تنوع بین- و درون‌گونه‌ای گونه‌های منتخب پونه‌سا (*Nepeta* spp.) از ایران بر اساس ترکیبات فنولی هدف

نجمه هادی[۱]، عبدالعلی شجاعیان[۱*]، فاطمه سفیدکن[۲]، علی‌اشرف جعفری[۲]، دنیلا میشیچ[۳]، برانیسلاو شیلر[۳]

۱- به‌ترتیب، دانش‌آموخته دکتری فیزیولوژی و اصلاح گیاهان دارویی، استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. ۲- به‌ترتیب، استاد بخش تحقیقات گیاهان دارویی و محصولات فرعی، استاد بخش تحقیقات مرتع، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، تهران، ایران. ۳- مؤسسه تحقیقات بیولوژی سینیشا استانکوویچ، دانشگاه بلگراد، بلگراد، صربستان.

[*]نویسنده مسئول: shojaeiyan@modares.ac.ir

چکیده

۲۹ توده از گونه‌های منتخب ایرانی پونه‌سا، *Nepeta kotschyi*، *N. cataria*، *N. menthoides* و *N. crassifolia*، تحت شرایط زراعی مشابه، کشت شدند. در این پژوهش، برای اولین‌بار، تجزیه کمّی ۱۰ ترکیب فنولیِ هدف با استفاده از روش UHPLC/-HESI-MS/MS در عصاره متانولی توده‌ها صورت گرفت. نتایج، کارآمدی ترکیبات فنولی در تمایز گونه‌ها و تعیین روابط درون و بین گونه‌ها را نشان داد. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) و تجزیه خوشه‌ای (CA) همدیگر را حمایت کردند و معنی‌دار بودن نتایج حاصل در گروه‌بندی مواد گیاهی را نشان دادند. گونه‌های *N. kotschyi* و *N. cataria* به‌وضوح از دو گونه دیگر جدا شدند. همچنین، گونه *N. cataria* از گونه *N. kotschyi*، متمایز شد. با توجه به دندروگرام حاصل از CA و در ضریب فاصله ۰/۱۰، به‌ترتیب، هشت، دو و سه گروه ژنوتیپی در توده‌های *N. kotschyi*، *N. cataria* و *N. menthoides* تشخیص داده شد.

کلمات کلیدی: پونه‌سا (*Nepeta* spp.)، تیره نعنا، ترکیبات فنولی، تنوع بین‌گونه‌ای، تنوع درون‌گونه‌ای

مقدمه

پونه‌سا (*Nepeta*)، یکی از بزرگ‌ترین جنس‌های تیره نعنا، و ایران از خواستگاه‌های اصلی آن است (Pojarkova, 1954). نپتالاکتون‌ها، فلاونوئیدها (Formisano *et al*., 2011) و اسیدهای فنولیک (Mišić *et al*., 2015) به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه اصلی گونه‌های پونه‌سا و عامل اصلی ارزش دارویی و فعالیت‌های بیولوژیک آن‌ها گزارش شده‌اند. جم‌زاد و همکاران (۲۰۰۳b) فلاونوئیدهای سطحی برگ تعدادی از گونه‌های پونه‌سا و برخی جنس‌های خویشاوند، و ارزیابی مفید بودن آن‌ها در تعیین روابط فیلوژنتیک در سطوح گونه و جنس را مطالعه کرده‌اند. همچنین، میشیچ و همکاران (۲۰۱۵) به بررسی هم‌زمان ترکیبات فنولی و نپتالاکتون‌ها در تعدادی از گونه‌های پونه‌سا پرداخته‌اند. در پژوهش حاضر، برای اولین بار، تنوع بین- و درون‌گونه‌ای ۲۹ توده از چهار گونه ایرانی پونه‌سا، بر اساس کمیت و حضور ترکیبات فنولیِ هدف مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بذور ژرم‌پلاسم مورد مطالعه (جدول ۲) از بانک ژن مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه گردید و به‌منظور حذف اثر محیط در ارزیابی‌ها، در شرایط زراعی مشابه کشت شد. عصاره متانولی (متانول ۹۹/۸ درصد) مواد گیاهی (پیکره گیاه در مرحله ۷۰ درصد گل‌دهی، خشک شده در سایه) به روش میشیچ و همکاران (۲۰۱۵) تهیه گردید. "کروماتوگرافی مایع با کارایی بسیار بالا"مدل Dionex Ultimate 3000 متصل به طیف‌سنج جرمی مدل TSQ Quantum Access Max triple-quadrupole مجهز به منبع یونیزاسیون (HESI)، برای جداسازی، تعیین و اندازه‌گیری کمّی اجزای ترکیبات فنولی مورد استفاده قرار گرفت (Mišić *et al*., 2015). آنالیزها در سه تکرار انجام شدند. به‌منظور تعیین نقش هر یک از ترکیبات فنولی در ایجاد تنوع بین- و درون‌گونه‌ای، از روش تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) استفاده شد. تجزیه خوشه‌ای (CA) برای میانگین محتوی هر یک از ترکیبات فنولی برای هر توده بر اساس ماتریس فاصله گوور و با استفاده از الگوریتم UPGMA انجام گرفت.

نتایج و بحث

اطلاعات UHPLC/-HESI-MS و UHPLC/-HESI-MS/MS برای ترکیبات فنولی هدف اندازه‌گیری شده در گونه‌های مورد مطالعه در پژوهش حاضر در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج بررسی حضور و مقدار ترکیبات فنولی هدف در مواد گیاهی مورد مطالعه، در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۱. اطلاعات UHPLC/-HESI-MS و UHPLC/-HESI-MS/MS برای ترکیبات فنولی هدف اندازه‌گیری شده در چهار گونه پونه‌سا

ترکیبات فنولی (اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدها)		-HESI-MS		
شماره پیک		زمان بازداری	[M-H]- [m/z]	دو قطعه طیف جرمی [m/z (شدت نسبی به درصد)]
۱	5-*O*-Caffeoylquinic acid (Chlorogenic	۲/۳۲	۳۵۳	**۱۹۱** (۱۰۰)، ۱۷۳ (<۵)، ۱۶۱ (<۵)، **۱۲۷** (<۵)
۲	Caffeic acid^{S,R}	۲/۵۷	۱۷۹	**۱۳۵** (۶۵)، **۱۳٤** (۱۰۰)
۳	4-*O*-Caffeoylquinic acid (Chlorogenic	۲/۹۱	۳۵۳	**۱۹۱** (۱۰۰)، ۱۷۳ (<۵)، ۱۶۱ (<۵)، **۱۲۷** (<۵)
۴	Unidentified caffeic acid derivative^{R}	۳/۵۹	۳۵۹	۱۹۷ (۵)، ۱۷۹ (<۵)، ۱۶۱ (<۵)، ۱۵۳ (۱۵)، ۱۳۵ (۱۰۰)، ۱۲۱ (۵)، ۱۰۹ (<۵)
۵	Rutin^{S,R}	۳/۹۲	۳۵۹	**۳۰۰** (۱۰۰)، ۲۷۱ (۵)، ۲۵۴ (۵)، ۱۷۸ (<۵)
۶	Rosmarinic acid^{S,R}	۴/۷۸	۳۵۹	۱۶۱ (<۵)، **۱۳۵** (۱۰۰)، **۱۲۳** (۲۵)
۷	Luteolin^{S,R}	۵/۳۹	۲۸۵	۱۹۹ (۱۵)، ۱۷۵ (۱۵)، **۱۵۱** (۱۲)، **۱۳۳** (۱۰۰)، ۱۲۱ (۵)، ۱۰۷ (۱۰)، ۸۳ (<۵)
۸	Quercetin^{S,R}	۵/۴۴	۳۰۱	۲۷۲ (۱۵)، ۲۴۲ (۱۸)، ۲۱۱ (۲۰)، **۱۷۹** (۲۳)، **۱۵۱** (۷۷)، ۱۲۱ (۱۰۰)، ۱۰۷ (۸۷)، ۸۳ (۲۰)
۹	Apigenin^{S,R}	۵/۸۴	۲۶۹	۲۲۵ (۵)، ۱۵۱ (۱۵)، **۱٤۹** (۱۲)، ۱۲۱ (۵)، **۱۱۷** (۱۰۰)، ۱۰۷ (۱۰)
۱۰	Naringenin^{S,R}	۵/۸۵	۲۷۱	۲۱۳ (۷)، ۱۸۵ (۵)، **۱۵۱** (۲۰)، **۱۱۹** (۱۰۰)، ۱۱۷ (۲۰)، ۱۰۷ (۲۰)، ۸۳ (۱۰)

طیف‌های مورد استفاده در پایش واکنش منتخب (SRM) برای اندازه‌گیری کمی ترکیبات فنولی به‌صورت پررنگ نشان داده شده‌اند.
S: تأیید شده توسط استاندارد؛ R: تأیید شده توسط رفرنس‌ها

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) و تجزیه خوشه‌ای (CA) همدیگر را حمایت کردند و معنی‌دار بودن نتایج حاصل در گروه‌بندی مواد گیاهی را نشان دادند (شکل ۱). در CA (شکل ۱، بالا)، گونه‌های *N. kotschyi* و *N. cataria* به‌وضوح از دو گونه دیگر در ضریب فاصله تقریبا ۰/۴ و حمایت بوت‌استرپ ۱۰۰ جدا شدند (شکل ۱ گروه۱ و ۲). همچنین، گونه *N. cataria* از گونه *N. kotschyi*، در ضریب فاصله تقریبا ۰/۳، متمایز شد (شکل ۱ گروه۱.ب). داخل گونه *N. kotschyi* (شکل ۱ گروه۱.الف)، توده‌ها در ضریب فاصله تقریبا ۰/۱۷ و حمایت بوت‌استرپ ۸۷ به دو بخش تفکیک شدند؛ توده‌های تفت۴، اردکان۳، تفت۵ و صدوق در یک بخش و سایر توده‌های این گونه در بخش دیگر قرار گرفتند.

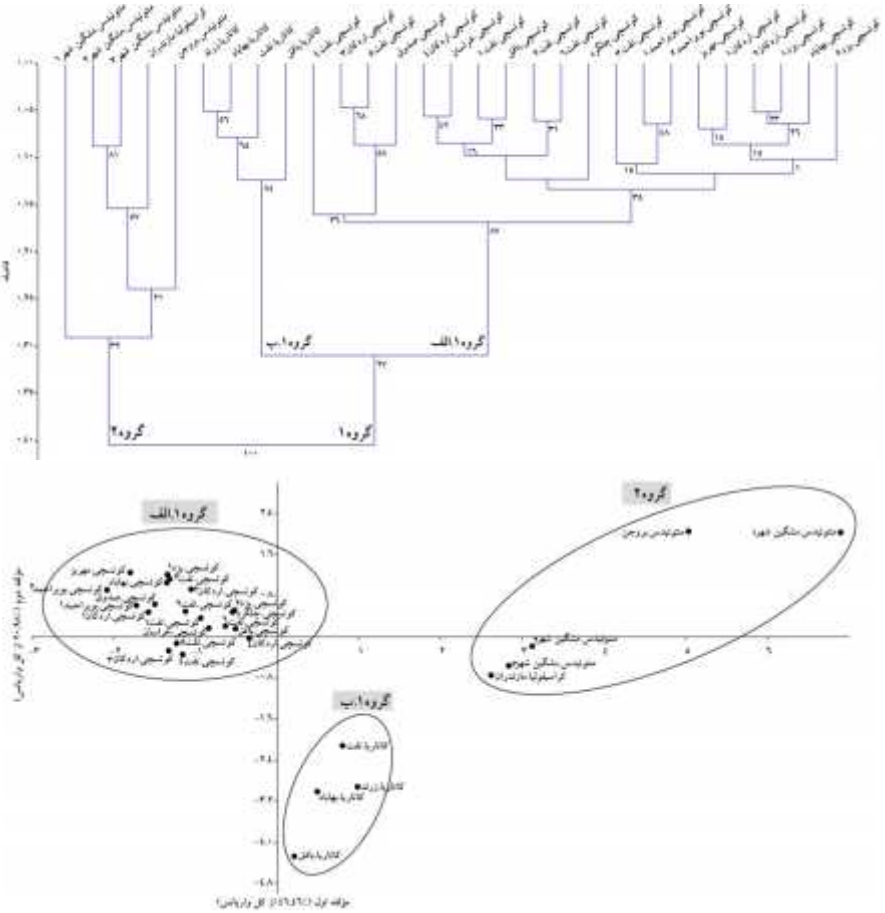
بر اساس نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر، گونه *N. crassifolia* به گونه *N. menthoides* نزدیک‌تر از گونه *N. cataria* قرار گرفت (شکل ۱)، درحالی‌که در طبقه‌بندی تاکسونومیک جنس پونه‌سا (Budantsev, 1993 به‌نقل از Jamzad *et al.*, 2003a)، *N. crassifolia* و *N. cataria* در بخش مشابه (sect. *Nepeta*) گروه‌بندی می‌شوند و گونه *N. menthoides* داخل بخش دیگری (sect. *Spicatae*) قرار می‌گیرد.

در PCA (شکل ۱، پایین) بر اساس همبستگی بین ترکیبات فنولی، سه مؤلفه اول در مجموع ۷۷/۹۱ درصد تنوع موجود بین گونه‌ها و توده‌های مورد بررسی را توجیه نمودند. پلات دو بعدی حاصل از PCA، ۶۷/۴۴ درصد از کل تنوع را در خود نشان می‌دهد (شکل ۱). مؤلفه اول (PC1)، ۴۶/۴۶ درصد از سهم تنوع را دارد و نارینجنین، مشتق ناشناخته اسید کافئیک، لوتئولین و اسید رزمارینیک، ترکیبات اصلی دخیل در سهم تنوع این مؤلفه را تشکیل می‌دهند. کوئرستین، اسیدهای کلروجنیک ۱ و ۲ و مشتق ناشناخته اسید کافئیک، عمدتا مسئول سهم تنوع مؤلفه دوم (PC2)، ۲۰/۹۸ درصد، بودند.

نتایج نشان می‌دهد که ترکیبات فنولی هدف، نه‌تنها در تمایز گونه‌ها و روابط آن‌ها موفق هستند، بلکه همچنین می‌توانند روابط توده‌ها در هر گونه را نیز نشان دهند. به‌طور مثال، توده‌های مشگین‌شهر۱ و بروجن از گونه *N. menthoides*، به‌طور واضح از دو توده دیگر این گونه در طول مؤلفه اول (PC1) جدا می‌شوند، که نشان از تفاوت پروفایل‌های متابولیک آن‌هاست. بنابراین، بر اساس نتایج به‌دست آمده، ترکیبات فنولی هدف می‌توانند به‌عنوان یک نشانگر شیمیایی علاوه‌بر دیگر نشانگرها (نشانگرهای مبتنی‌بر DNA، نشانگر اسانس و غیره) برای نشان دادن تنوع در سطح بین توده‌ها داخل گونه‌های پونه‌سا مورد استفاده قرار گیرند.

جدول ۲. تجزیه کمّی ۱۰ ترکیب فنولی هدف (میکروگرم بر گرم وزن خشک) با روش UHPLC/-HESI-MS/MS در ۲۹ توده از چهار گونه پونه‌سا

کد بانک ژن	گونه	توده	روتین	لوتئولین	کوئرستین	آپیجنین	نارینجنین	اسید کلروجنیک۱	اسید کلروجنیک۲	اسید کافئیک	مشتق ناشناخته اسید کافئیک	اسید رزمارینیک
۱۵۹۰۸	*Nepeta kotschyi* var. *persica*	اردکان۱	۱/۰	۴/۶	۰/۰	۱۶/۵	۰/۵	۱۶۴۷/۴	۱۵۹۳/۳	۲۳/۰	۱۴۰۱/۰	۷۳۵/۵
۱۵۸۵۷		اردکان۲	۱/۶	۱/۸	۰/۰	۱۲/۱	۰/۴	۱۷۹۳/۱	۱۴۷۵/۳	۱۶/۲	۱۷۰۷/۲	۱۱۳۷/۵
۱۳۰۴۰		اردکان۳	۰/۸	۳/۶	۰/۲	۳۶/۸	۱/۸	۱۴۵۲/۷	۱۳۷۴/۴	۱۸/۷	۱۵۲۵/۶	۵۶۶/۷
۱۵۸۵۲		اردکان۴	۲/۲	۳/۴	۰/۰	۴۲/۴	۱/۸	۱۰۰۷/۷	۸۶۰/۵	۱۸/۲	۱۲۱۸/۷	۶۵۰/۴
۱۵۸۵۳		تفت۱	۱/۷	۱/۰	۰/۰	۸/۶	۰/۴	۱۳۹۱/۰	۱۱۹۴/۵	۱۳/۸	۱۴۳۳/۵	۷۲۸/۲
۱۳۰۶۱		تفت۲	۱/۳	۴/۳	۰/۰	۳۹/۷	۱/۵	۲۰۰۲/۸	۹۵۰/۲	۲۴/۰	۱۴۸۴/۵	۸۶۷/۵
۱۵۸۲۷		تفت۳	۲/۴	۳/۱	۰/۰	۲۲/۰	۰/۷	۲۵۹۸/۶	۹۳۸/۰	۲۰/۰	۱۸۳۵/۴	۱۰۴۹/۶
۱۰۳۵۰		تفت۴	۱/۳	۴/۲	۰/۳	۵۸/۰	۲/۴	۱۹۳۱/۱	۸۷۴/۳	۲۸/۱	۱۶۸۵/۹	۹۹۲/۸
۲۱۰۴۸		تفت۵	۱/۱	۲/۹	۰/۳	۴۳/۹	۱/۷	۱۷۵۷/۴	۱۲۴۳/۰	۱۸/۲	۱۵۹۴/۱	۶۹۴/۷
۱۵۸۲۸		تفت۶	۱/۱	۳/۶	۰/۰	۳۶/۵	۱/۵	۱۷۵۹/۷	۶۴۶/۹	۱۹/۷	۱۳۵۴/۷	۸۲۹/۴
۱۵۸۵۰		مهریز	۱/۶	۴/۱	۰/۰	۲۱/۳	۰/۶	۲۱۳۴/۸	۱۷۷۸/۸	۱۹/۳	۱۷۲۵/۵	۸۰۴/۸
۲۱۰۲۷		صدوق	۱/۱	۳/۰	۰/۲	۴۱/۵	۱/۸	۱۷۵۲/۷	۱۹۷۷/۸	۱۲/۶	۱۶۴۲/۵	۵۵۲/۱
۲۱۰۳۵		بافق	۱/۳	۳/۵	۰/۰	۲۲/۸	۰/۸	۱۲۱۲/۹	۱۰۲۵/۶	۱۶/۰	۱۳۶۲/۷	۸۷۵/۲
۲۱۰۳۹		بهاباد	۲/۰	۳/۳	۰/۰	۲۴/۹	۱/۰	۱۹۹۰/۲	۱۶۴۴/۱	۲۳/۲	۱۷۳۷/۸	۱۲۰۶/۸
۱۸۶۹۷		یزد۱	۱/۵	۲/۲	۰/۰	۲۳/۰	۱/۱	۱۸۷۲/۴	۱۸۶۸/۱	۱۸/۹	۱۶۹۹/۱	۱۰۹۶/۴
۱۸۶۹۵		یزد۲	۰/۹	۳/۰	۰/۰	۱۵/۹	۰/۶	۱۹۰۲/۴	۱۰۳۸/۶	۱۶/۳	۱۳۱۳/۳	۱۱۷۵/۴
۲۵۷۴۰		خراسان	۱/۳	۵/۷	۰/۰	۴۰/۷	۰/۹	۱۴۰۱/۰	۸۰۱/۶	۱۸/۱	۱۴۱۳/۵	۵۳۴/۷
۲۹۵۵۶		چلگرد	۱/۷	۶/۶	۰/۰	۷۲/۵	۴/۰	۱۶۷۴/۴	۸۷۶/۲	۲۳/۹	۱۱۹۳/۹	۵۴۰/۲
۳۱۹۵۵	*N. kotschyi* var. *kotschyi*	بویراحمد۱	۰/۷	۳/۰	۰/۰	۱۹/۰	۱/۱	۱۷۵۹/۸	۱۰۷۸/۸	۱۹/۸	۱۹۳۱/۳	۵۸۴/۹
۲۹۲۳۱		بویراحمد۲	۱/۶	۳/۵	۰/۰	۲۶/۷	۱/۴	۲۲۴۸/۷	۱۲۴۲/۷	۲۴/۵	۱۸۷۴/۱	۵۹۲/۱
۱۸۳۱۷	*N. cataria*	زرند	۰/۲	۳/۷	۰/۲	۱/۹	۰/۲	۱۹/۴	۱۳/۵	۱۹/۹	۴۱۸/۷	۱۲۲۷/۶
۲۱۰۳۰		بهاباد	۰/۲	۳/۷	۰/۳	۱/۶	۰/۳	۲۱/۳	۱۶/۶	۲۰/۲	۶۱۷/۰	۹۴۳/۱
۲۱۱۳۲		بافق	۰/۱	۳/۲	۰/۵	۱/۵	۰/۳	۲۵/۴	۱۷/۶	۲۶/۱	۲۸۷/۵	۸۹۹/۶
۲۱۰۹۴		تفت	۰/۲	۶/۶	۰/۰	۲/۱	۰/۳	۲۳/۵	۱۶/۰	۲۰/۸	۴۲۴/۷	۹۶۶/۷
۳۱۳۳	*N. crassifolia*	مازندران	۳/۷	۴/۴	۰/۰	۱۸/۴	۹/۸	۴۳۹/۲	۱۶۴/۰	۱۵/۵	۱۰۶/۸	۱۱۴۸/۱
۱۳۳۰۸	*N. menthoides*	مشگین‌شهر۱	۱/۴	۷۰/۷	۰/۰	۲۷۳/۹	۱۳/۴	۴۲۸/۶	۱۴۷/۷	۱۲/۳	۲۱۸/۰	۱۵۵۳/۴
۱۳۳۰۶		مشگین‌شهر۲	۵/۶	۲۴/۷	۰/۰	۳۲/۲	۴/۲	۵۴۲/۴	۱۶۷/۴	۱۰/۴	۴۱۵/۹	۱۴۳۳/۶
۱۳۳۰۱		مشگین‌شهر۳	۲/۵	۲۲/۴	۰/۰	۴۸/۴	۲/۵	۴۳۱/۷	۱۵۱/۲	۷/۹	۲۰۸/۶	۱۲۱۲/۵
۹۸۷۹		بروجن	۲۱/۱	۱۳/۹	۰/۰	۱۴۲/۸	۱۱/۰	۶۸۱/۳	۲۰۵/۵	۱۰/۹	۶۱۸/۲	۱۴۴۷/۵



شکل ۱. (بالا) تجزیه خوشه‌ای و روابط بین چهار گونه پونه‌سا (*Nepeta kotschyi*، *N. cataria*، *N. menthoides* و *N. crassifolia*) و توده‌های داخل هر گونه براساس ترکیبات فنولی (با استفاده از ضریب فاصله گوور، ضریب کوفنتیک = ۰/۸۷)، (پایین) بای‌پلات تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و پراکنش چهار گونه پونه‌سا و توده‌های داخل گونه‌ها بر اساس ترکیبات فنولی

منابع

1. Formisano, C., Rigano, D. and Senatore, F. 2011. Chemical constituents and biological activities of *Nepeta* species. Chemistry & Biodiversity, 8: 1783-1818.
2. Jamzad, Z., Chase, M.W., Ingrouille, M., Simmonds, M.S.J. and Jalili, A. 2003a. Phylogenetic relationships in *Nepeta* L. (Lamiaceae) and related genera based on ITS sequence data. Taxon, 52: 21-32.
3. Jamzad, Z., Grayer, R.J., Kite, G.C., Simmonds, M.S.J., Ingrouille, M. and Jalili, A. 2003b. Leaf surface flavonoids in Iranian species of *Nepeta* (Lamiaceae) and some related genera. Biochemical Systematics and Ecology, 31: 587-600.
4. Mišić, D., Šiler, B., Gašić, U., Avramov, S., Živković, S., Nestorović Živković, J., Milutinović, M. and Tešić, Ž. 2015. Simultaneous UHPLC/DAD/±HESI-MS/MS analysis of phenolic acids and nepetalactones in methanol extracts of *Nepeta* species: a possible application in chemotaxonomic studies. Phytochemical Analysis, 26: 72-85.
5. Pojarkova, A.I. 1954. *Nepeta*. In: Flora of the USSR. Academy of Science of the U.S.S.R., Moskva-Leningrad, Vol.20, 191-292.

Inter- and intra-species diversity of selected *Nepeta* species from Iran based on targeted phenolic compounds

N. Hadi[1], A. Shojaeiyan[1*], F. Sefidkon[2], A.-Ashraf Jafari[2], D. Mišić[3], B. Šiler[3]

1-Respectively, PhD in Physiology and Breeding of Medicinal Plants, Assistant Professor of Dep. of Horticultural Science, Tarbiat Modares University (TMU), Tehran, Iran. 2- Respectively, Professor of Medicinal plants and By-products Research Division, Professor of Rangelands Research Division, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran. 3- Respectively, Senior Research Associate, Research Associate, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", University of Belgrade, Belgrade, Serbia.

*Corresponding author: shojaeiyan@modares.ac.ir

Abstract

29 accessions of selected Iranian *Nepeta* species, *N. kotschyi*, *N. cataria*, *N. menthoides* and *N. crassifolia*, were planted under the same field conditions. In this research, for the first time, quantitative analysis of 10 targeted phenolic compounds was performed using UHPLC/-HESI-MS/MS method in methanol extract of accessions. The results showed that phenolic compounds are capable in differentiating species and also showing inter- and intra-species relationships. Principal Component Analysis (PCA) and Cluster Analysis (CA) supported each other and showed the significance of obtained results in grouping of plant materials. *N. kotschyi* and *N. cataria* were clearly separated from other two species. Also, *N. cataria* was differentiated from *N. kotschyi*. Considering dendrogram obtained from CA and in distance coefficient of 0.10, eight, two and three genotypic groups was distinguished in accessions of *N. kotschyi*, *N. cataria* and *N. menthoides*, respectively.

Key words: *Nepeta spp.*, Lamiaceae, Phenolic compounds, Inter-species diversity, Intra-species diversity