

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی میزان تغییرات خصوصیات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی
جمعیت‌های مختلف پولک (*Stachys inflata* Benth.) در استان همدان

مهتاب صالحی^{۱*} - رمضان کلوندی^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۲۱

چکیده

پولک (*Stachys inflata* Benth.) گیاه دارویی متعلق به تیره نعنائیان، در طب سنتی و بومی کاربرد گسترده‌ای دارد. این پژوهش، به‌منظور بررسی میزان تغییرات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی هفت جمعیت گیاه پولک در مناطق مختلف استان همدان به اجرا درآمد. جمعیت‌ها از مناطق قاضی‌خان، آوزرمان، اکباتان، اسدآباد، ازناوله، کوهانی و گاماسیاب جمع‌آوری گردید. صفات مورفولوژیکی شامل ارتفاع بوته، طول و عرض برگ، طول و عرض براکته و گلچه، طول گل آذین و طول میانگره، وزن تر و خشک شاخه گلدار، وزن تر و خشک برگ و گل و قطر ساقه و تعدادی از صفات فیتوشیمیایی شامل درصد اسانس و محتوای فنل و فلاونوئید مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد بیش‌ترین میزان اسانس مربوط به جمعیت‌های آوزرمان، ازناوله و کوهانی (۰/۲ درصد حجمی - وزنی) و کم‌ترین میزان اسانس مربوط به جمعیت اسدآباد (۰/۱۱ درصد حجمی - وزنی) بود. اگرچه ۲۲ ترکیب در اسانس شناسایی شد، اما تنوع زیادی در اجزای تشکیل‌دهنده اسانس در جمعیت‌های مورد مطالعه وجود داشت. جمعیت منطقه آوزرمان، بیش‌ترین میزان فنل کل (۱۴۱/۹ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره) و فلاونوئید (۱۰۹/۴ میلی‌گرم روتین در گرم عصاره) را داشت. براساس نتایج تجزیه کلاستر، هفت جمعیت مورد مطالعه در دو گروه جداگانه قرار گرفتند. در این مطالعه، بیشترین اسانس از جمعیت‌هایی به دست آمد که از مناطق دارای کمترین ارتفاع از سطح دریا (آوزرمان، کوهانی و ازناوله) جمع‌آوری شده بودند. خاک این مناطق دارای فسفر بیشتری بود، بنابراین براساس نتایج حاصله، عوامل محیطی نیز همانند عوامل ژنتیکی در ایجاد تنوع در خصوصیات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی این گیاه مؤثر بوده‌اند.

واژه‌های کلیدی: اسانس، فسفر، فلاونوئید، فنل کل

مقدمه

جمله رویشگاه‌های طبیعی این گونه، کشور ایران می‌باشد. این گونه در مناطق مختلف استان همدان، پراکنش وسیعی دارد (۱۰). آب و هوای استان همدان به‌علت وجود کوه‌های مرتفع، رودخانه‌ها و پستی و بلندی‌های زیاد، بسیار متنوع می‌باشد. این تنوع آب و هوایی به همراه نوع خاک، ارتفاع و سایر شرایط محیطی، موجب شده است تا انواع پوشش‌ها و گونه‌های متفاوت گیاهی در نقاط مختلف استان مشاهده شود (۲۴). انعطاف‌پذیری ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی، سبب تنوع و تغییر تدریجی آنها در مناطق مختلف جغرافیایی شده و جمعیت‌های یک گونه را به‌وجود می‌آورد که از نظر صفات نمودی، فیزیولوژیکی، شیمیایی، بوتانیکی و نهایتاً ژنتیکی از یکدیگر متمایز می‌باشند (۱۷). از مهم‌ترین خصوصیات ویژه یک برنامه اصلاحی در درون جامعه گیاهی، بررسی وجود تنوع ژنتیکی است (۹). تأثیر عوامل محیطی بر تولید مواد مؤثره دارویی، مسئله بسیار پیچیده‌ای است و این عوامل از جمله نور، آب و هوا، خشکی محیط، ارتفاع از سطح دریا و عوامل خاک می‌توانند بر مقدار کل ماده مؤثره، اجزای اسانس و

جنس *Stachys* از خانواده نعنائیان (Lamiaceae) با حدود ۳۰۰ گونه در دنیا، پراکندگی وسیع و اثرات درمانی متعددی دارد (۲۱). در طب سنتی، گونه‌هایی مانند *S. schtschegleevii* و *S. inflata* Benth. با نام محلی پولک شناخته می‌شوند و در آذربایجان شرقی، به عنوان داروی ضد عفونت‌های ریوی و در بیماری‌های التهابی استفاده می‌گردند (۱۶). گونه *S. inflata* Benth. از پراکندگی فراوانی در سراسر جهان و به‌طور خاص در منطقه مدیترانه برخوردار است و از

۱- استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشگاه نهاوند

*- نویسنده مسئول: (Email: mhtb.salehi@gmail.com)

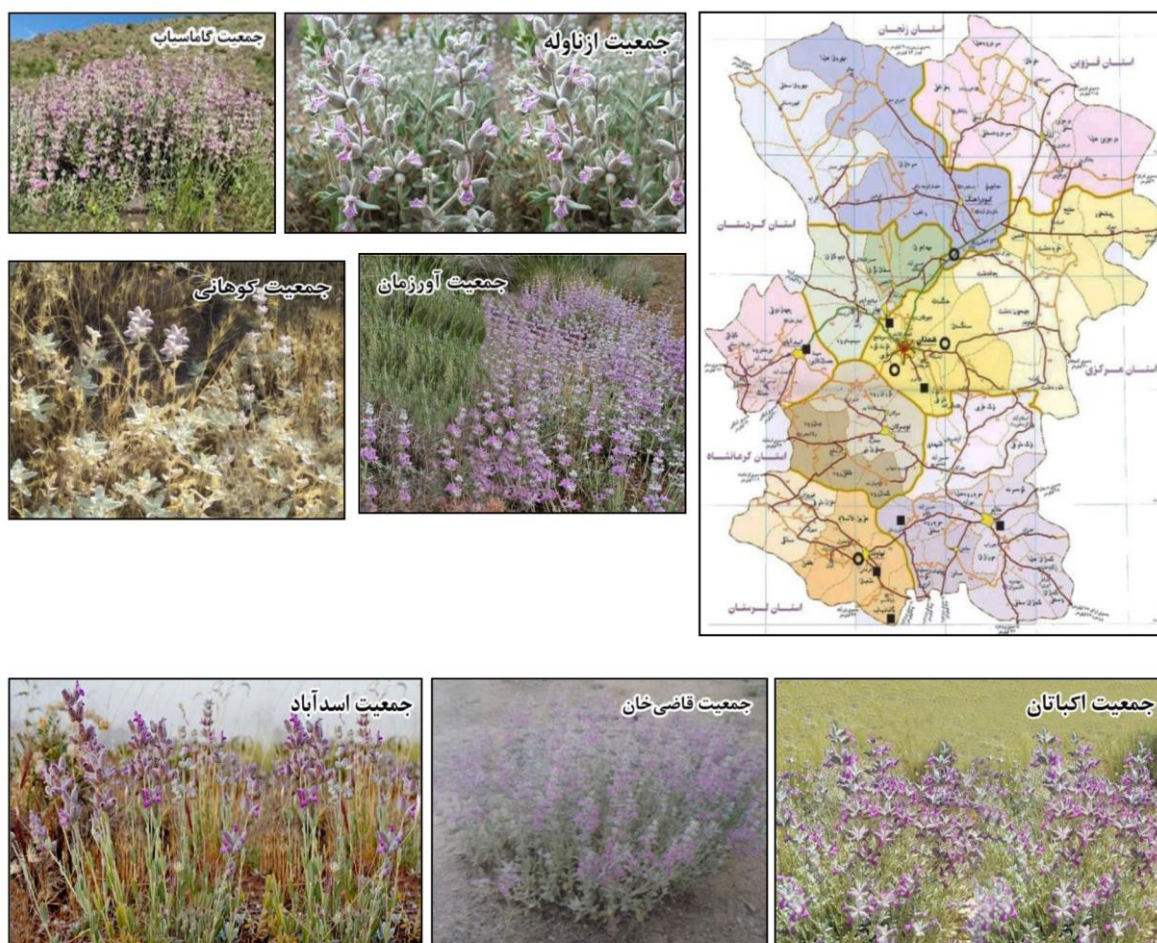
۲- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

بیوماس تولیدی گیاه تأثیر گذار باشند (۱۹). مطالعات صورت گرفته، بیانگر وجود تنوع درون و بین گونه‌ای قابل ملاحظه اجزای اسانس این گیاهان است. در بررسی *S. inflata* Benth. جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های مختلف استان مازندران، اصلی‌ترین اجزای تشکیل دهنده اسانس، بی‌سیکلو ژرماکرن (از ۱۱/۲ تا ۱۶/۶ درصد) و ژرماکرن دی (از ۸/۷ تا ۱۶/۹ درصد) بیان گردید (۲). در مطالعه‌ای بر روی گیاه *S. schtschegleevii* Sosn. که از جلفا در استان آذربایجان جمع‌آوری گردید، مهم‌ترین اجزای تشکیل دهنده اسانس، آلفا-پینن (۲۷/۴۳ درصد)، بتا-فلاندرن (۱۴/۶۸ درصد)، ژرماکرن دی (۱۴/۱۲ درصد)، بتا-پینن (۱۰/۲۵ درصد) و آلفا-فلاندرن (۴/۷۰ درصد) گزارش گردید (۱۸). هدف از این پژوهش، ارزیابی تنوع مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی برخی جمعیت‌های گیاه پولک در مناطق مختلف استان همدان بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، هفت جمعیت گیاه *S. inflata* Benth. از مناطق مختلف استان همدان شامل قاضی‌خان، آورزمان، اکباتان، اسدآباد، ازناوله، کوهانی و گاماسیاب در مرحله گلدهی در خردادماه سال ۱۳۹۶ جمع‌آوری گردید (۱۰۰ نمونه از هر جمعیت) و به‌منظور شناسایی و تفکیک این گونه از گونه‌های مشابه، در هرباریوم مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان، بررسی لازم صورت گرفت. انتخاب مناطق جمع‌آوری براساس فلور ایرانیکا (۲۱) و سایر گزارش‌های ارائه‌شده (۱۰) در زمینه پراکنش این گونه در استان همدان صورت گرفت (شکل ۱). سپس صفات مورفولوژیکی شامل ارتفاع بوته، طول و عرض برگ، طول و عرض براکته و گلچه، طول گل‌آذین و طول میانگره با خط کش، وزن تر و خشک شاخه گلدار، وزن تر و خشک برگ و گل با ترازوی آزمایشگاهی و قطر ساقه با کولیس و تعدادی از صفات فیتوشیمیایی شامل درصد اسانس و محتوای فنل و فلاونوئید بررسی گردید. به‌منظور بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک، نمونه خاکی تا عمق ۳۰ سانتی‌متری از هر منطقه، جمع‌آوری شد (۵). نمونه خاک‌ها به آزمایشگاه منتقل شد و نتایج آنالیز خاک، در جدول ۱ آمده است. نمونه‌های گیاهی پس از جمع‌آوری در مرحله گلدهی کامل، در سایه در دمای حدود ۲۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردیدند. سپس تا زمان اندازه‌گیری صفات فیتوشیمیایی، در پاکت کاغذی در آزمایشگاه با دمای 22 ± 3 درجه سانتی‌گراد و دور از نور خورشید به‌مدت یک ماه نگهداری شدند. برای اسانس‌گیری از نمونه‌ها، مقدار ۵۰ گرم بیکر رویشی (اندام هوایی) را آسیاب و سپس به روش تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه کلونجر به مدت سه ساعت اسانس‌گیری شد (۸). آبیگری نمونه‌ها با استفاده از سولفات سدیم خشک انجام شد. درصد اسانس، به‌صورت حجمی/وزنی تعیین شد. جهت تجزیه نمونه‌های اسانس و اندازه‌گیری

ترکیبات موجود در آن، از دستگاه کروماتوگراف گازی GC و کروماتوگراف گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/Mass) در پژوهشگاه گیاهان دارویی کرج استفاده شد. دمای ابتدایی آن، ۵۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما، به مدت ۵ دقیقه، گرادیان حرارتی ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد و سپس با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد و ۳ دقیقه توقف در این دما و زمان پاسخ ۷۵ دقیقه بود. دمای اتاقک تزریق، ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد به صورت split ۱ به ۳۵ بود و از گاز هلیوم به عنوان حامل با سرعت جریان ۰/۵ میلی‌متر در دقیقه استفاده گردید. ورودی دستگاه به مدت سه دقیقه در ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس طی دو مرحله، با سرعت‌های ۸ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه، به ۲۰۰ و ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد رسانده و به مدت سه دقیقه در این دما نگهداری شد. طیف‌نگار جرمی مورد استفاده، مدل Agilent 5973 با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون‌ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون، ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد بود. گاز کروماتوگرافی استفاده‌شده از نوع Agilent 6890 با ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS بود. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آنها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در کتب مرجع و با استفاده از طیف‌های جرمی و ترکیبات استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه دیجیتال دستگاهی صورت گرفت (۱ و ۱۲) (شکل ۲). به منظور عصاره‌گیری، ۱۰ گرم از پودر گیاه، با ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول، به مدت ۲ ساعت توسط دستگاه اولتراسونیک عصاره‌گیری شد (۲۰). جهت بررسی محتوای تام فنلی و فلاونوئید از روش خلیقی سیگارودی و همکاران (۲۰۱۲) استفاده شد (۱۱). برای اندازه‌گیری فنل، غلظت‌های مختلف گالیک اسید استاندارد، عصاره گیاه و آب مقطر شاهد در سه تکرار تهیه شد و به آنها معرف فولین - سیوکالتو و سدیم کربنات اضافه گردید. بعد از ۹۰ دقیقه، جذب نمونه‌ها در برابر شاهد توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در مورد فلاونوئید، غلظت‌های مختلف روتین استاندارد تهیه شد و به آن، سدیم نیتريت، کلرید آلومینیوم و سود اضافه گردید. سپس جذب محلول صورتی‌رنگ در برابر شاهد در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. داده‌های این مطالعه، براساس طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS(9.2) در سطح احتمال پنج و یک درصد، تجزیه آماری شدند. برای مقایسه میانگین‌ها، از آزمون دانکن استفاده گردید. گروه‌بندی جمعیت‌ها براساس صفات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی و از طریق تجزیه کلاستر به‌وسیله نرم‌افزار SPSS به روش «وارد» انجام شد. همبستگی صفات (کمی) نیز به روش «پیرسون» انجام شد.



شکل ۱ - مناطق نمونه برداری و تصاویر جمعیت‌های گونه *S. inflata* در استان همدان

(مربع‌های سیاه رنگ روی نقشه، نشان‌دهنده مناطق جمع‌آوری گیاه هستند و دایره‌های توخالی، سایر مناطق پراکنش گیاه را نشان می‌دهند).

Figure 1- Sampling regions and photos of *S. inflata* populations in Hamedan Province

(Squares on the map, are plant collection regions and empty circles, show other distribution regions of the plant).

نتایج و بحث

(۰/۶۶ سانتی متر) و بالاترین وزن خشک (۱/۱۶ گرم) و وزن تر (۲/۶۹ گرم) شاخه گلدار را داشت. در مورد صفات طول و عرض گلچه، بالاترین مقدار این صفات مربوط به جمعیت منطقه ازناوله (به ترتیب ۱/۶۸ و ۰/۸۸ سانتی متر) و کم‌ترین آن مربوط به جمعیت سد اکباتان (به ترتیب ۱/۲۸ و ۰/۵۸ سانتی متر) بود. بیش‌ترین میزان اسانس از جمعیت‌های آورزمان، ازناوله و کوهانی (۰/۲ درصد) به دست آمد و جمعیت اسداباد، دارای کم‌ترین اسانس (۰/۱۱ درصد) بود. بیش‌ترین میزان فنل کل (۱۴۱/۹ میلی گرم گالیک اسید در گرم عصاره) و فلاونوئید (۱۰۹/۴ میلی گرم روتین در گرم عصاره)، در جمعیت منطقه آورزمان مشاهده گردید و کم‌ترین میزان فنل کل (۸۶/۹ میلی گرم گالیک اسید در گرم عصاره) مربوط به جمعیت منطقه اسداباد و کم‌ترین میزان فلاونوئید (۶۸/۸ میلی گرم روتین در گرم عصاره) مربوط به جمعیت منطقه کوهانی بود (جدول ۲).

مقایسه میانگین‌های صفات نشان داد که بیش‌ترین میزان ارتفاع گیاه (۴۷/۲ سانتی متر) مربوط به جمعیت آورزمان بود که با سایر جمعیت‌ها تفاوت معنی‌داری داشت و کم‌ترین آن مربوط به جمعیت منطقه گاماسیاب (۲۶ سانتی متر) بود. همچنین بیش‌ترین مقدار قطر ساقه (۲/۵۴ میلی متر) مربوط به جمعیت آورزمان بود که از نظر آماری، با جمعیت اسداباد (۲/۳۸ میلی متر) تفاوت معنی‌داری نداشت و کم‌ترین مقدار قطر ساقه در جمعیت‌های روستای کوهانی (۱/۳۹ میلی متر) و سد اکباتان (۱/۵۰ میلی متر) مشاهده شد (جدول ۲). بیش‌ترین میزان طول برگ مربوط به جمعیت منطقه اسداباد (۳/۶۰ سانتی متر) بود. جمعیت اسداباد، دارای بیش‌ترین تعداد گل (۷/۲) و بلندترین گل‌آذین (۲۱/۲ سانتی متر) بود که با جمعیت‌های ازناوله، قاضی‌خان و آورزمان، تفاوت معنی‌داری نداشت. جمعیت اسداباد همچنین بیش‌ترین عرض براکته

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک روشنگاه‌های جمعیت‌های مورد مطالعه *S. inflata*
 Table 1- Geographical characteristics and chemical and physical properties of the soil of studied *S. inflata* populations habitats

روشگاه Habitat	طول Longitude	عرض Latitude	ارتفاع از سطح دریا Altitude (m)	مجموع بارندگی سالیانه Total annual rainfall (mm)	میانگین دمای سالیانه (درجه سانتی‌گراد) Average annual temperature (°C)	هدایت الکتریکی (دسی‌زیمنس بر متر) Electrical conductivity (ds.m ⁻¹)	کربن آلی (درصد) Organic carbon (%)	پتاسیم قابل دسترسی (پی.پی.ام) Available potassium (ppm)	فسفر قابل دسترسی (پی.پی.ام) Available phosphorus (ppm)	نیترژن قابل جذب (درصد) Absorbable nitrogen (%)	کربنات کلسیم (درصد) Carbonate calcium (%)	اسیدیته گل اشباع Saturated soil acidity (pH)
آوزمان Avarzaman	34° 18'	48° 36'	1708	230.2	16.4	0.41	0.2	100.0	28.0	0.02	3.0	7.5
کوهانی Koohtani	34° 09'	48° 24'	1715	275.4	17.2	0.53	1.6	180.0	28.8	0.17	14.4	7.5
ازنوله Aznaveleh	34° 14'	48° 85'	1809	199.1	15.5	0.4	0.4	70.0	21.3	0.04	46.7	7.6
گاماسیاب Gammasiab	34° 03'	48° 22'	1848	280.3	16.3	0.5	0.8	100.0	21.3	0.08	3.8	7.6
اسداباد Asadabad	34° 53'	48° 14'	1997	377.5	16.1	0.4	0.4	70.0	15.6	0.04	3.8	7.6
اکیاتان Ekbatan	34° 44'	48° 36'	2030	193.3	16.6	0.48	0.3	70.0	11.0	0.03	8.5	7.5
قاضی‌خان Ghazi Khan	34° 49'	48° 19'	2105	202.5	15.3	0.47	0.5	90.0	18.4	0.05	2.3	7.6

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی جمعیت‌های مورد مطالعه *S. inflata*
 Table 2- Compare means of morphological and phytochemical traits of studied populations of *S. inflata*

ردیف Row	صفت Trait	جمعیت Population							
		گامسیاب Gammasiab	کوهانی Koohani	اسداباد Asadabad	ازناوله Aznavaleh	قاضی خان Ghazi Khan	اکباتان Ekbatan	اورزمان Avazaman	
1	ارتفاع بوته (سانتی‌متر)	26 ^c	32.60 ^{bc}	38.20 ^b	31.60 ^{bc}	35.80 ^b	38.20 ^b	47.20 ^a	
2	قطر ساقه (میلی‌متر)	1.66 ^{cd}	1.39 ^d	2.38 ^{ab}	2.03 ^{bc}	1.72 ^{cd}	1.50 ^d	2.54 ^a	
3	طول برگ (سانتی‌متر)	2.70 ^c	2.84 ^{bc}	3.60 ^a	2.70 ^c	3 ^{bc}	3.10 ^b	2.90 ^{bc}	
4	عرض برگ (سانتی‌متر)	0.94 ^{abc}	0.82 ^{bc}	1.10 ^a	1 ^{ab}	0.74 ^c	1.06 ^{ab}	1.14 ^a	
5	تعداد گل در بوته	4.8 ^b	4.6 ^b	7.2 ^a	6.4 ^{ab}	6.4 ^{ab}	5.2 ^b	6 ^{ab}	
6	طول گل‌آذین (سانتی‌متر)	11.1 ^b	10.9 ^b	21.20 ^a	15.6 ^{ab}	16.4 ^{ab}	14.4 ^b	20.6 ^a	
7	طول براکت (سانتی‌متر)	0.66 ^{ab}	0.7 ^a	0.74 ^a	0.72 ^a	0.7 ^a	0.58 ^b	0.76 ^a	
8	عرض براکت (سانتی‌متر)	0.46 ^b	0.52 ^b	0.66 ^a	0.5 ^b	0.5 ^b	0.5 ^b	0.5 ^b	
9	طول گلچه (سانتی‌متر)	1.36 ^{abc}	1.50 ^{abc}	1.60 ^{ab}	1.68 ^a	1.54 ^{ab}	1.28 ^c	1.50 ^{abc}	
10	عرض گلچه (سانتی‌متر)	0.83 ^{ab}	0.8 ^{ab}	0.82 ^{ab}	0.88 ^a	0.68 ^{bc}	0.58 ^c	0.72 ^{abc}	
11	وزن تر شاخه گلدار (گرم)	1.526 ^{bc}	1.120 ^c	2.694 ^a	2.026 ^{ab}	1.522 ^{bc}	1.846 ^{bc}	1.620 ^{bc}	
12	وزن خشک شاخه گلدار (گرم)	0.804 ^{bcd}	0.578 ^d	1.162 ^a	1.102 ^{ab}	0.718 ^{cd}	0.794 ^{bcd}	0.948 ^{abc}	
13	وزن تر برگ (گرم)	0.272 ^a	0.032 ^b	0.062 ^b	0.05 ^b	0.038 ^b	0.066 ^b	0.062 ^b	
14	وزن خشک برگ (گرم)	0.028 ^a	0.016 ^b	0.022 ^{ab}	0.024 ^{ab}	0.02 ^{ab}	0.026 ^a	0.028 ^a	
15	وزن تر گل (گرم)	0.19 ^a	0.26 ^a	0.24 ^a	0.18 ^a	0.14 ^a	0.14 ^a	0.15 ^a	
16	وزن خشک گل (گرم)	0.098 ^a	0.054 ^b	0.092 ^a	0.108 ^a	0.064 ^b	0.054 ^b	0.066 ^b	
17	طول میانگوه (سانتی‌متر)	2.6 ^{ab}	2.7 ^a	2.7 ^a	2.1 ^{bc}	2 ^c	2.6 ^{ab}	3.1 ^a	
18	درصد اسانس میزان فلاونوئید (میلی‌گرم روتین در گرم عصاره)	0.15 ^c	0.2 ^a	0.11 ^d	0.2 ^a	0.16 ^{bc}	0.17 ^b	0.2 ^a	
19	میزان فنل (میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره)	77.2 ^d	68.8 ^e	70.8 ^f	82.07 ^c	75.5 ^e	85.1 ^b	109.4 ^a	
20	میزان فنل (میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره)	100.5 ^e	106.2 ^b	86.9 ^e	104.5 ^c	91.5 ^f	103.5 ^d	141.9 ^a	

در هر ردیف، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، تفاوت آماری معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.
 In each row, means with at least a similar letter, are not significantly different (P<0.05).

اگرچه ۲۲ ترکیب در اسانس هفت جمعیت مورد مطالعه شناسایی شد (جدول ۳)، اما اسپاتونول (۲۶/۵۲ درصد) در جمعیت اسدآباد، اکتانول استات (۱۴/۰۳ درصد) و اینسنسول استات (۱۳/۴۱ درصد) در جمعیت آوزرمان، ژرماکرن دی (۱۳/۹۶ درصد) در جمعیت ازناوله، بی سیکلو ژرماکرن (۱۰/۶۶ درصد) و فیتول (۹/۵۲ درصد) در جمعیت اکباتان، اجزای اصلی تشکیل دهنده اسانس بودند. همچنین تنوع زیادی در درصد و نوع اجزای تشکیل دهنده اسانس در جمعیت‌های مورد مطالعه وجود داشت، به طوری که بیشترین میزان اکتانول استات (۱۴/۰۳ درصد)، اینسنسول استات (۱۳/۴۱ درصد)، اسکالرن (۸/۲۶ درصد) و اینسنسول (۷/۷۷ درصد) در جمعیت آوزرمان و بالاترین میزان آلفا-پینن (۶/۱۸ درصد) و ژرماکرن دی (۱۳/۹۶ درصد) در جمعیت ازناوله و بیشترین درصد بی سیکلو ژرماکرن (۱۰/۶۶ درصد) و فیتول (۹/۵۲ درصد) در جمعیت اکباتان و بالاترین درصد اسپاتونول (۲۶/۵۲ درصد) در جمعیت اسدآباد و بیشترین میزان هگزا دکانوئیک اسید (۹/۴۶ درصد) در جمعیت گاماسیاب مشاهده شد (جدول ۳). موضوع وجود تنوع در درصد و نوع اجزای تشکیل دهنده اسانس در آزمایشاتی که در مناطق دیگر نیز انجام شده است، مورد تأیید قرار گرفته است. نتایج آزمایش یآوری و شاه-گلزاری (۲۰۱۲) در بررسی مواد تشکیل دهنده *S. inflata* Benth. در تویسرکان نشان داد که بیشترین اجزای موجود در اسانس شامل کاربوفیلن اکسید (۱۳/۸۴ درصد)، ای-سیترال (۱۳ درصد)، زد-سیترال (۱۲/۹ درصد)، اسپاتونول (۱۰/۶۵ درصد)، ای آر-کورکومین (۶/۵۱ درصد)، ۸و۱-سینئول (۴/۸۹ درصد)، لیمونن (۴/۶ درصد) و آلفا-تریپنئول (۲/۵۵ درصد) بود (۲۵). سجادی و سومائی (۲۰۰۴) بر روی اجزای شیمیایی *S. inflata* که از کوه‌های صفا در استان اصفهان جمع‌آوری گردیده بود، مطالعه‌ای انجام دادند و ژرماکرن دی، بی سیکلو ژرماکرن، آلفا-پینن، بتا-فلاندرن را به عنوان اجزای اسانس اعلام نمودند (۲۲). بررسی انجام شده روی ترکیبات اسانس گیاه *S. inflata* نشان داد اصلی‌ترین اجزای تشکیل دهنده اسانس شامل هگزا دکانوئیک اسید (۹/۱ درصد)، بی سیکلوژرماکرن (۵/۱ درصد)، آلفا - پینن (۵/۸ درصد) و ژرماکرن - دی (۸/۹ درصد) بودند که این اجزاء با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت دارد (۱۵).

تنوع موجود در ترکیبات این گیاه، به فاکتورهای متعددی از قبیل ژنتیک، عوامل محیطی و اثرات متقابل آنها و همچنین اندام گیاهی، زمان برداشت، روش عصاره‌گیری اکتیپ و منشأ جغرافیایی (اقلیم، خاک، ارتفاع و توپوگرافی) بستگی دارد. باتوجه به پراکندگی وسیع *S. inflata* در ایران، این گونه در مناطق اکولوژیکی مختلف، اجزای اسانس متفاوتی دارد (۲۵). تحقیقات نشان داده است که تفاوت در خاستگاه ژنتیکی، فاکتورهای اکولوژیکی، تفاوت‌های ژنتیکی، تکنیک‌ها و روش‌های مورد استفاده در کشت، باعث ایجاد تفاوت‌های

کمی و کیفی در ترکیبات اسانس در گیاهان دارویی و معطر می‌شود (۴ و ۲۳).

در این پژوهش، بازده اسانس در جمعیت‌های گونه *S. inflata* از ۰/۱۱ تا ۰/۲ درصد (حجمی/وزنی) در مناطق مختلف، متغیر بود. در این مطالعه، رویشگاه‌های آوزرمان، ازناوله و کوهانی با میزان اسانس ۰/۲ درصد در بین سایر رویشگاه‌های بررسی شده، دارای بالاترین میزان اسانس بودند (جدول ۲). این جمعیت‌ها از ارتفاعات پایین‌تری جمع‌آوری شده بودند (جدول ۱). علیمحمدی و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای بر روی *S. obtusirena*، علت بالا بودن اسانس این گونه را در مناطق با ارتفاع پایین، بیش‌تر بودن عمق و رطوبت خاک و عناصر غذایی در آن مناطق عنوان نمودند (۳). در مطالعه حاضر نیز، خاک رویشگاه‌های کم‌ارتفاع، دارای فسفر قابل دسترس بیش‌تری بوده است (جدول ۱). همچنین بین ارتفاع رویشگاه‌های مورد مطالعه از سطح دریا و میزان فسفر خاک این مناطق، همبستگی منفی و معنی‌دار (۰/۸۶-) وجود دارد (جدول ۴). به عبارت دیگر، با افزایش ارتفاع رویشگاه‌های مورد بررسی، میزان فسفر خاک کاهش می‌یابد و بیش‌ترین فسفر خاک، مربوط به مناطقی است که دارای کم‌ترین ارتفاع از سطح دریا بوده‌اند. به نظر می‌رسد یکی از دلایل بالا بودن میزان اسانس در رویشگاه‌های آوزرمان، ازناوله و کوهانی، بالا بودن فسفر قابل دسترس این مناطق است. در مطالعه‌ای که توسط علی‌بخشی و همکاران (۱۳۹۳) بر روی اسانس گیاه *S. inflata* جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های مختلف استان مازندران صورت گرفت، موضوع بالاتر بودن میزان اسانس در مناطق با ارتفاع کم‌تر، مورد تأیید قرار گرفت (۲). به دلیل تفاوت‌های اقلیمی مناطق بررسی شده در این مطالعه و دیگر مطالعات یادشده، اختلاف در میزان و عملکرد اسانس این گونه، قابل توجیه است.

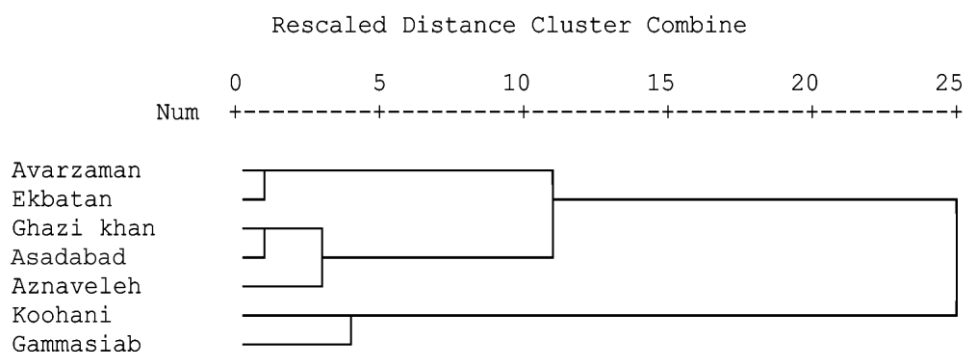
در این پژوهش، میزان فنل کل در جمعیت‌های گونه *S. inflata* از ۸۶/۹ تا ۱۴۱/۹ میلی گرم گالیک اسید در گرم عصاره و فلاونوئید از ۶۸/۸ تا ۱۰۹/۴ میلی گرم روتین در گرم عصاره در مناطق مختلف، متغیر بود (جدول ۲). در این مطالعه، رویشگاه آوزرمان دارای بالاترین محتوای فنل و فلاونوئید کل بود (جدول ۲). به‌طور کلی، محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی تام، دارای تنوع وسیعی بین جمعیت‌ها بود. عوامل متعددی می‌تواند بر میزان ترکیبات فنلی تأثیرگذار باشد که نمونه گیاهی (نوع گونه، جمعیت، اندام مورد استفاده، مرحله نمو) و شرایط محیطی گیاه (نوع خاک، شرایط اقلیمی، تنش‌ها) از آن جمله می‌باشند (۱۴). در مطالعه محمدی و همکاران (۲۰۱۶)، میزان فنل (۱۲۹/۹۶ میلی گرم اسید گالیک در گرم عصاره) و فلاونوئید (۲۹/۶۲ میلی گرم کورنستین در گرم عصاره) در اندام هوایی گیاه پولک جمع‌آوری شده از کوه‌های چهارباغ گرگان گزارش شده است (۱۳).

گروه‌بندی هفت جمعیت مورد مطالعه از گونه *S. inflata* براساس

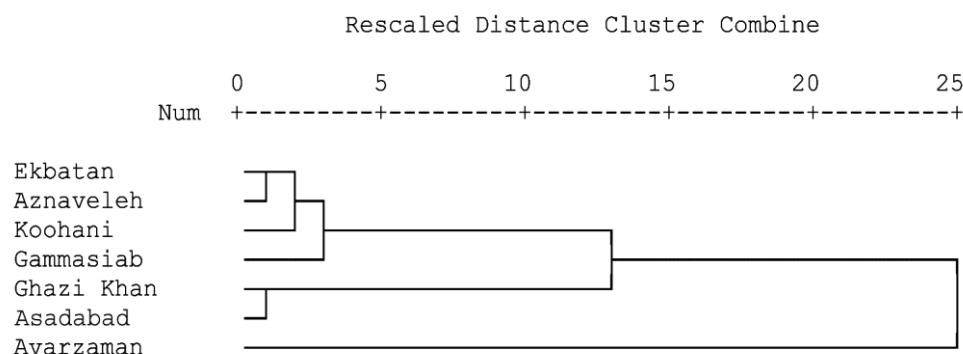
هاست. از طرفی، قرار گرفتن جمعیت‌ها در دو گروه جداگانه می‌تواند به دلیل تنوع جمعیت‌ها از نظر ژنتیکی و شرایط محیطی محل جمع آوری آنها باشد.

در این آزمایش، گروه‌بندی جمعیت‌ها براساس ارزیابی صفات مورفولوژیکی، تا حدودی با پراکنش جغرافیایی آنها مطابقت داشت. زیرا جمعیت‌های مناطق کوهانی و گاماسیاب که هر دو در شهرستان نهاوند واقع هستند، در یک گروه طبقه‌بندی شدند. ولی در مورد صفات فیتوشیمیایی، این مطابقت وجود نداشت. عدم تطابق منشأ جغرافیایی با صفات فیتوشیمیایی با نتایج گزارشات قبلی در خانواده نعنایان مطابقت دارد (۷ و ۶).

صفات مورفولوژیک و فیتوشیمیایی به روش «وارد» صورت گرفت. دندروگرام‌های به‌دست‌آمده از تجزیه خوشه‌ای صفات مورفولوژی و فیتوشیمیایی در جمعیت‌های جمع‌آوری‌شده، در شکل‌های ۲ و ۳ آمده است. براساس آنالیز دندروگرام صفات مورفولوژی، جمعیت‌های مطالعه شده به دو گروه اصلی تقسیم‌بندی شدند. جمعیت‌های آوززمان، اکباتان، قاضی‌خان، ازناوله و اسدآباد در گروه A و جمعیت‌های کوهانی و گاماسیاب در گروه B قرار گرفتند. همچنین براساس آنالیز دندروگرام صفات فیتوشیمیایی، جمعیت‌های اکباتان، قاضی‌خان، ازناوله، اسدآباد، کوهانی و گاماسیاب در گروه A و جمعیت آوززمان در گروه B قرار گرفتند. قرار گرفتن جمعیت‌ها در یک گروه، نشان‌دهنده یکنواختی بیش‌تر در جمعیت‌های آن گروه نسبت به سایر جمعیت



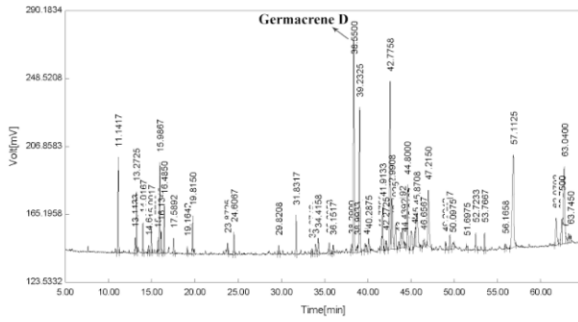
شکل ۲- تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌های مورد مطالعه *S. inflata* Benth. براساس صفات مورفولوژیکی
Figure 2- Cluster analysis of studied *S. inflata* Benth. populations according morphological traits



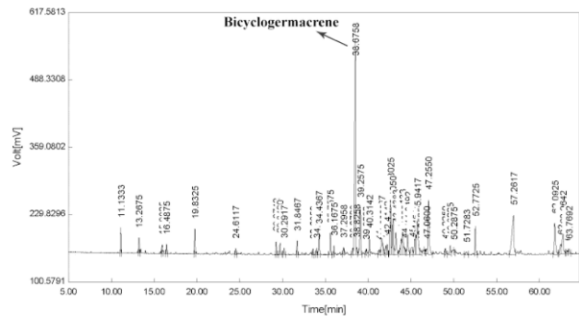
شکل ۳- تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌های مورد مطالعه *S. inflata* Benth. براساس صفات فیتوشیمیایی
Figure 3- Cluster analysis of studied *S. inflata* Benth. populations according phytochemical traits

جدول ۴- ضرایب همبستگی بین ارتفاع رویشگاه‌های مورد مطالعه و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک
Table 4- Correlation coefficients of studied habitats height and physical and chemical properties of the soil

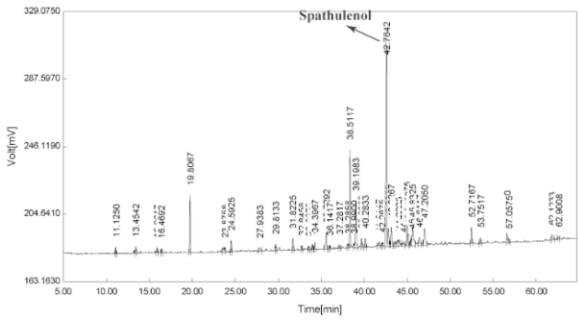
صفات مورد بررسی Studied traits	ارتفاع Height of Habitats	هدایت الکتریکی Electrical conductivity	اسیدیته اشباع Saturated soil acidity	کربنات کلسیم معادل Carbonate calcium Equivalent	ازت قابل جذب Absorbable nitrogen	فسفر قابل دسترس Available phosphorus	پتاسیم قابل دسترس Available potassium	کربن آلی Organic carbon	رس Clay	سیلت Silt	شن Sand
ارتفاع رویشگاه‌ها Height of habitats	1										
هدایت الکتریکی Electrical conductivity	-0.03 ^{ns}	1									
اسیدیته گل اشباع Saturated soil acidity	0.35 ^{ns}	-0.31 ^{ns}	1								
کربنات کلسیم معادل Carbonate calcium equivalent	0.49 ^{ns}	-0.29 ^{ns}	0.18 ^{ns}	1							
ازت قابل جذب Absorbable nitrogen	0.36 ^{ns}	0.75 [*]	-0.21 ^{ns}	0.20 ^{ns}	1						
فسفر قابل دسترس Available phosphorus	-0.86 [*]	0.13 ^{ns}	-0.28 ^{ns}	0.11 ^{ns}	0.51 ^{ns}	1					
پتاسیم قابل دسترس Available potassium	0.17 ^{ns}	0.68 ^{ns}	-0.46 ^{ns}	-0.10 ^{ns}	0.91 ^{**}	0.73 ^{ns}	1				
کربن آلی Organic carbon	0.38 ^{ns}	0.76 ^{ns}	-0.19 ^{ns}	0.02 ^{ns}	1.00 ^{**}	0.50 ^{ns}	0.90 ^{**}	1			
رس Clay	0.54 ^{ns}	0.32 ^{ns}	0.37 ^{ns}	0.25 ^{ns}	0.32 ^{ns}	0.09 ^{ns}	0.09 ^{ns}	0.34 ^{ns}	1		
سیلت Silt	0.46 ^{ns}	0.25 ^{ns}	0.20 ^{ns}	0.13 ^{ns}	0.45 ^{ns}	0.7 ^{ns}	0.21 ^{ns}	0.46 ^{ns}	0.83 [*]	1	
شن Sand	0.32 ^{ns}	-0.28 ^{ns}	-0.25 ^{ns}	-0.16 ^{ns}	-0.43 ^{ns}	-0.07 ^{ns}	-0.18 ^{ns}	-0.44 ^{ns}	-0.89 ^{**}	-0.99 ^{**}	1



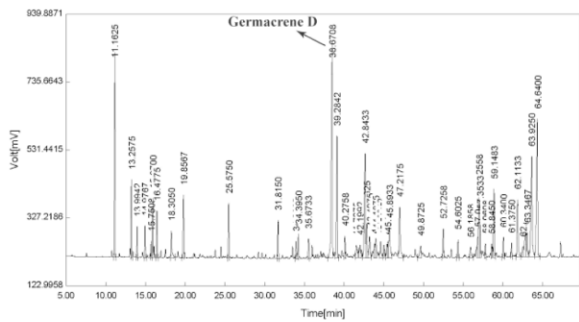
گاماسیاب (Gammasiab)



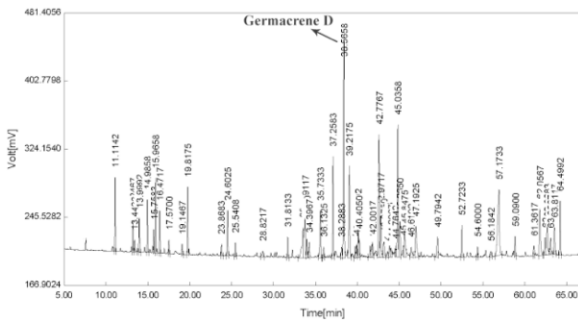
کوهانی (Koohani)



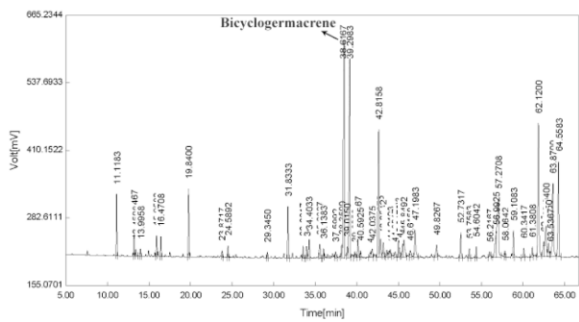
اسداباد (Asadabad)



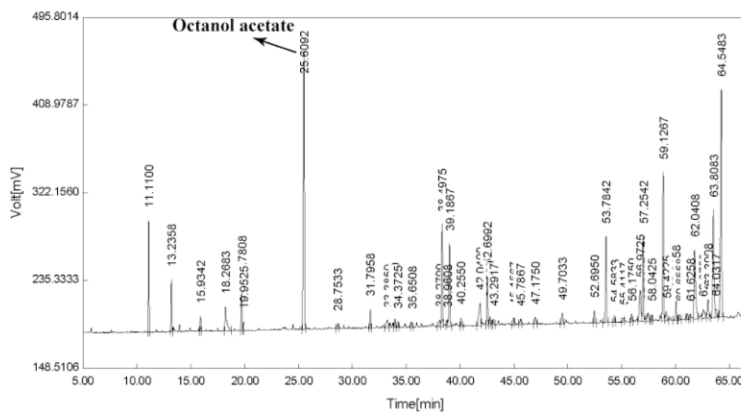
ازنوله (Aznaveleh)



قازی خان (Ghazi Khan)



اکباتان (Ekbatan)



آورزمان (Avarzaman)

شکل ۴- نمودارهای کروماتوگرام اسانس هفت جمعیت گونه *S. inflata* در استان همدان
Figure 4- Essential oil chromatograms of seven populations of *Stachys inflata* in Hamedan Province

نتیجه گیری

عوامل محیطی و اقلیمی نیز بر صفات فیتوشیمیایی مؤثر هستند. در این مطالعه، بیشترین میزان اسانس در مناطقی تولید شده است که دارای کمترین ارتفاع از سطح دریا می‌باشند. این مناطق، دارای میزان فسفر در دسترس و بیش‌تری در خاک بودند. با توجه به تحقیقات صورت‌گرفته بر روی اجزای اسانس *S. inflata* Benth. در مناطق مختلف ایران، اجزای تشکیل‌دهنده اسانس و درصد‌های این اجزاء کاملاً متفاوت است؛ به‌طوری که برخی اجزایی که در یک منطقه دیده می‌شود، در منطقه دیگر وجود ندارد و این موضوع، تأکید بیش‌تری بر اثر اقلیم دارد. این تفاوت حتی در جمعیت‌های مورد مطالعه در یک استان نیز کاملاً مشهود است.

نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان داد که گیاه دارویی پولک، از نظر نوع و درصد اجزای تشکیل‌دهنده اسانس در بین جمعیت‌های جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف استان همدان دارای تنوع بالایی می‌باشد. بیش‌ترین میزان اسانس، مربوط به رویشگاه‌های آورزمان و کوهانی (واقع در شهرستان نهاوند) و ازناوله (واقع در شهرستان ملایر) بود. اما در رویشگاه گاماسیاب که از نظر جغرافیایی در شهرستان نهاوند واقع است، چنین نتیجه‌ای مشاهده نشد. همچنین جمعیت آورزمان، دارای بیش‌ترین محتوای فنل و فلاونوئید بود که با جمعیت‌های مجاورش از جمله کوهانی و گاماسیاب، تفاوت معنی‌داری داشت. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که علاوه بر عوامل ژنتیکی،

منابع

- 1- Adams R.P. 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Australia.
- 2- Alibakhshi M., Mahdavi S.Kh., Mahmoodi J., and Ghelichnia H. 2014. Phytochemical evaluation of *Stachys inflata* essential oil in different habitats of Mazandaran Province. *Eco-phytochemical Journal of Medical Plants* 2(2): 56-68. (In Persian)
- 3- Alimohammadi M., Yadegari M., and Shirmardi H.A. 2017. Effect of elevation and phenological stages on essential oil composition of *Stachys*. *Turkish Journal of Biochemistry (Turk Biokimya Dergisi)* 42(6): 647-656.
- 4- Argyropoulou C., Daferera D., Tarantilis P.A., Fasseas C., and Polissiou M. 2007. Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H.B.K. (Verbenaceae) at two developmental stages. *Biochemical Systematics and Ecology* 35(12): 831-837.
- 5- Azarnivand H., Ghavam Arabani M., Sefidkon F., and Tavili A. 2010. The effect of ecological characteristics on quality and quantity of the essential oils of *Achillea millefolium* L. subsp. *millefolium*. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 25(4): 556-571. (In Persian)
- 6- Azizi A., Hadian J., Gholami M., Friedt W., and Honermeier B. 2012. Correlations between genetic, morphological, and chemical diversities in a germplasm collection of the medicinal plant *Origanum vulgare* L. *Chemistry and Biodiversity* 9(12): 2784-2801.
- 7- Bigdeloo M., Nazeri V., and Hadian J. 2013. Study on effect of some environmental factors on morphological traits and essential oil productivity of *Thymus caramanicus* Jalas. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 28(4): 756-766. (In Persian)
- 8- British pharmacopoeia. 1988. Vol. 2, London, HMSO Pp: A137-A138.
- 9- Fathalipoor Z., Nabati Ahmadi D., Rajabi Memari H., Siyahpoosh A., and Seddighi Dehkordi F. 2014. Determination of plant variation using morphological properties and cluster analysis in *Anethum* germplasms. *Journal of Plant Productions (Agronomy, Breeding and Horticulture)* 37(4): 57-67. (In Persian)
- 10- Jamzad Z. 2012. Flora of Iran: Lamiaceae. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran p: 234. (In Persian)
- 11- Khalighi-Sigaroodi F., Ahvazi M., Yazdani D., and Kashefi M. 2012. Cytotoxicity and antioxidant activity of five plant species of Solanaceae family from Iran. *Journal of Medicinal Plants* 11(43): 41-53.
- 12- McLafferty F.W., and Stauffer D.B. 1989. Wiley / NBS Registry of Mass Spectral Data. 7 Volume Set. Wiley, New York.
- 13- Mohammadi A., Mazandarani M., and Asghari J. 2016. Echophytochemical, antioxidant and ethnopharmacological properties of *S. inflata* Benth. extract from Chahar Bagh mountain. *Medical Laboratory Journal* 10(3): 43-47.
- 14- Moraes de souza R.A., Oldoni T.L.C., Regitano-D'Arce M.A.B., and Alencar S.M. 2008. Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil. *Ciencia y Tecnologia Alimentaria* 6(1): 7-41.
- 15- Morteza-Semnani K., Akbarzadeh M., and Changizi Sh. 2006. Essential oils composition of *Stachys byzantina*, *S. inflata*, *S. lavandulifolia* and *S. laxa* from Iran. *Flavour and Fragrance Journal* 21(2): 300-303.
- 16- Mozaffarian V. 1996. A Dictionary of Iranian Plant Names. Farhang Moaser, Tehran p: 522. (In Persian)
- 17- Nemeth E., and Bernath J. 2008. Biological activities of yarrow species (*Achillea spp.*). *Current Pharmaceutical Design* 14(29): 3151-3167.
- 18- Norouzi-Arasi H., Yavari I., and Alibabaei M. 2004. Chemical constituents of the essential oil of *Stachys*

- schtshegleevii* Sosn. from Iran. Journal of Essential Oil Research 16(3): 231-232.
- 19- Omidbaigi R. 2013. Approaches of production and products of medicinal plants. Vol. 1, 7th edition, Tehran, Tarrahan-e-Nashr p. 154. (In Persian)
- 20- Ozkan G., Sagdic O., Ekici L., Ozturk I., and Ozcan M.M. 2007. Phenolic compounds of *Origanum sipyleum* L. extract and its antioxidant and antibacterial activities. Journal of Food Lipids 14(2): 157-169.
- 21- Rechinger K.H., and Hedge I.C. 1982. Flora Iranica. Akademische Druck Verlagsanstalt, Graz, Austria Pp: 150, 359, 360, 361, 365.
- 22- Sajjadi S.E., and Somae M. 2004. Chemical composition of the essential oil of *Stachys inflata* Benth. from Iran. Chemistry of Natural Compounds 40(4): 378-380.
- 23- Santos-Gomes P.C., Fernandes-Ferreira M., and Vicente A.M.S. 2005. Composition of the essential oils from flowers and leaves of Vervain [*Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton] grown in Portugal. Journal of Essential Oil Research 17(1): 73-78.
- 24- Statistical Center of Iran. 2012. Statistical Yearbook of Hamedan Province, Chapter 1. [In Farsi]
- 25- Yavari A., and Shahgolzari S.M. 2013. Chemical composition of the essential oil of *Stachys inflata* Benth. from Iran. Asian Journal of Plant Science and Research 3(2): 62-65.



Evaluation of Morphological and Phytochemical Characteristics Changes in Different Populations of *Stachys inflata* Benth. in Hamedan Province

M. Salehi^{1*} – R. Kalvandi²

Received: 02-03-2019

Accepted: 01-07-2020

Introduction: Medicinal plants are rich sources of the main active substances in many drugs. Although the production of secondary metabolites is controlled by genes, their production are considerably influenced by environmental conditions, so that environmental factors cause changes in the growth of medicinal plants as well as the amount of active substances. In different habitats, physiological, morphological and genetically variations are seen in populations of species. These variations are created in response to contrasting environmental conditions. Studies of population in many plant species regarding to the pattern of variation have showed the occurrence of localized populations which adapted to the particular ecological conditions of their habitat. Iran as a center of diversity of *Stachys* houses about 35 species. The majority of species prefers alpine and subalpine habitats and grows under various ecological conditions in habitats like rocky places, mountain steppes, and stream banks or sometimes in forests. *S. inflata* Benth. is a medicinal plant from Lamiaceae family which is used extensively in folk and traditional remedies to treat infection, asthma, rheumatism and other inflammatory diseases.

Materials and Methods: This study was conducted to evaluate the morphological and phytochemical diversity of seven populations of *S. inflata* Benth. from different districts of Hamedan province in 2017. Traits such as plant height, stem diameter, leaf length and width, fresh and dry weight of floral branch, inflorescence length, fresh and dry weight of flower, essential oil percentage and phenol and flavonoid content were measured. In order to investigate physical and chemical properties of soil, soil samples were collected from a depth of 30 cm. Then they were transferred to the soil laboratory. Plants samples were collected in flowering stage and were dried in 25-30 °C. They were stored in envelopes in 22±3 °C away from the sun. For extracting essential oil, 50 gr of shoots were milled and then mixed with distilled water. This process lasted for three hours. Main components of essential oil were identified and determined by gas chromatography. The grouping of populations based on morphological and phytochemical traits was done by cluster analysis. The correlation between the elevations of studied areas above the sea level and soil properties was also done by Pearson method.

Results and Discussion: The results showed that the highest essential oil content was related to Avarzaman, Aznaveleh and Koohani populations (0.2%) and the lowest amount was obtained from Asadabad (0.11%). Although 22 compounds were identified in the essential oil, there was a great deal of variation in the percentage and type of components of the essential oil in the studied populations. The main components of essential oil were Spathulenol (26.25%), Octanol acetate (14.03%), Germacrene D (13.96%), Incensole acetate (13.41%), Bicyclogermacrene (10.66%) and Phytol (9.52%). Avarzaman population had the highest total phenol (141.9 mg GAE/gr) and flavonoid content (109.4 mg routine/gr) and the lowest content of phenol (86.9 mg GAE/gr) and flavonoid (68.8 mg routine/gr) was related to Asadabad and Koohani populations respectively. Avarzaman had the highest plant height (47.2 cm) and was significantly differed with other populations. The highest dry weight of floral branches (1.16 mm) was related to Asadabad population that was not significantly differed with Aznaveleh and Avarzaman population and the lowest dry weight of floral branch (0.57 mm) was observed in Koohani population. There was a significant negative correlation (-0.86) between the height of the studied habitats and the level of phosphorus in these areas. According to the morphological traits dendrogram analysis, seven studied populations were divided into two main groups. The populations of Avarzaman, Ekbatan, Ghazi Khan, Aznaveleh and Asadabad were in group A and Koohani and Gammasiab populations were in group B. Based on phytochemical traits dendrogram analysis, the populations of Ekbatan, Ghazi Khan, Asadabad, Koohani and Gammasiab were in group A and Avarzaman population was in group B.

Conclusion: In this study, the highest amount of essential oil content was obtained from populations which

1- Assistant Professor of Horticultural Sciences and Engineering Department, University of Nahavand

(*- Corresponding Author Email: mhtb.salehi@gmail.com)

2- Assistant Professor, Natural Resources Research Division, Hamedan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education Organization (AREEO), Hamedan, Iran

were collected from areas with the lowest elevation above the sea level. The soil of these areas had more phosphorous content. Therefore, the environmental factors as well as genetic factors have contributed in creating diversity in morphological and phytochemical characteristics of this plant.

Keywords: Essential oil, Flavonoid, Phosphorous, Total phenol