ارزیابی تنوع برخی از شاخص‌های فیتوشیمیایی عصاره برگ ژنوتیپ‌های گونه‌های مختلف گیاه زرشک (*Berberis*) در شمال غرب ایران

ناصر قلیزاده مقدم[۱]، بهمن حسینی[۲*]، ابوالفضل علیرضالو[۲]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی محصولات باغبانی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ایران

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

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۰۲/۰٦ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۰۳/۲٤

چکیده

در این تحقیق برگ تعداد ۲۸ ژنوتیپ زرشک در اردیبهشت ۱۳۹۵ از شمال‌غرب کشور جمع آوری گردید. نمونه‌ها پس از عصاره‌گیری با دستگاه اولتراسونیک از نظر صفات فیتوشیمیایی فنول کل (روش فولین سیوکالتیو)، فلاونوئید کل (روش کلرید آلمینیوم)، کلروفیل a، b و کارتنوئید (روش لیچن تالر) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (روش FRAP و DPPH) مختلف مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین میزان فنول کل به‌ترتیب در ژنوتیپ‌های Z۸ و Z۱۹ به میزان ۷۵/۹۶ و ۱۳/۵۹(میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک) می‌باشد. بیشترین و کمترین میزان فلاونوئید کل به‌ترتیب در ژنوتیپ‌های Z۲۰ و Z۱۹ به میزان ۱۴/۹۹ و ۲/۱۰ (میلی‌گرم کوئرستین بر صد گرم ماده خشک) مشاهده شد. بیشترین میزان کلروفیلa، b و کارتنوئید به‌ترتیب در ژنوتیپ‌های Z۳، Z۲۶، Z۸ به میزان۲۶/۳۲ (میلی‌گرم بر صد گرم ماده خشک)، ۵/۳۷ (میلی‌گرم بر صد گرم ماده خشک) و ۱۸/۸۶ (میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) گزارش شد. بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روش FRAP به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ Z۸ به میزان ۴/۱۴ (میکرومول آهن بر گرم ماده خشک گیاه) بود. بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روش DPPH نیز متعلق به ژنوتیپ Z۶ به میزان ۹۲/۳۰ درصد بود. نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با میزان فنول کل و فلاونوئید کل در عصاره‌های گیاه ارتباط مستقیم دارد و می‌توان از خواص آنتی‌اکسیدانی ژنوتیپ‌های Z۲۰ و Z۸ (*B. vulgaris*) که در آنها میزان فنول کل و فلاونوئید کل بالاتر است در صنایع غذایی و دارویی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: آذربایجان، آنتی اکسیدان، برگ زرشک، فنول، فلاونوئید، کارتنوئید

*نویسنده مسئول: b.hosseini@urmia.ac.ir

مقدمه

تیره زرشک (Berberidaceae) شامل ۱۵ جنس و ۶۵۰ گونه است که بیشتر آنها در مناطق معتدله نیمکره شمالی پراکنده‌اند. جنس زرشک (*Berberis*) دارای ۵۰۰ گونه است که شماری از آنها و از جمله زرشک زالزالکی، زرشک زرافشانی، زرشک خراسانی، زرشک راست خوشه، زرشک معمولی و زرشک ژاپنی در ایران وجود دارد (Alemardan et al., 2013).

برگ زرشک خوراکی به‌عنوان قابض و در درمان عوارض ناشی از فقدان ویتامین C نیز به کار می‌رود. همچنین برگ زرشک در اسهال مزمن، آب آوردن بافت‌ها و در اسکوربورت استفاده می‌شده است. ماده‌ای به نام متوکسی هیدونوکارپین در عصاره برگ زرشک وجود دارد که در ترکیب با بربرین می‌تواند برخی باکتری‌های مقاوم را نابود کند. طبق مطالعات انجام شده روی برگ زرشک، ترکیباتی مثل ویتامین C، ویتامین K، کربوهیدراتها، آلکالوئیدها و همچنین ترکیبات فلاونوئیدی است که مصرف پزشکی دارند (Imanshahidi and Hosseinzadeh., 2008; Zarei et al., 2015). آنالیز فیتوشیمیایی عصاره خام گونه *B. vulgaris* وجود آلکالوئیدها، تانن‌ها و ترکیبات فنولیک را در این گونه اثبات کرده است (Rounsaville and Ranney, 2010).

طبق مطالعه‌ای که در استان گلستان بر روی خصوصیات فنولوژیکی و فیتوشیمیایی (فلاونوئید تام، فنول تام، آنتوسیانین، آلکالوئیدها) اندام‌های مختلف زرشک بی‌دانه انجام گرفت، مشخص شد که میوه و برگ بیشترین مقدار متابولیت‌های ثانویه را دارا بودند (Mazandarani et al., 2013). همچنین در مطالعه دیگر خصوصیات فیزیکوشیمیایی، مواد موثره و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ۱۹ ژنوتیپ از زرشک بی‌دانه (*B. vulgaris*) جمع‌آوری شده از شمال شرقی آناتولی ترکیه را مورد آزمایش قرار دادند. نتایج نشان داد که ژنوتیپ‌های مختلف زرشک، تفاوت‌های معنی‌داری از لحاظ خصوصیات مورد مطالعه دارند (Yildiz et al., 2014). متفاوت بودن خصوصیات فیتوشیمیایی در ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های مختلف، در سایر گیاهان دارویی نیز به اثبات رسیده است. در یک بررسی، خصوصیات فیتوشیمیایی گونه‌های مختلف مریم‌گلی (*Salvia officinalis*) در مکان‌های مختلف مورد تحقیق و آزمایش قرار گرفت (Maksimovic et al., 2007). در سایر مطالعات انجام گرفته در گیاهان دارویی از جمله برگ بو (*Laurus nobilis*)، آویشن (*Thymus*)، دارچین (*Cinnamomum verum*)، نعناع (*Menthe*) و بومادران (*Achillea millefolium*) نتایج نشان داد که میزان مواد موثره این گیاهان تحت تاثیر ژنوتیپ و مکان جمع‌آوری می‌باشد (Marzouki et al., 2009; Horwath et al., 2008; Kumar et al., 2012; Chauhan et al., 2009; Ebrahimi et al., 2012). تنوع ژنتیکی، قابلیت بقای یک گونه و یا جمعیت را از طریق ایجاد توانایی سازگاری با تغییرات محیطی فراهم می‌کند. بنابراین تنوع ژنتیکی برای بقای طولانی مدت یک گونه ضروری است (Bataillon et al., 1996). ادامه روند افزایش تولید و بهبود کیفیت مواد غذایی بستگی به حفاظت و به‌کارگیری مؤثر منابع ژنتیکی دارد که با بهره‌برداری درست از آنها می‌توان ارقام مناسب‌تر گیاهی را تولید کرد. از طرفی بهبود خصوصیات مورفولوژیکی، بیولوژیکی و همچنین تغییر سطوح ترکیبات موثره، بستگی به وجود تنوع ژنتیکی دارد (HazlerPilepic et al., 2008). ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاهان اطلاعات مناسبی در مورد نحوه طبقه‌بندی ژنوتیپ‌های جمعیت در اختیار به‌نژادگران قرار می‌دهد. با توجه به اهمیت بررسی تنوع گیاهان دارویی که دارای مواد موثره ارزشمندی هستند. در این تحقیق خصوصیات فیتوشیمیایی برگ‌های

ژنوتیپ‌ها و گونه‌های مختلف زرشک در منطقه شمال غرب کشور که دارای تنوع وسیعی از این گیاه دارویی مهم می‌باشد، بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

مناطق پراکنش: شناسایی و پراکنش گونه‌ها در شمال غرب کشور با استفاده از منابع مختلف در این زمینه و بازدید از این مناطق در فصل بهار ۱۳۹۵ انجام شد. مشخصات مناطق مورد مطالعه مطابق جدول ۱ می‌باشد.

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی: در این مرحله ۲۸ نمونه برگ از ژنوتیپ‌های زرشک موجود در استان‌های آذربایجان‌شرقی و آذربایجان غربی در خردادماه ۱۳۹۵ جمع‌آوری شد. نمونه‌های مذکور پس از برداشت، جهت شناسایی و انجام آزمایشات فیتوشیمیایی به گروه علوم باغبانی دانشگاه ارومیه منتقل شده و در شرایط آزمایشگاه با دمای $25^{\circ}C$، خشک و نگهداری شدند.

عصاره‌گیری: نمونه‌های خشک شده برگ، بوسیله‌هاون چینی و نیتروژن مایع به‌صورت کامل پودر شده و عصاره‌گیری متانولی توسط دستگاه اولتراسونیک با اضافه کردن ۲۰ میلی‌لیتر محلول متانول ۸۰ درصد روی هر نمونه در دمای ۳۰ درجه و قدرت ۱۲۰هرتز (Elmasonic) در مدت زمان ۳۰ دقیقه گردید. سپس نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی، فیلتر شدند.

اندازه‌گیری فنول کل: جهت اندازه‌گیری فنول کل از معرف فولین سیوکالتیو استفاده شد. ۱۰ میکرولیتر از عصاره متانولی موردنظر به میزان بیست برابر رقیق شد. سپس میزان ۹۰ میکرولیتر آب دیونیزه به میزان مشخصی از عصاره‌های رقیق شده اضافه گردید. در مرحله بعد میزان ۶۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتیو ۱۰ درصد به هریک از نمونه‌ها اضافه کرده و به مدت ۵ الی ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در مرحله آخر میزان ۴۸۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد به هر یک از عصاره‌ها اضافه و به‌مدت ۳۰ الی ۴۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی قرار گرفت. قرائت جذبی محلول موردنظر در طول موج ۷۶۰ نانومتر به‌وسیله اسپکتروفتومتر (MODEl: UV2100 PC) انجام شد. آب دیونیزه به‌عنوان شاهد و گالیک‌اسید به‌عنوان استاندارد استفاده گردید. منحنی استاندارد بر اساس گالیک‌اسید، ترسیم و نتایج به‌صورت میلی‌گرم اکی‌والان گالیک‌اسید بر وزن خشک گیاه گزارش شد (Ebrahimzadeh et al., 2008).

اندازه‌گیری فلاونوئید کل: جهت اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل به مقدار ۸۰ میکرولیتر از عصاره متانولی مورد نظر، ۱۵۰ میکرولیتر نیتریت سدیم ۵ درصد اضافه کرده و بعد از مدت زمان ۵ دقیقه میزان ۳۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰درصد اضافه شد. سپس بعد از مدت ۵ دقیقه میزان ۱ میلی‌لیتر محلول سود ۱ مولار بر روی هر نمونه اضافه کرده و با آب مقطر به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. طول موج جذبی محلول مورد نظر در طول موج ۳۸۰ نانومتر و نسبت به محلول شاهد قرائت شد. از محلول کوئرستین جهت رسم نمودار استاندارد استفاده شد و میزان فلاونوئید کل عصاره براساس میلی‌گرم (کوئرستین بر گرم) وزن خشک گیاه گزارش شد (Chang et al., 2002).

کاروتنوئید کل و کلروفیل a وb: جهت اندازه‌گیری میزان کلروفیل a، b و کارتنوئید کل، میزان ۵۰ میلی‌لیتر متانول ۹۶ درصد به ۱ گرم از هر نمونه پودر شده اضافه گردید. سپس به‌مدت ۱ دقیقه در دور rpm ۱۰۰۰ سانتریفیوژ کرده و با کاغذ صافی دولایه صاف شدند. محلول بدست آمده به مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۲۵۰۰ سانتریفیوژ گردید. فاز رویی جداسازی و جذب محلول در طول‌موج‌های ۶۶۶، ۶۵۳ و ۴۷۰ نانومتر

نسبت به شاهد (متانول ۹۶ درصد) اندازه‌گیری شد. میزان کاروتنوئید و کلروفیل a و b برای هر عصاره با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه گردید (Dere et al., 1998).

$$Ca=15.65\ A666 - 7.340\ A653$$
$$Cb=27.05\ A653 - 11.21\ A666$$
$$Cx+c = 1000\ A470 - 2.860\ Ca - 129.2\ Cb/245$$

جدول ۱: مناطق جمع‌آوری جمعیت‌های مختلف زرشک

ژنوتیپ		محل جمع‌آوری	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	ارتفاع (متر)
Z۱	*B.carataegina*	آذربایجان غربی/ خان دره	۳۷° ۲۰'۲۶ "	۴۵ °۰۸' ۴۱"	۱۴۰۴
Z۲	*B.vulgaris*	آذربایجان غربی/ مقیتالو	۳۸° ۰۵' ۷۵"	۴۵° ۰۵' ۰۰"	۱۳۵۷
Z۳	*B.vulgaris*	آذربایجان غربی/ نقده	۳۶° ۵۳' ۱۰"	۴۵° ۲۷' ۳۵"	۱۵۰۶
Z۴	*B.vulgaris*	آذربایجان شرقی/ قره تپه	۳۸° ۱۵' ۵۵"	۴۵° ۲۱' ۱۳"	۱۲۷۸
Z۵	*B.vulgaris*	آذربایجان غربی/ مقانجوق	۳۸° ۱۴' ۱۷"	۴۴° ۴۵' ۲۷"	۱۳۲۸
Z۶	*B.vulgaris*	آذربایجان شرقی/ امستجان	۳۸° ۲۲' ۲۵"	۴۵° ۲۱' ۳۳"	۱۴۲۷
Z۷	*B.vulgaris*	آذربایجان شرقی/ شبستر	۳۸° ۱۰' ۲۹"	۴۵° ۴۱' ۱۹"	۱۳۹۲
Z۸	*B.vulgaris*	آذربایجان شرقی/ صوفیان	۳۸° ۱۵' ۴۰"	۴۵° ۵۶' ۴۷"	۱۳۲۶
Z۹	*B.vulgaris*	آذربایجان شرقی/ مرند	۳۸° ۱۹' ۲۰"	۴۵° ۵۶' ۰۳"	۱۳۹۰
Z۱۰	*B.integerima*	آذربایجان شرقی/ داران	۳۸° ۴۹' ۳۱"	۴۵° ۴۸' ۲۱"	۱۳۲۱
Z۱۱	*B.integerima*	آذربایجان شرقی/ جلفا	۳۸° ۵۴' ۱۹"	۴۵° ۵۰' ۱۲"	۹۸۰
Z۱۲	*B.integerima*	آذربایجان شرقی/ سیه رود	۳۸° ۵۲' ۰۶"	۴۶° ۰۰' ۲۷"	۶۴۵
Z۱۳	*B.integerima*	آذربایجان شرقی/ جرجن	۳۸° ۵۰' ۱۲"	۴۶° ۱۰' ۰۱"	۶۰۱
Z۱۴	*B.integerima*	آذربایجان شرقی/ دوزال	۳۸° ۵۱' ۴۵"	۴۶° ۱۳' ۵۵"	۵۳۹
Z۱۵	*B.integerima*	آذربایجان شرقی/ اوشتبین	۳۸° ۵۰' ۵۴"	۴۶° ۲۳' ۲۱"	۵۳۹
Z۱۶	*B.integerima*	آذربایجان شرقی/ خومارلو	۳۹° ۰۹' ۵۱"	۴۷° ۰۱' ۴۵"	۳۹۷
Z۱۷	*B.integerima*	آذربایجان شرقی/ کلیبر	۳۸° ۴۸' ۳۹"	۴۷° ۰۳' ۴۸"	۴۱۰
Z۱۸	*B.integerima*	آذربایجان شرقی/ عاشقلو	۳۸° ۵۳' ۳۶"	۴۶° ۵۴' ۵۹"	۱۳۷۹
Z۱۹	*B.vulgaris*	آذربایجان شرقی/ امند	۳۸° ۱۲' ۱۶"	۴۶° ۰۹' ۲۸"	۱۳۹۴
Z۲۰	*B.vulgaris*	آذربایجان شرقی/ تبریز	۳۸° ۰۴' ۱۱"	۴۵° ۵۹' ۴۵"	۱۳۶۳
Z۲۱	*B.integerima*	آذربایجان شرقی/ عاشقلو	۳۸° ۵۳' ۵۷"	۴۶° ۴۹' ۳۱"	۱۳۴۸
Z۲۲	*B.integerima*	آذربایجان شرقی/ عاشقلو	۳۸° ۵۰' ۱۳"	۴۷° ۰۰' ۰۰"	۱۳۶۹
Z۲۳	*B.vulgaris*	آذربایجان شرقی/ اسکو	۳۷° ۵۶' ۰۵"	۴۶° ۰۵' ۳۳"	۱۴۷۸
Z۲۴	*B.vulgaris*	آذربایجان شرقی/ آذرشهر	۳۷° ۳۸' ۲۳"	۴۵° ۵۷' ۳۸"	۱۸۱۵
Z۲۵	*B.vulgaris*	آذربایجان شرقی/ عجبشیر	۳۷° ۲۹' ۰۲"	۴۶° ۱۰' ۳۰"	۱۱۴۰
Z۲۶	*B.vulgaris*	اردبیل/ هیق	۳۸° ۲۳' ۳۵"	۴۷° ۳۳' ۱۲"	۱۴۵۰
Z۲۷	*B.vulgaris*	آذربایجان شرقی/ مراغه	۳۷° ۲۸' ۲۹"	۴۶° ۱۷' ۴۸"	۱۶۳۱
Z۲۸	*B.vulgaris*	اردبیل/ آق کند	۳۷° ۲۸' ۲۹"	۴۸° ۱۴' ۰۸"	۱۳۸۷

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

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (Mean of square)				
		فنل کل	فلاونوئید کل	کاروتنوئید کل	کلروفیل a	کلروفیل b
ژنوتیپ	۲۷	۶۸۹/۷۲**	۲۵/۷۶ **	۳۸/۰۸ **	۱۱۳/۸۳ **	۴/۴۴**
اشتباه	۵۶	۳/۶۰	۰/۱۸	۰/۱۴	۰/۰۵۹	۰/۱۴
CV%		۴/۰۱	۴/۷۵	۱۶/۰۷	۱/۵۳	۱۶/۷

** معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد

جدول ۳: میزان ترکیبات فیتوشیمیایی ژنوتیپ‌های زرشک

ژنوتیپ		محل جمع آوری	فنول * کل	فلاونوئید کل	کاروتنوئید کل	کلروفیل a	کلروفیل b
Z۱	*B.carataegin*	آذربایجان غربی/ خان دره	۶۳/۷۴۱	۱۲/۱۱۲	۱۴/۷۷	۱۹/۸۱	۴/۳۵۴
Z۲	*B.vulgaris*	آذربایجان غربی/ مقیتالو	۳۱/۶۳۲	۶/۴۱۲	۸/۲۵۴	۲۴/۳۱۸	۱/۸۶۶
Z۳	*B.vulgaris*	آذربایجان غربی/ نقده	۴۷/۸۷۷	۹/۹۵	۱۲/۰۷۷	۲۶/۳۱۶	۳/۷۰۴
Z۴	*B.vulgaris*	آذربایجان شرقی/ قره تپه	۵۷/۶۱۹	۱۰/۴۵۴	۱۳/۳۶۹	۱۲/۶۹۰	۱/۳۷۰
Z۵	*B.vulgaris*	آذربایجان غربی/ مقانجوق	۷۲/۶۳۹	۱۳/۶	۱۲/۹۶۲	۱۲/۷۷۶	۲/۳۵۴
Z۶	*B.vulgaris*	آذربایجان شرقی/ امستجان	۷۳/۳۴۶	۱۲/۲۷۵	۱۱/۰۰۳	۱۷/۷۲۰	۱/۹۲۹
Z۷	*B.vulgaris*	آذربایجان شرقی/ شبستر	۵۸/۱۶۳	۱۲/۱۲۵	۱۷/۷۰۹	۱۳/۱۱۰	۰/۹۸۱
Z۸	*B.vulgaris*	آذربایجان شرقی/ صوفیان	۷۵/۹۵۹	۱۳/۳۶۶	۱۸/۸۶۱	۱۲/۹۲۷	۱/۶۵۸
Z۹	*B.vulgaris*	آذربایجان شرقی/ مرند	۴۹/۱۲۹	۷/۹۶۲	۹/۷۴۰	۱۹/۷۱۵	۲/۹۴۱
Z۱۰	*B.integerima*	آذربایجان شرقی/ داران	۳۶/۱۲۲	۷/۷۱۲	۱۰/۲۰۹	۲۳/۵۹۲	۱/۰۵۷
Z۱۱	*B.integerima*	آذربایجان شرقی/ جلفا	۳۸/۹۷۹	۸/۰۱۶	۷/۴۰۱	۱۴/۶۴۹	۱/۸۶۲
Z۱۲	*B.integerima*	آذربایجان شرقی/ سیه رود	۴۳/۰۰۶	۸/۲۰۴	۱۸/۰۳۸	۱۶/۰۳۶	۰/۶۰۷
Z۱۳	*B.integerima*	آذربایجان شرقی/ جرجن	۳۹/۱۷۰	۸/۱	۱۲/۸۶۰	۲۴/۳۶۲	۲/۴۰۱
Z۱۴	*B.integerima*	آذربایجان شرقی/ دوزال	۳۶/۱۴۹	۷/۱۲۹	۱۴/۱۵۴	۲۵/۰۳۱	۱/۷۴۸
Z۱۵	*B.integerima*	آذربایجان شرقی/ اوشتبین	۳۳/۰۲۰	۵/۶۵	۸/۳۰۱	۱۱/۷۲۵	۰/۵۵۷
Z۱۶	*B.integerima*	آذربایجان شرقی/ خومارلو	۳۸/۷۳۴	۸/۸۲۵	۱۴/۰۷۲	۱۴/۷۳۰	۱/۲۳۸
Z۱۷	*B.integerima*	آذربایجان شرقی/ کلیبر	۴۵/۲۶۵	۸/۵۳۷	۱۱/۸۹۱	۴/۹۱۷	۱/۵۳۳
Z۱۸	*B.integerima*	آذربایجان شرقی/ عاشقلو	۴۷/۴۱۴	۱۰/۱۲۵	۸/۷۳۷	۲۱/۲۸۹	۲/۵۷۶
Z۱۹	*B.vulgaris*	آذربایجان شرقی/ امند	۱۳/۵۹۱	۲/۱۰۴	۲/۶۸۴	۶/۵۰۵	۱/۸۱۲
Z۲۰	*B.vulgaris*	آذربایجان شرقی/ تبریز	۷۲/۷۷۵	۱۴/۹۸۷	۱۳/۵۸۱	۱۱/۱۹۷	۱/۴۸۰
Z۲۱	*B.integerima*	آذربایجان شرقی/ عاشقلو	۴۵/۹۴۵	۹/۱۱۶	۱۱/۹۰۳	۸/۷۹۶	۲/۸۹۵
Z۲۲	*B.integerima*	آذربایجان شرقی/ عاشقلو	۳۳/۱۲۹	۶/۷۷۹	۱۲/۱۳۴	۱۲/۱۸۱	۳/۱۵۱
Z۲۳	*B.vulgaris*	آذربایجان شرقی/ اسکو	۶۳/۳۳۳	۱۲/۷۷۹	۱۵/۶۷۱	۲۵/۳۷۴	۲/۴۸۳
Z۲۴	*B.vulgaris*	آذربایجان شرقی/ آذرشهر	۳۸/۴۰۸	۷/۶۳۷	۱۵/۲۷۰	۱۳/۰۶۶	۲/۹۰۹
Z۲۵	*B.vulgaris*	آذربایجان شرقی/ عجبشیر	۳۳/۰۲۰	۶/۱۵۴	۱۴/۴۶۸	۱۹/۳۶۸	۵/۱۹۴
Z۲۶	*B.vulgaris*	اردبیل/ هیق	۳۷/۵۳۷	۴/۹	۹/۵۷۶	۱۳/۴۵۶	۵/۳۷۶
Z۲۷	*B.vulgaris*	آذربایجان شرقی/ مراغه	۴۹/۸۶۳	۸/۳۲۹	۱۵/۰۵۹	۱۰/۴۲۳	۲/۴۲۷
Z۲۸	*B.vulgaris*	اردبیل/ آق کند	۴۹/۹۴۵	۸/۳۱۶	۱۵/۱۰۴	۷/۴۹۰	۲۳/۰۸۷
LSD			۳/۱۰	۰/۶۹	۰/۳۴	۰/۳۹	۰/۶۳

فنول کل (mg GAE/g DW)، فلاونوئید کل (mg/g DW)، کاروتنوئید کل (µg/g DW)، کلروفیل a و b (µg/g)

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP: میزان ۵۰ میکرولیتر از عصاره‌های متانولی مورد نظر را به ۳ میلی‌لیتر محلول معرف FRAP (بافر استات سدیم ۳۰۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۳/۶، فریک-تریس پریدیل- است-ریازین و فریک کلرید) که به‌صورت تازه تهیه شده است اضافه شد. سپس محلول حاصل را داخل حمام بن ماری به‌مدت ۳۰ دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم. قرائت جذبی محلول مورد نظر در طول موج ۵۹۳ نانومتر نسبت به محلول شاهد انجام گرفت. جهت رسم نمودار استاندارد از سولفات آهن استفاده گردید و نتایج به‌صورت میلی مول Fe^{2+} بر گرم وزن خشک بیان شد (Zugic et al., 2014).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH: جهت سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH میزان ۲۰ میکرولیتر از عصاره ۵ برابر رقیق شده متانولی به ۲ میلی‌لیتر محلول DPPH اضافه گردید. محلول حاصل با دور متوسط همزده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای $25\ ^{\circ}C$ قرار داده شد. قرائت جذبی محلول مورد نظر در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر نسبت به شاهد (Blank) که در تهیه آن نیز در روش بالا بجای عصاره از اتانول ۸۰ درصد استفاده شده بود، انجام گرفت (Nakajima et al., 2004).

جهت محاسبه فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH از فرمول زیر استفاده شد

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

Abs blank: میزان جذب Blank

Abs sample: میزان جذب نمونه

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های بدست آمده در سه تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی بوسیله نرم‌افزار SAS آنالیز شدند. از آزمون LSD جهت محاسبات مقایسه میانگین داده‌ها و کلاستر بندی داده‌ها بر اساس روش Ward و معیار مربع فواصل اقلیدسی انجام گردید.

جدول ٤: تجزیه واریانس خصوصیات آنتی‌اکسیدانی ژنوتیپ‌های مختلف زرشک

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (Mean of square)	
		فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH)	فعالیت آنتی‌اکسیدانی (FRAP)
ژنوتیپ	۲۷	۷۵۷/۷۹**	۱/۵۰**
اشتباه	۵۶	۵/۴۷	۰/۰۳
CV%		۳/۲۸	۸/۱۳

**معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد

نتایج

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس فنول کل ژنوتیپ‌های زرشک نشان می‌دهد که میزان فنول کل ژنوتیپ‌های زرشک در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار هستند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان می‌دهد که بیشترین مقدار فنول کل مربوط به ژنوتیپ Z۸ (آذربایجان‌شرقی- صوفیان) به میزان (mg/g DW) ۷۵/۹۶ و کمترین مقدار فنول کل مربوط به ژنوتیپ Z۱۹ (آذربایجان‌شرقی- امند) به میزان (mg/g DW) ۱۳/۵۶ می‌باشد.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان می‌دهد که میزان فلاونوئید کل ژنوتیپ‌های مختلف زرشک در

سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بوده و همچنین نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان می‌دهد که میزان فلاونوئید کل ژنوتیپ‌های زرشک از (mg/100g DW) ۲/۱۰ مربوط به کد Z۱۹ واقع در (استان آذربایجان‌شرقی– امند) تا (mg/100g DW) ۱۴/۹۹ مربوط به کد Z۲۰ واقع در (استان آذربایجان شرقی– تبریز) متغیر می‌باشد.

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس کلروفیل a و b و کاروتنوئید نشان می‌دهد که تفاوت ژنوتیپ‌های زرشک در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار می‌باشد و همچنین نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان می‌دهد که بیشترین مقدار کلروفیل a مربوط به ژنوتیپ Z۳ (آذربایجان‌غربی– نقده) به میزان (mg/100g DW) ۲۶/۳۲ و کمترین مقدار مربوط به ژنوتیپ Z۱۷ (آذربایجان‌شرقی– کلیبر) به میزان (mg/100g DW) ۴/۹۱ می‌باشد. همچنین بیشترین مقدار کلروفیل b به میزان (mg/100g DW) ۵/۳۷ مربوط به ژنوتیپ Z۲۶ (اردبیل – هیق) و کمترین میزان (mg/100g DW) ۰/۵۵مربوط به‌ژنوتیپ Z۱۵ (آذربایجان‌شرقی– اوشتبین) می‌باشد. همچنین بیشترین و کمترین میزان کارتنوئید ژنوتیپ‌های زرشک به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های Z۸ (آذربایجان شرقی – صوفیان) و Z۱۹ (آذربایجان شرقی – امند) به میزان (mg/100g DW) ۱۸/۸۶و (mg/100g DW) ۲/۶۸می‌باشند.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ژنوتیپ‌های زرشک به روش FRAP نشان می‌دهد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ژنوتیپ‌های زرشک در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ژنوتیپ‌های زرشک طبق روش FRAP متغیر بوده و شامل بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به میزان (μmol Fe^{++}/g DW) ۴/۱۴ مربوط به ژنوتیپ Z۸ (آذربایجان‌شرقی – صوفیان) و کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به میزان (μmol Fe^{++}/g DW) ۱/۰۰۳ مربوط به ژنوتیپ Z۱۹ (آذربایجان‌شرقی– امند) بود. همچنین طبق نتایج از جدول تجزیه واریانس میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH نیز همانند روش FRAP در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار می‌باشد. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ژنوتیپ‌های زرشک به روش DPPH نیز متغیر می‌باشد و بیشترین مقدار مربوط به ژنوتیپ Z۶ (آذربایجان شرقی– امستجان) به میزان ۹۲/۳۰ درصد و کمترین مقدار مربوط به ژنوتیپ Z۱۹ (آذربایجان‌شرقی – امند) به میزان ۳۳/۰۹ درصد بود.

دسته‌بندی جمعیت‌ها: برای ترسیم دندروگرام داده‌های فیتوشیمیایی گونه‌ها و ژنوتیپ‌های زرشک از روش Ward استفاده شد. نتایج نشان داد که ژنوتیپ‌های مختلف در چهار گروه اصلی شامل گروه یک (Z۱، Z۲۳، Z۴، Z۷، Z۵، Z۲۰، Z۸، Z۶)، گروه دو (Z۲، Z۱۳، Z۱۴، Z۱۱، Z۲۴، z۳، Z۹، Z۱۸)، گروه سه (Z۱۰، Z۲۵، Z۱۵، Z۲۶، Z۱۶، Z۲۲، Z۱۲، Z۲۱، Z۱۷، Z۲۸، Z۲۷) و گروه چهار(Z۱۹) می‌باشند. بیشترین فاصله مربوط به سه ژنوتیپ Z۳ از یک گروه و دو ژنوتیپ Z۱۰ و Z۲۵ از یک گروه دیگر می‌باشد و کمترین فاصله مربوط به دو ژنوتیپ Z۵ و Z۲۰ از یک گروه می‌باشد. ژنوتیپ‌های Z۵ و Z۲۰ در مولفه‌های میزان فنول کل، میزان فلاونوئید کل و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارای مقادیر بالا و مشابه به هم بودند. ژنوتیپ‌های Z۳ ، Z۱۰ و Z۲۵ دارای میزان‌های کمتری از فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بودند.

در این پژوهش تجزیه و تحلیل چند متغیره، به منظور دسته‌بندی نمونه‌ها با توجه به خصوصیات فیتوشیمیایی (فنول کل، فلاونوئید کل، کارتنوئید کل و کلروفیل a و b) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (با روش

FRAP و DPPH) انجام شد. با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ۷ متغیر اولیه در قالب دو متغیر جدید (دو مؤلفه اصلی) تعیین شدند که این دو مولفه در مجموع ۷۱ درصد (۵۲ درصد برای مولفه اول و ۱۹ درصد برای مولفه دوم) از تغییرات کل را توجیه نمودند. اولین مولفه همبستگی بالایی با محتوای فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی اکسیدانی (FRAP و DPPH) برگ‌های زرشک داشت. همچنین دومین مولفه همبستگی بالایی با کلروفیل a و b داشت.

بحث

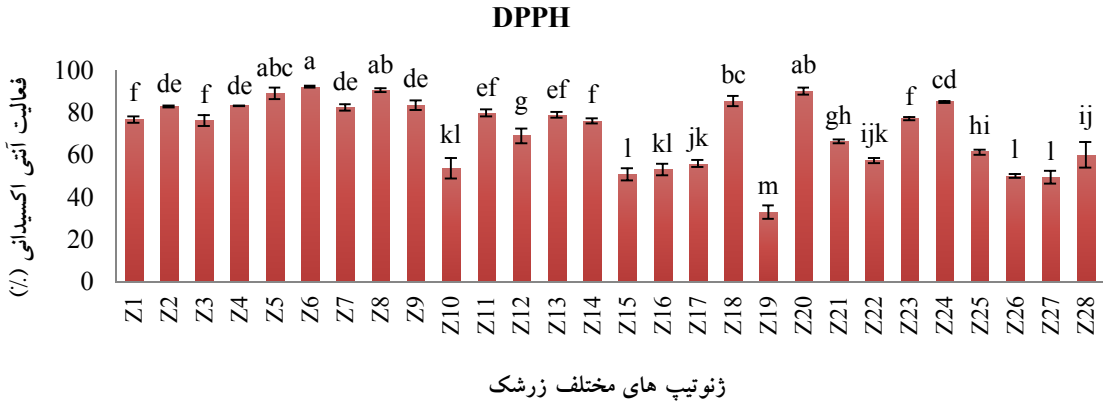
در تحقیق حاضر میزان فنول کل ۱۳/۵۹ الی ۷۵/۹۶ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک متغیر بود که تاحدودی با سایر نتایج گزارش شده مطابقت داشت. در مطالعه‌ای که به بررسی میزان فنول کل در اندام‌های مختلف زرشک پرداختند و نشان داده شد که میزان فنول کل از (mg/g DW) ۱۰/۳۴تا ۵۲/۵۴ متغیر می‌باشد (Zovko Koncic et al., 2010). همچنین آن‌ها نشان دادند که میزان فنول کل در برگ‌ها بیشتر از سایر اندام‌های زرشک است. متفاوت بودن میزان فلاونوئید در سایر مطالعات نیز به اثبات رسیده است که با تحقیق حاضر مطابقت داشت. بررسی‌های انجام‌شده روی اندام‌های مختلف زرشک نشان داد که میزان فلاونوئید کل از (mg/g DW) ۰/۲۴ تا ۴/۲۳ متغیر می‌باشد و بیشترین میزان فلاونوئید کل در اندام برگ بود (Zovko Koncic et al., 2010). بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی زرشک نشان می‌دهد که این خاصیت به علت ترکیبات فنولی است (Farag et al., 2003; Hanachi and Golkho., 2009).

طبق مطالعات انجام شده روی برخی گونه‌های زرشک مشخص شد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با میزان فلاونوئید و فنول ارتباط مستقیم دارد (Motalleb et al., 2005). در مطالعه دیگری که صورت گرفت میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ارتباط مستقیم با فنول کل می‌باشد و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی رابطه ضعیفی با میزان فلاونوئید کل دارد (Zovko et al., 2010). مطالعات دیگری نشان می‌دهد که علاوه بر ترکیبات فنولیک فاکتورهای دیگری نیز روی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان تأثیر دارند (Grassmann, 2005). در این مطالعه میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ژنوتیپ‌های زرشک با میزان فنول کل و فلاونوئید کل در ارتباط مستقیم می‌باشد. میزان ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدهای موجود در ژنوتیپ‌های زرشک علاوه بر ارتباط به گونه‌های مختلف تحت تأثیر اقلیم مناطق مختلف نیز می‌باشد. طبق مطالعه انجام گرفته روی اندام‌های مختلف زرشک نشان داده شد که بیشترین میزان فنول مربوط به اندام میوه و سپس گل و برگ می‌باشد و همچنین بیشترین میزان فلاونوئید مربوط به اندام برگ می‌باشد (مازندرانی و همکاران، ۱۳۹۲). مهمترین ترکیبات فلاونوئیدی زرشک شامل سه ترکیب روتین، کوئرستین و کامفرول می‌باشد (Zovko et al., 2010).

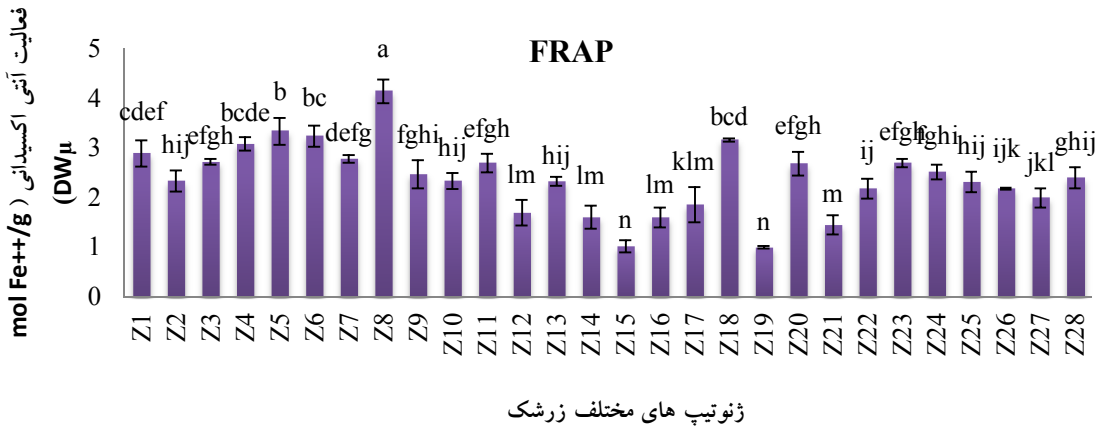
مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که عوامل محیطی مانند میزان بارش و میانگین دما و همچنین غلظت عناصر غذایی موجود در خاک می‌توانند سطح ترکیبات پلی‌فنولیک برگ را تغییر دهند (Rezende et al., 2015). در مطالعه دیگری که صورت گرفت نشان داده شد که ژنوتیپ‌ها اثرات متفاوتی بر روی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند (Scalzo et al., 2005).

طی تحقیقی که اثر ژنوتیپ و سال برداشت بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان میوه مورتیلا انجام شد نشان داد که علاوه بر ژنوتیپ، فصل برداشت، میزان بارش و سایر عوامل زنده و غیرزنده نیز بر روی میزان فنول کل و خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان تأثیر دارند (Alfaro et al., 2013). نتایج این تحقیق نشان داد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با میزان فنول کل و فلاونوئید کل رابطه مستقیم دارد. همچنین میزان فنل کل و فلاونوئید کل علاوه بر ژنوتیپ تحت

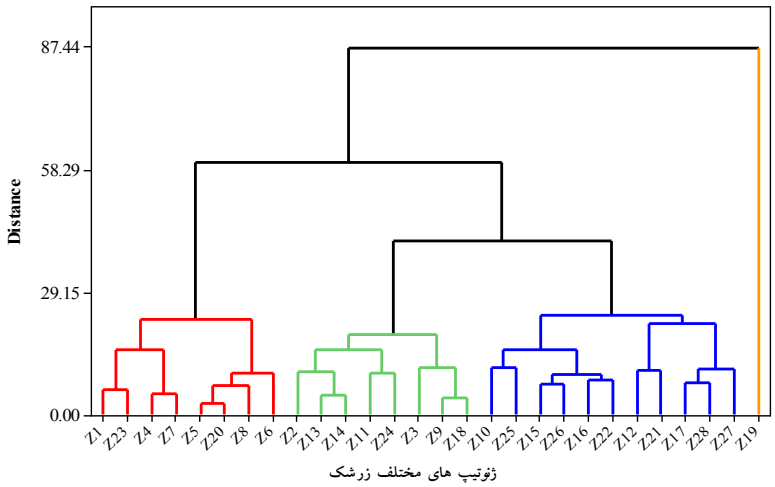
تأثیرعوامل محیطی از قبیل میزان بارش و میانگین دمایی دارد. همچنین میزان فنول کل و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به عوامل زنده، مواد مغذی خاک و زمان برداشت نیز در ارتباط است.



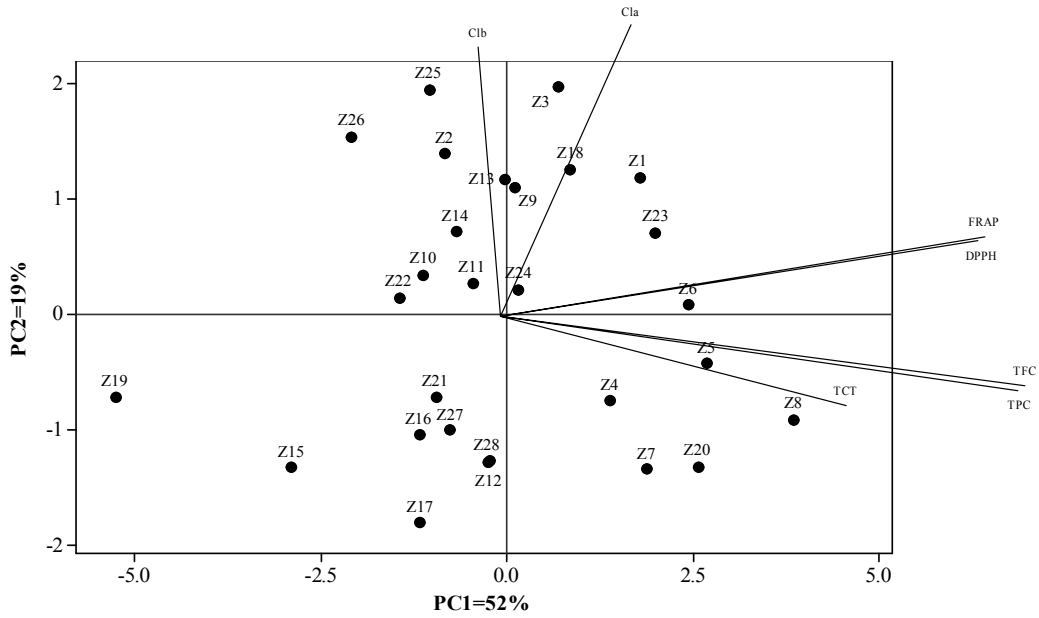
شکل ۱: مقایسه میانگین خصوصیات آنتی‌اکسیدانی (DPPH) ژنوتیپ‌های مختلف زرشک



شکل ۲ : مقایسه میانگین خصوصیات آنتی‌اکسیدانی (FRAP) ژنوتیپ‌های مختلف زرشک



شکل ۳: دندروگرام ژنوتیپ‌های مختلف زرشک بر اساس خصوصیات فیتوشیمیایی



شکل ٤: تجزیه به مولفه‌های اصلی در ژنوتیپ‌های مختلف زرشک

نتیجه‌گیری نهایی

اطلاعات کمی روی خصوصیات فیتوشیمیایی برگهای گونه‌های مختلف زرشک موجود می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که ژنوتیپ‌های جمع آوری شده از مناطق مختلف شمال غرب کشور دارای پتانسیل خوبی از مواد فیتوشیمیایی و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند که می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. در بین نمونه‌های مورد مطالعه ژنوتیپ‌های Z۲۰ و Z۸ (*B. vulgaris*) دارای پتانسیل بالایی از نظر ترکیبات فیتوشیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بودند که می‌تواند مورد توجه اصلاح گران گیاهان دارویی و صنایع غذایی و دارویی قرار گیرد.

References

1. Alemardan, A., Asadi, W., Rezaei, M., Tabrizi, L. and Mohammadi, S. 2013. Cultivation of Iranian seedless barberry (*Berberis integerrima* 'Bidaneh') A medicinal shrub. Industrial Crops and Products, 50: 276-287.
2. Alfaro, S., Mutis, S., Palma, R., Quiroz, A., Seguel, I. and Scheuermann, E. 2013. Influence of genotype and harvest year on polyphenol content and antioxidant activity in murtilla (*Ugni molinae* Turcz) fruit. Soil Science and Plant Nutrition, 13: 67-78.
3. Bataillon, T.M., David, J.L. and Schoen, D.J. 1996. Neutral genetic markers and conservation: simulated Germplasm collections. Genetics, 144: 409-417.
4. Chang, Q., Zuo, Z., Harrison, F. and Chow, M.S.S. 2002. Hawthorn. Clinical Pharmacology. 42(6): 605–612.
5. Chauhan, R.S., Kaul, M.K., Shahi, A.K., Kumar, A., Ram, G. and Tawa, A. 2009. Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. accession [IIIM(J)26] from North-West Himalayan region, India. Industrial Crops and Products, 29: 654–656.
6. Dere, S., Gunes, T. and Sivaci, R. 1998. Spectrophotometric determination of chlorophyll - a, b and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. Journal of Botany, 22: 13-17.
7. Ebrahimi, M., Farajpour, M., Beigmohamadi, M. and Ebrahimi, M. 2012. Genetic relationships among yarrow based on random amplified

Polymorphic DNA markers. Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research, 3(4): 69-73.

8. 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. Journal of Pharmacol-online, 1: 7-14.
9. Farag, RS. EI-Baroty, G.S. and Basuny, AM. 2003. The influence of phenolicextracts obtained from the olive plant (cv. Picual and Kronakii), on the stability ofsunflower oil. International Journal of Food Science and Technology, 102:46-52.
10. Fatehi, M., Saleh, T.M., Fatehi-Hassanabad, Z., Farrokhfal, Kh., Jafarzadeh, M. and Davodi, S. 2005. A pharmacological study on *Berberis vulgaris* fruit extract. Journal of Ethno pharmacology, 102(1): 46–52.
11. Grassmann, J. 2005. Terpenoids as plant antioxidants. Vitam. Horm. 72: 505–535.
12. Hanachi, P., and Golkho, Sh. 2009. Using Hplc todetermination the composition and antioxidant activity of *Berberis vulgaris*. Europian Journals Publishing, 29(1): 47-54.
13. HazlerPilepic, K., Males, Z. and Plazibat, M. 2008. Genetic structure in *Hypericum perforatum* L. Population. Periodicum Biologorum. 110(4): 367–3710.
14. Horwath, A.B., Grayer, R.J., Keith-Lucas, D.M. and Simmonds, M.S.J. 2008. Chemical characterization of wild population of *Thymus* from different climatic regions in southeast Spain. Biochemical Systematics and Ecology, 36:117-133.
15. Kumar A., Jhadwal, N., Lal, M. and Singh, M. 2012. Antibacterial activity of some medicinal plants used against UTI causing pathogens. Journal of Life science and Pharma Research. 4: 278-83.
16. Imanshahidi, M. and Hosseinzadeh, H. 2008. Pharmacological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine. Phytother Res, 22: 999–1012.
17. Maksimovic, M., Vidic, D., Milos, M., Editasolic, M., Abadzic, S. and Siljak-yakovley, S., 2007. Effect of the environmental condition on essential oil profile in two Dinaric Salvia species: S. *brachyodon* Vandas and *S. offecinalis* L. Biochemicl Systematics and Ecology, 35: 437-478.
18. Marzouki, H., Elaissi, A., Khaldi, A., Bouzid, S., Falconieri, D., Marongiu, B., Piras, A. and Porcedda, S., 2009. Seasonal and geographical variation of *Laurus nobilis* L. essential oil from Tunisia. Open Nat. Prod. J., 2: 86-91.
19. Mazandarani, M., Ghasemi, N., Bayat, H., 2013. Investagion of secondary active compounds of medical plant (*Berberis vulgaris* L) and its comparison among different part of the plant in South East of Golestan province. Plant Enviromental Physiology, 8: 59-70.
20. Motalleb, G., Hanachi, P., Kua, S.H., Fauziah, O. and Asmah, R. 2005. Evaluation of phenolic content and total antioxidant activity in *Berberis vulgaris* fruit extract. Journal of Biological Sciences, 5: 648–653.
21. Neel, M.C. and Ellstr N.C. 2003. Conservation of genetic diversity in the endangered plant *Eriogonum ovalifolium* var. *vineum* (Polygonaceae). Journal of Conservation Genetics, 37: 352-354.
22. 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. Journal of BioMed Research International, 5: 241-247.
23. Rezende V.L., Oliveira-Filho A.T., Eisenlohr P.V., Kamino L.H.Y. and Vibrans A.C. 2015. Restricted geographic distribution of tree species calls for urgent conservation eforts in the Subtropical Atlantic Forest. Biodiversity and Conservation 24: 1057-1071.
24. Rounsaville T.J. and Ranney T.G. 2010. Ploidy levels and genome sizes of *Berberis* L. and *Mahonia* nutt. Species, hybrids, and cultivars. Hort science, 45: 1029-1033.

25. Scalzo, J., Mezzetti, B. and Battino, M. 2005. Total antioxidant capacity evaluation: Critical steps for assaying berry antioxidant features. Biofactors, 23: 221–227.
26. Yildiz, H., Ercisli, S., Sengul, M., Topdas, E.F., Beyhan, O., Cakir, O., Narmanlioglu, HK. And Orhan, E. 2014. Some Physicochemical Characteristics, Bioactive Content and Antioxidant Characteristics of Non-Sprayed Barberry (*Berberis vulgaris* L.) Fruits from Turkey. Erwerbs-Obstbau, 56: 123-129.
27. Zarei, A., Changizi-Ashtiyani, S., a Taheri, S. and Ramezani, M. 2015. A quick overview on some aspects of endocrinological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* L. Avicenna J Phytomed, 5 (6): 485-497.
28. Zovko Koncic, M., Kremer, D., Schühly, W., Brantner, A., Karlovic, K. and Kalodera, Z. 2010. Chemical differentiation of *Berberis croatica* and *B. vulgaris* using HPLC fingerprinting. Croatica Chemica Acta, 83: 451–456.
29. 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. Journal of Industrial Crops and Products, 52: 519-527.