زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال دوم، شماره دوم، (پیاپی ۴) تابستان ۱۳۸۹، صفحه ۶۷ -۸۰
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۱/۲۳
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۹/۰۳/۳۱
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۸۹/۰۵/۰۴

تنوع شیمیایی افراد گونهٔ *Astragalus verus* Olivier (Fabaceae)، بر اساس الگوی فلاونوئیدی در غرب ایران

مهتاب عسگری نعمتیان[1*]، مرتضی عطری[2] و عبدالکریم چهرگانی راد[2]
[1] دانشگاه پیام نور مرکز بهار (همدان)
[2] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

چکیده

گون (*Astragalus*) به عنوان بزرگترین جنس گیاهان آونددار به شمار می‌رود. این جنس دارای ۲۵۰۰-۳۰۰۰ گونه و ۲۵۰ بخش است. این بررسی به منظور تعیین و تشخیص تنوع درون گونه‌ای در افراد گونهٔ *Astragalus verus* Olivier از نظر فلاونوئیدها در غرب ایران انجام گرفت. ترکیبات فنلی برگ‌ها در جمعیت‌های مختلف گونهٔ *A. verus* مربوط به ۲۰ زیستگاه مختلف از غرب کشور استخراج و به روش TLC مطالعه گردید و حضور یا فقدان سه استاندارد فلاونوئیدی (فلاوون، کوئرستین و روتین) در آنها بررسی شد. سرانجام داده‌های به دست آمده از مطالعات فلاونوئیدی توسط نرم‌افزارهای MVSP و SPSS به روش‌های WARD و PCA و UPGMA آنالیز شدند. نتایج به دست آمده از مطالعات فلاونوئیدی، تنوع درون گونه‌ای در سطح ترکیبات شیمیایی را نشان داد. گروه‌های مختلف از نظر ترکیبات فنلی برای افراد گونهٔ *A. verus* در غرب ایران از زیستگاه‌های مطالعه شده به دست آمد. این گروه‌ها در زیستگاه‌های مختلف تحت شرایط اکولوژیک متفاوت حضور داشتند. عوامل اکولوژیک مورد مطالعه، شامل: بافت خاک، اسیدیته، هدایت الکتریکی ارتفاع از سطح دریا، طول و عرض جغرافیایی بودند. آنالیز داده‌های اکولوژیک نشان داد در بین عوامل مورد مطالعه، عامل ارتفاع مهمترین نقش را در ایجاد تنوع درون گونه‌ای در غرب کشور دارد.

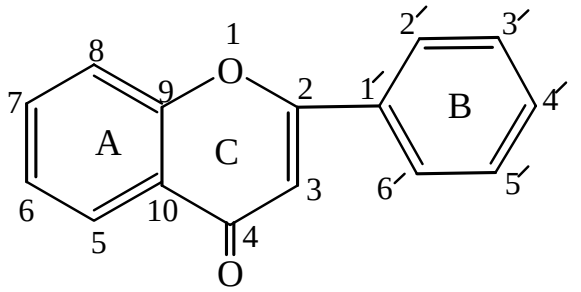
واژه‌های کلیدی: گون، ترکیبات فلاونوئیدی، تنوع درون گونه‌ای

مقدمه

فلاونوئیدها به‌عنوان یکی از بزرگترین گروه ترکیبات طبیعی شناخته می‌شوند. تا به امروز متجاوز از ۴۰۰۰ فلاونوئید شناخته شده است که به‌طور وسیعی در برگ‌ها، دانه‌ها، پوسته و گل‌های گیاهان وجود دارند (Medica-Saric *et al*., 2004). به‌طور خلاصه، فلاونوئیدها بزرگترین گروه ترکیبات طبیعی فنلی در گیاهان هستند و به دلیل حضور آنها در تقریباً همه گروه‌های گیاهی، در بیشتر

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: mahtabasgari@yahoo.com، شماره تماس: ۰۸۱۱-۴۲۲۰۹۱۱

مطالعات مربوط به عصاره‌های گیاهی بررسی می‌شوند و ساختار عمومی همه آنها یک اسکلت ۱۵ کربنه به صورت دو یا سه حلقهٔ متصل به هم است (شکل ۱) (Markham, 1982). اگرچه از این ترکیبات در تمام سطوح رده‌بندی و در اغلب گروه‌های گیاهی می‌توان استفاده نمود، ولی کاربرد آنها در درجهٔ اول در بررسی روابط بین‌گونه‌ای نزدیک و همچنین تنوعات درون‌گونه‌ای حایز اهمیت است (Judd *et al.*, 1999). فلاونوئیدها ترکیبات دی فنیل پروپانوئیدی هستند که تقریباً در همه گیاهان یافت می‌شوند و نقش‌های فراوانی برای این ترکیبات شناخته شده است. در گیاهان عالی فلاونوئیدها دفاع در برابر نور ماوراءبنفش، پاتوژن‌ها، علف‌خواران را سبب می‌شوند. نقش ویژهٔ آنها در گیاهان در ایجاد رنگ و تثبیت نیتروژن در گیاهان است که دارای زندگی همزیستی‌اند. آثار سلامت فلاونوئیدها بیشتر در نتیجه خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و توانایی کلاتهٔ‌کنندگی آنهاست. مطالعات زیادی انجام شده است تا مؤثر بودن فلاونوئیدها به‌عنوان عوامل ضدقارچی، ضدباکتریایی، ضد ویروسی، ضد التهاب، آنتیهٔ‌اکسیدانت، تعادلهٔ‌کنندهٔ ایمنی، و ضد عوامل موتاژن سمّی را به اثبات رساند (Medica-Saric *et al.*, 2004). امروزه بسیاری از ترکیبات مصنوعی و طبیعی فلاونوئیدها برای مقابله با ویروس‌ها و سلول‌های سرطانی استفاده می‌شود. کوئرستین، روتین، پلارگونیدین، لوکوسیانیدن و نارنجینین از ترکیباتی هستند که خاصیت ضد ویروسی دارند. این مواد با خاموش کردن سنتز پروتئین میزبان که توسط ویروس القا شده، عمل بازدارندگی خود را نشان می‌دهند. دخالت احتمالی کوئرستین در فعال کردن و اصلاح پاسخ‌های ایمنی‌شناختی پستانداران که منجر به تولید پروستاگلندین و ممانعت از رشد تومور می‌شود به‌طور کامل تشریح شده است (Middleton and Kandaswami, 1993).



شکل ۱- اسکلت عمومی فلاونوئیدها (Markham, 1982)

مطالعات کموتاکسونومیک به کارهای دوکاندول بر می‌گردد (Hegnauer, 1967). Erdtman (۱۹۵۶) ترکیبات فنلی را در افراد جنس *Pinus* L. مطالعه و از آنها در رده‌بندی و گروه‌بندی گونه‌ها استفاده نمود.

Semmar و همکاران در سال ۲۰۰۵، بر اساس تفاوت الگوهای فلاونوئیدی افراد *Astragalus caprinus* L. چهار کموتیپ از این گونه را معرفی کردند، که این کموتیپ‌ها متعلق به شرایط اکولوژیک و اقلیمی متفاوتی بودند. در بررسی‌های انجام شده بر روی جمعیت‌های مختلف گونهٔ *Artemisia pedemontana* Balb. موجود در زیستگاه‌های مختلف، تنوع ترکیبات شیمیایی آنها به اثبات رسید (Perez-Aloso *et al.*, 2003). تنوع شیمیایی در سطح درون گونه‌ای (کموتیپ) در جمعیت‌های مختلف *Cryptocarya mandioccana* Meissner (Lauraceae) مشخص کرد که هر یک از این کموتیپ‌ها در زیستگاه‌های مختلف تحت شرایط اکولوژیک متنوع حضور داشتند (Telascrea *et al.*, 2006). نتایج مطالعات مذکور شده نشان داد عوامل اکولوژیک نقش مهمی در

ایجاد تنوع درون گونه‌ای دارند. با توجه به اینکه افراد گونهٔ *A. verus* دارای گسترش نسبتاً وسیعی در مناطق مورد بررسی بوده، در زیستگاه‌های مختلف، تحت شرایط اکولوژیک متفاوت قادر به استقرار و بقا هستند، هدف از این مطالعه تشخیص وجود یا فقدان تنوع درون‌گونه‌ای، در افراد گونه مورد نظر در زیستگاه‌های مختلف تحت شرایط اکولوژیک متفاوت است. با توجه به اهمیت فلاونوئیدها به‌عنوان نشانگرهای ژنتیکی مناسب در روشن نمودن قرابت‌ها و تنوع‌های درون‌گونه‌ای و بین گونه‌ای، از این ترکیبات در تعیین تیپ‌های احتمالی موجود در جمعیت‌های متفاوت گونه گیاهی مورد نظر در چند ناحیه از غرب ایران استفاده شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و مناطق جمع‌آوری آنها

با استفاده از منابع موجود و با مراجعه به مراکز تحقیقاتی چهار استان همدان، کرمانشاه، کردستان و اراک و استفاده از هرباریوم‌های آنها، مناطق پراکنش گونه مورد نظر در چهار استان مشخص گردید. سپس مواد گیاهی از ۲۰ زیستگاه مختلف *A. verus* تحت شرایط اکولوژیک متفاوت در چهار استان مورد بررسی جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده، خشک و پرس شده، پس از شناسایی در هرباریوم دانشگاه بوعلی سینا نگهداری شد. در هر زیستگاه، علاوه بر جمع آوری نمونه‌های گیاهی مورد نظر، عوامل اکولوژیک و ادافیک مختلف، از قبیل: طول و عرض جغرافیایی زیستگاه، ارتفاع از سطح دریا، بافت خاک، اسیدیته و هدایت الکتریکی، درصد و جهت شیب بررسی گردید.

جدول ۱- زیستگاه‌های مطالعه شده گونهٔ *A. verus* در غرب ایران

ایستگاه	استان	Voucher number	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (m)
A. verus 1	همدان	7286	N 34° 47' 44"	E 43° 11' 7.1"	2324
A. verus 2	همدان	7287	N 34° 47' 40"	E 43° 11' 34"	2517
A verus 3	همدان	7288	N 34° 47' 45"	E 43° 11' 34"	2408
A. verus 4	همدان	7289	N 34° 47' 44"	E 43° 11' 33"	2305
A. verus 5	همدان	7290	N 34° 47'42"	E 48° 11' 42"	2216
A. verus 6	همدان	7291	N 34° 47' 40"	E 48° 11' 42"	2350
A. verus 7	همدان	7292	N 34° 43' 29"	E 43° 26' 15"	2563
A. verus 11	همدان	7293	N 34° 14' 00"	E 43° 04' 31"	1723
A. verus 14	همدان	7294	N 35° 22' 36"	E 43° 55' 45"	2024
A. verus 15	همدان	7295	N 35° 22' 37"	E 48° 55' 46"	2015
A. verus 20	همدان	7296	N 34° 37' 54"	E 48° 17' 45"	1898
A. verus 23	همدان	7297	N 34° 45' 13"	E 48° 29' 22"	1750
A. verus 24	همدان	7298	N 34° 45' 19"	E 48° 29' 19"	1800
A. verus 30	کرمانشاه	7299	N 34° 17' 00"	E 46° 56' 00"	1640
A. verus 31	کرمانشاه	7300	N 34° 17' 00"	E 46° 15' 00"	1850
A. verus 32	کرمانشاه	7301	N 34° 14' 00"	E 46° 15' 00"	2600
A. verus 37	کردستان	7302	N 35° 1.7' 00"	E 46° 56' 00"	1800
A. verus 38	همدان	7303	N 34° 4.3' 00"	E 49° 36' 00"	2550
A. verus 39	همدان	7304	N 34° 4.3' 00"	E 49° 36'.7 00"	1650
A. verus 41	همدان	7305	N 33° 53.3' 00"	E 49° 32.8' 00"	1680

آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی به منظور استخراج فلاونوئیدها

ابتدا نمونه‌های گیاهی هر جمعیت، خشک گردید. به علت حساس بودن فلاونوئیدها به افزایش دما، عمل خشک شدن نمونه‌های گیاهی در دمای پایین و سایه، انجام شد. سپس برگ‌های خشک شده هر تاکسون جدا و در پاکت‌های کاغذی مخصوص به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های انتخاب شده از هر نظر سالم و دور از هر گونه آلودگی قارچی، میکروبی، نکروز و ... بودند. سپس برگ‌ها خُرد و در ظروف پلاستیکی در دمای $4^{\circ}C$ و دور از رطوبت نگهداری شدند.

استخراج فلاونوئیدها

۵۰۰ میلی‌گرم پودر برگ خشک شده از هر نمونه گیاهی در ارلن ۲۵ میلی‌لیتری ریخته شد و ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۹۹٪ به آن اضافه گردید. ارلن‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در اولترا سونیک با دور بالا قرار داده شدند. عصاره‌های حاصل با کاغذ صافی، صاف و برای آنالیز با TLC در یخچال نگهداری شدند (Pereira *et al.*, 2004).

کروماتوگرافی به روش TLC

در این تحقیق، از صفحات آماده 25 Feuilles d aluminium CCM (20×20) Gel de silice 60 F_{254} (Merck) استفاده شد. این صفحات پس از لکه‌گذاری با سرنگ هامیلتون در تانک‌های مخصوص کروماتوگرافی محتوی ۴۰-۶۰ میلی‌لیتر فاز متحرک قرار داده شدند. کروماتوگرافی به‌روش صعودی انجام شد و زمانی که جبهه حلال حدود ۱۴ سانتی‌متر از محل لکه‌گذاری (مبدأ) بر روی صفحات پیشروی نمود، آنها را از تانک خارج نموده، شیوهٔ جداسازی مواد، تعداد نوارها و لکه‌های تشکیل شده و همچین رنگ آنها در نور مرئی و UV-366nm قبل و بعد از اسپری نمودن با معرف‌ها مطالعه شد. R_f هر یک از لکه‌ها نیز به‌روش زیر محاسبه گردید (Medica- Saric *et al.*, 2004).

$$R_f = \frac{\text{فاصله لکه از مبدأ}}{\text{فاصله جبهه حلال از مبدأ}}$$

برای مطالعه مقایسه‌ای فلاونوئیدهای برگ، در جمعیت‌های گونه مورد مطالعه به روش کروماتوگرافی یک بعدی، از حلال‌های مختلف استفاده شد که در جدول ۲ آورده شده است. در نهایت، حلالی که به‌طور نسبی برای گونه مورد مطالعه، تفکیک مناسبی را ارایه نمود، انتخاب گردید. تفکیک عصاره‌های فلاونوئیدها به کمک فاز متحرک BAW (شامل: بوتانول نرمال ـ استیک اسید ـ آب مقطر به نسبت ۴:۱:۵) حاصل شد. بعد از خاتمه کروماتوگرافی، هر یک از کروماتوگرام‌ها با معرف دی فنیل بوریک اسید اتانول آمین استر اسپری شدند. بعد از خشک شدن، رنگ و Rf لکه‌های ایجاد شده در نور سفید و UV- 366 nm بررسی شدند (Medica- Saric *et al.*, 2004).

مطالعه عوامل اکولوژیک

ضمن جمع‌آوری داده‌های فلوریستیک، داده‌های اکولوژیک زیستگاه‌های مورد مطالعه *A. verus* جمع‌آوری شدند. موقعیت هر زیستگاه توسط دستگاه GPS مشخص گردید. سپس داده‌های اکولوژیک جمع‌آوری شده از هر زیستگاه در فرم‌های ویژه‌ای وارد گردید. از بین داده‌های

اکولوژیک جمع‌آوری شده، از قبیل: ارتفاع، جهت شیب، درصد شیب، pH، EC و بافت خاک برخی از آنها، از جمله: ارتفاع، pH، EC و بافت خاک مطالعه و بررسی شدند. نمونه خاک زیستگاه‌ها از عمق ۳۰ سانتی‌متری جمع‌آوری شد و در آزمایش‌های مربوط به خاک، ۱۰ گرم خاک در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و به مدت نیم الی یک ساعت با همزن مخلوط گردید. سپس سوسپانسیون بدست آمده چند دقیقه ساکن ماند تا ته‌نشین شود و محلول رویی توسط pH متر (مدل Gen Way) و EC خاک از عصاره صاف شده همان سوسپانسیون توسط هدایت‌سنج (مدل Gen Way) و بافت خاک توسط هیدرومتر تعیین و اندازه‌گیری شد.

جدول ۲- نام و ترکیب مجموعه‌ای از حلال‌ها که به‌عنوان فاز متحرک در تجربیات TLC به‌کار برده شده‌اند (Markham, 1982; Wagner and Bladt, 1996).

نام حلال	ترکیب حلال	کاربرد
BAW	بوتانول نرمال ـ استیک استیک ـ آب مقطر (۴:۱:۵) پس از مخلوط کردن سریع در یک دکانتور ریخته و فاز بالایی استفاده شد.	مناسب برای جداسازی گلیکوزیدهای و آگلیکوزیدها
EFAW	اتیل استات ـ فرمیک اسید ـ استیک اسید گلاسیال ـ آب مقطر (۲۶:۱۱:۱۱:۱۰۰)	تفکیک گلیکوزیدها
TBA	tert ـ بوتانول ـ استیک اسید گلاسیال ـ آب مقطر (۱:۱:۳)	تفکیک مناسب آگلیکوزیدها و گلیکوزیدها
Forestal	کلریدریک اید غلیظ ـ استیک اسید گلاسیال ـ آب مقطر(۱۰:۳۰:۳)	جداسازی فلاوون و فلاوونول آگلیکون‌ها
AcOH 50%	استیک اسید گلاسیال ـ آب مقطر(۱:۱)	تفکیک آگلیکون‌ها
AcOH 15%	استیک اسید گلاسیال ـ آب مقطر(۸۵:۱۵)	تشخیص منو، دی و تری گلیکوزیدها
AcOH 2%	استیک اسید گلاسیال ـ آب مقطر(۴۹:۱)	مناسب برای تشخیص پلی گلیکوزیدها و اسیدهای فنلی
H_2O	آب مقطر	مناسب برای تشخیص O و C - گلیکوزیدها

تحلیل داده‌ها

در این مرحله، ابتدا حضور یا غیاب لکه‌های مشاهده شده روی کروماتوگرام مربوط به کروماتوگرافی لایه نازک TLCبرای جمعیت‌های مختلف گونه مورد مطالعه به دست آمد. سپس با استفاده از نرم‌افزار SPSS به روش‌های WARD و PCA و همچنین نرم‌افزار MVSP به روش UPGMA آنالیز داده‌های فیتوشیمیایی انجام شد. آنالیز داده‌های اکولوژیک هم با استفاده از نرم‌افزار MVSP و Anaphyto ver. 95 با روش‌های CCA و FCA انجام شد.

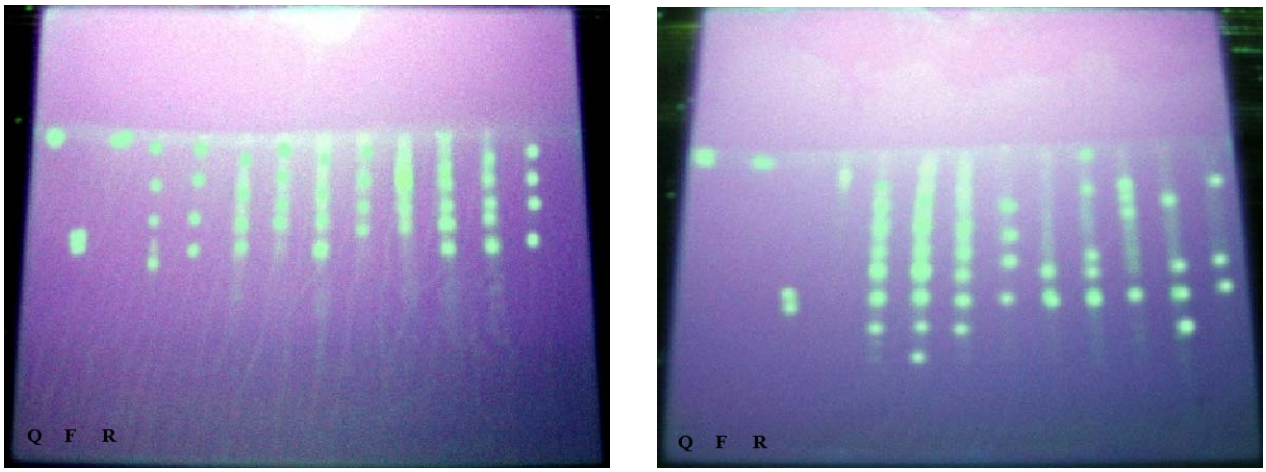
نتایج

نتایج حاصل از مطالعات فلاونوئیدی

مطالعات فلاونوئیدی به منظور تعیین سطح و نوع تنوع درون گونه‌ای انجام شد. کروماتوگرام‌های به دست آمده، نوارها و لکه‌های فلاونوئیدی مختلف را با کیفیت متفاوت در افراد *A. verus* نشان دادند (شکل ۲). باندهای مختلف فلاونوئیدی و R_f آنها اندازه‌گیری شدند. نتایج آنها در جدول ۳ نشان داده شده است. سپس داده‌های فلاونوئیدی آنالیز شد. گروه‌های به دست آمده از آنالیز داده‌های فلاونوئیدی تنوع درون گونه‌ای را در حد تنوع ترکیبات

شیمیایی (کموتیپ) نشان می‌دهند. مطابق این نتایج، می‌توان گروه‌های مختلف فلاونوئیدی را برای *A. verus* در غرب ایران معرفی کرد. این گروه‌ها به لحاظ کمیت، کیفیت و R_f باندهای فلاونوئیدی متفاوتند. همچنین در بین سه استاندارد فلاونوئیدی مورد مطالعه کوئرستین، روتین و فلاون، استاندارد فلاون بیشتر از دو مورد دیگر در جمعیت‌های مختلف گونه مورد نظر مشاهده شد، اما با توجه به تنوع بالای ترکیبات فنلی دیگر در این جمعیت‌ها، آنالیز داده‌های فلاونوئیدی و گروه‌بندی آنها بر اساس کلیه ترکیبات فنلی موجود انجام گرفت. گروه‌های به دست آمده به شرح زیر است:

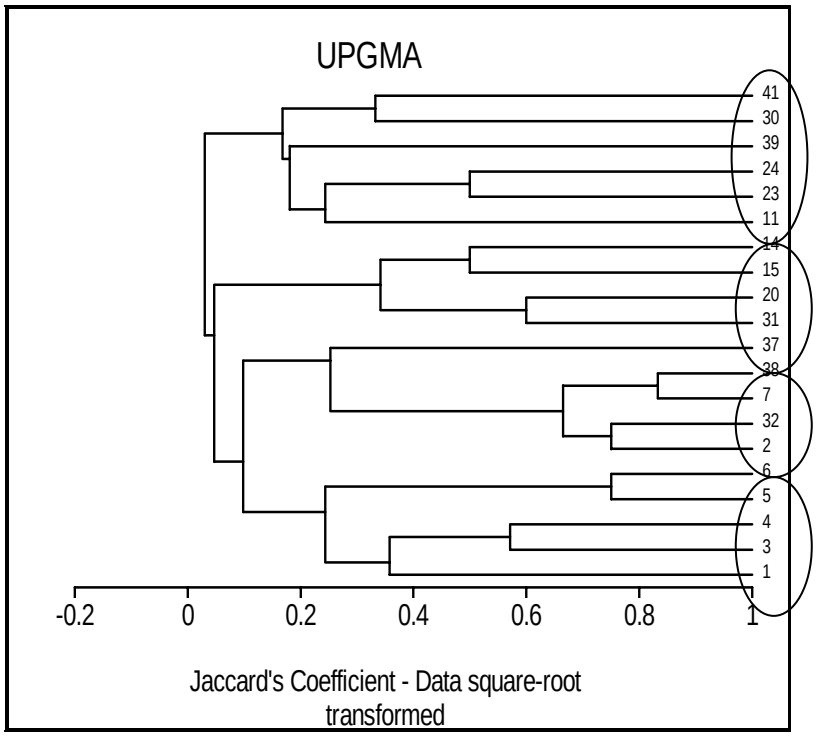
گروه A شامل جمعیت‌های شماره (۱۱، ۲۳، ۲۴، ۳۰، ۳۹ و ۴۱)، گروه B شامل جمعیت‌های شماره (۱۴، ۱۵، ۲۰، ۳۱ و ۳۷)، گروه C شامل جمعیت‌های شماره (۲، ۷، ۳۲ و ۳۷) و گروه D شامل جمعیت‌های شماره (۱، ۳، ۴، ۵ و ۶) هستند (شکل‌های ۳ و ۴ و ۵). این گروه‌بندی بر اساس تشابه و تفاوت در باندهای فلاونوئیدی آنها انجام گرفته است. بر اساس این نتایج می‌توان چهار گروه فلاونوئیدی متنوع از جمعیت‌های مختلف *A. verus* در زیستگاه‌های متفاوت از غرب ایران را معرفی نمود. گروه‌های به دست آمده از آنالیز داده‌های فیتوشیمیایی به روش‌های UPGMA و PCA (شکل‌های ۳ و ۴) با گروه‌های به دست آمده از آنالیز همان داده‌ها به روش Ward (شکل ۵) همپوشانی و تطابق خوبی دارند و چهار گروه فیتوشیمیایی را نشان می‌دهند.



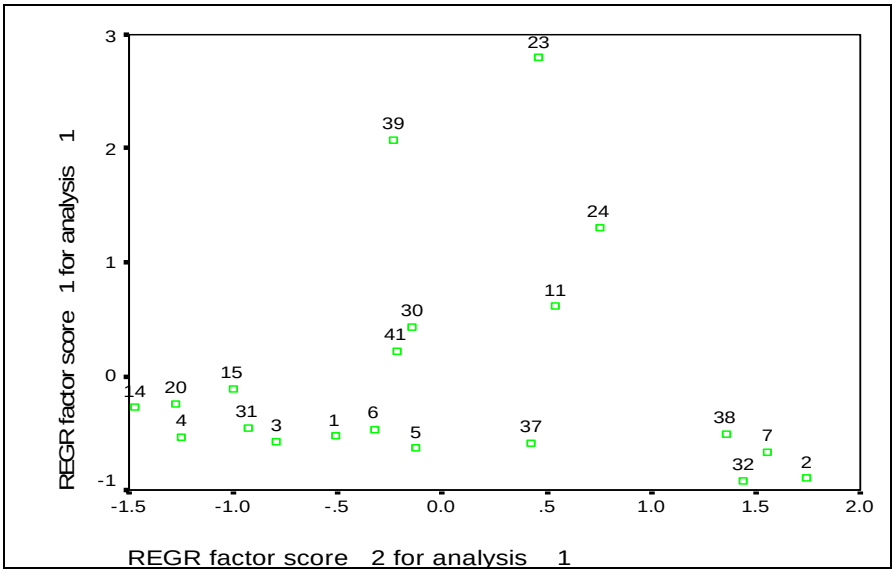
شکل ۲- کروماتوگرام‌های حاصل از TLC یک بعدی عصاره فلاونوئید گلیکوزیدی برگ جمعیت‌های مختلف *A. verus* در حلال BAW و استانداردهای فلاونوئیدی کوئرستین (Q)، روتین (R) و فلاوون (F).

جدول ۳- حضور و فقدان لکه‌های فلاونوئیدی روی کروماتوگرام حاصل از TLC یک بعدی مربوط به برگ جمعیت‌های مختلف *A. verus*، همان‌طور که مشاهده می‌شود R_f جمعیت‌های مختلف متفاوتند.

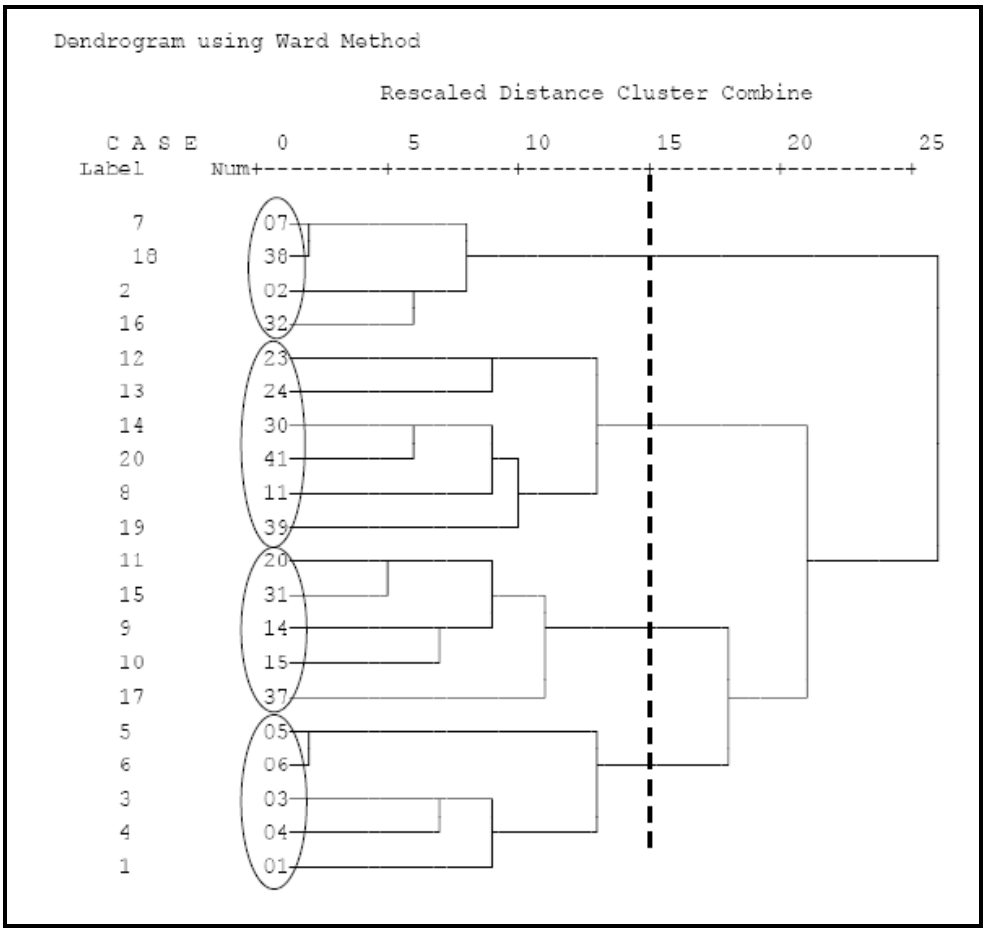
R_f	1	2	3	4	5	6	7	11	14	15	20	23	24	30	31	32	37	38	39	40
27.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
32.1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
39.2	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
40.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
41.4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1
42.8	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47.1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
50.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
51.4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
53.5	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
55.7	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
57.1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
58.5	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
60.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
64.2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
65.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
67.8	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
71.4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
75	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
78.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
82.1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
85.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
90.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
97.8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



شکل ۳- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای مطالعات فلاونوئیدهای گلیکوزیدی (آنالیز) TLC به روش UPGMA با ضریب Jaccard در جمعیت‌های مختلف *A. verus*. چهار گروه شیمیایی قابل تشخیص است.



شکل۴- آنالیز داده‌های فلاونوئیدی حاصل از TLC در جمعیت‌های *A. verus* با روش PCA



شکل ۵- آنالیز داده‌های فلاونوئیدی جمعیت‌های *A. verus* به روش Ward

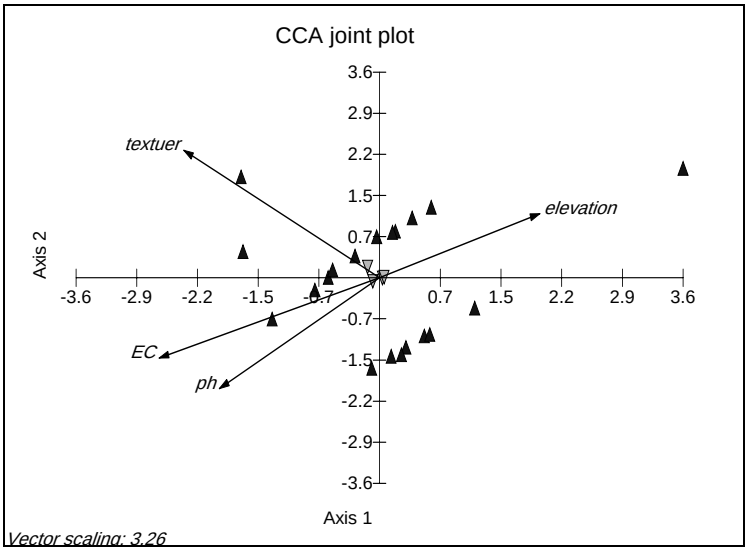
نتایج حاصل از مطالعات اکولوژیک

در بین عوامل اکولوژیک جمع‌آوری شده، شامل: ارتفاع، pH، EC، بافت خاک، جهت شیب، درصد شیب و طول و عرض جغرافیایی، برخی از آنها از قبیل pH، EC و بافت خاک در آزمایشگاه مورد آزمایش و اندازه‌گیری قرار گرفتند(جدول ۵) و نتایج حاصل از آنها با نرم‌افزارهای Anaphyto ver. 95 و MVSP به روش‌های FCA و CCA آنالیز شدند. مقایسه نتایج به دست آمده از آنالیز فاکتورهای اکولوژیک روی محورهای چند گانه مشخص نمود (شکل‌های ۶ و ۷)، بین عوامل اکولوژیک مطالعه شده، عامل ارتفاع مهمترین نقش را در تفکیک و گروه‌بندی زیستگاه‌ها دارد (شکل ۶). این نتایج به طبقه‌بندی زیستگاه‌های ویژه در چهار دامنه ارتفاع منجر گردید (شکل ۷). گروه‌بندی زیستگاه‌های ویژه بر اساس گروه‌بندی ارتفاع به شرح ذیل است: گروه ۱ شامل زیستگاه‌های ویژه شماره ۱۱، ۲۳، ۲۴، ۳۰، ۳۹ و ۴۱ است. دامنهٔ ارتفاعی این زیستگاه‌ها بین ۱۶۰۰-۱۸۵۰متر، با جهت شیب شمال- غربی، pH آنها بین ۷/۹-۸/۳، بافت خاک Sandy clay loam، Clay loam و Sandy loam.

گروه ۲ شامل زیستگاه‌های ویژه شماره ۱۴، ۱۵، ۲۰، ۳۱و ۳۷ است. دامنه ارتفاعی این زیستگاه‌ها بین ۱۸۵۰-۲۲۰۰ متر، با جهت شیب شمال- غربی، pH آنها بین ۷/۹-۸/۳، بافت خاک Sandy clay loam و Sandy loam.

گروه ۳ شامل زیستگاه‌های ویژه شماره ۱، ۳، ۴، ۵ و ۶ است. دامنه ارتفاعی این زیستگاه‌ها بین ۲۲۰۰-۲۴۰۰ متر، با جهت شیب شمال- غربی، pH آنها بین ۷/۱-۸/۰، بافت خاک Sandy clay loam و Sandy loam.

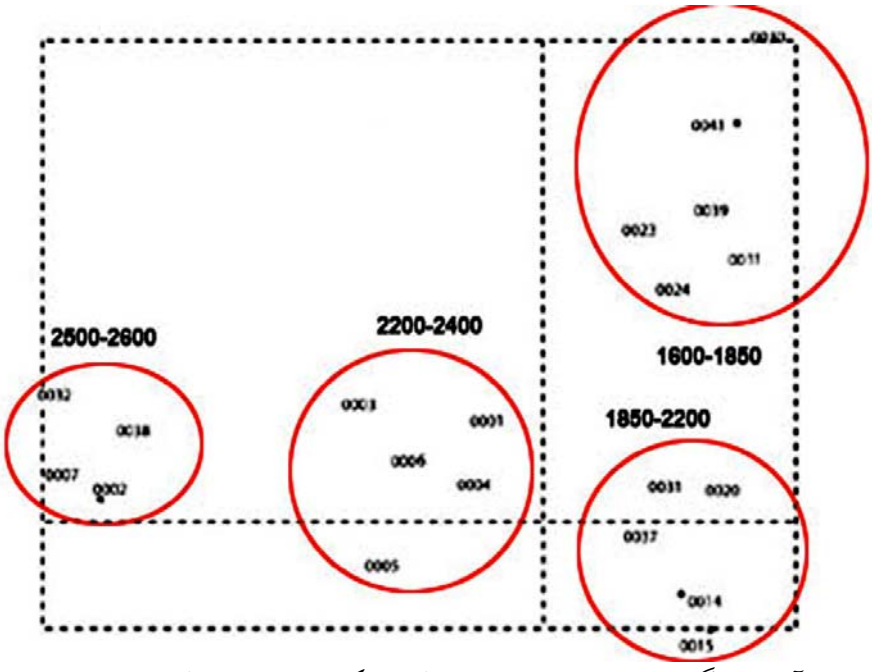
گروه ۴ شامل زیستگاه‌های ویژه شماره ۲ ، ۷، ۳۲ و ۳۸ است. دامنهٔ ارتفاعی این زیستگاه‌ها بین ۲۵۰۰-۲۶۰۰ متر، با جهت شیب شمال- غربی، pH آنها بین ۷/۸-۸/۱، بافت خاک loamy Sandy و Sandy loam.



شکل ۶- نتایج حاصل از آنالیز داده‌های اکولوژیک به روش CCA. همان‌طور که مشاهده می‌شود، اکثر زیستگاه‌های ویژه در امتداد محور عامل اکولوژیک ارتفاع از سطح دریا قرار گرفته‌اند.

جدول شماره ۵- نتایج حاصل از آنالیز داده‌های خاک‌شناسی مربوط به زیستگاه‌های مختلف *A. verus*

Stations	Texture of soil	%Clay	%Silt	%Sand	EC	pH
1	Sandy clay Loam	21.3	25.9	52.8	7.27	7.1
2	Sandy Loam	17.2	24.1	48.7	49.8	8
3	Sandy Loam	17.2	25.1	42.7	50.8	8
4	Sandy Loam	16.3	25.9	57.8	54.74	7.6
5	Sandy Loam	16.3	25.9	57.8	55.73	7.4
6	Sandy Loam	7.18	40.92	51.9	44.85	7.7
7	Loamy Sandy	12.2	4.1	83.7	38.92	7.8
11	Sandy Clay Loam	26.3	15.9	57.8	102.2	8.1
14	Sandy Clay Loam	22.1	10.9	67	118	7.9
15	Sandy Clay Loam	29.9	29.1	31	84.41	8.2
20	Sandy Loam	15.8	12.8	71.4	106.2	8.1
23	Clay Loam	32.2	25.9	41.9	95.29	8
24	Sandy Clay Loam	32.2	5	62.8	104.2	7.9
30	Sandy Loam	14.9	24.1	61	92.32	8.1
31	Sandy Clay Loam	29.3	20.9	52.8	136.8	8.1
32	Sandy Loam	17.2	15	67.8	106.2	8
37	Sandy Clay Loam	24.9	19.1	56	72.54	8
38	Sandy Loam	27.2	30	42.8	56.72	8.1
39	Sandy Clay Loam	27.2	24.1	48.7	71.55	8.3
41	Sandy Clay Loam	27.2	25.1	48.7	68.55	8.3



شکل ۷- گروه‌های حاصل از آنالیز زیستگاه‌های *A. verus* بر اساس عامل اکولوژیک ارتفاع. همانطور که مشاهده می‌شود، زیستگاه‌های ویژه بر اساس دامنهٔ ارتفاعی در چهار گروه قرار می‌گیرند که این چهار گروه ارتفاعی دارای همپوشانی خوبی با گروه‌های فلاونوئیدی هستند.

بحث و نتیجه‌گیری

تنوع زیستی هر منطقه ظرفیت زیستی آن منطقه را نشان می‌دهد. یکی از ذخایر مهمی که منجر به تنوع زیستی می‌شود، تنوع درون گونه‌ای و بین گونه‌ای است. ایجاد تنوع درون گونه‌ای و بین گونه‌ای در هر منطقه‌ای، منشأ اصلی گونه‌زایی آن منطقه است و می‌تواند سبب غنای گونه‌ای آن منطقه شود. بنابراین شناخت تنوع درون گونه‌ای و بین گونه‌ای در هر منطقه، به منظور شناخت تنوع زیستی هر منطقه بسیار مهم است (Atri and Asgari Nenatian, 2009). همچنین تنوع زیستی برای عملکرد اکوسیستم، می‌تواند مفید باشد و به عنوان عامل حفاظتی اکوسیستم در مقابل آشفتگی و اختلال و تغییرات محیطی محسوب گردد (Atri and Asgari Nenatian, 2009). نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که جمعیت‌های مطالعه شده گونهٔ *A.verus* در غرب ایران، دارای تنوع شیمیایی هستند که این تنوع درون گونه‌ای می‌تواند ناشی از تفاوت شرایط اکولوژیک زیستگاه‌های آنها باشد. به عبارت دیگر، عوامل اکولوژیک متفاوت در زیستگاه‌های مختلف، آثار مهم، اما متفاوتی در ایجاد تنوع درون گونه‌ای دارند. در این راستا Callaghan و همکاران (۲۰۰۴) اظهار کردند که افراد یک گونه به عنوان واحدهای اصلی اکوسیستم هستند که به تغییرات شرایط محیطی پاسخ می‌دهند. همچنین Atri و همکاران (۲۰۰۷) بیان کردند که عوامل اکولوژیک، نقش مهمی در ترکیب فلوریستیک و ریختار هر منطقه ایفا می‌کند. هر گونه تغییر در فاکتورهای اکولوژیک منطقه می‌تواند به تغییراتی در ترکیب فلوریستیک و یا حتی ریختارهای گیاهی آن منطقه منجر شود، به طوری‌که نتایج به دست آمده از مطالعات فیتوشیمیایی، چهار گروه متفاوت به لحاظ ترکیبات فلاونوئیدی را نشان می‌دهد. این گروه‌بندی بر اساس تشابه و تفاوت باندهای فلاونوئیدی و R_f جمعیت‌های مختلف گونهٔ *A. verus* در غرب ایران انجام گرفت. بر اساس این نتایج، می‌توان چهار گروه متفاوت فلاونوئیدی گونه مورد مطالعه، متعلق به زیستگاه‌های مختلف در غرب کشور را معرفی نمود. این چهار گروه به لحاظ کمّیت و کیفیت ترکیبات فلاونوئیدی متفاوتند. چهار گروه حاصل از آنالیز داده‌های فلاونوئیدی به روش UPGMA، توسط روش‌های PCA و Ward هم تایید می‌شوند که گروه‌ها در چهار دامنه ارتفاعی ۱۶۰۰-۱۸۵۰ متر و ۱۸۵۰-۲۲۰۰ متر و ۲۲۰۰-۲۴۰۰ متر و ۲۵۰۰- ۲۶۰۰ متر قرار می‌گیرند. کمترین و بیشترین دامنه ارتفاع به ترتیب ۱۶۰۰ و ۲۶۰۰ متر است. بر اساس این نتایج می‌توان اظهار کرد، در بین داده‌های اکولوژیک مورد مطالعه، ارتفاع، عامل مهمی در ایجاد تنوع شیمیایی درون گونه‌ای در افراد گونه مورد بررسی در زیستگاه‌های مورد مطالعه است. از سوی دیگر، در بررسی گونه‌های گیاهی باید در نظر داشت که هیچ گونه گیاهی در هیچ زیستگاهی به طور تصادفی بقا نمی‌یابد (عطری، ۱۳۷۸).

با توجه به اینکه هر زیستگاهی دارای ترکیبی از عوامل بوم‌شناختی ویژه خود است، بر اثر عوامل اکولوژیک خاص حاکم بر آن، ترکیب گونه‌ای ویژه‌ای را می‌پذیرد. بنابراین، نقش و اهمیت عوامل اکولوژیک روی ترکیب رُستنی‌ها و روابط دو جانبه آنها در یک زیستگاه مشخص می‌شود. پس تنوع و تغییر عوامل اکولوژیک و تأثیر پدیده‌هایی چون بر هم کنش و جایگزینی عوامل اکولوژیک، باعث به وجود آمدن شرایط اکولوژیک مختلف و در نتیجه، ایجاد

زیستگاه‌های متفاوت در یک منطقه می‌شود (عطری، ۱۳۷۸). بنابراین، مطالعه معیارهای اکولوژیک در ایجاد تنوع در زیستگاه‌های متفاوت یک منطقه امری ضروری است. بر همین اساس سعی شد تا در بررسی و تعیین تنوع درون گونه‌ای به صورت تنوع شیمیایی، از معیارهای اکولوژیک هم در مرحله جمع‌آوری داده‌های گیاهی استفاده شود. همچنین، به نظر می‌رسد که الگوهای فنلی متابولیت‌های فلاونوئیدی، نشانگرهای مناسب در جهت درک روند تنوع زیستی به شکل تنوع درون گونه‌ای در نتیجه شرایط مختلف ژئوگرافیک و اکولوژیک هستند.

منابع

عطری، م. (۱۳۷۸) برداشتی نوین از عوامل اکولوژیک و تقسیم‌بندی آنها در بررسی پوشش‌های گیاهی. مجله زیست‌شناسی ایران، ۸: ۱-۴.

Atri, M. and Asgari Nematian, M. (2009) HPLC analysis of flavonoids of *Astragalus gossypinus* (Fabaceae), as a medicinal plant in the west of Iran. Planta medica 75: 877-1094.

Atri, M., Kalvandi, R. and Sefidkon, F. (2007) Introduction of DSS (Determination of Special Station) method for discrimination of intra specific diversity with mention of *thymus eriocalyx* study in Iran. 1st National Plant Taxonomy Conference of Iran, Tehran.

Callaghan, T.V., Björn, L. O., Chernov, Y., Chapin, I. F. S., Christensen, T. R., Huntley, B., Ims, R. A., Jolly, D. J., ohansson, M., Jonasson, S., Matveyeva, N., Panikov, N., Oechel, W. C., Shaver, G. R., Elster, J., Henttonen, H., Laine, K., Taulavuori, K., Taulavuori, E. and Zöckler, C. (2004) Climate change and UV-B impacts on arctic tundra and polar desert ecosystems: Biodiversity, distributions and adaptations of arctic species in the context of environmental change. Ambio 33: 404-417.

Erdtman, H. (1956) Organic chemistry and conifer taxonomy. In: Perspectives in Organic Chemistry (ed. Alexander, T.) 453- 494. Interscience, New York.

Hegnauer, R. (1967) Chemical characters in plant taxonomy: some possibilities and limitations. Pure Applied Chemistry 14:174-187.

Judd, W., Campbell, C. S., Kellogg, E. A. and Stevens, P. F. (1999) Plant systematics, phylogenetic approach. Sinauer Association, Mssachusetts.

Markham, K. R. (1982) Techniques of flavonoid identification. Academic Press, London.

Medica-Saric, M., Jasprica, I., Smolcic-Bubalo, A., Mornar, A. (2004) Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoids and phenolic acids. Croatica Chemica Acta 77(1-2): 361--366.

Middleton, J. R. E. and Kandaswami, C. (1993) The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, in flammation and cancer. In: The flavonoids, Advances in research since 1989 (ed. Harborne, J. B.) 125-164. Springer Verlag, Berlin.

Perez-Alonso, M. J., Velasco-Negueruela, A., Palá-Paúla, J. and Sanzb, J. (2003) Variations in the essential oil composition of *Artemisia pedemontana* gathered in

Spain: chemotype camphor-1,8-cineole and chemotype davanone. Biochemical Systematics and Ecology 31(1): 77-84.

Pereira, C. A. M., Yariwake, J. H., Lancas, F. M., Wauters, J. N., Tits, M. and Angenot, L. (2004) A HPLC decsitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnate* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. Phytochemical Analysis 15:241-248.

Semmar, N., Jay, M., Farman, M. and Chemli, R. (2005) Chemotaxonomic analysis of *Astragalus caprinus* (Fabaceae) based on the flavonic patterns. Biochemical Systematics and Ecology 33: 187-200.

Telascrea, M., de Araújo, C. C., Marques, M. O. M., Facanali, R., Moraes, P. L. R. and Cavalheiro, A. J. (2006) Essential oil from leaves of *Cryptocarya mandioccana* Meisner (Lauraceae): Composition and intraspecific chemical variability. Biochemical Systematics and Ecology 35(4): 222-232.

Wagner, H. and Bladt, S. (1996). Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas. Springer, Berlin.

Chemical variation of *Astragalus verus* Olivier (Fabaceae) according to flavonoid pattern in the West of Iran

Mahtab Asgari Nematian [1*], Morteza Atri [2] and Abdolkarime Chehregani Rad [2]

[1] Department of Biology, Payame Noor University, Hamedan
[2] Department of Biology, Faculty of Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan

Abstract

Astragalus is the largest genus of vascular plants. This genus has 2500-3000 species and 250 sections. In regard to economic and medicinal importance of *Astragalus* genus, this study, was carried out to determine and to distinguish of intraspecific diversity in phenolic components of *Astragalus verus* in the west of Iran. For this reason, leave phenolic components belonging to 20 different stations were extracted and analyzed by TLC (Thin Layer Chromatography), to examine the presence or absence of three flavonoidic standards, such as flavones, quercetine and rutin. Finally, data of flavonoid studies were analyzed by MVSP (Multivariate Statistical Package) and SPSS (Statistical Package for the Social Science) softwares with WARD, PCA (Principle Component Analysis) and UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) methods. Results of flavonoid studies showed intraspecific diversity in chemical components (chemotype) level. The results showed different phenolic groups of *Astragalus verus* from different stations with different ecological conditions. The studied ecological factors included soil texture, pH, EC, elevation, latitude and longitude. Ecological data analysis showed that, among studied ecological factors, elevation from sea level has the most important role in observed intraspecisic diversity of *Astragalus verus* in the west of Iran.

Key words: *Astragalus*, Phenolic components, Intraspecific diversity

*Corresponding Author: mahtabasgari@yahoo.com