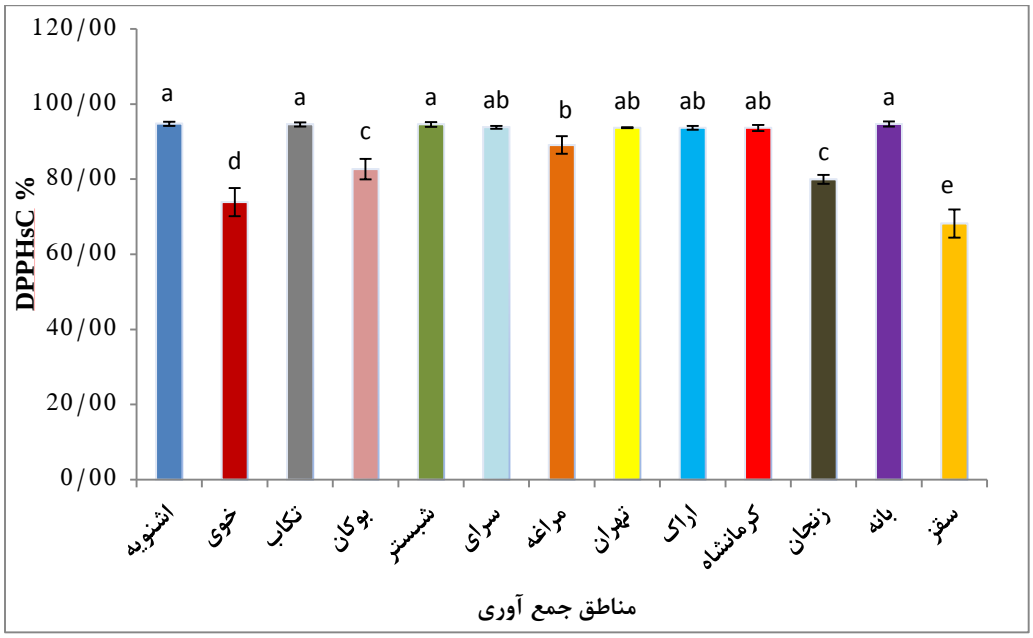
جدول ٤: تجزیه واریانس خصوصیات آنتی‌اکسیدانی ژنوتیپ‌های مختلف ریواس

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات ((Mean of square))	
		فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH)	فعالیت آنتی‌اکسیدانی (FRAP)
ژنوتیپ	١٢	٢٤٨/٤٨٥**	٨١٠/٨٢٣**
اشتباه	٢٦	١٠/٣٧٦٧	٣/٣٢١
کل	٣٨		
CV%		٣/٦٥٠	٦/٨٧٧

**معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد



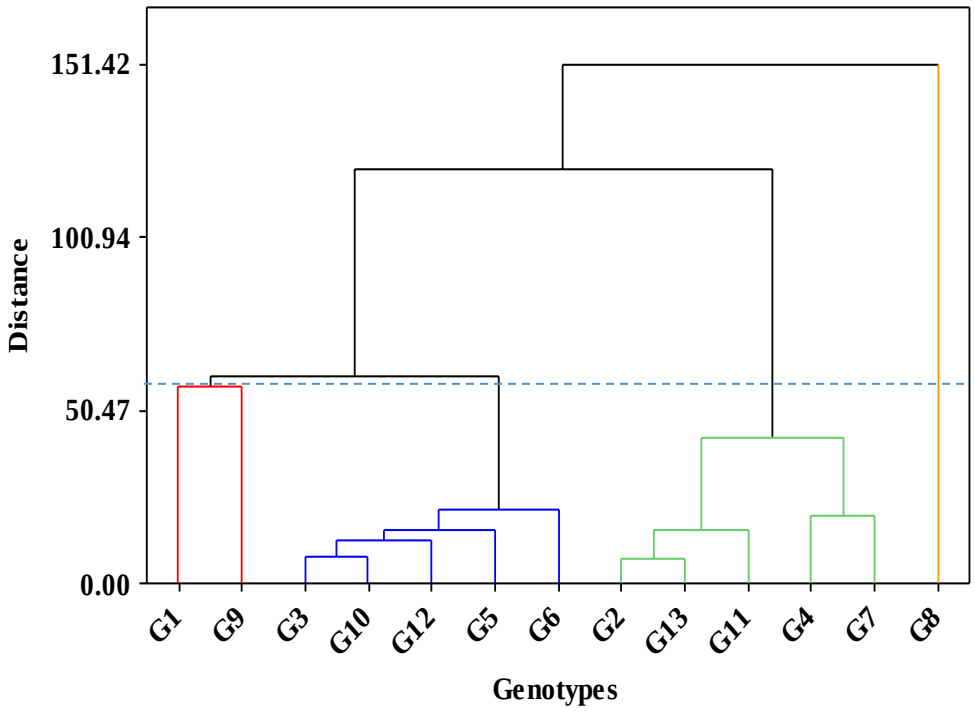
شکل ۱: مقایسه میانگین عملکرد آنتی‌اکسیدانی جمعیت‌های مختلف ریواس در روش FRAP



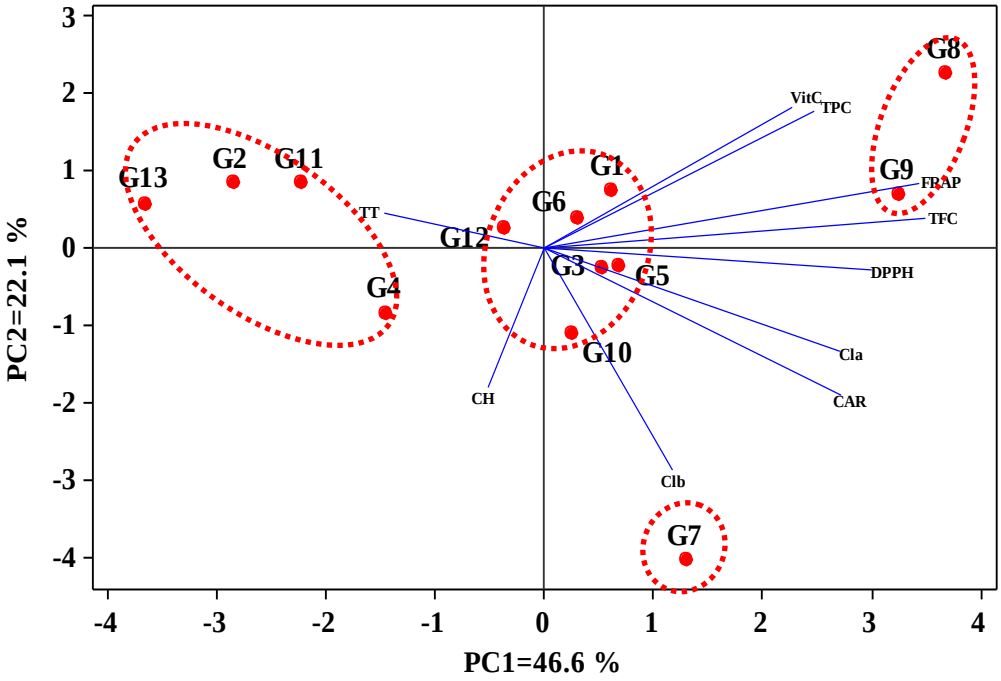
شکل ۲: مقایسه میانگین عملکرد آنتی‌اکسیدانی جمعیت‌های مختلف ریواس در روش DPPH

بیشترین عمومیت را در بین روش‌های کمومتریک، تجزیه به مولفه‌های اصلی دارد. با توجه به تعداد متغیرهای مورد مطالعه و تنوع مشاهده شده در همه آنها، تجزیه و تحلیل چند متغیره، به منظور طبقه بندی کردن نمونه‌ها با توجه به محتوای فنول کل، فلاونوئید کل، کلروفیل a، b و کاروتنوئید کل، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (با دو روش FRAP و DPPH)، ویتامین ث، تانن، کربوهیدرات محلول انجام شد. با استفاده از تجزیه به مولفه‌های اصلی ۱۰ متغیر اولیه در قالب ٤ متغیر جدید (٤ مولفه اصلی) تعیین شدند که

این ٤ مولفه در مجموع ٨٨/٧ درصد از تغییرات کل را توجیه نمودند که از این مقدار ٤٦/٦ درصد برای مولفه اول، ٢٢/١ درصد برای مولفه دوم، ١٢/٧ درصد برای مولفه سوم و ٧/٣ درصد برای مولفه چهار محاسبه گردید. اولین مولفه همبستگی بالایی با فلاونوئید تام و فعالیت های آنتی‌اکسیدانی داشت. دومین مولفه نمونه‌ها را کلرفیل b و کاروتنوئید متمایز کرد، مولفه‌های سوم نمونه‌ها را به ترتیب با تانن و کربوهیدرات محلول متمایز شد و مولفه چهارم نمونه‌ها را بر اساس کربوهیدرات و ویتامین ث متمایز می کرد. با توجه به نتایج به دست آمده از تجزیه مولفه های اصلی نمودار دی پلات با استفاده از مولفه های اول و دوم ترسیم گردید(شکل ٤). بر این اساس، در این دسته بندی ژنوتیپ‌های ١١، ٢، ١٣ در یک دسته، ٨ و ٩ در یک دسته و ژنوتیپ ٧ به تنهایی دریک دسته قرار گرفته‌اند، که دسته اول دارای تانن بیشتر، دسته دوم دارای فنل، فلاونوئید، آنتوسیانین و آنتی‌اکسیدان (DPPH و FRAP) بیشتر و در تفکیک دسته سوم کلروفیل b و کربوهیدرات محلول بیشترین اثر را نشان داده است. بقیه ژنوتیپ‌ها از نظر فیتوشیمیایی در حد متوسط قرار دارند.



شکل ٣: دندروگرام جمعیت‌های مختلف ریواس



شکل ٤: دی‌پلات جمعیت‌های مختلف ریواس

بحث

در سالهای اخیر با افزایش نیاز به سلامت بشری، تقاضا برای غذا داروها[1] افزایش یافته است. واژه‌ای که از سال ۱۹۷۹بوسیله استفان دفلیس[2] ابداع گردید که به صورت زیر تعریف می‌شود "قسمتی از غذا که خاصیت دارویی مفیدی مانند جلوگیری و درمان بیماری ها داشته باشد"(Tapas et al, 2008). پژوهش حاضرگل های ریواس با خاصیت آنتی اکسیدانی را به عنوان یک ترکیب غذا دارو معرفی می‌کند.

با توجه به مقایسه خصوصیات فیتوشیمیایی عصاره گل ریواس در رویشگاه‌های طبیعی ملاحظه می‌شود که فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنل کل و فلاونوئید کل با توجه به شرایط محیطی و اقلیمی به ویژه ارتفاع محل رویشگاه در ارتباط است. به‌طوری که بیشترین فنل کل مربوط به G۸ (تهران – لواسان) با ارتفاع ۲۱۳٤ متر و بیشترین فلاونوئید کل مربوط به G۹ (مرکزی – اراک) با ارتفاع ۲۲٦۸ متر مشاهده شد. و بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش (FRAP) در ارتفاع ۲۱۳٤ مربوط به (تهران – لواسان) مشاهده شد. که این همبستگی بین فنل کل و فعالیت آنتی اکسیدانی کل را همراه با افزایش ارتفاع است را نشان می‌دهد. ارتباط بین ترکیبات فنولی و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی توسط مطالعات قبلی گزارش شده است (Fattahi et al, 2013). در مطالعه حاضر با افزایش ارتفاع میزان فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی-اکسیدانی افزایش پیدا می‌کند. البته علاوه بر فاکتور ارتفاع سایر فاکتورها (نور، دما، شیب محیط، رطوبت نسبی منطقه و میانگین بارندگی سالیانه) را هم باید مدنظر قرار داد. از دلایل افزایش ترکیبات فنولی و ترکیبات آنتی اکسیدانی در شرایط مرتفع میتوان شدت تابش نور UV را عنوان کرد. شرایط خشکی و وجود

۱- Nutraceuticals
۲- Stephen DeFelice

UV از شرایط مساعد برای افزایش ترکیبات فنولی مانند فلاونوئیدها می باشد (Nikolova et al, 2005) .اثرات دارویی ژنوتیپ‌های ریواس به صورت عمده با میزان ترکیبات فنلی آن‌ها در ارتباط است. میزان و نوع مواد موثره گیاهان دارویی با هدایت هر دو فاکتور ژنتیکی و محیطی مشخص می‌شود. تفاوت در میزان مواد موثره (فنول و فلاونوئید کل) و فعالیت آنتی اکسیدانی می‌تواند تحت تاثیر شرایط آب و هوایی، تغییرات جغرافیایی، شرایط فیزیولوژیکی و تکاملی تغییر یابد (Figueiredo et al., 2008).. در نتایج حاصل از ترکیبات فیتوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی اگرچه ممکن است بین مناطق مختلف تفاوت‌هایی وجود داشته باشد، که این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از گستره و پراکنش وسیع مناطق مورد مطالعه در این پژوهش باشد. در کل می‌توان نتیجه گرفت که تنوع و گستره زیاد کمیت این مواد مؤثره می‌تواند ناشی از تفاوت‌های آب‌وهوایی و جغرافیایی مکان‌های رویش و ژنتیکی باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که این گیاه تنوع بالایی از نظر ترکیبات فیتوشیمیایی در گل دارد که می‌تواند در کارهای اهلی‌سازی و اصلاح گیاه مورد استفاده قرار گیرد. با این حال مطالعات تکمیلی دیگری در تایید نتایج حاضر و پیشبرد فعالیت‌های اصلاحی ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری نهایی

گیاهان منبع مهمی از ترکیبات هستند که به عنوان متابولیت‌های ثانویه شناخته شده‌اند. بررسی مقادیر ترکیبات فعال ثانوی در اندام‌ها و مقایسه آنها نشان داد که میزان مواد موثره ثانوی (فلاونوئید، فنل، آنتوسیانین) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در اندام‌های مختلف و گیاهان هیچ گاه ثابت نیست و متناسب با مراحل رشد گیاه و شرایط محیطی قابل تغییر است. به طور کلی نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان داد که گونه‌های مختلف ریواس دارای میزان بالایی از ترکیبات فنولی بوده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی دارند. این نتایج پیشنهاد می‌کنند که ژنوتیپ‌های مختلف ریواس دارای منابع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بوده و می‌توانند در صنایع غذایی و دارویی کاربرد فراوان داشته باشند. در بین ژنوتیپ‌ها مطالعه شده ژنوتیپ‌های تهران و اشنویه و شبستر غنی‌تر از سایر مناطق می‌باشند، که می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی و اهلی سازی این گیاه مورد توجه قرار گیرند. با توجه به اثرات نامطلوب آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی بر سلامت انسان، تحقیقات بیشتر در زمینه‌ی استخراج، خالص سازی و کاربرد عصاره گل ریواس در صنایع غذایی و دارویی پیشنهاد می‌شود . با شناسایی و کاربرد بیشتر ترکیبات بیولوژیک اندام‌های مختلف ریواس می‌توان برای استفاده بهینه از مقادیر انبوه این گیاه در کشور برنامه ریزی کرد.

References

1. Akerstrom, A., Jaakola, L., Bang, U. and Jaderlund, A. 2010. Effects of latitude-related factors and geographical origin on anthocyanidin concentrations in fruits of *Vaccinium myrtillus* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58: 11939–11945.
2. Arosio, B., Gagliano, N., Fusaro, L.M., Parmeggiani, L., Tagliabue, J. and Galetti, P. 2000. Aloe-emodin quinone pretreatment reduces acute liver injury induced by carbon tetrachloride. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology, 87: 229–233.
3. Celine, F., Le Texier, L., Roy, S., Delaforge, M., Gregoire, S. and Neuwels, M. 2004. Parameters and mechanistic studies on the oxidative ring cleavage of syntheticheterocyclic naphthoquinones by Streptomyces strains. Applied Microbiology and Biotechnology, 65: 446–456.
4. Chang, Q., Zuo, Z., Harrison, F. and Chow, M.S.S. 2002. Hawthorn. The

42(6): 605–612.
5. Ebrahimzadeh, M.A., Hosseinimehr, S.J., Hamidinia, A. and Jafari, M. 2008. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Feijoa sallowiana* fruits peel and leaves. Pharmacologyonline, 1: 7-14.
6. Emad, M., gheybi, F., Rasoli, M., Khanzadeh, R., and Mohammadi, S. 2003.Medicinal-industrial plant of Rhubarb. Poneh publication, Tehran, 69p.
7. Ercisli, S. and Esitken, A. 2004. Fruit characteristics of native rose hip (*Rosa* spp.) selections from the Erzurum province of Turkey. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 32(1): 51-53.
8. Fang, F., Wang, J., Zhao, Y., Jin, C., Kong, W., and Zhao, H. 2011. A comparative study on the tissue distributions of Rhubarb anthraquinones in normal and CCl_4-injured rats orally administered Rhubarb extract. Journal of Ethnopharmacology, 137: 1492-1497.
9. Fattahi, M., Nazeri, V., Torras-Claveria, L., Sefidkon, F., Cusido, R.M., Zamani, Z. and Palazon, J. 2013. Identification and quantification of leaf surface flavonoids in wild-growing populations of *Dracocephalum kotschyi* by LC–DAD–ESI-MS. Food Chemistry, 141, 139-146.
10. Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. and Scheffer, J.J. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. Flavour and Fragrance Journal. 23, 213–226.
11. Fok, T.F. 2001. Neonatal jaundice Traditional Chinese medicine approach. Journal of Perinatology, 21: 98-100.
12. Harborne, J.B., Mabry, T.J. and Mabry, H. 1975. The Flavonoids. London: Chapman and Hall, 866p.
13. Huang, Q., Lu, G., Shen, H.M., Chung, M.C. and Ong, C.N. 2007. Anti-cancer properties of anthraquinones from Rhubarb. Medicinal Research Reviews, 27: 609-630.
14. Irigoyen, J.J., Emerich, D.W. and Sanchez-Diaz M. 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in Journal of Clinical Pharmacology, nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. Physiologia Plantarum, 84: 55-60.
15. Li, A., Bao, B., Grabovskaya-Borodina, A.E., Hong, S.P., McNeill, J., Mosyakin, S.L., Ohba, H. and Park, C.W. 2003. Rheum. In: Wu, Z.Y., Raven, P.H., Hong, D.Y. (Eds.), Flora of China. Vol. 5 (Ulmaceae through Basellaceae). Garden Press, St. Louis, pp. 341-350.
16. Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthetic membranes. Methods in Enzymology, 148: 350-382.
17. Luthar, Z. and Kreft, I. 1999. Influence of temperature on tannin content in different ripening phases of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds, Fagopyrum, 16: 61-65.
18. Munzuroglu, O., Karatas, F. and Gur, N. 2000. A study of the levels of vitamins A, E and C and Selenium in Rhubarb (*Rheum ribes* L.) Turkish Journal of Biology, 24: 397–404.
19. Nakajima, J.i., Tanaka, I., Seo, S., Yamazaki, M. and Saito, K. 2004. LC/PDA/ESI-MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries. BioMed Research International, 5: 241-247.
20. Neel, M.C. and Ellstr, N.C. 2003. Conservation of genetic diversity in the endangered plant *Eriogonum ovalifolium* var. *vineum* (Polygonaceae). Conservation Genetics, 37: 352-354.
21. Nikolova, M.T., Taskova, R.M., and Peev, D.R. 2005. Exudate flavonoid aglycones of Veronica: Ecological and systematic implications. Biochemical Systematics and Ecology, 33(12), 1258–1268.
22. Orhan, D.D., Hartevioglu, A., Küpeli, E. and Yesilada, E. 2007. *In vivo* anti-inflammatory and antinociceptive activity of the crude extract and fractions from *Rosa canina* L. fruits. Journal of Ethnopharmacology, 112: 394-400.
23. Shoemaker, M., Hamilton, B., Dairkee, S. H., Cohen, I. and Campbell, M.J. 2005. *In vitro* anticancer activity of twelve Chinese medicinal herbs. Phytotherapy Research, 19: 649–651.

24. Tapas, A.R., Sakarkar, D.M. and Kakde, R.B. 2008. Flavonoids as nutraceuticals: A review. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 7(3): 1089–1099.
25. Tsai, J.C., Tsai, S., and Chang, W.C. 2004. Effect of ethanol extracts of three Chinese medicinal plants with laxative properties on ion transport of the rat intestinalepithelia. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 27: 162-165.
26. Tseng, S.H., Lee, H.H., Chen, L.G., Wu, C.H., and Wang, C.C. 2006. Effects of three purgative decoctions on inflammatory mediators. Journal of Ethnopharmacology, 105: 118-124.
27. Urbonaviciute, A., Jakstas, V., Kornysova, O., Janulis, V., and Maruska A. 2006. Capillary electrophoretic analysis of flavonoids in single-styled hawthorn (*Crataegus monogyna Jacq.*) ethanolic extracts. Journal of Chromatography A, 1112: 339-344.
28. Wang, J., Zhao, H., Zhao, Y., Jin, C., Liu, D. and Kong, W. 2011. Hepatotoxicity orhepatoprotection? Pattern recognition for the paradoxical effect of the Chinese Herb *Rheum palmatum* L. in treating rat liver injury, Plos One. 6: 24498.
29. Yu, M., Luo, Y.L., Zheng, J.W., Ding, Y.H., Li, W. and Zheng, T.Z. 2005. Effects of Rhubarb on isolated gastric muscle strips of guinea pigs World. Journal of Gastroenterology, 11: 2670-2673.
30. Zhao, Y.L., Wang, J.B., Zhou, G.D., Shan, L.M. and Xiao, X.H. 2009. Investigations of free anthraquinones from Rhubarb against alpha-naphthylisothiocyanate - induced cholestatic liver injury in rats. Journal of Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology, 104: 463-469.
31. Zugic, A., Đordevic, S., Arsic, I., Markovic, G., Zivkovic, J., Jovanovic, S. and Tadic, V. 2014. Antioxidant activity and phenolic compounds in 10 selected herbs from Vrujci Spa, Serbia. Industrial Crops and Products, 52: 519-527.